



HAL
open science

Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal humain : mise en évidence d'espèces bactériennes et de gènes impliqués dans la fonction

Ruben Halifa

► To cite this version:

Ruben Halifa. Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal humain : mise en évidence d'espèces bactériennes et de gènes impliqués dans la fonction. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC025 . tel-04213492

HAL Id: tel-04213492

<https://theses.hal.science/tel-04213492>

Submitted on 21 Sep 2023

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

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

THÈSE

N° d'ordre :

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

Spécialité : Microbiologie

Soutenue le 29 avril 2021 par

RUBEN HALIFA

Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote
intestinal humain : mise en évidence d'espèces
bactériennes et de gènes impliqués dans la fonction

Jean-Marc Chatel	Directeur de recherche, INRAE Jouy-en-Josas	Président du jury
Marie-Paule Gonthier	Professeure, Université de la Réunion	Rapportrice
Augustin Scalbert	Directeur de recherche, IARC Lyon	Rapporteur
Catherine Renard	Directeur de recherche, INRAE Nantes	Examinatrice
Eric Peyretailade	Maître de conférences, Université Clermont-Auvergne	Examinateur
Pascale Mosoni	Chargée de recherche hors classe, INRAE Theix	Directrice de thèse
Michel Dubourdeaux	Directeur R&D, HerbalT	Invité
Carine Le Bourvellec	Chargée de recherche, INRAE Avignon	Invitée

Unité Microbiologie Environnement Digestif et Santé, UMR454, UCA,

INRAE Clermont-Ferrand/Theix

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier grandement Pascale Mosoni, ma directrice de thèse qui m'a donné l'opportunité de porter ce sujet. Je te remercie pour ta disponibilité et les longues discussions que nous avons pu avoir tout au long de ces trois années de thèse et du soutien que tu m'as procuré lors de la rédaction de ce manuscrit. Tu as fait tout ton possible pour m'encourager à aller au bout des choses.

Merci ensuite à Carine Le Bourvellec, ma co-encadrante d'Avignon. En travaillant avec toi j'ai pu découvrir tout un monde de biochimie qui m'était inconnu. Je te remercie de m'avoir accueilli à Avignon, de ton soutien et tes conseils lors de la rédaction de ce manuscrit. Je me souviendrai toujours de mon arrivé à Avignon sous les rafales de Mistral !

Merci à toi Pierre Peyret qui ma co-encadré et suivi pendant ma thèse, pour les discussions dans le couloir et ton soutien lors de la rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci à Agnès Cornu avec qui j'ai collaboré pour l'utilisation de l'HPLC-DAD. Je te remercie pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir, de m'avoir emmené courir avec toi et fait découvrir les environs de Theix.

Je voudrais également remercier Michel Dubourdeaux et HerbalT d'avoir financé ce projet et pour les nombreux conseils donnés lors des différents comités de suivi de thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, Jean-Marc Chatel, Marie-Paule Gonthier et Augustin Scalbert pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail ; Catherine Renard et Eric Peyretailade pour leur participation en tant qu'examineurs.

Je remercie Claudine Manach et Denis Le Paslier pour avoir fait partie de mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos conseils scientifiques qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie la région auvergnate de m'avoir accueillie dans ses montagnes, ses prairies, ses fromages et ses écureuils. Les nuits passées au Rimbaud, Still, Delirium et Baraka resteront dans ma mémoire comme des moments hors du temps, hors de la thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des personnes au sein de l'unité MEDIS, avec qui j'ai pu discuter, apprendre et rigoler. De façon notoire, Yacine, Julien et Marion. Greg, je t'ai souvent embêté au Facs. Mickael et nos longues conversations. Alexandra, un vrai plaisir de te voir tous les matins dans le bus et au labo. Nelly, une vraie joie au labo, c'était un grand plaisir de venir te voir et t'embêter lors de tes manips. Stéphanie, au grand sourire, toujours à taquiner, merci pour tout ! Fred, Annick,

Evelyne, vous aviez toujours un grand sourire, j'espère que je ne vous ai pas fait trop rire ! Je tiens à vous dire que j'ai toujours apprécié nos conversations. Merci à toi Laurie pour les différentes conversations que nous avons pu avoir, les conseils et le soutien lors de l'écriture, mais également les échanges pendant les championnats de biathlon. Michel, à mon plus grand regret, je n'ai pas su triompher de toi au badminton. Je te remercie pour tout quand même.

Je n'ai pas eu beaucoup l'opportunité de passer, mais c'était toujours avec un grand sourire (petit clin d'oeil à Claude, toujours souriant) que j'étais accueilli au CBRV ! Donc je remercie l'ensemble de l'unité MEDIS du côté UCA.

Je remercie grandement l'ADAS du centre de Theix pour m'avoir permis de passer du temps au sport, à pouvoir me décontracter et oublier la thèse pendant l'heure de midi. David (aka Crousti), Michel et Mathieu, merci d'avoir organisé le handball, le badminton et le basket-ball. Je remercie l'ensemble des personnes avec qui j'ai passé ces heures, dans la bonne humeur et la rigolade. Entre autres, Laurent, Claire, Yoan, Yohan, Fabien, Sylvain, Bernard, Cyril, Xavier, Henri, Daniel, Saïd et Dominique.

Je remercie également l'ensemble des personnes de l'unité SQPOV qui m'ont accueilli à Avignon et qui m'ont rapidement intégré comme l'un des leurs. Spécialement je voudrai remercier Romain mon binôme de bureau, qui m'a fait redécouvrir le foot. Thibault voisin d'HPLC, toujours à blaguer. Bea, attachante. Les personnes avec qui j'ai pu courir (Christian, Patrice, Aurélie, Lea) et découvrir les paysages d'Avignon. Les nombreux thésards (Boris, Clara, Xuwei, Armand). Je tiens particulièrement à remercier Claire et Christian pour leurs aides sur les analyses LC-MS.

La bande, Thomas, Roxane, Damien, Mélusine, Alexandra et Pierre, je vous remercie de m'avoir fait changer les idées pendant les deux dernières années de thèse. Par vos chamailleries, histoires et bêtises, votre testostérone (Pierro spécialement). Je ne me suis jamais ennuyé aux soirées. Pierre, tu as et tu es toujours une personne vraiment cool à apprendre à connaître. Mélusine, ton rire est enchanteur, tout comme ta voix est mélodieuse. Damien, tu es d'une grande connaissance et aller à l'escalade avec toi était un grand bonheur, tu es une grande source de motivation. Alexandra, tu es une personne au grand cœur, avec qui ça a été un grand bonheur de discuter. Thomas, Roxane, vous étiez sympa.

Notre rencontre a été comique Bastien mais tu as réussi à tenir le coup, un grand bonheur ces soirées avec toi.

Pauline, Moïse, Charles et tant d'autres personnes rencontrées à l'INRAE, je vous remercie énormément pour les moments passés ensemble. Merci Angéline pour les sorties piscine ! Elena, tu

m'as donné goût à la pâtisserie. Je te remercie pour les nombreuses discussions en tout genre en rentrant le soir, ta joie et ta bonne humeur !

Eglantine, tu as été un rayon de soleil à l'INRAE avec qui j'ai beaucoup discuté, couru et combattu sur les terrains de bad ! Je porte de temps en temps ton petit bonnet tricoté. Les moments de rigolades ont été des échappatoires à la thèse, je te remercie.

Alessandra et Hélène, je vous remercie pour les moments passés pendant ces trois années de thèse, à Theix comme à l'extérieur. Hélène, dommage que tu n'aies pas pu rester plus longtemps avec nous, ton sourire des îles rayonnait, Grenoble en est chanceux. Alessandra, aux gestes de la main virevoltant. Tu es une des personnes les plus attachante et marquante que je connaisse, ta gentillesse est aussi grande que ta crinière. Ton grand cœur m'a illuminé pendant nos nombreuses soirées. Je te remercie pour tout !

Philippe, tu es la première personne avec qui j'ai noué une amitié à Clermont. Premier avec qui j'ai bu des pintes en ces lieux. Tu occupes une place particulière dans la réussite de ma thèse, les moments passés au still et les sorties de VTT. Je te remercie énormément ! Surtout pour l'ensemble des analyses bio informatiques qu'on a pu tester.

Roxane, tu fais partie des personnes rencontrées sur Clermont qui m'a le plus marqué. J'ai partagé tant de bons moments avec toi. Nos soirées autour d'un verre (ou plusieurs) et nos soirées dansantes font définitivement parties de mes plus beaux souvenirs pendant ma thèse. Tant de moments indescriptibles, qu'un grand merci ne suffirait pas.

Thomas, te remercier est une problématique à elle seule. Je ne sais pas par où commencer. Nous avons passé tellement de temps ensemble, que ces deux à trois années de thèse auraient été bien différentes si je ne t'avais pas connu. Tu m'as fait découvrir cette région, ses montagnes et ses lacs. Toujours là si j'en avais besoin, pour faire une randonnée, discuter ou des jeux de société. Tu fais partie des personnes qui font que j'en suis là aujourd'hui. Ces quelques mots ne décrivent pas l'ensemble des remerciements que je te dois.

Simon, depuis que je te connais, tu es un de mes meilleurs amis, un confident dans mes moments de doutes, une personne que je respecte énormément. Le Saint-Nectaire et toi ne faites qu'un. Et ma thèse et moi ne serions pas là sans toi.

D'autres personnes que je voudrais remercier, Romain, Fred, Mamady, Leo, mes amis d'enfance qui ont toujours su croire en moi. Nous venons de loin, mais avons fait notre bout de chemin depuis. Pauline, on s'est chamaillé, mais tu es quelqu'un que j'apprécie énormément, au grand cœur et pleine de force, je te remercie pour tout.

Juliette, mon amour, te remercier n'est et ne sera jamais assez.

Résumé

Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal humain : mise en évidence d'espèces bactériennes et de gènes impliqués dans la fonction.

Les flavan-3-ols font partie des polyphénols les plus consommés par l'Homme et sont présents sous la forme de monomères et d'oligomères tels que les procyanidines. La majorité des flavan-3-ols transite vers le côlon où réside le microbiote intestinal. Alors que les voies métaboliques de dégradation des flavan-3-ols par le microbiote sont relativement bien décrites, les microorganismes et les gènes microbiens impliqués dans ces voies sont très peu connus. L'objectif de la thèse était donc d'identifier les microorganismes et les gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols et en particulier des procyanidines. A partir de selles humaines de trois individus sains, des approches de culturomique combinées à un criblage de l'activité métabolique des isolats bactériens par HPLC-DAD ont permis d'obtenir quatre souches de l'espèce *Eggerthella lenta* et une souche de l'espèce *Flavonifractor plautii* capables de dégrader la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine. L'activité de ces souches a ensuite été testée sur les procyanidines de type B (DP2 à 4) et A (DP2) et les métabolites générés ont été caractérisés par LC-ESI-MS/MS. Nous avons ainsi montré pour la première fois que *E. lenta* est capable de dégrader les procyanidines. La réaction catalysée par *E. lenta*, validée sur les dimères, correspond à l'ouverture du cycle C de l'unité terminale. Par une approche transcriptomique (RNAseq) réalisée chez *E. lenta*, couplée à l'expression hétérologue des gènes d'intérêt chez *Escherichia coli*, nous avons mis en évidence deux gènes (*fmber1*, *fmber2*) codant deux benzyl ether reductases impliquées dans l'ouverture du cycle C des monomères et un opéron de deux gènes (*pber*) catalysant cette réaction sur les dimères de procyanidines de type B. Enfin, deux opérons de trois gènes (*cadh*, *ecadh*) codant deux complexes enzymatiques impliqués dans la déshydroxylation du cycle B de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine ont aussi été identifiés. En conclusion, les espèces *E. lenta* et *F. plautii*, ainsi que les gènes identifiés dans cette étude, constitueront à l'avenir de bons marqueurs du métabolisme microbien des flavan-3-ols chez l'Homme. Ceci permettra à terme de mieux appréhender les effets de la consommation des flavan-3-ols chez les individus en bonne santé ou à risque de maladies chroniques.

Mots-clés : Métabolisme microbien des flavan-3-ols, *Eggerthella lenta*, *Flavonifractor plautii*

Abstract

Metabolism of flavan-3-ols by the human gut microbiota: unraveling of bacterial species and genes involved

Flavan-3-ols are among the most consumed polyphenols by humans and are present as monomers and oligomers such as procyanidins. The majority of flavan-3-ols reach the colon where the intestinal microbiota resides. While the metabolic pathways for the degradation of flavan-3-ols by the microbiota are relatively well described, only a few microorganisms and microbial genes involved in these pathways are known. The objective of the thesis was therefore to identify the microorganisms and genes involved in the degradation of flavan-3-ols and in particular procyanidins. From human stools of three healthy individuals, culturomic approaches combined with screening for the metabolic activity of bacterial isolates by HPLC-DAD allowed us to obtain four strains of the species *Eggerthella lenta* and one strain of the species *Flavonifractor plautii* degrading (+)-catechin and (-)-epicatechin. The activity of these strains was then tested on B-type (DP2 to 4) and A-type (DP2) procyanidins and the metabolites generated were characterized by LC-ESI-MS / MS. We have thus shown for the first time that *E. lenta* degrades procyanidins. The reaction catalyzed by *E. lenta* on dimers (B-type and A-type), corresponds to the opening of the C-ring of the terminal unit. By a transcriptomic approach (RNAseq) carried out in *E. lenta*, coupled with the heterologous expression of the genes of interest in *Escherichia coli*, we have discovered two genes (*fmber1*, *fmber2*) encoding two benzyl ether reductases involved in the opening of the C-ring of the monomers and an operon of two genes (*pber*) catalyzing this reaction on the dimers of type-B procyanidins. Finally, two operons of three genes (*cadh*, *ecadh*) encoding two enzymatic complexes involved in the dehydroxylation of the B-ring of (+)-catechin and (-)-epicatechin have also been identified. In conclusion, the species *E. lenta* and *F. plautii*, as well as the genes identified in this study, will constitute good markers of the microbial metabolism of flavan-3-ols in humans in the future. This will ultimately allow a better understanding of the effects of the consumption of flavan-3-ols in individuals in good health or at risk of chronic diseases.

Keywords: Microbial metabolism of flavan-3-ols, *Eggerthella lenta*, *Flavonifractor plautii*

Table des matières

Remerciements	I
Résumé.....	IV
Abstract	IV
Table des matières	1
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	6
Liste des annexes	7
Liste des Abréviations, sigles et acronymes	8
Introduction	9
Etude bibliographique	11
1. Chapitre 1 : Flavan-3-ols, sous classe majeure de polyphénols : de l'aliment à l'Homme	11
1.1. Généralités sur les polyphénols.....	11
1.2. Flavonoïdes.....	13
1.3. Flavan-3-ols	13
1.3.1. Flavan-3-ols dans les aliments	16
1.3.2. Consommation de flavan-3-ols dans la population humaine	20
1.3.3. Métabolisme « non microbien » des flavan-3-ols.....	22
1.3.3.1. Métabolisme de phase II et cycle entéro-hépatique	22
1.3.3.2. Biodisponibilité des flavan-3-ols	23
1.3.4. Effets santé des flavan-3-ols.....	25
2. Chapitre 2 : Microbiote intestinal humain et impact des flavan-3-ols sur sa composition	28
2.1. Généralités sur le microbiote du tractus gastro-intestinal humain	28
2.2. Composition du microbiote intestinal	29
2.2.1. Microbiote intestinal et évolution avec l'âge	30
2.2.2. Microbiote intestinal, entérotypes et régime alimentaire.....	31
2.2.3. Microbiote intestinal, dysbioses et pathologies	32
2.3. Fonctions métaboliques du microbiote intestinal humain	33
2.4. Impact des flavan-3-ols sur la composition du microbiote intestinal	35
3. Chapitre 3 : Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal humain	38
3.1. Dégradation des flavan-3-ols monomères par le microbiote intestinal.....	38
3.2. Voies métaboliques de dégradation des monomères de flavan-3-ols.....	40
3.2.1. Productions des dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols	40
3.2.2. Production des dérivés de phényl- γ -valérolactones et d'acides phénylvalériques.....	41
3.2.3. Production des dérivés d'acides phénylpropioniques	43
3.2.4. Production des dérivés d'acides phénylacétiques	44
3.2.5. Production des dérivés d'acides benzoïques	45
3.3. Voies métaboliques de dégradation des oligomères de flavan-3-ols	46

3.3.1.	Impact des liaisons interflavaniques et du degré de polymérisation sur la dégradation des procyanidines	46
3.3.2.	Premières étapes de la dégradation microbienne des procyanidines	47
3.3.3.	Métabolites issus de la dégradation microbienne des procyanidines	49
3.4.	Biodisponibilité et effets santé des métabolites microbiens des flavan-3-ols	51
3.5.	Notions de métabotypes et métabotypes putatifs liés au métabolisme microbien des flavan-3-ols	53
4.	Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés.....	60
4.1.	Dégradation des monomères	60
4.1.1.	Ouverture du cycle C	60
4.1.2.	Ouverture du cycle A	62
4.1.3.	Déshydroxylation du cycle B.....	63
4.1.4.	Clivage de la liaison ester liant l'acide gallique	65
4.2.	Dégradation des procyanidines	66
4.3.	Dégradation par les micro-organismes aérobies	66
4.4.	Gènes identifiés	67
	Bilan de l'étude bibliographique	72
	Questions de recherche et démarche expérimentale	74
	Matériels et méthodes	75
1.	Approches de culturomique	75
1.1.	Echantillons biologiques, souches bactériennes et conditions de culture	75
1.2.	Stratégie d'isolement de micro-organismes impliqués dans les voies métaboliques de dégradation des flavan-3-ols	75
2.	Approches biochimiques.....	77
2.1.	Produits chimiques	77
2.2.	Préparation de procyanidines de type B purifiées à partir de parenchyme de la pomme....	77
2.2.1.	Extraction	78
2.2.2.	Purification sur C18 : élimination des sucres et concentration des polyphénols.....	78
2.2.3.	Purification sur Luna HILIC : isolement des procyanidines de degré de polymérisation défini.	79
2.2.4.	Quantification et détermination du degré de polymérisation des procyanidines de type B	79
2.3.	Analyse des flavan-3-ols et de leurs métabolites microbiens à partir des surnageants de culture microbiens.....	81
2.3.1.	Analyses HPLC-DAD	81
2.3.1.1.	Préparation des échantillons	81
2.3.1.2.	Méthode d'analyse des échantillons	81
2.3.2.	Caractérisation par LC-ESI-MS/MS « Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric » des métabolites microbiens	82
3.	Approches moléculaires et bioinformatiques.....	83
3.1.	Extraction d'ADN génomique (ADNg).....	83
3.2.	Amplification et séquençage de l'ADN ribosomal 16S.....	84

3.3.	Arbres phylogénétiques.....	84
3.4.	Séquençage des génomes bactériens avec la technologie PacBio.....	85
3.5.	Assemblage et analyse des génomes bactériens.....	85
3.6.	Analyse transcriptomique chez <i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243	86
3.6.1.	Culture bactérienne et induction par les flavan-3-ols.....	86
3.6.2.	Extraction des ARN totaux.....	87
3.6.3.	Séquençage RNAseq avec la technologie Illumina.....	87
3.6.4.	Traitement des données de séquençage RNAseq.....	87
3.6.5.	Analyse de l'expression différentielle.....	88
3.6.6.	Analyse des gènes d'intérêts	90
3.7.	Expression hétérologue des gènes d'intérêts chez <i>Escherichia coli</i>	90
3.7.1.	Synthèse des gènes d'intérêt et clonage dans un vecteur d'expression.....	90
3.7.2.	Transformation chez <i>E. coli</i> TOP10	92
3.7.3.	Vérification de l'expression des protéines d'intérêt par les souches de <i>E. coli</i> recombinantes par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	92
3.7.4.	Analyse des capacités de dégradation des flavan-3-ols par les souches <i>E. coli</i> recombinantes exprimant les gènes d'intérêts	93
3.8.	Analyse de la prévalence des gènes d'intérêt chez les <i>Eggerthellaceae</i>	93
3.9.	Analyse de la prévalence des gènes d'intérêts dans les métagénomés intestinaux humains ..	94
	Résultats.....	95
1.	Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols.....	95
1.1.	Stratégie d'isolement bactérien à partir de selles humaines.....	95
1.2.	Criblage de l'activité catalytique des isolats bactériens	95
1.2.1.	Validation de la méthodologie de criblage par HPLC-DAD avec la souche de référence <i>E. lenta</i> DSM 2243	95
1.2.2.	Bilan de l'isolement de micro-organismes dégradant le monomère de (+)-catéchine	96
1.2.3.	Activité de dégradation sur le stéréoisomère (-)-épicatéchine.....	100
1.3.	Bilan de l'isolement de micro-organismes dégradant le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol.....	101
1.3.1.	Activité de dégradation sur les stéréoisomères (-)-3',4'-diOHPP-2-ol et (-)-3'-OHPP-2-ol..	105
1.4.	Dégradation des procyanidines par les souches de notre collection	106
1.4.1.	Purification des procyanidines de type B.....	106
1.4.2.	Dégradation des procyanidines	108
1.4.2.1.	Procyanidines de type B.....	108
1.4.2.2.	Procyanidines de type A	110
1.4.3.	Caractérisation des métabolites microbiens produits à partir des procyanidines	111
2.	Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches.....	117
2.1.	Séquençage génomique des isolats <i>Eggerthella lenta</i>	117
2.1.	Séquençage génomique des isolats <i>Flavonifractor plautii</i>	121
3.	Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols	124

3.1.	Transcriptome de <i>E. lenta</i> en présence de flavan-3-ols.....	124
3.1.1.	Approche transcriptomique mise en œuvre.....	124
3.1.2.	Analyse des données brutes issues du séquençage RNAseq	124
3.1.3.	Expression génique différentielle chez <i>E. lenta</i> en présence de flavan-3-ols	125
3.1.4.	Gènes du groupe A	127
3.1.5.	Gènes du groupe B	129
3.1.6.	Gènes du groupe C	133
3.2.	Expression hétérologue des gènes du groupe B chez <i>E. coli</i>	134
3.2.1.	Activité enzymatique des protéines extraites des <i>E. coli</i> recombinantes sur différents flavan-3-ols.....	136
3.3.	Rôle de l'opéron ELEN_RS01395-1400 dans l'activité de dégradation du dimère PCB-2 ...	139
3.4.	Recherche des gènes d'intérêts dans les génomes et métagénomes intestinaux humains	141
3.4.1.	Gènes du groupe A	141
3.4.2.	Gènes du groupe B	144
	Discussion et perspectives	150
	Références bibliographiques.....	162
	Annexes	180

Liste des figures

Figure 1.	Unité de base des composés phénoliques.....	11
Figure 2.	Classification des polyphénols en deux classes : flavonoïdes et non flavonoïdes, adapté de Goszcz et al. (2015).	12
Figure 3.	Squelette carboné des flavonoïdes.....	13
Figure 4.	Structures chimiques de certains monomères et oligomères (procyanidines) de flavan-3-ols.	15
Figure 5.	Nomenclature d'un oligomère.....	16
Figure 6.	Absorption, métabolisme et circulation des flavan-3-ols dans l'organisme.	23
Figure 7.	Distribution et organisation du microbiote intestinal à travers le tractus gastro-intestinal. .	29
Figure 8.	Composition du microbiote intestinal humain.	30
Figure 9.	Trois enterotypes distincts dans la population humaine.	32
Figure 10.	Principales fonctions du microbiote intestinal de l'Homme.	33
Figure 11.	Nouvelle définition d'un « prébiotique » par opposition à un « non-prébiotique » selon Gibson et al. (2017).	36
Figure 12.	Importance de l'orientation des carbones et des chaînes latérales sur le métabolisme des monomères de flavan-3-ols.....	39
Figure 13.	Premières étapes de la dégradation des monomères de flavan-3-ols par le microbiote intestinal : ouverture du cycle C et déshydroxylation du cycle B.	41
Figure 14.	Dérivés phényl-γ-valérolactones et d'acides phénylvalériques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols.	42
Figure 15.	Seconde étape de la dégradation des monomères de flavan-3-ols par le microbiote intestinal : ouverture du cycle A.	43
Figure 16.	Dérivés d'acides phénylpropioniques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols....	44
Figure 17.	Dérivés d'acides phénylacétiques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols	45
Figure 18.	Dérivés d'acides benzoïques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols	46
Figure 19.	Premières étapes de la dégradation des dimères de procyanidines de type B et A par le microbiote intestinal : Ouverture du cycle C.	48

Figure 20. Proposition de voies de dégradation du dimère B ₂ par le microbiote intestinal.....	50
Figure 21. Métabotypes associés au métabolisme microbien de l'acide ellagique et de la daidzeine.	54
Figure 22. Classification des individus en métabotypes après consommation de flavan-3-ols selon Mena et al. (2019).	56
Figure 23. Classification des individus en groupes métaboliques après consommation de flavan-3-ols selon Cortés-Martín et al. (2019).	57
Figure 24. Micro-organismes isolés impliqués dans l'ouverture du cycle C et la déshydroxylation du cycle B des monomères.....	61
Figure 25. Micro-organismes isolés impliqués dans l'ouverture du cycle A des monomères.	63
Figure 26. Dégradation de la catéchine par des micro-organismes aérobies	67
Figure 27. Implication de l'enzyme Ber dans l'ouverture des hétérocycles du Pinorésinol, adapté de Bess et al. (2020)	68
Figure 28. Implication de différents complexes enzymatiques dans la déshydroxylation de métabolites de flavan-3-ols.....	69
Figure 29. Questions de recherche de la thèse.	74
Figure 30. Schéma expérimental utilisé pour l'obtention d'isolats actifs sur la (+)-catéchine, issus de selles humaines.....	76
Figure 31. Criblage de l'activité de dégradation de la (+)-catéchine par les micro-organismes par HPLC-DAD (280 nm).....	77
Figure 32. Schéma de la réaction de thioacidolyse.	80
Figure 33. Schéma expérimental utilisé pour l'obtention des ARN totaux de la souche <i>E. lenta</i> DSM 2243 après induction par différents flavan-3-ols.	87
Figure 34. Schéma de l'approche RNAseq : des ARN totaux aux gènes différentiellement exprimés.	89
Figure 35. Schéma illustrant les régions flanquant les gènes d'intérêt pour le clonage hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>	91
Figure 36. Constructions plasmidiques réalisées dans le vecteur pBAD pour l'expression hétérologue des gènes d'intérêt chez <i>E. coli</i>	92
Figure 37. Suivi de la dégradation bactérienne de la (+)-catéchine par HPLC-DAD.	96
Figure 38. Comparaison de la dégradation de la (+)-catéchine par les isolats.....	98
Figure 39. Bilan du métabolisme de la (+)-catéchine par nos isolats <i>E. lenta</i>	100
Figure 40. Comparaison de la dégradation de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine par les isolats.	101
Figure 41. Dégradation des métabolites Ac et Aec par les isolats <i>F. plautii</i>	104
Figure 42. Bilan du métabolisme des dérivés (+)-hydroxyphényl-propan-2-ols, métabolites ouverts de la (+)-catéchine, par nos isolats <i>F. plautii</i>	105
Figure 43. Dégradation du dimère PCB-2 par les isolats.....	108
Figure 44. Dégradation du trimère PCB-3 par les isolats.	109
Figure 45. Dégradation du tétramère PCB-4 par les isolats.....	110
Figure 46. Dégradation du dimère PCA-2 par quelques isolats <i>E. lenta</i>	111
Figure 47. Hypothèse de fragmentation du métabolite PCB-2A avec une ouverture du cycle sur l'unité terminale, inspiré de Sun et Miller (2003).....	112
Figure 48. Comparaison de la fragmentation de PCA-2 et du métabolite PCA-2A avec une ouverture sur le cycle sur l'unité terminale, inspiré de Engemann et al. (2012).....	115
Figure 49. Bilan de la dégradation des dimères de procyanidines de type B et A par les <i>E. lenta</i>	115
Figure 50. Analyse du pangénome de l'ensemble des souches <i>E. lenta</i> Roary (v3.11.2).	121
Figure 51. Expression différentielle de l'ensemble des gènes de <i>E. lenta</i> DSM 2243 en présence de flavan-3-ol par rapport à la condition témoin sans flavan-3-ol.	126
Figure 52. Gènes candidats potentiellement impliqués dans la métabolisation des flavan-3-ols.	127
Figure 53. Organisation génomique et expression différentielle des gènes du groupe A en présence des flavan-3-ols.....	128
Figure 54. Couverture des lectures RNAseq sur le locus génomique des gènes Elen_RS01395 et Elen_RS01400.....	130
Figure 55. Structure chimique de la FAD (flavine adénine dinucléotide).....	131
Figure 56. Alignement multiple des séquences de la protéine BER et des protéines candidates.....	132

Figure 57. Représentation des différents domaines de la protéine BER et des protéines candidates.	133
Figure 58. Organisation génomique et expression différentielle des gènes du groupe C en présence des flavan-3-ols.....	134
Figure 59. Schéma expérimental utilisé pour l'obtention de <i>E. coli</i> recombinants exprimant les gènes du groupe B.....	135
Figure 60. Analyse SDS-PAGE des protéines cellulaires des souches recombinantes de <i>E. coli</i> avec ou sans induction par le L-arabinose.....	135
Figure 61. Dégradation des monomères de flavan-3-ols en présence des extraits protéiques obtenus à partir des <i>E. coli</i> exprimant les gènes du groupe B.....	137
Figure 62. Dégradation des monomères gallatés de flavan-3-ols en présence des extraits protéiques obtenus à partir des <i>E. coli</i> exprimant les gènes du groupe B.....	138
Figure 63. Dégradation des procyanidines de type B en présence des extraits protéiques obtenus à partir des <i>E. coli</i> exprimant les gènes du groupe B.....	139
Figure 64. Dégradation du dimère PCB-2 par différentes souches de <i>E. lenta</i> portant ou non l'opéron Elen_RS01395-RS01400.....	140
Figure 65. Prévalence des gènes de dégradation des flavan-3-ols du groupe A dans les métagénomés intestinaux humains.....	143
Figure 66. Arbre phylogénétique de quelques souches affiliées au genre <i>Eggerthella</i>	146
Figure 67. Prévalence des gènes de dégradation des flavan-3-ols du groupe B dans les métagénomés intestinaux humains.....	148
Figure 68. Bilan des espèces et gènes impliqués dans le métabolisme de la (+)-catéchine par des bactéries isolées du microbiote intestinal et décrites dans la littérature (cf. Etude bibliographique 4.1).	151

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature des dimères de procyanidines de type B et de type A en fonction de leurs unités constitutives.....	15
Tableau 2. Analyses qualitatives et quantitatives des proanthocyanidines trouvées dans les aliments.....	17
Tableau 3. Consommation en flavonoïdes et en flavan-3-ols par des adolescents européens (Etude HELENA).....	21
Tableau 4. Gradient d'élution utilisé pour la purification des polyphénols.....	78
Tableau 5. Gradient d'élution utilisé pour la purification des procyanidines.....	79
Tableau 6. Gradient d'élution utilisé pour la détermination du degré de polymérisation des procyanidines.....	81
Tableau 7. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des échantillons microbiens.....	82
Tableau 8. Gradient d'élution utilisé dans l'identification des métabolites microbiens par LC-ESI-MS/MS.....	83
Tableau 9. Souches isolées de selles humaines dégradant la (+)-catéchine.....	97
Tableau 10. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches <i>E. lenta</i> après dégradation de la (+)-catéchine.....	98
Tableau 11. Résultats de l'isolement d'isolats bactériens avec le métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol.....	102
Tableau 12. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches <i>F. plautii</i> après dégradation de la (+)-catéchine.....	104
Tableau 13. Teneur et composition des fractions de procyanidines de pommes purifiées.....	107
Tableau 14. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches <i>E. lenta</i> après dégradation du PCB-2.....	112
Tableau 15. Molécules recherchées en LC-ESI-MS/MS après thioacidolyse des échantillons PCB-2A.....	113
Tableau 16. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches <i>E. lenta</i> après dégradation du PCB-3.....	114

Tableau 17. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches <i>E. lenta</i> après dégradation du PCA-2.	114
Tableau 18. Caractéristiques génomiques des isolats <i>E. lenta</i> après séquençage PacBio.	118
Tableau 19. Comparaison des valeurs ANI entre les isolats <i>Eggerthella lenta</i>	119
Tableau 20. Caractéristiques génomiques des isolats <i>F. plautii</i> après séquençage PacBio.	122
Tableau 21. Alignement des séquences (= lectures) RNAseq sur les régions codantes du génome <i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243.	125
Tableau 22. Gènes du groupe A induits en présence des flavan-3-ols.	127
Tableau 23. Pourcentages d'identités protéiques du groupe A.	129
Tableau 24. Induction des gènes du groupe B par les flavan-3-ols.	130
Tableau 25. Pourcentage d'identité entre la protéine BER et les protéines candidates (groupe B) obtenu avec blastP.	132
Tableau 26. Gènes du groupe C induits en présence des flavan-3-ols.	133
Tableau 27. Prévalence et conservation des gènes du groupe A à travers les souches de l'espèce bactérienne <i>E. lenta</i>	141
Tableau 28. Prévalence et conservation des gènes du groupe B à travers les <i>Eggerthellaceae</i>	144
Tableau 29. Prévalence et conservation des gènes du groupe B à travers les souches, espèces et genre bactériens de la famille des <i>Eggerthellaceae</i>	147
Tableau 30. Bilan des gènes impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols.	155

Liste des annexes

Figure A1. Spectres de masse en mode négatif de la (+)-catéchine.	180
Figure A2. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Ac.	180
Figure A3. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Bc.	180
Figure A4. Spectres d'absorbance des métabolites A et B.	181
Figure A5. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Cc.	182
Figure A6. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Dc.	182
Figure A7. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Ec.	182
Figure A8. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Fc.	183
Figure A9. Spectres d'absorbance des métabolites C et D.	183
Figure A10. Comparaison des spectres de masse en mode négatif de PCB-2 et de son métabolite PCB-2A.	184
Figure A11. Comparaison des spectres de masse en mode négatif de PCB-3 et de son métabolite PCB-3A.	184
Figure A12. Comparaison des spectres de masse en mode négatif de PCA-2 et de son métabolite PCA-2A.	185
Figure A13. Gel d'agarose après amplification par ERIC-PCR sur les 20 souches <i>E. lenta</i> isolées.	185
Tableau A1. Tampon anaérobie utilisé pour l'isolement.	186
Tableau A2. Milieu de culture anaérobies pour isolement et souches pures.	186
Tableau A3. Milieu de culture aérobie pour <i>Escherichia coli</i>	186
Tableau A4. Gènes de <i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243 surexprimés en présence de (+)-catéchine.	187
Tableau A5. Gènes de <i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243 surexprimés en présence de (-)-épicatéchine.	188
Tableau A6. Gènes de <i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243 surexprimés en présence du PCB-2.	189
Tableau A7. <i>Eggerthellaceae</i> utilisées pour les analyses de génomes.	190

Liste des Abréviations, sigles et acronymes

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNg : ADN génomique
ADNr : ADN ribosomal
AGCC : Acides gras à chaîne courte
ANI : Average Nucleotide Identity
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomal
ARNt : ARN de transfert
CDS : Coding DNA Sequence
DP : Degré de polymérisation
DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments
EPIC : European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ESI : electrospray
FC : Fold Change
FDR : False Discovery Rate
FPKM : Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads
GC % : Pourcentage de GC
HELENA : Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence
HPLC-DAD : High Pressure Liquid Chromatography - Diode Array Detector
IMC : Indice de masse corporel
Kb : Kilobase
LC-ESI-MS/MS : Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric
MCR20 : Milieu complet à 20 % de jus de rumen
mM : Micromolaire
MS : Masse sèche
pb : paire de bases
PBS : Tampon phosphate salin
PCA : Procyanidines de type A
PCB : Procyanidines de type B
PCR : Polymerase chain reaction
NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey
RT : Température ambiante
TAT : Twin Arginine Translocation
Rpm : Rotations par minute
3',4'-diOHPP-2-ol : 1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol
3'-OHPP-2-ol : 1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol
3',4',5'-triOHPP-2-ol : 1-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol
3',5'-diOHPP-2-ol : 1-(3',5'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol
3',4',5'-triOHVal : 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-γ-valérolactone
3',4',5'-triOHPVA : acide 4-hydroxy-5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)valérique
3',4'-diOHVal : 5-(3',4'-dihydroxyphényl)-γ-valérolactone
3',4'-diOHPVA : Acide 4-hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphényl)valérique
3'-OHVal : 5-(3'-hydroxyphényl)-γ-valérolactone
3'-OHPVA : Acide 4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl)valérique
3',4'-diOHPPA : Acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique
3',4'-diOHPAA : Acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique
3'-OHPPA : Acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique
3'-OHPAA : Acide 2-(3'-hydroxyphényl) acétique

Introduction

Aujourd'hui, il existe de nombreuses preuves épidémiologiques et cliniques des bienfaits d'une consommation élevée de fruits et légumes pour la santé cardiovasculaire et métabolique. Vu l'augmentation spectaculaire au cours des trois dernières décennies du nombre de personnes en surpoids et obèses dans l'Union Européenne (UE), on peut encore s'attendre, dans les années à venir, à une augmentation très significative du nombre d'individus atteints de maladies cardiovasculaires ou métaboliques. C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé préconise une consommation élevée de fruits et légumes, une recommandation relayée au niveau de l'UE par un grand nombre de programmes de politiques de santé publique qui préconisent de consommer au moins 400 grammes par jour de fruits et légumes, ce qui correspond à au moins cinq fruits et légumes.

Les fruits et légumes présentent plusieurs intérêts, faible densité énergétique, apport de fibres, minéraux et vitamines, mais ils sont aussi sources d'une grande variété de composés bioactifs appelés phytomicronutriments. Parmi ces phytomicronutriments, les polyphénols sont de loin les plus abondants et les plus consommés. L'apport moyen en polyphénols alimentaires est d'environ un gramme par jour et la contribution des flavonoïdes (classe chimique de polyphénols) est estimée à plus de 40 % de ces apports journaliers (Pérez-Jiménez et al. 2011). Les flavonoïdes sont les composés pour lesquels les effets santé ont été le plus exploré. Il a ainsi été montré qu'ils ont un large spectre d'activités biologiques, parmi lesquelles des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-angiogéniques, anti-prolifératives ou pseudo-oestrogéniques (Del Rio et al. 2013). Malgré les doses ingérées relativement élevées, les taux circulants (plasmatiques) de polyphénols dans notre organisme sont extrêmement faibles (concentrations de l'ordre du micromolaire). Ceci est principalement dû au fait que les formes estérifiées, glycosylées ou polymérisées des polyphénols telles que trouvées dans l'aliment ne sont que très peu absorbées (Morand et Milenkovic 2014). Ainsi, les polyphénols transitent dans le tube digestif et se retrouvent au contact du microbiote intestinal. Des études métabolomiques réalisées pour une grande part *in vitro* ont montré que le microbiote intestinal est capable de métaboliser les polyphénols en une grande variété de métabolites microbiens (Stalmach et al. 2013). On sait également par des études *in vivo* que certains métabolites sont absorbés (détectés dans le plasma et/ou l'urine) et peuvent dans certains cas exercer une activité biologique supérieure à celle des molécules parentes (Morand et Milenkovic 2014).

Malgré les nombreuses études visant à comprendre les effets et les modes d'actions des polyphénols dans la prévention de diverses pathologies, les études sur le rôle du microbiote intestinal dans ces effets sont extrêmement limitées. Lors d'une étude réalisée au laboratoire (UMR MEDIS) en collaboration avec deux laboratoires INRAE (UMRs SQPOV et MICALIS) (Le Bourvellec et al. 2019), il a

été montré que les polyphénols de pomme, très riches en flavonoïdes et plus particulièrement en flavan-3-ols monomères et polymères (procyanidines), sont dégradés par le microbiote fécal de sujets sains et génèrent une large gamme de catabolites phénoliques plus ou moins complexes. Cette étude a également montré que les eaux fécales générées par ces fermentations présentent une activité anti-inflammatoire *in vitro*. Alors que l'effet anti-oxydant des polyphénols est très documenté, leur effet anti-inflammatoire est nettement moins étudié (Chuang et McIntosh, 2011; Neyrinck et al., 2013). Par ailleurs lors de ces travaux, il n'a pas été possible d'identifier par des approches de métabarcoding 16S des candidats bactériens potentiellement impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols et plus particulièrement des procyanidines.

Dans ce contexte, il semble aujourd'hui indispensable d'étudier le métabolisme des polyphénols par le microbiote intestinal humain et d'identifier les micro-organismes et les gènes microbiens impliqués dans ces réseaux métaboliques, ainsi que les métabolites phénoliques générés par ces micro-organismes. Compte tenu des résultats obtenus, nous avons choisi de continuer à cibler les flavan-3-ols, classe de flavonoïdes largement répandue dans les fruits et boissons dérivées, ainsi que le chocolat, le thé, le café et le vin rouge.

Le mémoire de thèse est structuré de manière traditionnelle avec une étude bibliographique qui fait le bilan des connaissances sur le métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal. Les objectifs de la thèse sont ensuite posés sous la forme de questions de recherche. La partie Matériel et Méthodes décrit de manière exhaustive toutes les approches microbiologiques, biochimiques, moléculaires et bioinformatiques utilisées pour répondre aux questions posées. Les résultats sont ensuite découpés en trois chapitres. Le premier chapitre décrit l'obtention d'une collection de souches bactériennes capables de dégrader les flavan-3-ols monomères et oligomères et caractérise les métabolites générés. Dans le chapitre 2 des résultats, nous nous sommes attachés à mieux caractériser la collection de souches grâce au séquençage de leur génome. Ce chapitre reste succinct car les données de génomique ont été obtenues à la fin de la thèse. Le chapitre 3 des résultats décrit les gènes bactériens impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols. L'ensemble des résultats est ensuite discuté avec les perspectives qui pourraient découler de ces travaux. Le mémoire se termine par une annexe et la liste des références.

Etude bibliographique

1. Chapitre 1 : Flavan-3-ols, sous classe majeure de polyphénols : de l'aliment à l'Homme

1.1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols, métabolites secondaires, sont des molécules exclusivement retrouvées dans le règne végétal (fruits et légumes). Les polyphénols, assurent différentes fonctions chez les plantes, en participant notamment à la pigmentation des fruits et des fleurs, en jouant un rôle de défense contre les micro-organismes (activité antimicrobienne), mais également en leur procurant une protection contre les radicaux libres et ultraviolets (Manach et al. 2004; Marchiosi et al. 2020). Un polyphénol se définit par la présence d'au moins un noyau aromatique substitué par au moins un groupement hydroxyle (-OH) (Figure 1). A ce jour, plus de 8 000 composés phénoliques ont été identifiés chez les plantes, dont 500 se retrouvent dans notre alimentation (Neveu et al. 2010).

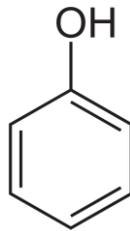


Figure 1. Unité de base des composés phénoliques

Les polyphénols sont classés selon leur structure chimique et en particulier selon le nombre de cycles aromatiques qu'ils possèdent et les éléments structuraux qui les lient (Durazzo et al. 2019). Les polyphénols sont divisés en deux classes, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Figure 2).

La consommation d'aliments riches en polyphénols est souvent associée à des effets bénéfiques pour la santé humaine ; elle aurait des effets préventifs sur un certain nombre de maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, inflammatoires ou encore certains cancers (Del Rio et al. 2013). Ces effets seraient en grande partie dus à l'activité anti-oxydante bien décrite de certains polyphénols, activité qui inhiberait la formation de radicaux libres qui induisent un stress oxydatif responsable du développement de certaines maladies chroniques (Scalbert et al. 2005).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la sous-classe des flavan-3-ols, qui font partis des flavonoïdes. Les autres sous-classes de flavonoïdes et non-flavonoïdes ne seront pas développées dans cette étude bibliographique car les polyphénols font l'objet d'une littérature extrêmement abondante et de revues très exhaustives (Manach et al. 2004; Crozier et al. 2009).

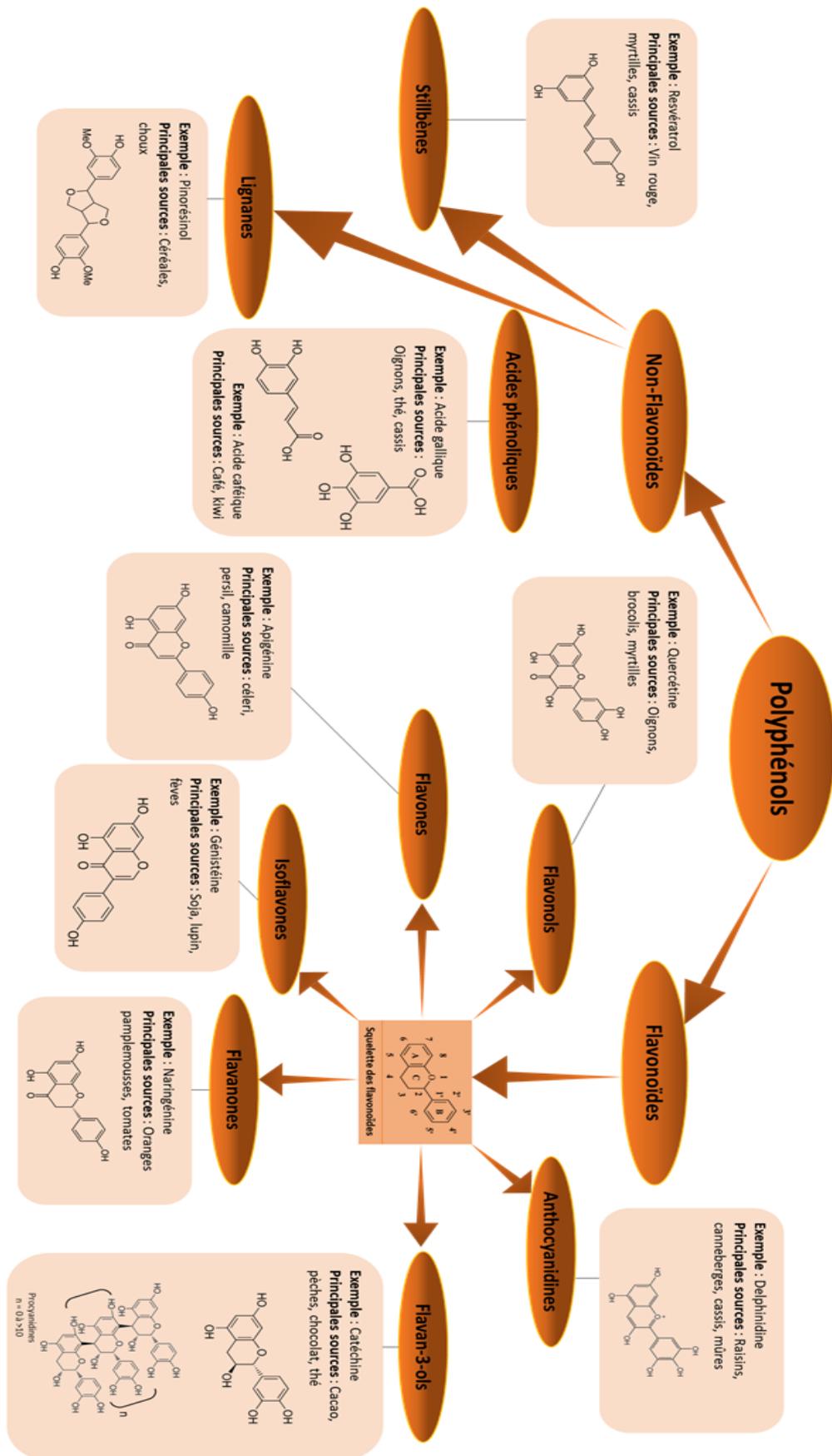


Figure 2. Classification des polyphénols en deux classes : flavonoïdes et non flavonoïdes, adapté de Goszcz et al. (2015).

1.2. Flavonoïdes

La majorité des polyphénols sont des flavonoïdes (6000 molécules), retrouvés de façon abondante dans les fruits, les légumes et les céréales (Ghedira, 2005). L'ensemble des flavonoïdes possède un squelette carboné similaire en C₆-C₃-C₆, correspondant à deux cycles aromatiques nommés cycles A et B, qui sont liés par une chaîne propyl et un oxygène formant un hétérocycle nommé cycle C (Figure 3). Les flavonoïdes sont ensuite catégorisés en six sous-classes majeures selon les différents niveaux d'oxydation de l'hétérocycle C : flavan-3-ols comprenant les formes monomères (catéchines) et les formes polymères (proanthocyanidines ou tannins condensés), flavonols, flavones, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Figure 2) (Manach et al. 2004).

Sur les différents cycles, le nombre de groupements hydroxyle peut varier, notamment le cycle B qui peut être soit mono-, di-, ou trihydroxylé sur les carbones C'₃, C'₄ et C'₅ (Figure 3). Les flavonoïdes peuvent également être méthoxylés, C-glycosylés et O-glycosylés (Aron et Kennedy 2008).

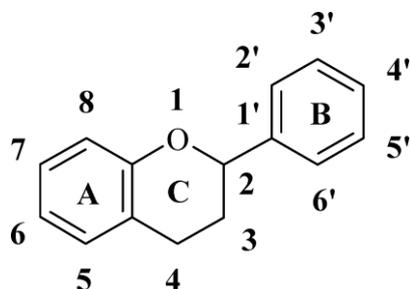


Figure 3. Squelette carboné des flavonoïdes

1.3. Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont une sous-classe importante des flavonoïdes et sont représentés par une grande diversité de molécules. Ils sont présents sous forme de monomères nommés catéchines, mais également d'oligomères et de polymères nommés proanthocyanidines ou tannins condensés. Ces derniers sont les formes majoritaires retrouvées dans les aliments (Gu et al. 2003). Les flavan-3-ols (monomères et oligomères) sont les seuls flavonoïdes à n'être présent dans les végétaux que sous forme aglycone (Gu et al. 2003).

Les monomères de flavan-3-ol sont nommés catéchines. Différents stéréoisomères co-existent du fait de la présence de deux carbones asymétriques en C₂ et C₃ (Figure 4). Les formes 2R, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, sont les plus fréquemment retrouvées dans la nature par rapport aux formes 2S (Kofink et al. 2007) (Figure 4). Le cycle B présente également différents niveaux d'hydroxylation, donnant ainsi les monomères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine quand les flavan-3-ols sont trihydroxylés (Figure 4). De plus, les monomères peuvent être estérifiés par de l'acide gallique en C₃ du cycle C, donnant la (épi)catéchine-3-O-gallate et la (épi)gallocatéchine-3-O-gallate.

Les proanthocyanidines ou “tanins condensés”, correspondent aux oligomères et polymères de flavan-3-ols. Cette dénomination de proanthocyanidines vient du fait qu'en milieu acide fort à chaud les liaisons reliant leurs unités monomériques sont labiles et libèrent des anthocyanidines après oxydation (aglycones d'anthocyanes) (Bate-Smith, 1954).

La structure des proanthocyanidines se caractérise par la nature des unités constitutives, la localisation et le type de liaisons interflavoniques, ainsi que par le degré de polymérisation, c'est-à-dire le nombre d'unités constitutives de la molécule (Hemingway et al. 1989). Jusqu'à treize groupes différents de proanthocyanidines ont été caractérisés en fonction du niveau d'hydroxylation du cycle B, avec majoritairement les procyanidines et les prodelphinidines, constituées respectivement des sous-unités (épi)catéchine et (épi)gallocatéchine (Aron et Kennedy, 2008). Des proanthocyanidines constituées de plusieurs type de flavan-3-ols monomères (par exemple (épi)catéchine et (épi)gallocatéchine) existent également (Gu et al. 2003; Sei-ichi et al. 2019; Kawahara et al. 2019). Les procyanidines, oligomères et polymères de catéchine et d'épicatéchine correspondent au groupe de proanthocyanidines qui a été le mieux caractérisé et le plus étudié. Rien que pour les dimères, dix molécules différentes ont été identifiées ce qui met en exergue leur complexité (Tableau 1). La nature et la position des liaisons interflavoniques permet de distinguer les procyanidines de type B et de type A. Les procyanidines de type B sont les plus fréquemment retrouvées et, comportent uniquement une liaison C-C, localisée entre les carbones C₄ et C₈ ou entre les carbones C₄ et C₆, cette dernière étant moins fréquente (Figure 4). Les procyanidines de type A possèdent une liaison entre les carbones C₄ et C₈ ou C₄ et C₆, mais également une liaison éther additionnelle (C-O-C) reliant les carbones C₂ et C₇ (C₂-O-C₇) ou les carbones C₂ et C₅ (C₂-O-C₅) (Tableau 1) (Figure 3) (Hemingway et al. 1989; Gu et al. 2003). Cette liaison rend les procyanidines de type A plus résistantes à la biodégradation (Xu et al. 2015).

La taille de ces molécules est décrite par leur degré de polymérisation (DP) qui varie fortement. Des procyanidines avec un DP compris entre 2 et 4 sont des oligomères, au-delà il s'agit d'un polymère (Hemingway et al. 1989). On caractérise l'unité terminale comme étant l'unité en dernière position des procyanidines et l'unité ou les unités d'extension(s) comme celle(s) précédant l'unité terminale (Figure 5).

Tableau 1. Nomenclature des dimères de procyanidines de type B et de type A en fonction de leurs unités constitutives.

	Dimères	Composition
<i>Type B</i>	B1	(-)-épicatéchine-(4 β →8)-(+)-catéchine
	B2	(-)-épicatéchine-(4 β →8)-(-)-épicatéchine
	B3	(+)-catéchine-(4 α →8)-(+)-catéchine
	B4	(+)-catéchine-(4 α →8)-(-)-épicatéchine
	B5	(-)-épicatéchine-(4 β →6)-(-)-épicatéchine
	B6	(+)-catéchine-(4 α →6)-(+)-catéchine
	B7	(-)-épicatéchine-(4 β →6)-(+)-catéchine
	B8	(+)-catéchine-(4 α →6)-(-)-épicatéchine
<i>Type A</i>	A1	(-)-épicatéchine-(2 β →7, 4 β →8)-(+)-catéchine
	A2	(-)-épicatéchine-(2 β →7, 4 β →8)-(-)-épicatéchine

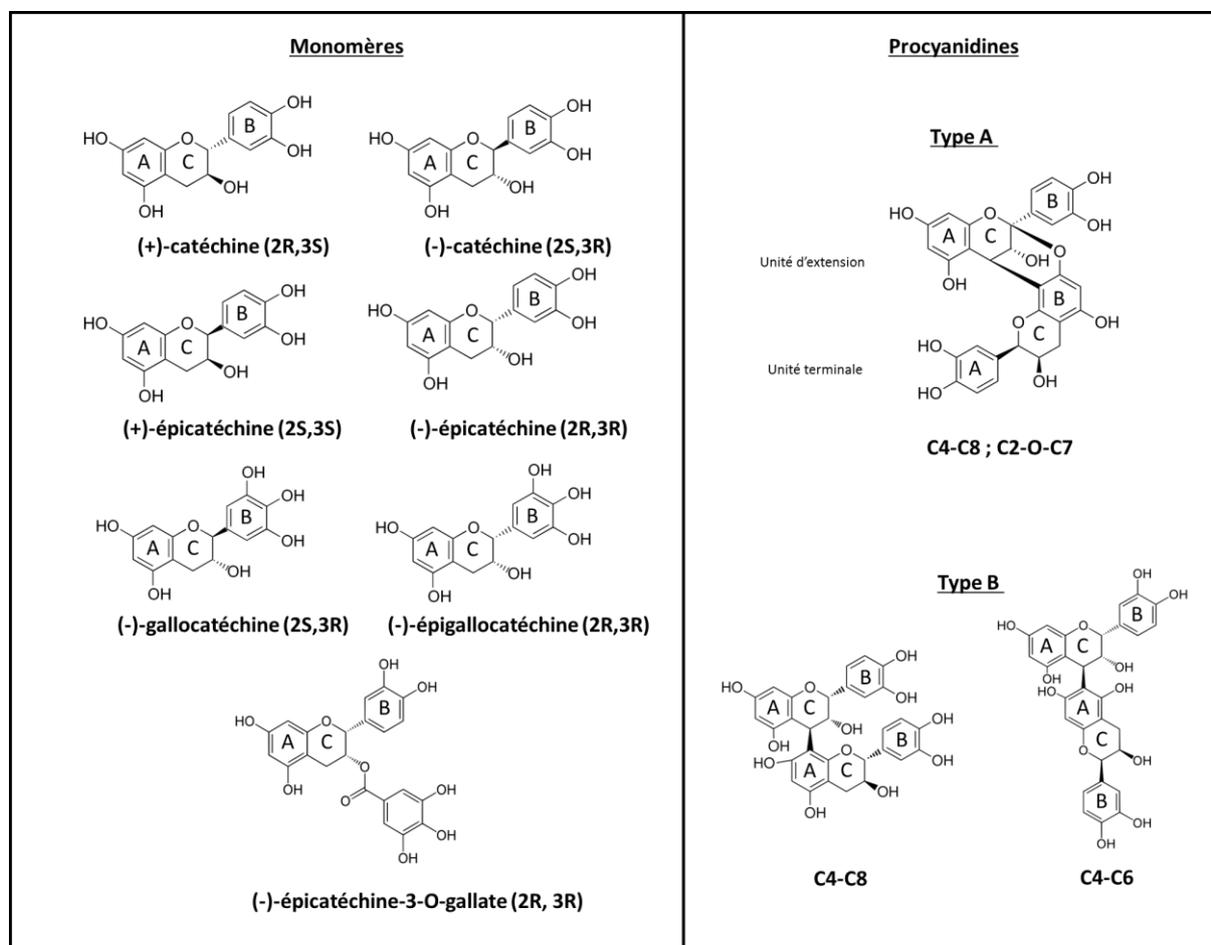


Figure 4. Structures chimiques de certains monomères et oligomères (procyanidines) de flavan-3-ols.

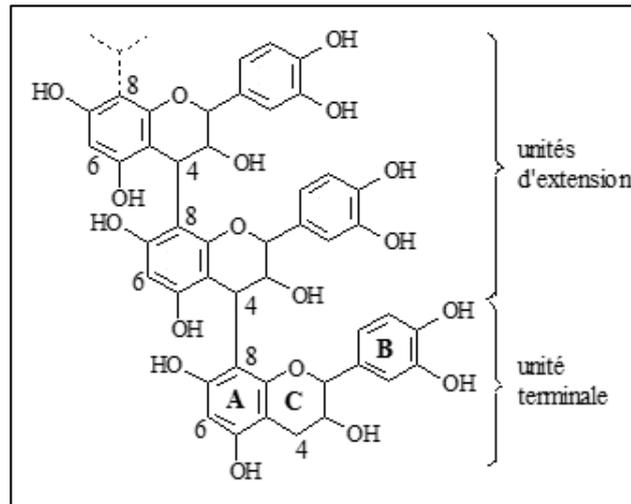


Figure 5. Nomenclature d'un oligomère.

1.3.1. Flavan-3-ols dans les aliments

Un aliment ne contient pas qu'un seul type de flavan-3-ols mais un mélange de monomères et de proanthocyanidines ; les formes monomériques peuvent être majoritaires par rapport aux proanthocyanidines ou vice-versa (Monagas et al. 2003; Favari et al. 2020). Des différences de proportions entre les monomères, mais également entre les différents types de proanthocyanidines sont également observées (Santos-Buelga et al. 1995).

En ce qui concerne les monomères de flavan-3-ols, ils se trouvent dans un grand nombre d'aliments tel que les fruits, les céréales, les boissons (vin, thé, cidre) et le chocolat (Crozier et al. 2009; Manach et al. 2004; Favari et al. 2020). La prune serait un des fruits où on retrouve le plus de monomères (100 mg/kg de matière fraîche du fruit entier) (Pascual-Teresa et al, 2000) mais certaines boissons telles que le thé vert en contiennent aussi beaucoup (jusqu'à 200 mg par infusion d'environ 2 g de thé) (Henning et al. 2003; Manach et al. 2004).

Les stéréoisomères de la catéchine et de l'épicatéchine sont les monomères les plus représentés dans les fruits et leurs pépins (pépins de raisin par exemple) (Santos-Buelga et al. 1995), alors que les formes trihydroxylées (gallocatéchine et épigallocatechine) sont bien plus présentes dans le thé, pouvant représenter jusqu'à 85 % des monomères totaux (Henning et al. 2003; Manach et al. 2004; Crozier et al. 2009).

Tableau 2. Analyses qualitatives et quantitatives des proanthocyanidines trouvées dans les aliments. Adapté de Gu et al. (2003; 2004) et Prior and Gu (2005). DP = degré de polymérisation ; C = (épi)catéchine ; GC = (épi)gallocatéchine; Af = (épi)afzéléchine ; ND = Non détecté. La détermination en proanthocyanidines a été réalisée sur les aliments entiers.

Aliments	Type de liaison	Unité constitutive	Monomère	Oligomère (2-10)	Polymère (>10)	DP moyen	Contenu total en proanthocyanidines
			<i>mg/100 g</i> (poids en matière fraîche)		<i>mg/L</i> (boissons)		
Fruits							
Aronia	B	C	5,2	116	542,6		663,7
Canneberge	A, B	C	7,3	178	233,5	8,5	418,8
Myrtille	B	C	3,8	58	194,7	15,9	255,8
Prune	A, B	C	11,4	204,5	57,3	11,1	215,9
Cassis	B	C, GC	0,9	26,4	122,4	47,9	147,8
Fraise	B	Af, C	4,2	65	75,8	6,3	145
Pomme	B	C	6,6	16	30,4		101
Grain de raisin	B	C, GC	1	21,8	58,9	20,9	81,5
Pêche	B	C	4,7	40,6	22		67,3
Poire	B	C	2	16,1	24,2	14,6	42,3
Framboise	B	Af, C	4,4	25,8	ND	2,7	30,2
Mûre	B	C	3,7	21,8	1,5	3,2	27
Nectarine	B	C	1,9	13,6	7,3		22,8
Abricot	B	C	2,8	12,1	0,8		15,6
Mangue	B	C	2,3	10,4	ND		12,8
Dates	B	C	ND	10,7	ND		10,7
Cerise	B	C	4,2	14	ND		8,2
Avocat	A, B	C	1	6,5	ND	3,2	7,4
Banane	B	C	0,2	3,8	ND		4
Kiwi	B	C	0,6	3	ND		3,7
Légumes							
Courge indienne	B	C	1,6	11,3	3,5		16,4
Céréales et légumineuses							
Sorgho	B	C	18	594,2	1307,3	8,4	1919,5
Fève de cacao	B	C	198,5	886,4	551		1635,9
Haricot pinto	B	Af, C	14,8	321,8	459,6	8,3	796,3
Haricot rouge	B	Af, C	21,9	278,5	263,4	6,7	563,8
Petit haricot rouge	B	Af, C	10,6	117,5	252,9	12	456,6
Orge	B	C	11	63,2	ND		74,2
Pois aux yeux noirs	B	C	14	19,4	ND		33,3
Haricot noir	B	C	2,9	5,2	ND		8,1
Fruits à coques							
Noisette	B	C, GC	9,8	168,4	322,4	14	500,7
Noix de pécan	B	C, GC	17,2	253,7	223	11,6	494,1
Pistache	B	C, GC	10,9	103,9	122,5	17,7	237,3
Amande	B	Af, C	7,8	96	80,3	12,7	184
Noix de noyer	B	C	6,9	40,3	20	16,2	67,3
Cacahuète	A, B	C	5,1	10,6	ND	3,2	15,6
Noix de cajou	B	C	6,7	2	ND		8,7
Boissons							
Vin rouge	B	C, GC	20	184	110	5,2	31,3
Bière	B	C, GC	4	18	ND	2,1	2,3
Épices							
Cannelle	A, B	Af, C	23,9	5575,4	2508,8	6,5	8108,2
Curry	A, B	C	ND	74,2	ND	3,7	74,2

En ce qui concerne les oligomères et polymères de flavan-3-ols, les fruits, les céréales, les légumineuses (haricots et fèves de cacao par exemple), les fruits à coque (noisette par exemple) et certaines boissons (vin, bière) sont les principales sources de proanthocyanidines (Tableau 2). Tandis qu'elles ne sont retrouvées que dans seulement 5 % des légumes et 13 % des épices (Gu et al. 2003). La teneur en proanthocyanidines dans les aliments consommés varie fortement selon l'aliment considéré, certains en sont riches (la cannelle, le sorgho et la fève de cacao), et d'autres pauvres (la banane, le kiwi et la bière) (Tableau 2). Cependant, les méthodes d'analyses utilisées peuvent être inappropriées pour apprécier la composition en proanthocyanidines (Tarascou et al. 2010). Par exemple, une autre étude montre que la banane est un aliment riche en proanthocyanidines (64 mg/100 g de matière fraîche) avec certains pouvant avoir des DP supérieurs à 100 (Hellström et al. 2009).

Les proanthocyanidines retrouvées dans l'alimentation sont majoritairement de type B. Cependant des aliments tels que la canneberge, les cacahuètes et l'avocat, ainsi que deux épices, le curry et la cannelle sont caractérisés par la présence d'un mélange de proanthocyanidines de type B et de type A (Tableau 2). Les proanthocyanidines de type A peuvent représenter jusqu'à 84-90 % des proanthocyanidines totales dans le curry et la cannelle et 51-65 % dans la canneberge et les cacahuètes, ou alors moins de 12 % comme dans l'avocat (Gu et al. 2003).

Une étude réalisée sur une grande variété de fruits à coque, de céréales et de légumineuses a montré que la composition en dimères varie selon les aliments, avec par exemple les lentilles (légumineuse) contenant majoritairement des procyanidines B₃ et B₆ alors que les amandes (fruit à coque) sont riches en procyanidines B₁ et B₂. En revanche, les procyanidines B₄, B₅ et B₈ sont très peu retrouvées dans ces aliments (Bittner et al. 2013). Les pépins de raisins sont composés majoritairement de procyanidines de type B₁ à B₄, les procyanidines de type B₅ à B₈ étant minoritaires (Tableau 1) (Santos-Buelga et al. 1995). En ce qui concerne les procyanidines de type A, Appeldoorn et al (2009) ont montré que la cacahuète, après extraction de la peau, contenait les dimères A₁ et A₂ représentant respectivement 6.9 et 2.1 % du poids sec total.

La catéchine et l'épicatéchine sont les monomères les plus fréquemment retrouvés en tant qu'unités constitutives des proanthocyanidines de type B et A, contribuant à 93,8 % des sous-unités totales (Gu et al. 2003). Les procyanidines sont donc les formes les plus généralement présentes. Néanmoins, dans certains aliments (cassis par exemple) les monomères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine représentent 40,2 % des sous-unités totales. On peut également retrouver dans quelques aliments (fraise et amande) des proanthocyanidines composés des monomères (épi)afzéléchine (un groupement hydroxyle en moins sur le cycle B par rapport aux monomères d'(épi)catéchines) (Tableau 2) (Gu et al. 2003).

Les proanthocyanidines sont majoritairement retrouvées dans les aliments avec de hauts degrés de polymérisation (DP>10), comme par exemple dans le cassis avec un DP moyen de 47,9 ou dans l'amande avec un DP moyen de 12,7 (Tableau 2) (Gu et al. 2004). Parmi les baies (cassis, aronia), les proanthocyanidines à haut DP peuvent représenter jusqu'à 82 % des proanthocyanidines totales (Prior et Gu 2005). Néanmoins, certains aliments contiennent des proanthocyanidines à plus petit DP, tels que la framboise et la mûre qui ont respectivement des DP moyens de 2,7 et 3,2 (Tableau 2) (Gu et al. 2003).

En conclusion, les données de la littérature mettent en évidence un grand nombre d'aliments végétaux qui contiennent des flavan-3-ols. Ces données montrent aussi que les teneurs totales en proanthocyanidines sont extrêmement variables d'un aliment à l'autre (de 2 à 8000 mg/100g de matière fraîche). Cependant, le contenu en flavan-3-ols (et en polyphénols de façon général) dans les aliments peut varier d'une étude à l'autre, dépendant de la méthode d'analyse utilisée ainsi que des échantillons analysés (variété, stade de récolte, stockage, pratiques culturales, procédés de transformation appliqués ou non). Sur le plan qualitatif, les flavan-3-ols sont très divers tant du point de vue de leur composition en unités constitutives, du type de liaisons interflavaniques (type B ou A), ou du degré de polymérisation. Néanmoins les procyanidines de type B avec des DP élevés sont fréquemment retrouvées quelle que soit l'origine botanique de l'aliment (fruits, céréales, légumineuses etc). Au final, c'est la consommation d'un aliment, en quantité et en fréquence qui sera déterminante. Par exemple la cannelle, qui est riche en flavan-3-ols sera relativement peu consommée. D'autre part, certains aliments ne seront pas consommés dans leur intégralité, tel que la pomme qui est dans certains cas consommée sans la peau alors que celle-ci est une source importante de procyanidines (165 mg/100g de matière fraîche dans la peau, contre 36 mg/100g de matière fraîche dans la chair) (Tsao et al. 2003). Tous ces facteurs font qu'il est très difficile d'estimer la consommation exacte en flavan-3-ols d'un individu à l'échelle du repas ou de la journée.

1.3.2. Consommation de flavan-3-ols dans la population humaine

Des études épidémiologiques basées sur des questionnaires alimentaires ont été réalisées à travers le monde (Europe, Amérique du Nord, Asie) pour déterminer la consommation humaine en polyphénols, et notamment en flavonoïdes et flavan-3-ols (Bo' et al. 2019). Connaître ces apports est déterminant pour corrélérer d'éventuels bénéfices de la consommation de polyphénols et particulièrement de flavan-3-ols sur la santé humaine.

Il est communément admis que la consommation en polyphénols se situe autour d'un gramme par jour et par personne (Scalbert et Williamson 2000). Cependant, de grandes variations existent selon les études, l'origine géographique des cohortes d'individus étudiées étant un critère important. Bo' et al (2019) ont réalisé une méta-analyse comprenant 45 études publiées sur les dix dernières années où la consommation en polyphénols a été mesurée en Europe, en Amérique du Nord et en Asie. D'après leur étude, la consommation moyenne totale en polyphénols serait de 900 mg/jour/personne en raison des apports en thé, café, vin rouge, fruits et légumes. Leur étude montre néanmoins de grandes disparités dans les quantités de polyphénols consommés entre les différentes zones géographiques. Le Japon serait le pays à la plus forte consommation de polyphénols avec 1500 mg/jour/personne, suivi des pays européens (900 mg/jour/personne) et nord-américains (800 mg/jour/personne). Une hétérogénéité est également observée à travers les populations européennes ; la Pologne et la France seraient les pays les plus gros consommateurs de polyphénols avec 1 g/jour/personne alors que l'Espagne serait le pays à la plus faible consommation avec seulement 300 mg/jour/personne. Cependant, Bo' et al (2019) montrent que les résultats en Europe divergent selon les études. Ainsi, une autre étude épidémiologique montre que le Danemark et la Grèce seraient respectivement les pays les plus gros et les plus faibles consommateurs de polyphénols avec une consommation de 1786 et 744 mg/jour/personne. Le régime méditerranéen est souvent associé à une forte consommation en polyphénols ; cependant les pays non-méditerranéens ont une consommation plus importante en polyphénols en raison de la consommation importante de café qui est riche en acides phénoliques tel que les dérivés d'acides caféiques (Bo' et al. 2019).

Parmi les polyphénols, la classe des flavonoïdes est la plus consommée. L'étude HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) réalisée sur 2428 adolescents à travers neuf villes européennes a permis de déterminer que la consommation en flavonoïdes est de 326 mg/jour/personne, correspondant à 75 - 76 % des polyphénols totaux consommés chez ces adolescents (Wisnuwardani et al. 2018). Toujours en Europe, l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) réalisée sur une cohorte de 36037 adultes a montré que la consommation de flavonoïdes était la plus importante chez les britanniques et les hommes du

pourtour méditerranéen, les flavonoïdes représentant 49 à 62 % des polyphénols totaux ingérés (Zamora-Ros et al. 2016). Les résultats de cette étude montrent des différences entre les hommes et les femmes avec respectivement 492 et 546 mg de flavonoïdes consommés/jour/personne (Zamora-Ros et al. 2016). En Pologne et en Australie, la consommation moyenne de flavonoïdes est élevée et similaire de l'ordre de 600 mg/jour/personne. Par contre, la consommation de flavonoïdes serait trois fois plus faible (200 mg/jour/personne) aux Etats-Unis, et dix fois plus faible en Asie (Chine et Corée du sud : 60 mg/jour/personne) (Bo' et al. 2019). Certaines bases de données utilisées pour estimer la consommation en polyphénols manquent d'informations sur certains aliments consommés (tel que le thé), ce qui peut expliquer la faible consommation retrouvée dans ces deux pays asiatiques (Lee et al. 2013).

Les flavan-3-ols (monomères et proanthocyanidines) sont les principaux flavonoïdes consommés puisqu'ils représentent 64 % des apports en flavonoïdes totaux selon l'étude HELENA (Tableau 3). La majorité des flavan-3-ols ingérés par les adolescents Européens de cette étude sont des proanthocyanidines (Tableau 3) qui proviendraient de la consommation de poires, pommes et produits chocolatés (Tableau 2) (Wisnuwardani et al. 2018). Il a été estimé chez la population américaine que 73,9 % des flavan-3-ols consommés étaient sous la forme de proanthocyanidines avec un DP supérieur à trois (Gu et al. 2004). L'étude NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) réalisée sur une cohorte de 8809 américains a également montré que les flavan-3-ols étaient la principale source de flavonoïdes ingérés (82 % des flavonoïdes totaux) avec 156 mg/jour/personne (Bo' et al. 2019). La plus forte consommation de flavan-3-ols a été observée chez les Kuna, peuple amérindien vivant sur une île des caraïbes, et a été estimée à 1880 mg/jour/personne du fait d'une importante consommation de cacao. Cette étude montre aussi une corrélation possible entre la consommation de flavan-3-ols et la santé, point qui sera présenté ultérieurement (Bernatova 2018).

Tableau 3. Consommation en flavonoïdes et en flavan-3-ols par des adolescents européens (Etude HELENA). Adapté de Wisnuwardani et al. (2018). MED = Méditerranéen.

Classes et sous-classes de polyphénols	Pays MED (%)		Pays Non-MED (%)	
	Garçons	Filles	Garçons	Filles
Flavonoïdes	75,9	74,6	76,1	76,4
Flavan-3-ols	48,6	47,7	51,8	54,3
Monomères	3,4	4,3	5,6	7
Proanthocyanidines	33,5	36,7	38,7	40,6

La consommation de thé serait malgré tout un facteur déterminant dans les apports alimentaires en flavan-3-ols (et flavonoïdes). L'étude EPIC réalisée chez les britanniques montre que le thé contribue pour 51,3 % de l'apport total de flavan-3-ols (Knaze et al. 2012). L'étude NHANES a également mis en

avant que les consommateurs de thé ingéraient 20 fois plus de flavonoïdes que les non consommateurs, avec une contribution des flavan-3-ols de thé de 646 mg/jour/personne (Bo' et al. 2019). Une étude réalisée sur 516 japonaises a montré que le thé représentait 98 % de la consommation en flavan-3-ols (Otaki et al. 2009).

En conclusion, la population humaine consomme en moyenne 900 mg/jour/personne de polyphénols, principalement sous la forme de flavonoïdes. Parmi cette classe, les flavan-3-ols sont les plus consommés (64-82 % des flavonoïdes totaux), sous la forme de monomères mais surtout de proanthocyanidines. Une grande variabilité existe dans la quantité de flavan-3-ols consommés selon les populations (156-1880 mg/jour/personne). La consommation de thé et de cacao, qui sont deux aliments riches en flavan-3-ols, y contribue fortement.

1.3.3. Métabolisme « non microbien » des flavan-3-ols

1.3.3.1. Métabolisme de phase II et cycle entéro-hépatique

Le métabolisme des polyphénols, et à fortiori des flavan-3-ols, est un processus complexe qui commence dès l'ingestion des aliments. La première étape consiste en la libération des flavan-3-ols de la matrice alimentaire pour les rendre bio-accessibles, elle commence au cours de la mastication (Saura-Calixto et al. 2007; Bohn 2014). Ces derniers vont ensuite transiter dans l'estomac puis l'intestin grêle. Une faible fraction des flavan-3-ols (moins de 20 %) va être absorbée au niveau de l'intestin grêle par diffusion passive et atteindre le foie via la veine porte.

Le foie est l'organe principal du métabolisme de phase II qui consiste à conjuguer certaines molécules comme les polyphénols sous forme aglycones ou les xénobiotiques avec des groupements tels que le glucuronate, le sulfate ou le méthyle (Figure 6) (Kappas et Alvares 1975). Les dérivés glucuronylés, sulfatés ou méthylés, aussi appelés métabolites conjugués, vont ensuite être pris en charge par la bile et être sécrétés dans l'intestin grêle. Ce cheminement des flavan-3-ols de l'intestin grêle vers le foie qui les conjugue pour être ensuite redirigés vers l'intestin grêle s'appelle le cycle entéro-hépatique. Malgré tout, une faible fraction des métabolites conjugués échappe à ce cycle et est véhiculée via la circulation sanguine vers d'autres organes (cœur, cerveau) pour être enfin sécrétés dans l'urine via les reins. Le métabolisme de phase II peut aussi avoir lieu au niveau de l'épithélium intestinal, et dans ce cas, les métabolites conjugués sont directement relargués dans l'intestin grêle (pas de cycle entéro-hépatique). Enfin, les flavan-3-ols non absorbés ou conjugués transitent de l'intestin grêle vers le côlon où ils seront métabolisés par le microbiote intestinal. Le métabolisme microbien des flavan-3-ols est traité dans le 2^{ème} chapitre de cette étude bibliographique.

Le métabolisme de phase II est un métabolisme qui a été très étudié jusqu'à présent pour diverses classes de polyphénols. Ces études ont contribué à l'acquisition de connaissances sur la biodisponibilité

de ces composés. La biodisponibilité d'un constituant alimentaire tel qu'un polyphénol se caractérise par la part quantitative de ce constituant qui, au cours du transit digestif, aura franchi l'épithélium intestinal et atteint la circulation sanguine. Cette biodisponibilité peut s'avérer déterminante si le constituant exerce une activité biologique d'intérêt au niveau d'un organe ou de plusieurs organes cibles (cf. 1.3.4). Nous allons voir que cette biodisponibilité est très faible pour les flavan-3-ols monomères et oligomères sous leur forme native.

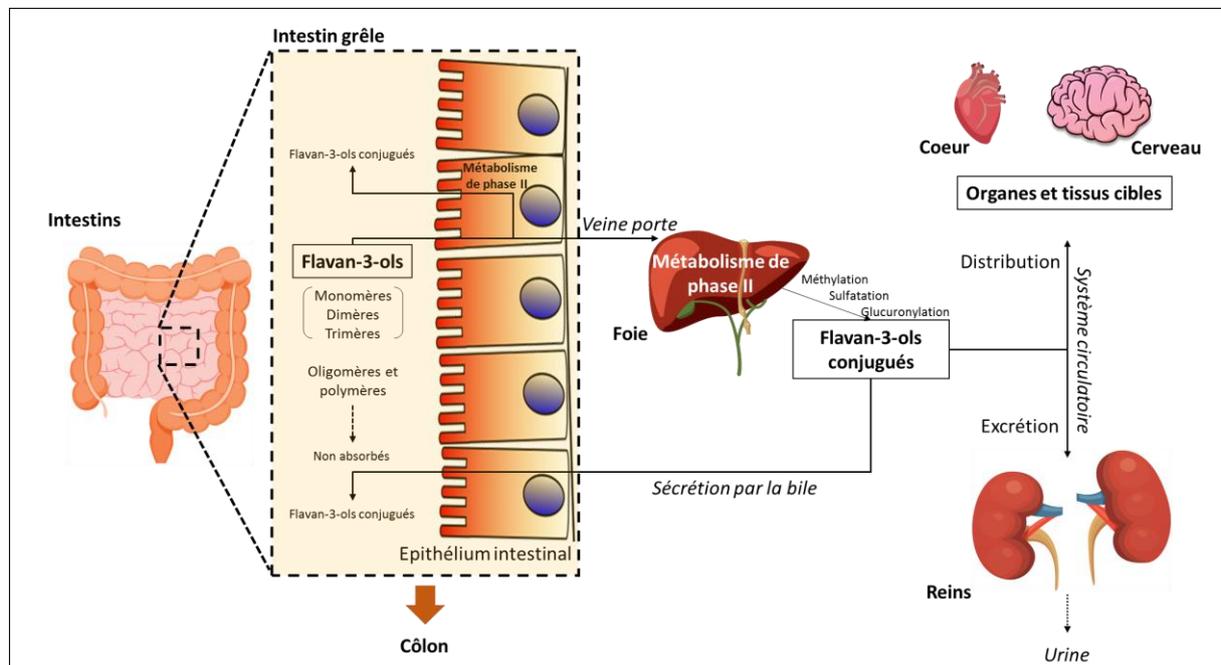


Figure 6. Absorption, métabolisme et circulation des flavan-3-ols dans l'organisme. Les flavan-3-ols alimentaires transitent dans l'intestin grêle. Une fraction de ces flavan-3-ols - principalement les monomères - est absorbée par les cellules de l'épithélium intestinal et rejoint le foie via la circulation sanguine (veine porte). Une autre fraction est conjuguée (méthylation, sulfatation, glucuronylation) au niveau de l'épithélium intestinal et excrétée dans la lumière de l'intestin grêle. Les flavan-3-ols qui atteignent le foie sont également conjugués puis distribués via la circulation sanguine vers différents organes pour être finalement excrété dans l'urine. Le foie peut également sécréter les flavan-3-ols conjugués via la bile au niveau de l'intestin grêle. Les flavan-3-ols non absorbés et conjugués présents dans la lumière intestinale transitent ensuite vers le côlon.

1.3.3.2. Biodisponibilité des flavan-3-ols

Pour rappel, en nutrition, la biodisponibilité est la proportion d'une molécule ingérée (nutriment, micro-constituant etc.) qui passe dans le sang et la circulation générale alors que la bioaccessibilité est la proportion qui est libérée de la matrice alimentaire dans le tractus digestif (par la mastication par exemple) et qui devient disponible à l'absorption. La biodisponibilité d'une molécule dépend donc de sa bioaccessibilité mais aussi d'autres facteurs comme les capacités absorbatives de l'épithélium intestinal.

Des études *in vivo* réalisées chez des patients ayant subi une iléostomie (acte chirurgical qui relie l'iléon, partie distale de l'intestin grêle, vers l'extérieur avec dispositif de collecte) ont montré que la

majeure partie des monomères de flavan-3-ols ingérés était peu absorbé. Stalmach et al (2010) ont montré que jusqu'à 69 % des flavan-3-ols (thé vert) ingérés pouvait se retrouver dans le fluide iléal, sous leur forme native (33 à 43 %) ou conjuguée (37 % ; méthylée, glucuronylée ou sulfatée) (Auger et al. 2008; Stalmach et al. 2010). Les monomères de flavan-3-ols possédant un résidu gallate ne sont ni absorbés ni conjugués (Auger et al. 2008; Stalmach et al. 2010). D'après les taux de métabolites conjugués retrouvés dans l'urine, seule une petite fraction des flavan-3-ols totaux consommés (6,8 – 9,3 %) serait finalement absorbée (Auger et al. 2008; Stalmach et al. 2010). L'absorption n'est pas similaire entre les différents monomères. Les monomères d'(épi)catéchine sont plus absorbés que les monomères d'(épi)gallocatéchine. Ainsi, 47 % des premiers se retrouvent dans l'urine sous leur forme conjuguée et seulement 26 % des seconds (Auger et al. 2008). Une étude a montré qu'après la supplémentation de 60 mg de (-)-épicatéchine radiomarquée au ¹⁴C, 20 % de la (-)-épicatéchine ingérée a été retrouvée dans l'urine sous les formes sulfatées, méthylées et glucuronylées (Ottaviani et al. 2016).

En ce qui concerne les procyanidines, proanthocyanidines les plus fréquemment retrouvées dans l'alimentation, l'absorption au niveau de l'intestin grêle est bien inférieure à celle des monomères. Une étude comparant la concentration en dimère B₂ et en (-)-épicatéchine dans le plasma de cinq individus après la consommation de cacao a montré que les dimères représentaient moins de 1 % du total des flavan-3-ols absorbés et que leur concentration était 20 fois inférieure à celle de la (-)-épicatéchine (Holt et al. 2002). Une autre étude réalisée chez des individus ayant subi une iléostomie a montré que plus de 90 % des procyanidines de jus de pomme (DP moyen de 5,4) n'étaient pas absorbées (Kahle et al. 2007). Ces résultats obtenus chez l'Homme ont aussi été mis en évidence chez le rat où seulement 0,34 % de la dose ingérée en procyanidines B₂ a été retrouvée dans l'urine 18 heures après l'ingestion (Baba et al. 2002). De plus, chez des rats canulés au niveau de l'intestin grêle, il a été montré que les dimères de type A étaient 10 à 20 fois moins absorbés que le monomère d'(-)-épicatéchine, les trimères de type A n'étant pas absorbés du tout (Appeldoorn et al. 2009).

En termes de cinétique d'absorption chez l'Homme, les flavan-3-ols natifs (monomères et dimères de procyanidines) et leurs métabolites (conjugués) sont rapidement identifiés dans le plasma. Ils atteignent un pic de concentration une à deux heures après ingestion (Holt et al. 2002; Ottaviani 2011; Ottaviani et al. 2012; 2016).

En termes de concentration des métabolites conjugués retrouvés dans le sang, les résultats varient selon les études qui elles-mêmes varient sur la nature et la quantité de flavan-3-ols ingérés. Néanmoins, la concentration en métabolites de la (-)-épicatéchine retrouvée dans le plasma est extrêmement faible et avoisine 1 µM pour 60 mg ingéré (Ottaviani et al. 2016). Elle est 100 fois moins importante pour les dimères B₂ dont la concentration dans le plasma se situerait entre 4 et 40 nM

après ingestion de procyanidines (Holt et al. 2002; Ottaviani et al. 2012). Les flavan-3-ols absorbés sont ensuite distribués aux organes du corps via la circulation sanguine, ils ont notamment pu être détectés chez le rat dans différents organes, tels que le foie, les reins, la rate, le cerveau et le tissu adipeux (Abd el Mohsen et al. 2002; Margalef et al. 2015; Wu et al. 2017).

En conclusion, les monomères de flavan-3-ols ((épi)catéchine et (épi)gallocatéchine) sont reconnus comme étant peu biodisponibles mais ils sont beaucoup plus biodisponibles que les monomères galloylés ou les procyanidines. La majorité des flavan-3-ols ingérés reste dans l'intestin grêle sous leur forme native ou conjuguée. Les formes conjuguées proviendraient du métabolisme de phase II exercé par les cellules intestinales, comme cela a pu être observé *in vitro* avec des cellules Caco-2 (Rodriguez-Mateos et al. 2014) et de l'excrétion via la bile (recirculation entéro-hépatique) après leur métabolisation par les cellules hépatiques (Das et Sothy 1971; Actis-Goretta et al. 2013).

1.3.4. Effets santé des flavan-3-ols

Depuis des décennies, les polyphénols font l'objets de recherches intensives dans le monde, en particulier pour mettre en évidence leurs effets bénéfiques en santé humaine. Pendant la dernière décennie (2009-2019), presque 5000 articles associant « polyphénol » et « santé » ont été publiés (Favari et al. 2020).

Une méta-analyse s'appuyant sur 46 études associant la consommation en polyphénols et leur impact sur différentes pathologies telles que le diabète ou les maladies cardiovasculaires a mis en évidence qu'il existait un effet protecteur des polyphénols contre ces pathologies (Bo' et al. 2019). Les flavan-3-ols participeraient pour une grande part à cet effet puisque ce sont les flavonoïdes les plus consommés (cf. section 1.3.2). Malgré ces nombreuses études, il n'existe à ce jour qu'une seule allégation qui associe la consommation de flavan-3-ols à des bénéfices santé et qui a été délivrée par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), organisme qui évalue et donne des recommandations sur les aliments consommés. Cette allégation indique que la consommation de flavan-3-ols du cacao permettrait de réduire les risques cardio-vasculaires (EFSA, 2014).

La consommation d'aliments riches en flavan-3-ols serait bénéfique pour les individus souffrant de pathologies liées aux maladies cardio-vasculaires. Des personnes souffrant d'une insuffisance cardiaque ont vu leur capacité vasculaire s'améliorer après quatre semaines de consommation de chocolat (Flammer et al. 2012), ce qui a pu également être observé chez des patients diabétiques après la consommation ponctuelle ou journalière de chocolat, aliment riche en flavan-3-ols (Balzer et al. 2008). Des fumeurs ont vu leur capacité vasculaire s'améliorer deux heures après la consommation d'environ 180 mg de flavan-3-ols (Heiss et al. 2005). De plus, la consommation de 1052 mg/jour de flavan-3-ols issus de cacao favoriserait une baisse de la pression artérielle chez des personnes souffrant d'hypertension (Davison et al. 2010), résultat qui a pu également être observé après supplémentation

en proanthocyanidines (Ren et al. 2021). De même, plusieurs méta-analyses ont montré qu'augmenter sa consommation en thé permettait de réduire l'incidence d'un accident vasculaire cérébral, en particulier ischémique (Shen et al. 2012), de réduire de 10 % le risque de développer une maladie des artères coronaires (athérosclérose) (Wang et al. 2011) et d'augmenter de 40 % la fonction endothéliale de l'artère brachiale (Ras et al. 2011). A l'inverse, une étude n'a montré aucun bénéfice santé lié à la consommation de flavan-3-ols. Après consommation de capsules contenant 1 à 2 g de flavan-3-ols issus d'extraits de cacao, chaque jour durant deux semaines par une trentaine d'individus, aucun changement de la pression artérielle ni de la fonction plaquettaire n'a pu être observé. Une explication possible à cette absence d'effets serait que cette étude a été réalisée sur des individus sains ne présentant aucun trouble de leurs fonctions cardio-vasculaires (Ottaviani et al. 2015).

Les flavan-3-ols auraient donc la capacité de prévenir voire restaurer certaines fonctions cardio-vasculaires dans le cas où ces capacités seraient affectées par certaines pathologies.

Comme nous avons pu le voir précédemment, les flavan-3-ols peuvent atteindre le cerveau (Schaffer et Halliwell, 2012) ; cet état de fait interroge sur un éventuel effet des flavan-3-ols sur les capacités cognitives. De nombreuses études et revues montrent que les flavan-3-ols préviendraient l'apparition de certaines maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer (Meng et al. 2010; Nehlig 2013; Xicota et al. 2016; Chen et al. 2019). Une étude sur des personnes âgées ayant consommée pendant trois mois des flavan-3-ols de cacao a montré qu'une consommation importante en flavan-3-ols (900 mg/jour) améliorerait de façon significative la fonction du gyrus denté de l'hippocampe, qui est impliqué dans la mémorisation spatiale, en réponse à une augmentation du volume sanguin au niveau du cerveau, par comparaison à des individus qui en consommaient peu (45 mg/jour) (Brickman et al. 2014). Une méta-analyse s'appuyant sur onze études réalisées sur des enfants et de jeunes adultes a montré que la consommation de flavan-3-ols issus de cacao s'accompagnait d'effets positifs sur les capacités cognitives. Elle a permis à court-terme d'augmenter le flux sanguin et l'oxygénation au niveau du cerveau, et à long-terme de stimuler les capacités cognitives telles que l'apprentissage de la parole, la mémorisation et l'attention (Martín et al. 2020).

En termes de mécanismes d'action, les effets positifs observés seraient dus aux différentes propriétés associées aux flavan-3-ols, telles que leurs activités antioxydantes (Miura et al. 1994; Nanjo et al. 1996; Villaño et al. 2007; Iacopini et al. 2008), anti-inflammatoires (Noreen et al. 1998; Lu et al. 2003; Jung et al. 2009; Tai et al. 2011). Les flavan-3-ols sont également connus pour leurs effets anti-cancers (Ichikawa et al. 2018; Sei-ichi et al. 2019; Kawahara et al. 2019).

Également, la consommation de canneberges qui est un fruit riche en procyanidines (type B et A) permettrait de réduire les infections urinaires, tel que les infections à UPEC (*Uro-pathogénic Escherichia coli*) et *Candida albicans* en réduisant l'adhésion des bactéries et la formation de biofilms

(Foo et al. 2000; Howell et al. 2005; Rane et al. 2014; Vostalova et al. 2015). Un des mécanismes d'action avancé dans la réduction des infections à UPEC serait la liaison des procyanidines de type A aux pili de ces pathogènes inhibant ainsi leur adhésion aux cellules épithéliales de la vessie (Ribić et al. 2018).

Pour conclure, de nombreuses études ont associé la consommation de flavan-3-ols à la prévention de pathologies cardio-vasculaires et neurologiques. Nous avons vu que la biodisponibilité des flavan-3-ols alimentaires, critère essentiel pour bénéficier des effets santé cités ci-dessus, est faible et concerne surtout les flavan-3-ols monomères. Sachant que la majorité des flavan-3-ols (précurseurs ou conjugués), migrent dans le tractus-digestif et atteignent le côlon qui héberge une population dense et diversifiée de micro-organismes, nous allons maintenant voir dans quelle mesure le côlon et son microbiote peuvent jouer un rôle dans la bio-activité des flavan-3-ols.

2. Chapitre 2 : Microbiote intestinal humain et impact des flavan-3-ols sur sa composition

2.1. Généralités sur le microbiote du tractus gastro-intestinal humain

Le tractus gastro-intestinal est habité par une communauté complexe de micro-organismes (virus, bactéries, archées, levures) que l'on appelle aujourd'hui « microbiote ». De par les différentes caractéristiques physico-chimiques retrouvées le long du tractus gastro-intestinal composé de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon, le microbiote devient de plus en plus abondant et diversifié au fur et à mesure que l'on atteint les parties distales du tractus (Figure 7). De plus, les propriétés physico-chimiques de chaque organe influent sur la composition du microbiote qui y réside (Clarke et al. 2019). Au niveau de l'estomac, le pH très acide (pH 1-3 à jeun) limite fortement la croissance bactérienne, qui résulte en un microbiote peu abondant et dominé par des bactéries acido-tolérantes (Figure 7). Au niveau du duodénum, qui est la partie proximale de l'intestin grêle, les sécrétions pancréatiques et biliaires qui s'y déversent vont aussi exercer une activité anti-microbienne (Figure 7). La vitesse de transit très rapide dans l'intestin grêle (3-5 h) est également un facteur limitant de la croissance bactérienne dans ce compartiment. Les bactéries présentes dans la lumière intestinale vont être éluées et seules les bactéries adhérentes au mucus de surface de l'épithélium intestinal vont pouvoir se maintenir et croître. De plus, les taux d'oxygène relativement élevés dans ce compartiment du fait des échanges absorbifs au travers de la paroi intestinale avec les vaisseaux sanguins (riches en oxygène) vont favoriser la croissance de micro-organismes aéro-tolérants ou anaérobies facultatifs. Enfin, au niveau du côlon, compartiment digestif plus dédié à l'absorption d'eau qu'à l'absorption de nutriments, le temps de transit est beaucoup plus lent (24 h – 48 h) favorisant la croissance bactérienne. Tout au long de l'intestin grêle jusqu'au côlon, un gradient inverse de pH et de teneur en oxygène va s'établir pour atteindre un pH proche de la neutralité et une pression partielle en oxygène très faible (anaérobiose) dans le côlon. Ainsi le microbiote du colon est essentiellement composé de micro-organismes anaérobies stricts. Le colon est un haut lieu de fermentation microbienne des nutriments alimentaires qui n'ont pas été absorbés en amont, mais aussi de nutriments endogènes (mucus par exemple) (Flint et al. 2012) (Figure 7). L'alimentation est donc un facteur très influent sur la composition du microbiote intestinal même si d'autres facteurs (génétique de l'hôte, hygiène, médication, stress, etc.) jouent également un rôle (Aziz et al. 2013).

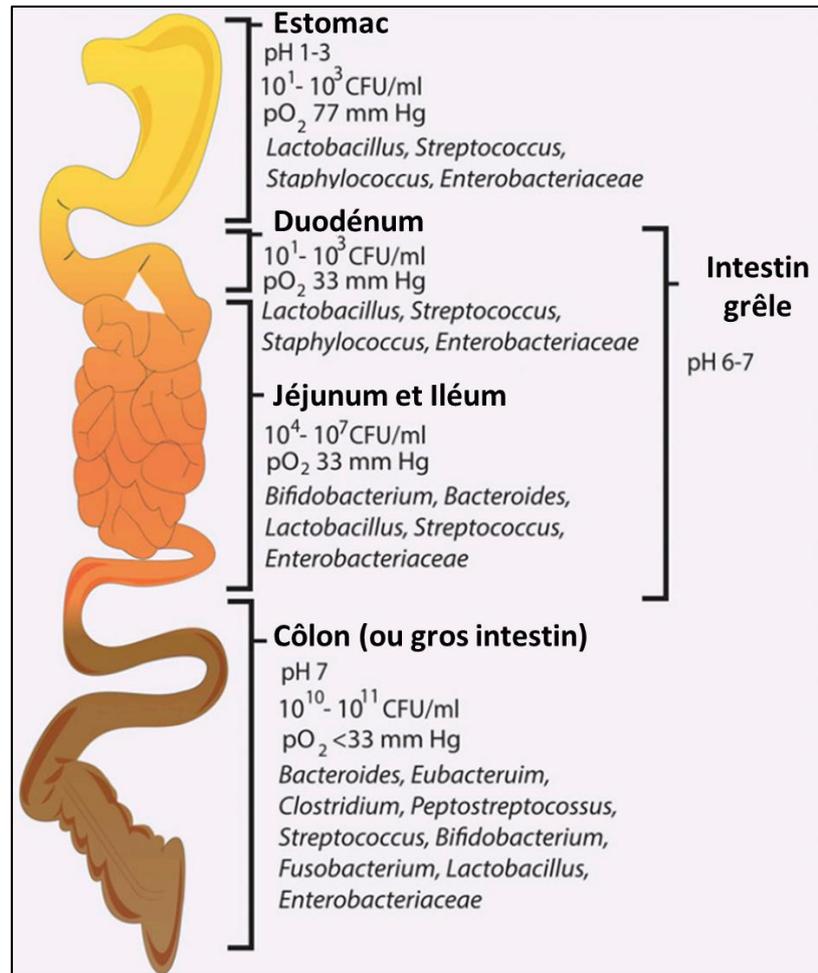


Figure 7. Distribution et organisation du microbiote intestinal à travers le tractus gastro-intestinal. Adapté de Clarke et al. (2019).

2.2. Composition du microbiote intestinal

On estime que le colon dans sa globalité contient plus de 10¹³⁻¹⁴ bactéries. Ces bactéries sont très diverses sur le plan taxonomique puisque plus de 1500 espèces bactériennes ont pu être isolées à ce jour à partir de larges cohortes d'individus (Lagier et al. 2016). Comme mentionné plus haut, le colon est également composé d'archées méthanogènes, de micro-organismes eucaryotes (levures) et de virus (bactériophages) (Arumugam et al. 2011; Lozupone et al. 2012). En 2007-2008, des programmes de recherches de grande envergure portant sur des cohortes de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines d'individus, ont été initiés en Europe (MetaHIT, ELDERMET) et aux USA (HMP) dans le but de mieux caractériser le microbiote intestinal. Chez un individu adulte sain, le microbiote intestinal est principalement composé de bactéries appartenant aux phyla des Firmicutes et des Bacteroidetes qui sont majoritaires, respectivement représentés par une forte proportion de bactéries du genre *Bacteroides* et *Faecalibacterium/Roseburia* (Figure 8). On trouve ensuite des bactéries qui font partie de phyla minoritaires tels que les Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia (Figure 8) (Tremaroli et Bäckhed 2012; Lozupone et al. 2012).

Une étude réalisée sur une cohorte en Europe a montré que le microbiote de chaque individu serait composé de 100 à 200 espèces bactériennes, et bien qu'il y ait des différences interindividuelles significatives, certaines espèces sont constamment présentes chez plus de 90 % des individus. Ces espèces, au nombre de 57, constitueraient donc un noyau commun à tous les individus (Qin et al. 2010). Ce noyau est constitué en majorité par des Firmicutes (genres *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* par exemple) et des Bacteroidetes (genres *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipe* par exemple) (Figure 8). Il faut noter que les espèces bactériennes mises en évidence dans ce noyau commun par méthode moléculaire ont toutes des représentants cultivés. Ceci souligne la complémentarité des approches moléculaires et culturales pour la caractérisation d'un écosystème microbien extrêmement complexe.

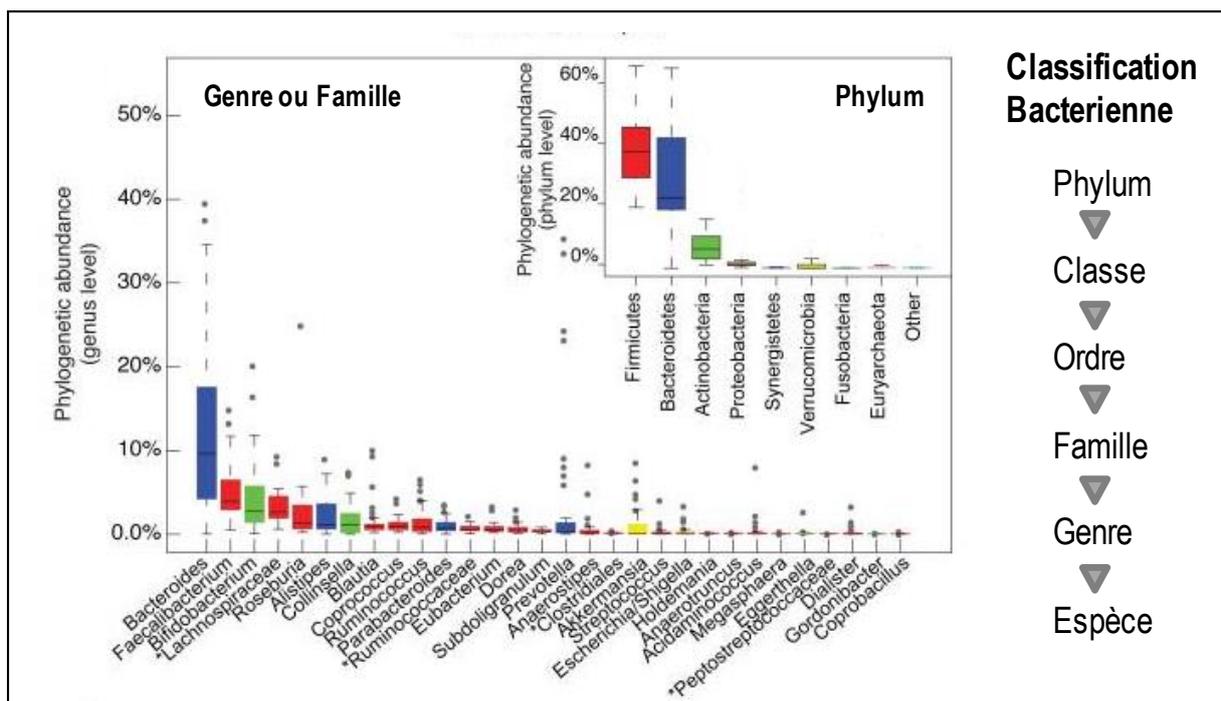


Figure 8. Composition du microbiote intestinal humain. Adapté de Arumugam et al. (2011).

2.2.1. Microbiote intestinal et évolution avec l'âge

Le microbiote intestinal s'implante à la naissance dès les premiers contacts avec les microbiotes (vaginal, fécal, buccal, etc...) de la mère. Dans les premières années de vie, le microbiote est très peu diversifié et dominé par les familles *Bifidobacterium* et *Enterobacteriaceae* avec des différences notables selon le mode d'accouchement (voie basse *versus* césarienne) et d'allaitement (maternel *versus* artificiel) (Quercia et al. 2014). La composition du microbiote évolue ensuite par contact avec l'environnement et lors du passage à une alimentation solide et variée. Le microbiote atteint un état mature et stable avec une composition similaire à celle d'un adulte à l'âge de 3 ans (Quercia et al. 2014; Voreades et al. 2014). Chez les personnes âgées, la composition du microbiote intestinal va se modifier avec, une diminution de la diversité bactérienne, une augmentation des Bacteroidetes au

détriment des Firmicutes, une augmentation des *Enterobacteriaceae* et une diminution des *Bifidobacteriaceae* (Duncan et Flint 2013; Quercia et al. 2014).

2.2.2. Microbiote intestinal, entérotypes et régime alimentaire

En 2011, le séquençage métagénomique du microbiote intestinal de 39 individus a mis en évidence que nous pouvions stratifier la population en trois groupes, nommés « entérotype » A, B et C (Figure 9) (Arumugam et al. 2011). La classification de ces entérotypes est basée sur la dominance de trois genres bactériens : *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus* (Figure 9). Il faut néanmoins préciser que cette classification et l'existence de l'entérotype C (*Ruminococcus*) sont encore sujets à controverse à travers la communauté scientifique (Cheng et Ning 2019).

Un aspect intéressant de cette classification a été révélé par Wu et al. (2011) qui ont montré sur une cohorte de 98 individus sains, que l'entérotype était fortement corrélé au régime alimentaire sur le long terme. L'entérotype *Bacteroides* serait associé à un régime riche en protéines et graisses animales alors que l'entérotype *Prevotella* serait associé à un régime riche en glucides et fibres. Ainsi, l'entérotype *Prevotella* serait plus fréquemment retrouvé chez les individus végétariens (Wu et al. 2011; Moraes et al. 2017). On le trouve également chez des Africains du Burkina Fasso dont le régime est à base de farines de millet, sorgho, et de légumes locaux, et est très pauvre en lipides et protéines animales (De Filippo et al. 2010).

Wu et al. (2011) ont aussi montré qu'un changement de régime pendant 10 jours ne suffit pas à changer d'entérotype. Ces résultats ont été confirmés par une étude sur l'effet à court terme (5 jours) d'un régime riche en fibres ou en protéines animales sur le microbiote. Cette étude a montré que les deux régimes altéraient le microbiote de manière transitoire et réversible, et que le régime « protéines » stimulait certaines espèces susceptibles de déclencher des pathologies digestives inflammatoires. Enfin, une étude plus récente réalisée par Liu et al. (2019) sur dix individus chinois a montré qu'après six mois de changement du régime alimentaire, les entérotypes sont revenus à leur état initial en un mois à partir du moment où ces individus ont repris leurs habitudes alimentaires.

Ce concept d'entérotype reste cependant source d'interrogations. En effet, on peut se demander si un entérotype particulier peut constituer un facteur de prédisposition à développer une pathologie. A ce jour, la communauté scientifique n'a pas encore de réponse. Les recherches se poursuivent afin de mieux comprendre le lien entre régime alimentaire, entérotype et santé.

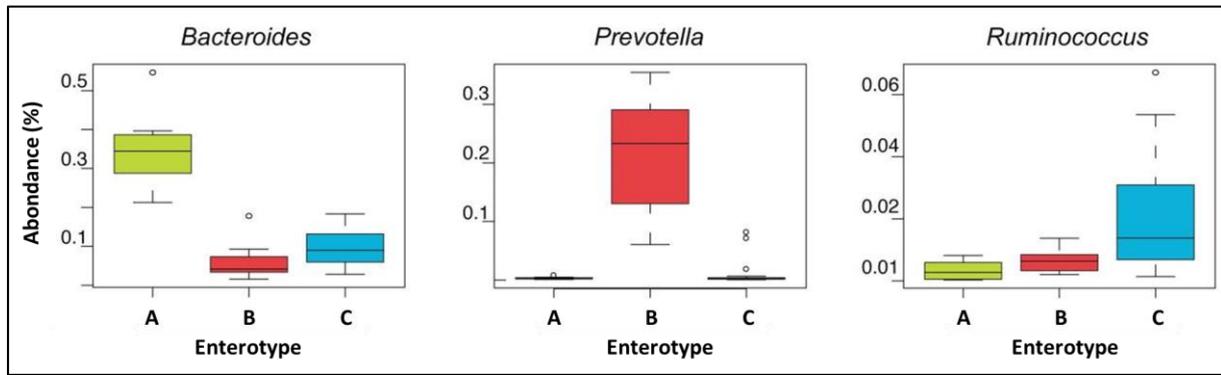


Figure 9. Trois enterotypes distincts dans la population humaine. Adapté de Arumugam et al. (2011). Les enterotypes A (vert), B (rouge) et C (bleu) se caractérisent respectivement par une abondance relative supérieure au sein du microbiote des genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*.

2.2.3. Microbiote intestinal, dysbioses et pathologies

La composition du microbiote est très souvent perturbée de manière irréversible chez les individus malades. Ces déséquilibres marqués du microbiote intestinal (appelés dysbioses, par opposition à eubiose = équilibre) ont été observés dans de nombreuses pathologies digestives (syndrome de l'intestin irritable, maladie de Crohn, cancer colorectal etc) ou extra-digestives (obésité, diabète de type 2, polyarthrite rhumatoïde, Parkinson, etc) (Flint et al. 2012; Zhang et al. 2015; Gagnière 2016; Nishiwaki et al. 2020). Ces dysbioses se caractérisent très souvent par une diminution de la diversité bactérienne, une augmentation des *Proteobacteria* et en particulier la famille des *Enterobacteriaceae* (Baumgart et al. 2007; Winter et Bäumlér 2014). Il faut cependant noter que ce ne sont souvent que des corrélations et que peu d'études ont fait la preuve de cause à effet (Crouzet et al. 2013). De plus, du fait que le microbiote remplit plusieurs fonctions au profit de son hôte, une dysbiose intestinale peut déclencher des dysfonctionnements métaboliques (Chassard et al. 2012) ou s'accompagner de la prolifération de bactéries pathogènes telles que *Clostridium difficile*, qui déclenche des diarrhées chroniques très difficiles à traiter (Theriot et Young 2015). En cas d'infections bactériennes, la prise d'antibiotiques est le plus souvent préconisée. Plusieurs études ont montré que la composition du microbiote peut être perturbée de manière transitoire par la prise d'antibiotiques (Dethlefsen et Relman 2011) mais en général le microbiote revient à son état d'équilibre (Wu et al. 2011; Brown et al. 2012). Par contre, la prise d'antibiotiques de manière trop rapprochée et sur des durées importantes peut déclencher une dysbiose (Dethlefsen et Relman 2011).

Très récemment, l'étude de la composition du microbiote chez des individus présentant des maladies inflammatoires a permis d'identifier un nouvel entérotype, appelé « Bact2 », qui serait associé à une dysbiose. Cet entérotype se caractérise par une forte abondance en *Bacteroides*, une faible abondance en *Faecalibacterium* et une faible densité microbienne (Vieira-Silva et al. 2019). Ce nouvel entérotype serait prévalent chez 13 % de la population ; il serait retrouvé chez 38 % des individus souffrant d'une colite ulcéreuse et jusqu'à 78 % chez les individus souffrant du syndrome de l'intestin irritable (Vieira-

Silva et al. 2019). Vieira-Silva et al (2020) ont montré sur une cohorte de 782 individus, que l'entérotipe Bact2 était retrouvé chez 18 % des personnes obèses (indice de masse corporelle (IMC) ≥ 30), contre 4 % chez les personnes minces ou en léger surpoids (IMC < 30). L'entérotipe Bact2 serait donc associé à l'obésité, aux maladies cardiovasculaires et à une inflammation chronique à bas bruit (Vieira-Silva et al. 2020).

2.3. Fonctions métaboliques du microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal humain possède un répertoire de gènes uniques ($3,36.10^6$ gènes) qui serait plus de 100 fois supérieur au génome humain (25 000 gènes) (Qin et al. 2010; Li et al. 2014; Cheng et Ning 2019). L'ensemble de ces gènes assure de nombreuses fonctions essentielles à l'homéostasie de l'hôte telles que le métabolisme de différents substrats (alimentaires ou endogènes), le développement et la maturation du système immunitaire ou encore la protection contre des agents pathogènes (Figure 8) (Kamada et al. 2013; Thursby et Juge 2017). Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux capacités de dégradation des substrats alimentaires non digérés dans la partie haute du tractus.

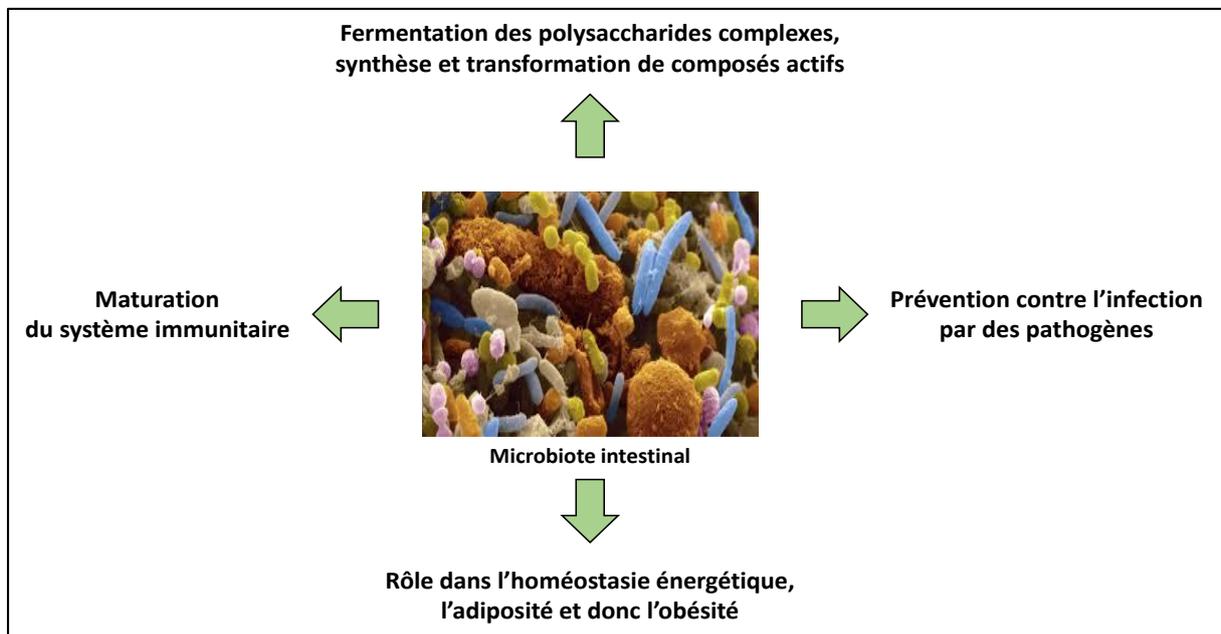


Figure 10. Principales fonctions du microbiote intestinal de l'Homme.

Une des fonctions majeures du microbiote intestinal est la dégradation des fibres alimentaires retrouvées dans les céréales, les fruits et les légumes. Ces fibres sont des glucides plus ou moins complexes (cellulose, hémicelluloses, pectines, amidon résistant) pour lesquels l'Homme ne dispose pas des enzymes nécessaires à leur dégradation (Rajilić-Stojanović et al. 2013). La dégradation anaérobie de ces substrats est un processus complexe faisant intervenir plusieurs espèces bactériennes et archées interagissant entre elles pour former une chaîne trophique. Les premiers acteurs de cette chaîne sont des bactéries fibrolytiques possédant des enzymes permettant de

transformer les polysaccharides en composés plus simples (oses, oligosides...). Les espèces impliquées dans ce processus appartiennent principalement aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* (Gérard et Bernalier-Donadille 2007). Les bactéries fermentaires convertissent ensuite ces produits de dégradation en pyruvate principalement par la voie de la glycolyse. Celui-ci est finalement métabolisé pour former des gaz comme l'hydrogène, le dioxyde de carbone et parfois du méthane, ainsi que des acides gras à chaîne courte (AGCC) dont les principaux sont l'acétate, le propionate et le butyrate (Rajilić-Stojanović et al. 2013). Les AGCC représentent une source énergétique importante pour l'hôte et ont des effets santé reconnus (effets anti-inflammatoire, anti-cancer, anti-obésité) (Arora et al. 2011; Hosseini et al. 2011; Flint et al. 2012).

Les bactéries du microbiote colique interviennent également dans le métabolisme des protéines qui représentent leur principale source d'azote avec 6 à 18 g atteignant le côlon chaque jour (Gérard et Bernalier-Donadille 2007). Tout comme pour les glucides, la dégradation des protéines nécessite l'intervention de plusieurs espèces bactériennes possédant une activité protéolytique comme les genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* ou encore *Lactobacillus* (Bernalier-Donadille 2010). Ceci conduit à la libération de peptides et d'acides aminés qui servent de source d'énergie pour des bactéries incapables de fermenter les glucides comme certaines espèces appartenant aux genres *Veillonella*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Acidaminococcus*, etc. (Bernalier-Donadille 2010). Les acides aminés peuvent également être fermentés pour produire des AGCC dont l'acétate, le propionate et le butyrate. Cependant, la dégradation des protéines conduit aussi à la production de composés pouvant être toxiques pour l'hôte comme l'ammoniaque, des phénols, des indoles ou des amines (Gérard et Bernalier-Donadille 2007).

Enfin, le microbiote intestinal participe également au métabolisme des acides gras. La quantité de lipide atteignant le côlon est estimée entre 4 et 8 g par jour auxquels s'ajoute ceux d'origine bactérienne et ceux provenant de la desquamation des colonocytes (Gérard et Bernalier-Donadille 2007). En fonction de leur structure, les acides gras présents dans le côlon subissent diverses transformations (oxydation, réduction, hydrolyse ...). Le cholestérol est métabolisé *via* le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. Dans le foie, il est transformé en acides biliaires qui sont ensuite conjugués à des molécules de taurine ou de glycine avant d'être sécrétés dans la bile et de rejoindre l'intestin où ils sont réabsorbés au niveau de l'iléon terminal. Cependant 5 à 10 % d'entre eux atteignent le côlon et subissent des réactions de déconjugaison par des bactéries appartenant aux genres *Bacteroides*, *Eubacterium* et *Clostridium* (Nicholson et al. 2012). Ces acides biliaires déconjugués sont ensuite métabolisés pour donner des acides biliaires secondaires (les primaires désignant ceux synthétisés par le foie) (Gérard et Bernalier-Donadille 2007).

Le microbiote intestinal joue donc un rôle majeur dans le métabolisme de nombreux nutriments conduisant à la production de métabolites bénéfiques et parfois délétères pour la santé de l'hôte. En

plus des glucides, des lipides et des protéines, les bactéries du côlon sont également capables de métaboliser d'autres composés présentant également des bienfaits pour l'Homme. Les polyphénols font partie de ces composés.

2.4. Impact des flavan-3-ols sur la composition du microbiote intestinal

Ces cinq dernières années, quelques revues ont fait le point sur l'impact d'un grand nombre de polyphénols sur la composition du microbiote intestinal et suggèrent que les polyphénols ont un effet prébiotique ainsi qu'un effet anti-microbien (Valdés et al. 2015; Tomás-Barberán et al. 2016; Espín et al. 2017; Loo et al. 2020). Malheureusement, peu de données sont disponibles concernant l'effet spécifique des flavan-3-ols puisque les études sont rarement réalisées avec des flavan-3-ols purifiés. Elles utilisent le plus souvent des aliments riches en flavan-3-ols pouvant contenir d'autres constituants alimentaires, comme par exemple les fibres qui sont reconnues pour leurs effets prébiotiques (Le Bourvellec et al. 2019).

En 2017, la définition d'un prébiotique a été revue par des chercheurs experts dans le domaine (Gibson et al. 2017) et est la suivante : un prébiotique est un substrat qui est sélectivement utilisé par des micro-organismes de l'hôte et qui apportent un bénéfice pour la santé. Le fait de spécifier qu'un prébiotique est un « substrat » implique donc que celui-ci doit être métabolisé par les micro-organismes. Les effets santé recherchés concernent non seulement le tractus gastro-intestinal (par exemple, inhibition des agents pathogènes, stimulation immunitaire), mais aussi le cardiométabolisme (par exemple, réduction des taux de lipides sanguins ou de l'insulino-résistance), la santé mentale (par exemple, métabolites qui influencent la fonction cérébrale, l'énergie et la cognition), la santé osseuse (par exemple, la biodisponibilité minérale) et bien d'autres. Les bactéries susceptibles de conférer de tels effets santé ne sont plus aujourd'hui limitées aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* mais incluent d'autres genres potentiellement bénéfiques *i.e.* *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* (Zhou 2017; Chung et al. 2017; Tamanai-Shacoori et al. 2017).

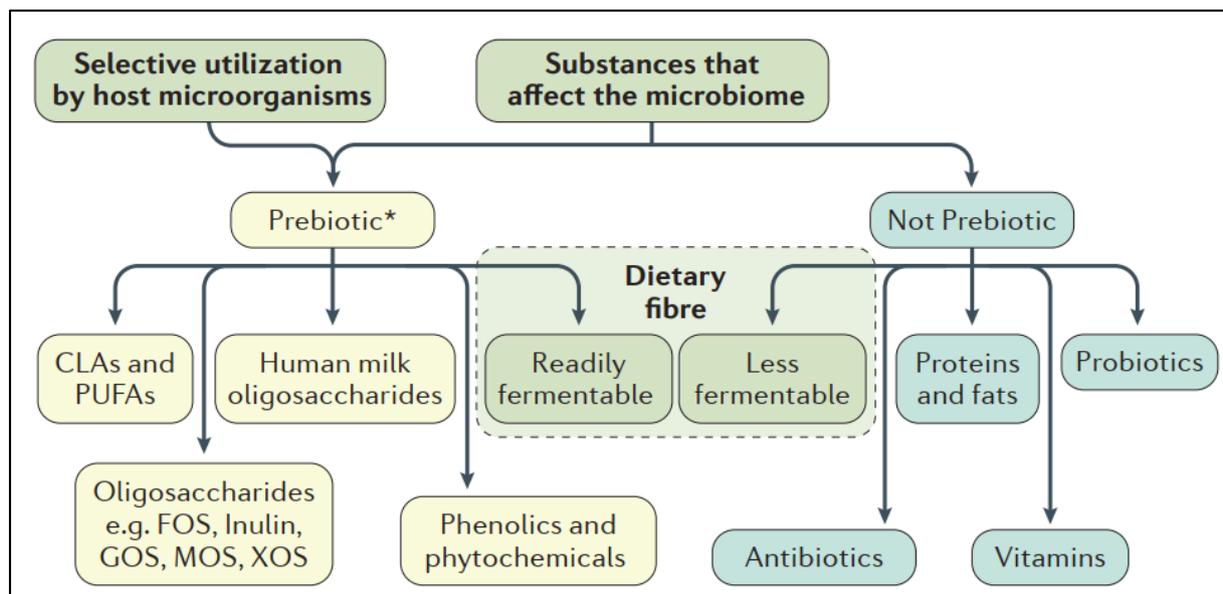


Figure 11. Nouvelle définition d'un « prébiotique » par opposition à un « non-prébiotique » selon Gibson et al. (2017). Les prébiotiques doivent être utilisés de façon sélective et avoir un effet bénéfique démontré sur la santé de l'hôte. Les prébiotiques alimentaires ne doivent pas être dégradés par les enzymes de l'hôte. CLA : acide linoléique conjugué ; PUFA : acides gras polyinsaturés ; FOS : fructo-oligosaccharides ; GOS : galacto-oligosaccharides ; MOS : manno-oligosaccharides ; XOS : xylo-oligosaccharides.

Du fait que certains polyphénols sont métabolisés par le microbiote intestinal (Valdés et al. 2015; Tomás-Barberán et al. 2016; Espín et al. 2017; Loo et al. 2020), ils deviennent donc des prébiotiques potentiels (Gibson et al. 2017). La revue de Loo et al. (2020) fait le bilan des effets des flavan-3-ols sur le microbiote intestinal obtenus par des approches *in vitro* en cultures pures ou en fermenteurs, et *in vivo* dans le cadre d'interventions nutritionnelles chez l'Homme ou chez des rongeurs. Les études *in vivo* ont essentiellement été réalisées avec des boissons ou extraits riches en flavan-3-ols comme le thé (vert, noir etc.). Les résultats sont très variables en fonction des flavan-3-ols testés (purs, mélanges, extraits, boissons), des doses administrées, de la durée de l'intervention et des méthodes utilisées pour quantifier les micro-organismes. Ainsi, pour l'instant l'effet prébiotique des flavan-3-ols n'est pas vraiment démontré. Seules deux études réalisées en fermenteur avec du microbiote fécal suggèrent que les monomères de flavan-3-ols ont un effet prébiotiques du fait d'une augmentation de *Bifidobacterium* spp., du groupe *Eubacterium rectale* et du groupe *Lactobacillus/Enterococcus* (Tzounis et al. 2008; Zhang et al. 2013). Une étude réalisée chez l'Homme montre que la consommation journalière de thé vert pendant dix jours est associée à une augmentation de *Bifidobacterium* spp. (Jin et al. 2012). Enfin, une étude interventionnelle chez le rat montre que la consommation d'extraits de canneberges (riches en proanthocyanidines de type A) pendant 8 semaines induit une augmentation de *Akkermansia* spp. (Anhê et al. 2015). D'autres études sont nécessaires afin de valider ces effets prébiotiques et de comprendre par quels mécanismes les flavan-3-ols les induisent. En effet, au sein d'une communauté complexe de micro-organismes en interactions (compétition etc), la croissance de

certaines bactéries bénéfiques pourrait être simplement due au fait que les flavan-3-ols inhibent la croissance d'autres bactéries commensales compétitives au sein de la communauté et libèrent ainsi une niche pour les premières.

Les flavan-3-ols ont comme tous les polyphénols une activité anti-microbienne qui peut être associée à un effet bactériostatique (inhibition de croissance) ou bactéricide (lyse bactérienne) ou à une inhibition de l'adhésion bactérienne aux cellules intestinales (Selma et al. 2009). Cette activité peut s'avérer intéressante si elle cible préférentiellement les bactéries pathogènes qui peuvent coloniser le tube digestif. Ainsi, plusieurs études *in vitro* ont montré l'impact négatif des flavan-3-ols sur un certain nombre de bactéries pathogènes (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, etc) en réduisant leur croissance ou en limitant leur adhésion aux cellules (Lee et al. 2006; Parkar et al. 2008; Janecki et Kolodziej 2010). Enfin, il a été montré chez l'Homme que la consommation de vin rouge et de canneberge inhibait certaines bactéries pathogènes du genre *Clostridium* (Queipo-Ortuño et al. 2012).

En conclusion, le microbiote intestinal humain est constitué d'une grande diversité de micro-organismes assurant différentes fonctions métaboliques. L'impact des flavan-3-ols sur la composition du microbiote intestinal n'est pas encore bien décrit mais quelques études suggèrent des effets prébiotiques et anti-pathogènes. Les micro-organismes du microbiote intestinal humain, comme nous allons le voir dans le chapitre qui suit, vont quant à eux dégrader les flavan-3-ols en métabolites phénoliques dont certains auraient des activités biologiques tout aussi intéressantes que leur précurseurs (Cueva et al. 2010).

3. Chapitre 3 : Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal humain

Comme décrit précédemment (cf. 1.3.3.2), la grande majorité des flavan-3-ols n'est pas absorbée au niveau de l'intestin grêle et arrive au niveau du côlon (Roowi et al. 2010). C'est dans ce compartiment digestif distal que le microbiote commensal, constitué d'une grande diversité de micro-organismes, va jouer un rôle essentiel dans la dégradation des flavan-3-ols (Déprez et al. 2000; Griffiths et Barrow 1972).

Dans ce sous chapitre seront présentées les connaissances acquises sur la dégradation des flavan-3-ols obtenues au travers d'études réalisées *in vitro* ou *in vivo* avec un microbiote complexe sans que les auteurs n'aient systématiquement étudié la composition du microbiote.

3.1. Dégradation des flavan-3-ols monomères par le microbiote intestinal

Différentes études ont comparé les cinétiques de dégradation des deux monomères les plus fréquemment retrouvés dans notre alimentation, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine. Ces monomères sont très rapidement dégradés (>90 % de dégradation) après 6 à 12 heures d'incubations *in vitro* avec des selles humaines (Sánchez-Patán et al. 2012; Ou et al. 2014). Cependant, des différences de métabolisation ont été relevées entre les deux stéréoisomères. La (-)-épicatéchine n'est dégradée qu'à 69,8 % en présence d'échantillons de selles humaines, alors que la (+)-catéchine est dégradée à 91,4 %, après 24 heures de culture (Aura et al. 2008). En revanche, avec des fèces de rats, la (-)-épicatéchine est dégradée complètement alors que la (+)-catéchine n'est dégradée qu'à 90 % (Serra et al. 2011). L'orientation du groupement hydroxyle au niveau du carbone C₃ du cycle C (Figure 12) aurait donc un impact sur la capacité du microbiote à dégrader ces deux précurseurs, même si cette différence de dégradation entre les deux stéréoisomères reste à confirmer. L'influence du groupement gallate et de la présence d'un troisième groupement hydroxyle sur le cycle A du monomère de (-)-épicatéchine a été étudiée, mais aucune différence sur la vitesse de dégradation n'a été observée entre ces quatre précurseurs (Meselhy et al. 1997).

Dans d'autres travaux réalisés *in vitro*, des différences inter-individuelles ont pu être observées en comparant la métabolisation de trois monomères par le microbiote de selles de trois individus. Ainsi, il apparaît qu'un des individus est capable de dégrader la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et la (-)-épicatéchine-3-O-gallate en seulement 10 heures, alors qu'un autre est capable de dégrader la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine en un temps similaire, mais met 24 heures pour dégrader la (-)-épicatéchine-3-O-gallate. Le dernier individu métabolise la (-)-épicatéchine-3-O-gallate en seulement 10 heures et les deux autres monomères en 24 heures (Sánchez-Patán et al. 2012). Ces différences dans la vitesse de métabolisation des monomères suggèrent que la composition du microbiote fécal de chaque individu influence le métabolisme des flavan-3-ols. A notre connaissance, une seule étude réalisée *in vivo* chez l'homme a confirmé ces résultats en utilisant un précurseur (-)-épicatéchine marqué au ¹⁴C et en suivant son métabolisme après ingestion par huit individus. Le

suivi du marquage a permis de tracer le précurseur non dégradé dans les urines à hauteur de 20 % de la quantité ingérée alors que 70 % est détecté sous forme dégradée dans les selles et l'urine (Ottaviani et al. 2016).

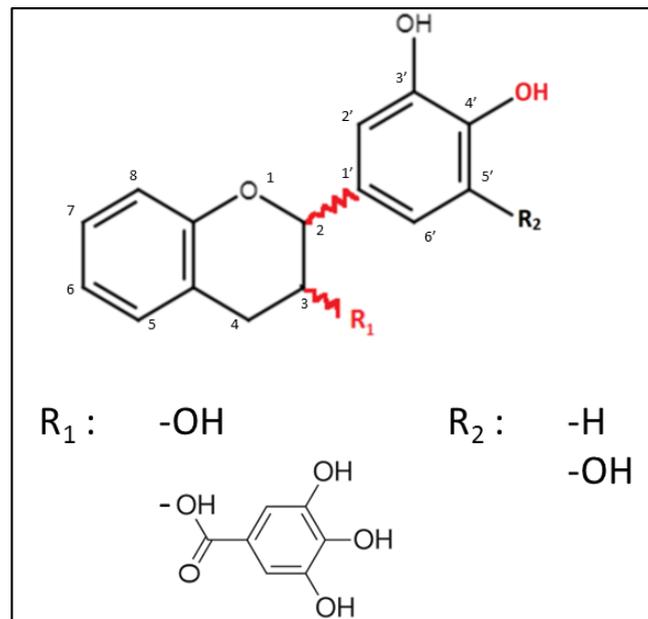


Figure 12. Importance de l'orientation des carbones et des chaînes latérales sur le métabolisme des monomères de flavan-3-ols. Les carbones en C₂ et C₃ sont asymétriques entraînant la possibilité de quatre énantiomères. Le carbone C₃, peut être estérifié ou non par de l'acide gallique. Le carbone C_{5'} peut être hydroxylé. En rouge sont représentés les éléments qui influent sur la dégradation des monomères de flavan-3-ols. La présence d'un groupement hydroxyle en C₃ et C_{4'} est indispensable à la dégradation des monomères et l'asymétrie des carbones en C₂ et C₃ influent sur leur vitesse de dégradation.

Le métabolisme des monomères estérifiés par l'acide gallique au niveau du C₃ demande une étape supplémentaire de métabolisation. Cette étape consiste en un clivage de la liaison ester qui permet l'obtention du monomère hydroxylé (libre) en C₃ d'une part et de l'acide gallique d'autre part (Figure 13). La présence du résidu gallate en C₃ inhibe la dégradation du monomère. Une expérience menée *in vitro* avec des fèces de rats a montré que le microbiote est incapable de dégrader les monomères (-)-épicatéchine-3-O-gallate et (-)-épigallocatechine-3-O-gallate alors que les monomères non estérifiés par de l'acide gallique sont facilement dégradés (Meselhy et al. 1997). De fait, la présence d'un groupement OH libre sur le carbone C₃ (Figure 12) est nécessaire à la poursuite de la métabolisation par le microbiote. Ainsi, après supplémentation alimentaire de trois individus avec la 3-O-méthyl-(+)-catéchine marquée au ¹⁴C sur le méthyle, aucun métabolite microbien n'a pu être détecté dans leur urine (Hackett et al. 1985).

La présence d'un groupement OH libre sur le carbone C_{4'} (Figure 12) serait également nécessaire pour la métabolisation des monomères par le microbiote (Meselhy et al. 1997).

Pour conclure, la dégradation des monomères au contact du microbiote intestinal est rapide, quasi-totale à condition d'avoir les groupements OH libres en C₃ et C₄' , ces derniers étant déterminants pour la dégradation. Néanmoins des différences inter-individuelles encore inexpliquées sont observées, elles seraient peut-être liées à la composition du microbiote. Les voies métaboliques de la dégradation microbienne des monomères de flavan-3-ols sont traités dans le chapitre suivant (cf. 3.2).

3.2. Voies métaboliques de dégradation des monomères de flavan-3-ols

3.2.1. Productions des dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols

La première étape du métabolisme des monomères d'(épi)catéchine et d'(épi)gallocatéchine consiste en l'ouverture du cycle C au niveau de la liaison entre l'oxygène et le carbone C₂, ce qui rend accessible le groupement phloroglucinol (cycle A) et génère des dérivés (di/tri)hydroxyphényl-propan-2-ols (Figure 13) (Ozidal et al. 2016).

Ces métabolites formés après ouverture du cycle C gardent la stéréochimie du carbone C₃ parental, donnant par exemple un métabolite différent à partir de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine (Figure 13) (Meselhy et al. 1997). Comme il a été rapporté plus haut, la présence d'un résidu gallate sur le carbone C₃ empêche l'étape d'ouverture du cycle C ; la liaison ester doit donc être hydrolysée au préalable (Meselhy et al. 1997).

Ces métabolites peuvent ensuite subir une étape de déshydroxylation du cycle B sur le carbone C₄' pour générer des dérivés (mono/di)hydroxyphényl-propan-2-ols (Figure 13) (Ozidal et al. 2016). Elle n'est cependant pas systématique. Aucun métabolite déshydroxylé sur le carbone C₃' , ni sur les carbones C₃' et C₄' à la fois n'a été observé à ce jour. Une étude cinétique réalisée *in vitro* avec un microbiote issu de selles humaines a ensuite montré que ces métabolites (dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols) sont transitoires et disparaissent rapidement du milieu de culture (Sánchez-Patán et al. 2012). Ce résultat corrobore les résultats d'une étude *in vivo* effectuée chez l'Homme où ces molécules n'ont été trouvées ni dans le sang, ni dans l'urine, ni dans les selles, montrant ainsi qu'elles sont rapidement dégradées en d'autres métabolites (Ottaviani et al. 2016).

Notons que l'ordre des réactions de dégradation des monomères présenté dans la Figure 13 n'est plus remis en question, avec d'abord l'ouverture du cycle C, puis la possible déshydroxylation du carbone C₄' du cycle B (Meselhy et al. 1997). De plus, ces dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols sont uniques au métabolisme microbien des flavan-3-ols et n'ont jamais été observés à partir d'une autre classe de polyphénol. Ce sont donc des marqueurs du métabolisme initial des monomères de flavan-3-ols (Ozidal et al. 2016).

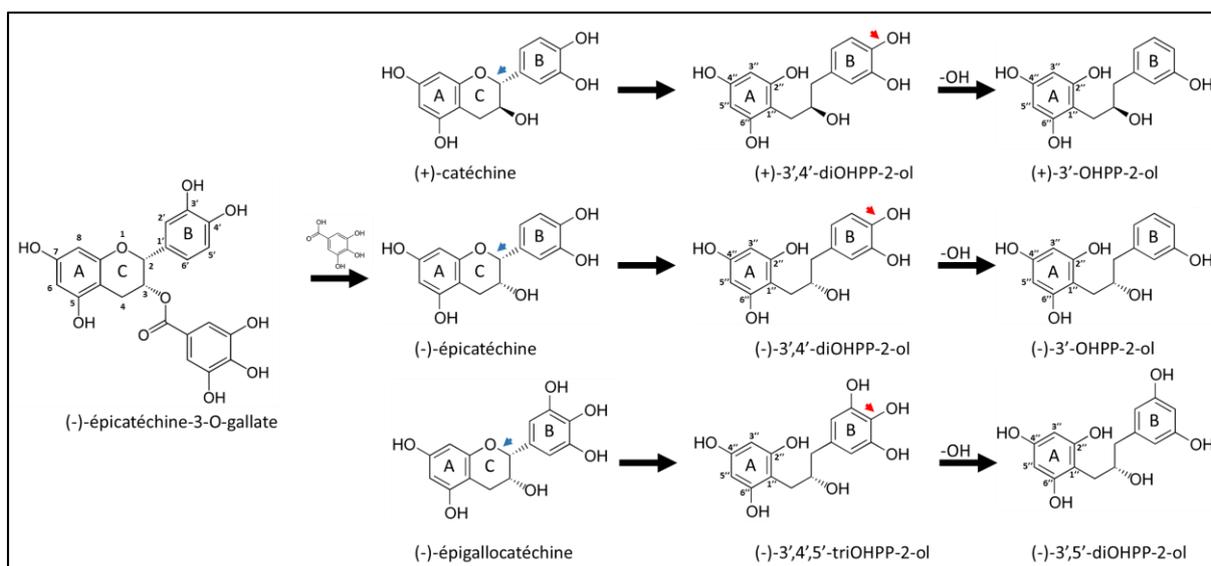


Figure 13. Premières étapes de la dégradation des monomères de flavan-3-ols par le microbiote intestinal : ouverture du cycle C et déshydroxylation du cycle B. En présence de résidu gallate, une première étape de désestérification du C₃ doit être réalisée. Ensuite la dégradation des monomères se poursuit par la réaction d'ouverture du cycle C (flèches bleues), puis une étape de déshydroxylation peut également avoir lieu sur le groupement hydroxyle en C_{4'} (flèches rouges).

(+)-3',4'-diOHPP-2-ol = (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(+)-3'-OHPP-2-ol = (+)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4'-diOHPP-2-ol = (-)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3'-OHPP-2-ol = (-)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4',5'-trihOHPP-2-ol = (-)-1-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',5'-diOHPP-2-ol = (-)-1-(3',5'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol.

3.2.2. Production des dérivés de phényl-γ-valérolactones et d'acides phénylvalériques

De façon similaire aux dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols, les dérivés phényl-γ-valérolactones et les dérivés d'acides phénylvalériques (Figure 14) sont uniques au métabolisme microbien des flavan-3-ols (Mena et al. 2019). Une étude de fermentation *in vitro* de différents fruits par des selles humaines ne met en évidence ces métabolites qu'à partir de fruits contenant des flavan-3-ols (Dall'Asta et al. 2012). De plus, ils n'ont jamais été observés dans le cadre d'autres expériences *in vitro* utilisant d'autres polyphénols alimentaires (Sadeghi Ekbatan et al. 2016).

Molécules	Schéma
Dérivés phényl-γ-valérolactones	
5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-γ-valérolactone	R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH
5-(3',4'-dihydroxyphényl)-γ-valérolactone	R ₁ =R ₂ =OH R ₃ =H
5-(3',5'-dihydroxyphényl)-γ-valérolactone	R ₁ =R ₃ =OH R ₂ =H
5-(3'-hydroxyphényl)-γ-valérolactone	R ₁ =OH R ₂ =R ₃ =H
5-phényl-γ-valérolactone	R ₁ =R ₂ =R ₃ =H
Dérivés acides phénylvalériques	
Acide 4-hydroxy-5-(3',4',5'-trihydroxyphényl) valérique	R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH
Acide 4-hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphényl) valérique	R ₁ =R ₂ =R ₄ =OH R ₃ =H
Acide 4-hydroxy-5-(3',5'-dihydroxyphényl) valérique	R ₁ =R ₃ =R ₄ =OH R ₂ =H
Acide 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl) valérique	R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH R ₄ =H
Acide 5-(3',4'-dihydroxyphényl) valérique	R ₁ =R ₂ =OH R ₃ =R ₄ =H
Acide 5-(3',5'-dihydroxyphényl) valérique	R ₁ =R ₃ =OH R ₂ =R ₄ =H
Acide 5-(3'-hydroxyphényl) valérique	R ₁ =OH R ₂ =R ₃ =R ₄ =H
Acide 5-phénylvalérique	R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H

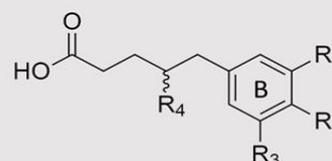
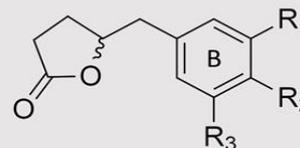


Figure 14. Dérivés phényl-γ-valérolactones et d'acides phénylvalériques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols.

La formation de ces métabolites à partir des monomères de flavan-3-ols est bien décrite. Ces métabolites sont formés par l'ouverture du cycle A à partir des monomères déjà ouverts sur le cycle C c'est-à-dire, les dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols (Figure 15). Ce clivage du cycle A génère les trois dérivés d'acides 4-hydroxy-5-(mono/di/tri)-hydroxyphényl valériques, qui peuvent se lactoniser (par cyclisation de la fonction acide avec l'hydroxyle en position C₄ (R₄)) pour former les trois (mono/di/tri)-hydroxyphényl-γ-valérolactones. Un équilibre entre les deux formes acide et lactone se met en place et dépend du pH du milieu, l'acidification du milieu déplaçant l'équilibre vers la forme lactone (Takagaki et Nanjo 2010). Ces métabolites gardent donc un squelette à cinq carbones avec le cycle B intact (Figure 15). Ils peuvent ensuite être déshydroxylés, sur les carbones C_{3'}(R₁), C_{4'}(R₂), C_{5'}(R₃) du cycle B et également sur le carbone C₄ (R₄) de la chaîne latérale, donnant lieu à cinq formes de phényl-γ-valérolactones et sept formes d'acide phénylvalériques (Figure 15) (Mena et al. 2019). Tous ces métabolites sont également transitoires mais ils ont une durée de vie suffisante pour être détectés *in vivo* dans le sang et l'urine d'individus consommant des flavan-3-ols (Ottaviani et al. 2016).

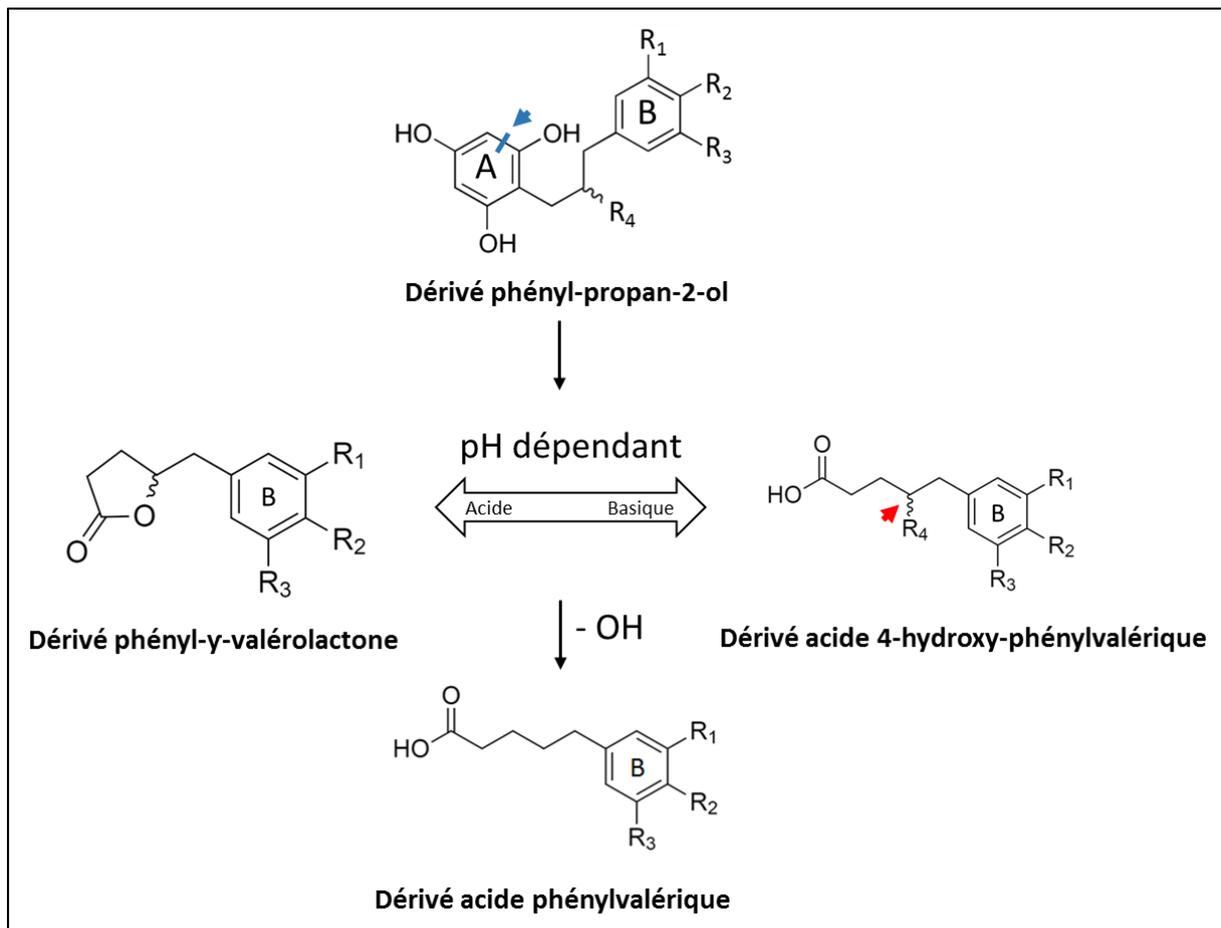


Figure 15. Seconde étape de la dégradation des monomères de flavan-3-ols par le microbiote intestinal : ouverture du cycle A. Après ouverture du cycle C des flavan-3-ols et la formation des dérivés phényl-propan-2-ols, le microbiote intestinal va cliver le cycle A (flèche bleue) pour former les dérivés phényl-γ-valérolactones et acides 4-hydroxy-phénylvalériques, dont les deux formes sont en équilibre et qui dépendent du pH de la solution. Les groupements hydroxyles (R_1 , R_2 et R_3) du cycle B pourront être déshydroxylés. La déshydroxylation du groupement R_4 (flèche rouge) entraîne la formation des dérivés acides phénylvalériques. R_1 , R_2 et R_3 pouvant être un groupement OH ou H. R_4 étant un groupement OH orienté en R ou S.

3.2.3. Production des dérivés d'acides phénylpropioniques

Les dérivés d'acides phénylpropioniques sont des métabolites importants du métabolisme des flavan-3-ols bien qu'ils soient communs au métabolisme microbien d'autres polyphénols (très décrit pour la quercétine par exemple) (Williamson et Clifford 2010; Najmanová et al. 2016; Sadeghi Ekbatan et al. 2016). Pour la suite de cette étude bibliographique, nous verrons comment ces métabolites microbiens sont générés à partir des flavan-3-ols.

A ce jour, quatre principaux dérivés d'acides phénylpropioniques ont été décrits lors d'études menées *in vitro* et *in vivo* avec des flavan-3-ols (Figure 16).

Molécules	Schéma
Dérivés acides phénylpropioniques	
Acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique	$R_1=R_2=OH$
Acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique	$R_1=OH R_2=H$
Acide 3-(4'-hydroxyphényl) propionique	$R_1=H R_2=OH$
Acide 3-phénylpropionique	$R_1=R_2=H$

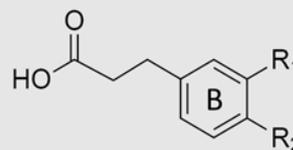


Figure 16. Dérivés d'acides phénylpropioniques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols.

Ces molécules sont issues de la β -oxydation des dérivés d'acides phénylvalériques (Monagas et al. 2010), réaction qui raccourcit la chaîne latérale de cinq à trois carbones et garde le cycle B intact. Ces métabolites peuvent ensuite subir plusieurs déshydroxylations sur le cycle B (R_1 et R_2) jusqu'à la forme non hydroxylée ; ils sont ensuite dégradés en d'autres dérivés phénoliques décrits ci-après (Le Bourvellec et al. 2019). La déshydroxylation de l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique se ferait préférentiellement sur le carbone C_4' (R_2) (Meselhy et al. 1997). Cette hypothèse est en accord avec la plus grande prévalence observée *in vitro* de l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique par rapport à l'acide 3-(4'-hydroxyphényl) propionique lors d'incubations avec des selles humaines supplémentées avec un extrait de pépins de raisin riche en flavan-3-ols (Sánchez-Patán et al. 2012).

La production de ces métabolites a été observée lors d'incubations *in vitro* de microbiotes de selles humaines avec les monomères de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine (Aura et al. 2008; Appeldoorn et al. 2009; Stoupi et al. 2010a; Ou et al. 2014). Néanmoins, les métabolites produits sont différents selon les études. Par exemple, avec le même précurseur tel que la (-)-épicatéchine, l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique n'a été détecté que dans une étude (Ou et al. 2014), mais pas dans deux autres (Aura et al. 2008; Stoupi et al. 2010a). Ces différences sont probablement le reflet de la composition et des capacités métaboliques des microbiotes utilisés. Des différences du même ordre ont pu être observées *in vitro* avec un extrait de pépins de raisin riche en flavan-3-ols. Sur trois microbiotes testés, l'un produit l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique qui s'accumule dans le surnageant de culture alors que les deux autres ne sont pas capable de produire l'acide 3-(4'-hydroxyphényl) propionique (Sánchez-Patán et al. 2012). Enfin, une différence dans la production de l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique a aussi été observée lors d'une étude chez l'Homme après consommation d'extraits de thé vert (Mena et al. 2019).

3.2.4. Production des dérivés d'acides phénylacétiques

La métabolisation microbienne des flavan-3-ols génère le plus souvent quatre dérivés d'acides phénylacétiques (Figure 17) (Chen et Sang 2014). Une des voies de formation de ces métabolites passe par une α -oxydation des dérivés d'acides phénylpropioniques, réaction qui réduit la chaîne latérale de trois à deux carbones tout en conservant le cycle B intact. Les groupements hydroxyles en C_3' (R_1) et

C₄' (R₂) peuvent aussi être déshydroxylés jusqu'à l'obtention de l'acide phénylacétique (Stoupi et al. 2010a; Sánchez-Patán et al. 2012).

Molécules	Schéma
Dérivés acides phénylacétiques	
Acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique	R ₁ =R ₂ =OH
Acide 2-(3'-hydroxyphényl) acétique	R ₁ =OH R ₂ =H
Acide 2-(4'-hydroxyphényl) acétique	R ₁ =H R ₂ =OH
Acide 2-phénylacétique	R ₁ =R ₂ =H

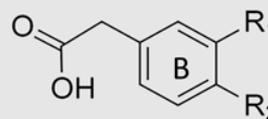


Figure 17. Dérivés d'acides phénylacétiques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols

Les dérivés d'acides phénylacétiques ne sont pas des métabolites microbiens spécifiques des flavan-3-ols dans la mesure où ils peuvent être produits à partir d'un autre polyphénol, la quercétine (acides 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique et 2-(3'-hydroxyphényl) acétique) (Rechner et al, 2004) et à partir de deux acides aminés, la tyrosine et la phénylalanine (acides 2-(4'-hydroxyphényl) acétique et 2-phényl acétique) (Curtius and Mettler, 1976). Pour la suite de cette étude bibliographique, je me focaliserai sur la genèse des dérivés d'acides phénylacétiques à partir des flavan-3-ols.

Une étude *in vitro* réalisée avec des selles humaines a montré que l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique n'est pas retrouvé à partir de la dégradation des deux monomères de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine, alors que les trois autres métabolites le sont (Figure 17) (Ou et al, 2014). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la voie métabolique d'obtention des dérivés d'acides phénylacétiques à partir des monomères passe par toutes les étapes décrites précédemment (ouvertures des cycles A et C, réduction de chaînes, et déshydroxylation du cycle B) et peut donc s'avérer limitante. Une autre explication est que ce métabolite est transitoire et ne s'accumule pas dans le milieu de culture (Le Bourvellec et al. 2019).

3.2.5. Production des dérivés d'acides benzoïques

Les dérivés d'acides benzoïques (Figure 18) font partis des métabolites finaux du métabolisme microbien des flavan-3-ols (Sánchez-Patán et al. 2012; Chen et Sang, 2014), mais également d'autres polyphénols (Serra et al. 2011) et d'autres précurseurs (phénylalanine et tyrosine) (Curtius et al. 1976). Ils sont formés à partir des dérivés d'acides phénylpropioniques par β -oxydation (perte de deux carbones sur la chaîne latérale) et à partir des dérivés d'acides phénylacétiques par α -oxydation (perte d'un carbone) (Das et Griffiths 1969; Curtius et al. 1976; Monagas et al. 2010).

La formation de ces dérivés peut se faire de façon plus directe à partir de l'acide 3',4',5'-trihydroxybenzoïque, nommé également acide gallique. Lors du métabolisme des flavan-3-ols galloylés, l'acide gallique peut-être obtenu par hydrolyse de la liaison ester (Figure 13) (Meselhy et al.

1997). Cela a notamment été observé avec un extrait de pépins de raisin riches en monomères et en procyanidines galloylés. L'acide gallique a rapidement été produit dès les premières heures d'incubation *in vitro* avec des selles humaines, bien avant l'apparition des dérivés d'acides phénylpropioniques et phénylacétiques, précurseurs des dérivés d'acides benzoïques (Sánchez-Patán et al. 2012).

L'acide gallique peut ensuite être décarboxylé pour former le 1,2,3-trihydroxybenzène (pyrogallol) (Meselhy et al. 1997), puis déshydroxylé en catéchol (Roowi et al. 2010; Sánchez-Patán et al. 2012).

Molécules	Schéma
Dérivés acides benzoïques	
Acide 3',4',5'-trihydroxybenzoïque	$R_1=R_2=R_3=OH$
Acide 3',4'-dihydroxybenzoïque	$R_1=R_2=OH$
Acide 3'-hydroxybenzoïque	$R_1=OH R_2=H$
Acide 4'-hydroxybenzoïque	$R_1=H R_2=OH$
Acide phénylbenzoïque	$R_1=R_2=H$

Figure 18. Dérivés d'acides benzoïques issus du métabolisme microbien des flavan-3-ols

3.3. Voies métaboliques de dégradation des oligomères de flavan-3-ols

La majorité des flavan-3-ols qui atteint l'intestin et qui est au contact du microbiote intestinal se trouve sous la forme d'oligomères et de polymères (procyanidines). Pourtant, la plupart des travaux sur les voies de dégradation des flavan-3-ols se sont focalisés sur les monomères. Ainsi de nombreuses zones d'ombres persistent encore dans la connaissance des mécanismes de dégradation des procyanidines par le microbiote intestinal bien que l'on sache depuis de nombreuses années qu'elles sont dégradées (Déprez et al. 2000). Les études réalisées chez l'Homme ont surtout porté sur les procyanidines de type B qui correspondent aux oligomères majoritairement retrouvés dans l'alimentation (cf. 1.3.2).

3.3.1. Impact des liaisons interflavoniques et du degré de polymérisation sur la dégradation des procyanidines

Comme décrit dans le chapitre I de cette étude bibliographique, les procyanidines sont classées en deux groupes (type B ou A) selon la nature de la ou des liaisons interflavoniques et peuvent atteindre des degrés de polymérisation très élevés (Figure 4) (cf. 1.3). Ces différences structurales ont un impact sur la capacité du microbiote à dégrader les procyanidines. Une étude réalisée *in vitro* avec des microbiotes humains montre que les dimères A₂ (une liaison interflavonique et une liaison éther) sont plus difficilement dégradés que les dimères B₂ (une liaison interflavonique) (Ou et al. 2014). L'hypothèse avancée par les auteurs est que la liaison éther additionnelle rend les dimères de type A plus résistants à la dégradation. Cette étude montre aussi que les monomères ((+)-catéchine et (-)-épicatéchine) sont plus facilement dégradés que les dimères de type B ou de type A (Ou et al. 2014).

De même, les dimères de type A sont mieux dégradés que les trimères (étude *in vitro* avec microbiote fécal de porc) (Engemann et al. 2012). L'étude de la dégradation des dimères de type B (B₁ à B₄) n'a montré aucune différence bien que ces dimères divergent dans leur composition en (+)-catéchine et en (-)-épicatéchine (Tableau 1) (Appeldoorn et al. 2009). D'autres travaux réalisés *in vitro* confirment ces résultats avec cependant des variations inter-individuelles sur les capacités de dégradation des dimères par le microbiote (Sánchez-Patán et al. 2012). Le degré de polymérisation (DP) des oligomères de type B influe également sur la capacité du microbiote à les dégrader. Des études de supplémentation *in vivo* réalisées chez l'Homme et le rat ont montré que plus le DP est élevé, moins les procyanidines sont dégradées. Ainsi, la supplémentation en flavan-3-ols (procyanidines de type B) avec des DP croissants corrèle avec une moindre excrétion urinaire de métabolites phénoliques microbiens (Gonthier et al. 2003; Hollands et al. 2020). Cette diminution de la biodisponibilité des métabolites phénoliques pourrait donc être due à une moindre dégradation microbienne des procyanidines ayant des DP élevés mais pourrait aussi s'expliquer par un effet antimicrobien des procyanidines qui inhiberaient la croissance des micro-organismes impliqués dans leur métabolisation ; il est aussi possible que les interactions qui se créent entre les procyanidines de haut DP et les protéines ou polysides (fibres) alimentaires rendent les procyanidines moins accessibles aux enzymes microbiennes (Scalbert, 1991; Abia et Fry 2001; Le Bourvellec et al. 2019).

3.3.2. Premières étapes de la dégradation microbienne des procyanidines

Les voies de dégradation des procyanidines par le microbiote intestinal humain sont plus complexes que celles des monomères mais la formation de métabolites communs laisse penser qu'il existe certaines similitudes dans leur métabolisme. Les points de divergences résident surtout dans les premières réactions de bioconversion de ces structures oligomériques en molécules plus simples et plus faciles à métaboliser. La dégradation des dimères et trimères de type B liés en C₄-C₈ a été principalement étudiée du fait de leur prédominance. Plusieurs voies métaboliques ont été proposées, mais aucune ne semble faire l'unanimité. En ce qui concerne les procyanidines de type B, une étude réalisée *in vitro* avec des microbiotes humains suggère que la libération des monomères par la rupture de la liaison interflavanique des dimères B₂ ne se déroulerait que dans 10 % des cas (Stoupi et al. 2010a). Une autre hypothèse serait que la rupture se déroule dans un second temps après ouverture du ou des cycle(s) C présent(s) au sein d'un dimère. Une étude similaire a permis de mettre en évidence 24 métabolites dimériques (Stoupi et al. 2010b). L'étude de leur structure par fragmentation des ions (LC-ESI-MS/MS) a mis en évidence que la moitié de ces métabolites présentaient un ou deux cycles C ouverts (Figure 19). Ces métabolites étant transitoires, ils n'ont été détectés que sur les neuf premières heures d'incubation et ne représentent que 20 % de la fraction initiale. Une autre étude *in vitro* avec le même dimère B₂ n'a pu confirmer ces résultats (Appeldoorn et al. 2009). En revanche, dans une

expérience réalisée *in vivo* chez la souris, une forme ouverte du cycle C du dimère B₂ a été observée dans le sang et les urines (Xiao et al. 2017). La mise en évidence de ces métabolites dimériques s'avère problématique dans la mesure où ces métabolites sont difficiles à caractériser sur le plan analytique, qu'ils sont produits en très faible proportion et que leur présence est éphémère (Stoupi et al. 2010b). D'autres travaux doivent donc être réalisés pour élucider les premières étapes de dégradation des procyanidines de type B. En ce qui concerne les procyanidines de type A, deux études ont observé un même métabolite dimérique après incubation du dimère A₂ avec des selles de porc et de rat (Engemann et al. 2012; Ge et al. 2015). Ce métabolite serait produit suite à l'ouverture du cycle C sur l'unité terminale (du bas) (Figure 19).

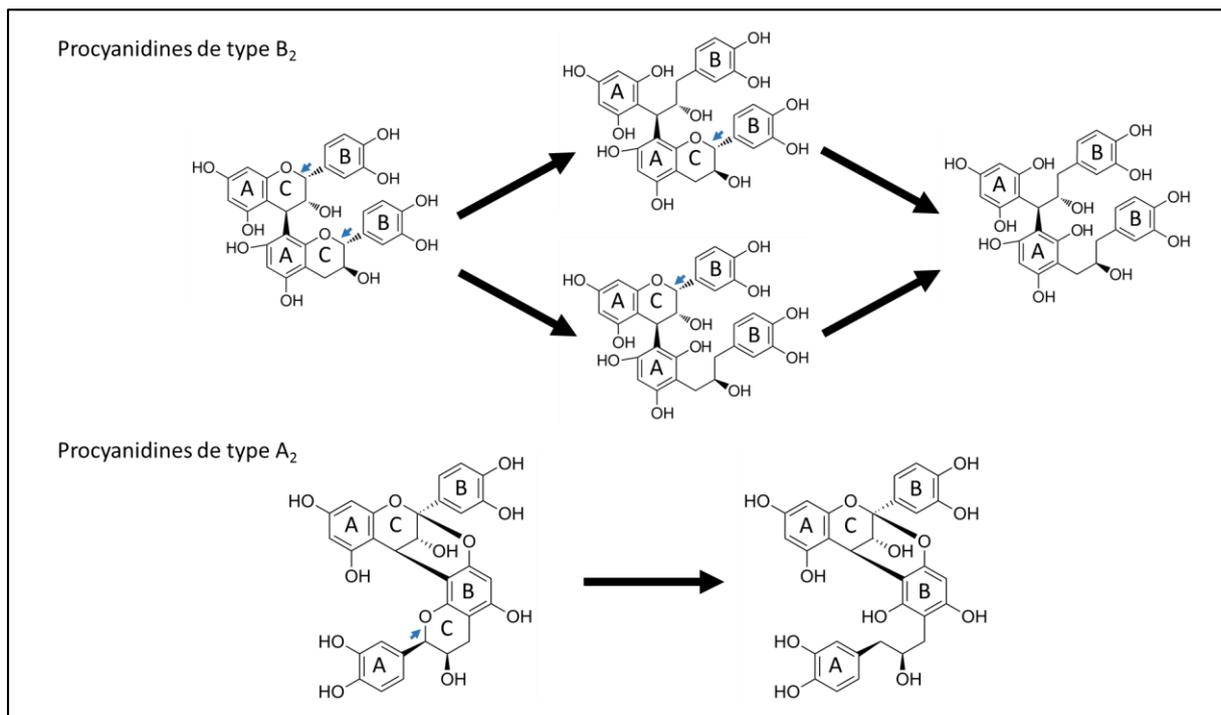


Figure 19. Premières étapes de la dégradation des dimères de procyanidines de type B et A par le microbiote intestinal : Ouverture du cycle C. L'ouverture du cycle C du dimère de type B se ferait sur l'une des deux unités (supérieure ou terminale), puis sur l'unité restante. L'ouverture du cycle C du dimère de type A se ferait uniquement sur l'unité terminale.

A ce jour, aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur la métabolisation par le microbiote intestinal des procyanidines de type B liées en C₄-C₆ et des prodelphinidines (oligomères composés d'unités (epi)gallocatéchine). Un effort important doit donc être entrepris pour identifier les voies métaboliques et les métabolites formés à partir de ces oligomères qui représentent aussi une part non négligeable des flavan-3-ols alimentaires.

En conclusion, l'ouverture d'un ou plusieurs cycles C serait la première réaction de dégradation des dimères de type B et A. Cette hypothèse paraît pertinente puisque cette réaction est aussi la première dans la voie métabolique de dégradation des monomères. A notre connaissance, elle n'a pas encore

été mise en évidence avec des procyanidines de DP supérieurs à 2. Si cette réaction est une voie privilégiée utilisée par le microbiote intestinal pour initier la dégradation des flavan-3-ols, il est maintenant nécessaire d'identifier les acteurs microbiens impliqués dans cette/ces réaction(s).

3.3.3. Métabolites issus de la dégradation microbienne des procyanidines

Bien que les premières étapes de la dégradation des procyanidines par le microbiote intestinal ne soient pas encore bien décrites, il semblerait que les étapes suivantes convergent vers la production de métabolites phénoliques identiques à ceux décrits pour les monomères de flavan-3-ols. En l'occurrence, les dérivés phényl- γ -valérolactones et d'acides phénylvalériques (Figure 14) peuvent également avoir comme origine les procyanidines (Figure 20). Plusieurs de ces dérivés ont été observés après incubation avec le dimère de type B₂ (Stoupi et al. 2010a; Ou et al. 2014), mais également en présence d'un extrait de pépins de raisin riche en procyanidines de type B (Sánchez-Patán et al. 2012). Une étude *in vivo* montre que les dérivés phényl- γ -valérolactones proviendraient essentiellement des monomères (comme vu précédemment) ainsi que des dimères et trimères de type B, alors que les oligomères de type B (DP > 3) en généreraient moins (Hollands et al. 2020). La plus faible métabolisation de ces derniers serait en partie due au fait qu'ils se complexent avec les fibres et les protéines alimentaires (Le Bourvellec et al. 2019; Liu et al. 2020). De plus, Appeldoorn et al. (2009) font l'hypothèse que la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone serait obtenu après le clivage de l'unité terminale du dimère de type B₂ (Figure 20 ; voie 2). Enfin, Stoupi et al. (2010a) ont identifié l'acide 5-(2',4'-dihydroxyphényl)-2-ene-valérique comme un métabolite unique issu du dimère de type B₂ (Figure 20 ; voie 4). Cependant, ce métabolite n'a été observé que dans cette étude.

En ce qui concerne la formation de ces dérivés à partir des procyanidines de type A, il y a très peu d'études et les résultats sont plus contrastés. Aucun dérivé de phényl- γ -valérolactone n'a été détecté après incubation *in vitro* de microbiotes fécaux humains avec des procyanidines de type A (Mena et al. 2019), bien que l'acide 5-(3'-hydroxyphényl) valérique ait été détecté à partir d'un dimère de type A₂ (Ou et al. 2014). Toujours *in vitro*, aucun dérivé de phényl- γ -valérolactone et ni d'acide phénylvalérique n'a été mis en évidence à partir d'extraits de canneberge riches en procyanidines de type A (Ou et al. 2014; Sánchez-Patán et al. 2015). Pour ce qui est des études *in vivo*, une étude chez le rat supplémenté avec des dimères de procyanidines de type A purifiés de kaki et de cacahuètes a permis de mettre en évidence plusieurs dérivés d'acides phénylvalériques (Ge et al. 2015).

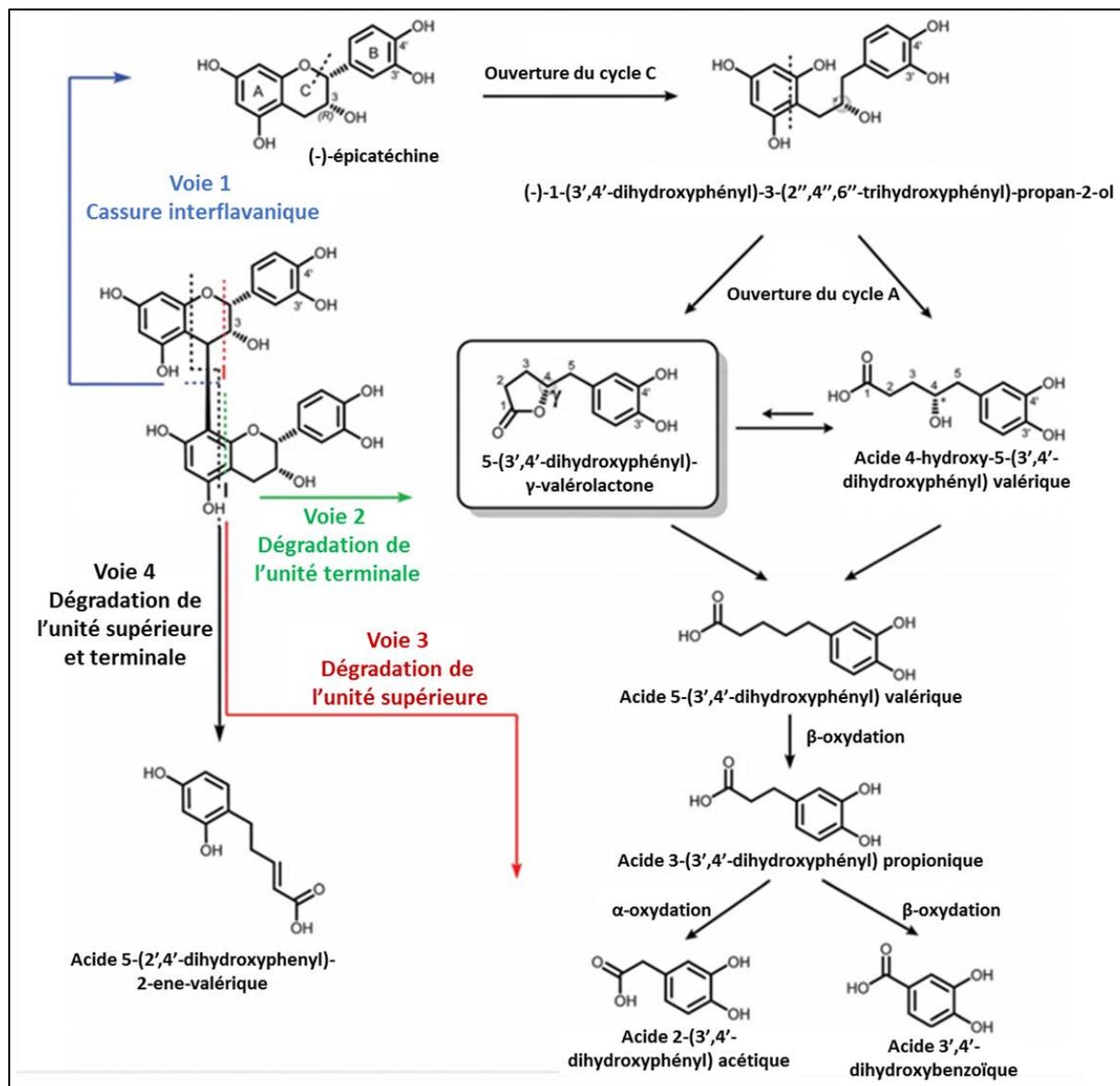


Figure 20. Proposition de voies de dégradation du dimère B₂ par le microbiote intestinal. Adapté de Mena et al. (2019). Quatre voies de dégradation possibles, avec la voie 1 (en bleu) formant la (-)-épicatechine par rupture de la liaison interflavanique. La voie 2 (en vert) formant la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)-γ-valérolactone par clivage de l'unité terminale. La voie 3 (en rouge) formant l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique par clivage de l'unité supérieure et la voie 4 (en noir) formant l'acide 5-(2',4'-dihydroxyphényl)-2-ene-valérique.

La production des métabolites d'acides phénylpropioniques (Figure 16) a été observée lors d'incubations *in vitro* de microbiotes de selles humaines avec les dimères de type A₂ et de type B₂ (Appeldoorn et al. 2009; Stoupi et al. 2010a; Ou et al. 2014). Ils seraient produits à la suite de la formation des dérivés phényl-γ-valérolactone et d'acides phénylvalériques, comme pour les monomères (Figure 20 ; voie 2).

Les dérivés d'acides phénylacétiques sont également produits à partir des procyanidines de type B et A (Figure 20) (Ou et al. 2014). Parmi ces dérivés, l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique proviendrait

plus de la dégradation des dimères de type B et A plutôt que de celle des monomères (étude *in vitro* réalisée avec des selles humaines) (Ou et al. 2014). Cette observation est confirmée par d'autres études *in vitro* où les auteurs n'ont obtenu ce métabolite qu'en présence de procyanidines (Aura et al. 2008; Appeldoorn et al. 2009; Stoupi et al. 2010a). En accord avec ces résultats, deux études réalisées *in vivo* (rat, homme) avec le monomère d'(-)-épicatéchine marqué n'ont pas permis de détecter ce métabolite (Borges et al. 2016; Ottaviani et al. 2016). Par contre, lors d'une autre étude réalisée chez le rat, ce métabolite a été retrouvé après une supplémentation des animaux avec la catéchine ; sa concentration est néanmoins inférieure à celle observée après l'apport de dimères de type B₃ (Gonthier et al. 2003). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les procyanidines et plus particulièrement les dimères sont à l'origine de la formation de l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique. Une des hypothèses formulées pour expliquer l'apparition de ce métabolite serait un clivage du cycle C de l'unité supérieure des dimères de type B (Figure 20 ; voie 3) (Appeldoorn et al. 2009).

Pour conclure, le microbiote intestinal est capable de dégrader les flavan-3-ols (monomères et procyanidines) via différentes voies métaboliques (ouverture des cycles A et C, déshydroxylation, α -oxydation, β -oxydation). Une grande diversité de métabolites phénoliques apparaît, dont certains sont transitoires tels que les formes ouvertes des flavan-3-ols et d'autres vont s'accumuler (dérivés d'acides phénylvalériques, propioniques, acétiques et benzoïques). Certains de ces métabolites sont spécifiques du métabolisme microbien des flavan-3-ols (dérivés de phényl- γ -valérolactones et d'acides phénylvalériques) (González-Sarrías et al. 2017). Mieux comprendre le rôle du microbiote dans la production de ces métabolites, à la fois d'un point de vue quantitatif, qualitatif mais aussi cinétique, s'avère primordial pour interpréter les résultats de biodisponibilité de ces métabolites. En effet, la biodisponibilité des métabolites microbiens varie d'un individu à l'autre et tend à mettre en évidence des métabotypes associés au métabolisme microbien des flavan-3-ols. Ces deux aspects, biodisponibilité et métabotypes, sont développés dans les deux sections suivantes.

3.4. Biodisponibilité et effets santé des métabolites microbiens des flavan-3-ols

L'ensemble des métabolites phénoliques microbiens issu de la dégradation des flavan-3-ols par le microbiote intestinal est retrouvé dans le sang et l'urine et a notamment pu être détecté chez le rat dans différents organes, tels que le foie, les reins, le cerveau et le tissu adipeux (Margalef et al. 2015; Ottaviani et al. 2016; Mena et al. 2019; Donato et al. 2019). Ces métabolites sont également soumis au métabolisme de phase II (méthylation, sulfatation, glucuronylation), comme l'atteste deux études *in vivo* réalisées chez l'homme après l'ingestion de monomères (Ottaviani et al. 2016; Mena et al. 2019). Des formes non-conjuguées ont aussi été identifiées dans l'urine.

Plusieurs études indiquent que la biodisponibilité des métabolites microbiens des flavan-3-ols est plus importante que celle des monomères précurseurs. Les dérivés de phényl- γ -valérolactones et d'acides

phénylvalériques, métabolites microbiens spécifiques des flavan-3-ols, constituent la grande majorité des métabolites identifiés dans l'urine et le sang et peuvent représenter jusqu'à 42 % du total des flavan-3-ols ingérés (Anesi et al. 2019; Cortés-Martín et al. 2019; Mena et al. 2019). On les retrouve dans l'organisme à des concentrations relativement élevées (de l'ordre du μM) après ingestion de flavan-3-ols monomères ou oligomères de type B (Ottaviani et al. 2016; Mena et al. 2019). En terme de cinétique, ces métabolites sont identifiés dans le plasma plus tardivement que leur précurseur et atteignent leur pic de concentration (588 nM) six heures après l'ingestion de 60 mg de (-)-épicatéchine, contre 1 à 2 heures pour le précurseur (1223 nM) ; leur présence dans l'organisme est plus longue puisqu'ils sont détectés jusqu'à 24 heures après ingestion de la source de flavan-3-ol contre 12 à 24 heures pour le précurseur (Wiese et al. 2015; Ottaviani et al. 2016). Du fait de ces différences de cinétiques, Ottaviani et al. (2016) ont exprimé les concentrations plasmatiques par unité de temps et montrent ainsi que ces métabolites sont à des concentrations trois fois plus élevée (14352 nM/h) que leur précurseur, la (-)-épicatéchine (4943 nM/h). La présence de ces métabolites dans l'organisme, plus tardive et plus durable que celle de leurs précurseurs peut en partie s'expliquer par le fait que leur biodisponibilité est dépendante de l'activité métabolique du microbiote intestinal, activité qui se localise dans la partie distale du tube digestif alors que les précurseurs (uniquement les monomères) sont absorbés tels quels dans l'intestin grêle, partie haute du tube digestif. La biodisponibilité des précurseurs et de leurs métabolites microbiens dépend également de la bioaccessibilité des flavan-3-ols qui peuvent être piégés dans la matrice alimentaire ou former des complexes avec d'autres constituants alimentaires, ce qui les rend moins rapidement absorbables et moins biodégradables (Le Bourvellec et al. 2019; Monfoulet et al. 2020).

Comme nous l'avons développé au début de cette étude bibliographique (cf 1.3.4.), les flavan-3-ols sont bien décrits pour leurs effets santé et ces effets ont surtout été attribués aux activités biologiques des flavan-3-ols précurseurs (non métabolisés par le microbiote) (cf 1.1.). Pourtant, ces précurseurs sont moins biodisponibles que leurs métabolites phénoliques microbiens. A ce jour, trop peu d'études ont investigué les potentiels effets santé des métabolites phénoliques microbiens. Ainsi, il n'est pas exclu que les effets santé attribués à la consommation d'aliments riches en flavan-3-ols soient en partie dus aux métabolites microbiens générés dans le colon (Campos et al 2020).

Les dérivés de phényl- γ -valérolactones et d'acides phénylvalériques font l'objet d'un intérêt grandissant de la part de la communauté scientifique pour leurs effets neuroprotecteurs, de maintien des capacités cardiovasculaires et effets anti-inflammatoires (Lee et al. 2017; Campos et al. 2019). La 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone a été proposée comme marqueur urinaire de la consommation de flavan-3-ols (Ottaviani et al. 2018). Sa présence plus importante dans les urines a notamment été corrélée à une baisse de la pression sanguine systolique (Ottaviani et al. 2020).

Les autres métabolites phénoliques microbiens, c'est-à-dire ceux qui ne sont pas spécifiques des flavan-3-ols, ont aussi été étudiés et présentent des activités biologiques intéressantes comme des activités anti-diabétiques, anti-inflammatoires, antioxydantes, cardio-protectrices, neuro-protectrices et antiadhésives contre les *Escherichia coli* uropathogènes (Monagas et al. 2010; Campos et al, 2019).

3.5. Notions de métabotypes et métabotypes putatifs liés au métabolisme microbien des flavan-3-ols

Les études sur le métabolisme des polyphénols réalisées chez l'Homme ont montré qu'il est possible de classer les individus selon leur phénotype métabolique, également nommé "métabotype". Il s'agit d'un concept développé assez récemment (Bolca et al. 2013; Espín et al. 2017) et apparu lors d'études sur cohortes d'individus sains après consommation de certains polyphénols. Le métabotype se caractérise par la détection d'un ou plusieurs métabolites phénoliques microbiens dans le sang ou l'urine d'un individu suite à la consommation d'un polyphénol donné.

A ce jour, les métabotypes obtenus à partir de l'acide ellagique (structure de base des ellagitannins) et la daidzéine (isoflavone) sont les mieux caractérisés. Pour ce qui concerne l'acide ellagique, la population peut être séparée en trois métabotypes selon la production de différents métabolites microbiens appelés urolithines. Les individus qui n'en produisent pas ont le métabotype 0, alors que ceux qui produisent l'urolithine A ont le métabotype A et ceux qui produisent l'urolithine B et/ou l'isourolithine A en plus de l'urolithine A ont le métabotype B. Ces trois métabotypes sont directement liés à la composition du microbiote intestinal et en particulier à la présence (métabotypes A et B) ou l'absence (métabotype 0) de souches bactériennes du genre *Gordonibacter* (famille des *Eggerthellaceae* et phylum des Actinobacteria) (Figure 21) (Selma et al. 2016; Cortés-Martín et al. 2018) qui seraient directement impliquées dans la formation des urolithines. De plus, une plus grande proportion en *Gordonibacter* dans le microbiote intestinal a été associée aux individus de métabotype A (García-Villalba et al. 2017; Tomás-Barberán et al. 2017).

Concernant la daidzéine, trois métabotypes distincts et indépendants ont été identifiés dans la population. Ils se caractérisent par la production d'équol ou de O-déméthylangolensine (ODMA) ou par l'absence de production de ces deux métabolites microbiens (Figure 21). Les métabotypes "équol" et "ODMA" sont aussi directement corrélés à la présence au sein du microbiote intestinal d'espèces bactériennes. Plusieurs espèces de la famille *Eggerthellaceae* sont impliquées dans la formation de l'équol (Braune et Blaut 2016), dont les espèces *Adlercreutzia equolifaciens*, *Asaccharobacter celatus* (nouvellement assignée *Adlercreutzia equolifaciens* subsp. *Celatus*) et *Slackia isoflavoniconvertens* qui sont significativement plus prévalentes chez les producteurs d'équol que chez les non producteurs (Iino et al. 2019). La formation du métabolite ODMA serait quant à elle corrélée à la présence de *Eubacterium ramulus* (Frankenfeld 2011) (Figure 21). La capacité à produire l'équol à partir de la

daïdzéine serait présente chez 30 % de la population caucasienne alors que celle à produire la O-déméthylangolensine dans 80 à 90 % de la même population (Frankenfeld 2017; Cortés-Martín et al. 2020).

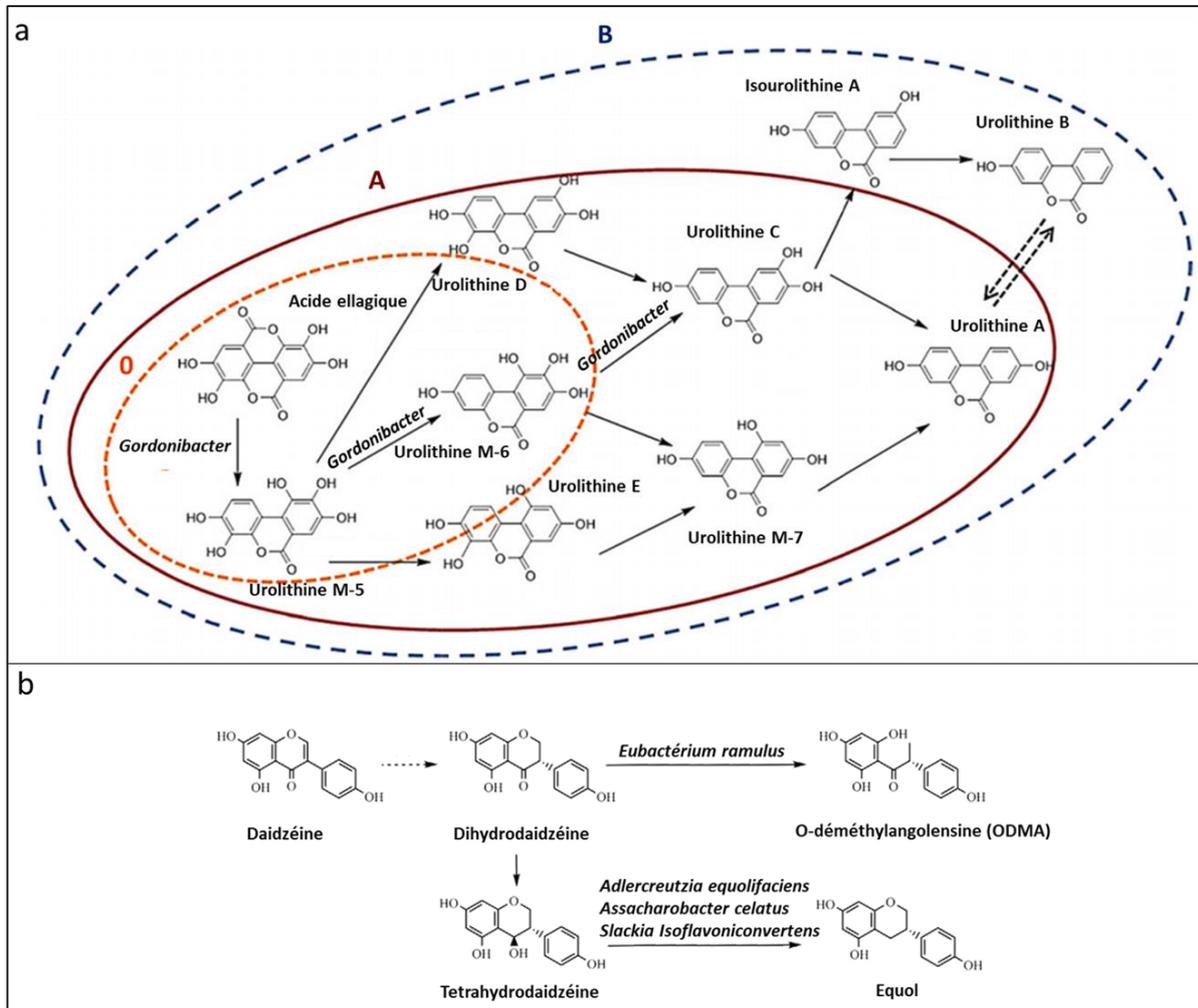


Figure 21. Métabotypes associés au métabolisme microbien de l'acide ellagique et de la daïdzéine. Adapté de Tomás-Barberán et al. (2017) et Cortés-Martín et al. (2020). **a.** Métabolisme de l'acide ellagique par le microbiote intestinal. La population peut être stratifiée en trois métabotypes selon les métabolites urolithines produits par les individus. Le métabotype 0 se caractérise par les métabolites entourés en orange, A en rouge et B en bleu. Le genre *Gordonibacter* est impliqué dans la production de certains des métabolites. **b.** Métabolisme de la daïdzéine par le microbiote intestinal. Les populations peuvent être des producteurs de ODMA, d'équol ou aucun des deux. La formation de ces métabolites serait liée à la présence de *E. ramulus* pour le premier et d'espèces de la famille des *Eggerthellaceae* pour le second.

L'existence de métabotypes associés au métabolisme des flavan-3-ols n'a été que très récemment proposée. Dans une première étude menée par Mena et al (2019), onze individus ont été suivis pendant douze semaines dont huit semaines durant lesquelles ils ont été supplémentés avec des extraits de café et de thé contenant 356 mg d'acide chlorogénique (dérivé de l'acide caféique) et 3469 mg de flavan-3-ols dont 93 % de gallicatéchine et d'épigallocatechine, ce qui correspond à une consommation journalière en flavan-3-ols 3 à 10 fois supérieure à la normale (cf section 1.3.2).

Plusieurs prélèvements urinaires ont été effectués avant, pendant et après la supplémentation pour suivre le profil d'excrétion sur 24 heures de divers métabolites phénoliques microbiens dont ceux issus des flavan-3-ols. Les métabolites conjugués (glucuronylés, méthylés, sulfatés) issus du métabolisme hépatique de phase II ont également été analysés. La comparaison des profils métaboliques des onze individus a permis de les séparer en trois métabotypes putatifs selon les concentrations en $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ de trois métabolites discriminants : la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone, la 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)- γ -valérolactone et l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique (Figure 22). Les deux premiers sont spécifiques du métabolisme microbien des flavan-3-ols alors que le troisième peut provenir à la fois du métabolisme des flavan-3-ols et de l'acide chlorogénique. Cependant, les auteurs ont associé la formation de l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique au métabolisme des flavan-3-ols du fait de la supplémentation alimentaire qui est dix fois supérieure en flavan-3-ols qu'en acide chlorogénique. Les trois métabotypes 1, 2 et 3 sont présentés dans la Figure 22 et ne sont pas basés sur la présence/absence des métabolites mais sur les concentrations journalières plus ou moins importantes des trois métabolites. Ainsi les métabotypes 1 et 3 sont diamétralement opposés avec une excrétion urinaire élevée de la 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)- γ -valérolactone et de la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone et faible de l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique pour le métabotype 1 alors que l'inverse est observé pour le métabotype 3. Le métabotype 2 présente un profil intermédiaire avec l'excrétion de la 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)- γ -valérolactone correspondant au métabotype 3 alors que l'excrétion des 2 autres métabolites est proche du métabotype 1.

Il faut cependant noter que dans cette étude, les métabotypes ne sont pas définis par la présence ou l'absence d'un métabolite microbien particulier mais par des différences de concentration de trois métabolites. De plus, aucune corrélation entre la composition du microbiote (pas étudiée) et le métabotype n'a été effectuée.

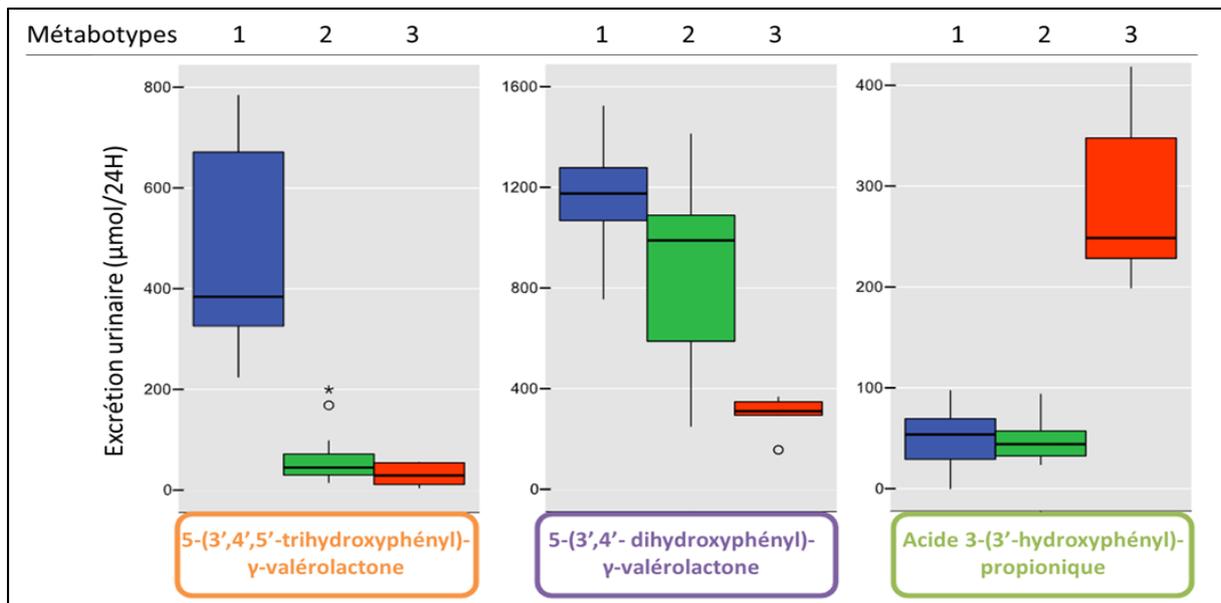


Figure 22. Classification des individus en métabotypes après consommation de flavan-3-ols selon Mena et al. (2019). L'analyse du profil d'excrétion urinaire sur 24 h de onze individus après la supplémentation d'extraits de café et de thé a permis de mettre en évidence trois métabotypes, en mesurant la concentration de trois métabolites : la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)-γ-valérolactone, la 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-γ-valérolactone et l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique. En bleu, le métabotype 1 ; en vert, le métabotype 2 ; en rouge, le métabotype 3.

Dans une seconde étude, Cortés-Martin et al. (2019) ont tenté de mettre en évidence des métabotypes sur une plus grande cohorte d'individus (68 individus) que Mena et al (2019) en utilisant une source de flavan-3-ols très différente, autant sur le plan quantitatif que qualitatif et sur une durée de supplémentation beaucoup plus courte (trois jours). Les individus recevaient un mélange de noix, d'amandes et de noisettes apportant 54,6 mg de flavan-3-ols par jour (12/0,6/42 mg de catéchine/épicatéchine/procyanidines avec un degré de polymérisation variant de 2,4 à 8,5). Au 4ème jour, un prélèvement urinaire à jeun a été effectué pour évaluer le profil d'excrétion des métabolites microbiens issus des flavan-3-ols (incluant les métabolites conjugués issus du métabolisme de phase II). Comme pour Mena et al. (2019), les auteurs n'ont pas mis en évidence de métabotypes se caractérisant par la présence ou l'absence de métabolites microbiens des flavan-3-ols. A partir des profils d'excrétion urinaire des 68 individus, ils ont pu néanmoins constituer quatre groupes d'individus se distinguant de par les concentrations différentes en quatre métabolites, la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)-γ-valérolactone, la 5-(3'-hydroxyphényl)-γ-valérolactone, l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique et l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique (Figure 23). Il faut noter que dans cette étude, ils n'ont pas détecté de 5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-γ-valérolactone car la supplémentation en fruit à coques ne contient pas de flavan-3-ols trihydroxyphényl comme retrouvés dans le thé. Ces groupes se définissent de la façon suivante :

- Groupe 1 : Concentration forte des quatre métabolites (4 individus).

Etude bibliographique

Chapitre 3 : Métabolisme des flavan-3-ols par le microbiote intestinal humain

- Groupe 2 : Concentration faible des quatre métabolites (32 individus).
- Groupe 3 : Concentration forte de la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone et faible de la 5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone et des acides 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique et 3-(3'-hydroxyphényl) propionique (16 individus).
- Groupe 4 : Concentration faible de la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone et 5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone et forte des acides 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique et 3-(3'-hydroxyphényl) propionique (16 individus).

Cette deuxième étude met ainsi en évidence deux groupes comparables à ceux décrits par Mena et al (2019). Ainsi, le groupe 3 (n=16) a des caractéristiques communes avec les métabotypes 1 et 2 (excrétion élevée de la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone et faible de l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique), et le groupe 4 (n=15) est proche du métabotype 3 (excrétion élevée de l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique et faible de la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone). Les groupes 1 (n=4, forts excréteurs des quatre métabolites) et 2 (grand groupe n=32, faibles excréteurs des 4 métabolites) n'ont pas d'équivalents dans les métabotypes décrits par Mena et al (2019).

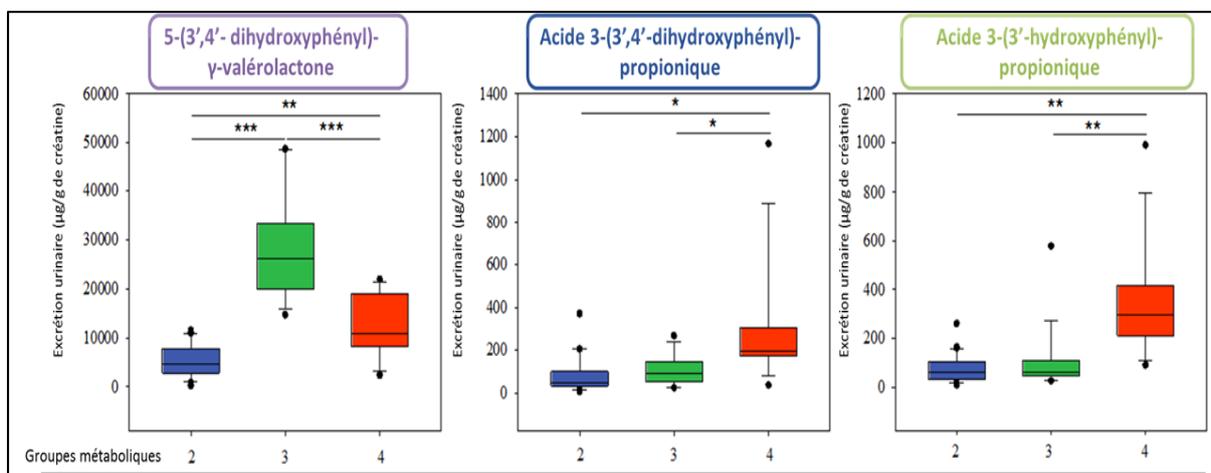


Figure 23. Classification des individus en groupes métaboliques après consommation de flavan-3-ols selon Cortés-Martín et al. (2019). L'analyse du profil d'excrétion urinaire de 68 individus après la supplémentation de noix, d'amandes et de noisettes a permis de mettre en évidence quatre groupes métaboliques, en mesurant la concentration de quatre métabolites : la 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone, la 5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone, l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique et l'acide 3-(3'-hydroxyphényl) propionique. Le groupe 1 n'a pas été représenté par ses auteurs dû à un nombre réduit d'individus présent dans ce groupe. En bleu, le groupe 1 ; en vert, le groupe 2 ; en rouge, le groupe 3.

Dans une troisième étude, Anesi et al. (2019) ont montré la possibilité de stratifier en "métabotypes" les individus en analysant uniquement les métabolites conjugués issus des flavan-3-ols. Ce type d'analyse met surtout en relief le métabolisme de phase II du foie. Le profil d'excrétion urinaire de onze individus a été suivi pendant 24 heures après l'ingestion de 400 grammes de pommes, équivalent à l'ingestion entre autres de 689 μ mol de (-)-épicatechine, de 1882 μ mol de procyanidines B₂ et de

2923 μmol d'oligomères avec un degré de polymérisation moyen de 8,5. Cette étude montre comme les précédentes la présence de forts et faibles producteurs des dérivés acides phénylvalériques et phényl- γ -valérolactones. Cependant, cette étude met surtout en évidence deux groupes d'individus qui se distinguent par leur métabolisme de phase II, en effectuant le ratio entre la forme sulfatée et la forme glucuronylée du métabolite 5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone :

$$R = \frac{5-(3'-hydroxyphenyl)-\gamma\text{-valérolactone-4'-sulfate}}{5-(hydroxyphenyl)-\gamma\text{-VL-glucuronide}}$$

- Métabotype 1 : $R > 1.8$
- Métabotype 2 : $R \approx 1$

En conclusion, la définition de "métabotype" dans le contexte particulier du métabolisme des flavan-3-ols chez l'Homme reste encore controversée. Les équipes espagnoles (Tomás-Barberán, Espín), considèrent que l'on peut classer les individus en différents métabotypes qu'à partir du moment où le profil métabolique d'un individu est associé à la présence ou l'absence d'un ou plusieurs micro-organismes responsables de la production des métabolites constituant le profil. Les équipes italiennes quant-à elles (Mena, Del Rio) stratifient les cohortes d'individus en différents métabotypes sur la base d'une abondance relative différente de plusieurs métabolites phénoliques sans avoir préalablement démontré que cette stratification est liée à la composition ou l'activité métabolique du microbiote. Les résultats des deux premières études décrites ci-dessus montrent qu'il est possible de stratifier des individus selon leur profil d'excrétion en métabolites phénoliques dont certains sont issus spécifiquement du métabolisme microbien des flavan-3-ols (dérivés phényl- γ -valérolactones). Si on suit la définition des chercheurs espagnols, ces résultats ne permettent pas de dire qu'il s'agit de métabotypes tant que les micro-organismes impliqués dans les voies de dégradation des flavan-3-ols ne seront pas tous identifiés et tant que l'on ne pourra pas corrélérer ces différences de profils métaboliques à des profils microbiens spécifiques.

Cependant, plusieurs études *in vitro* utilisant des selles humaines (Sánchez-Patán et al. 2012; Le Bourvellec et al. 2019), mais également *in vivo* chez l'Homme (Wiese et al. 2015; Favari et al. 2020; Hollands et al. 2020) tendent à montrer qu'il existe bien des différences inter-individuelles dans la production par le microbiote des dérivés de phényl- γ -valérolactones et d'acides phénylvalériques à partir de flavan-3-ols, ce qui tendrait à dire que le microbiote serait responsable des profils métaboliques différents d'un individu à l'autre et qu'il y aurait bien des métabotypes liés à la consommation de flavan-3-ols. Il faudra cependant confirmer le lien microbiote-métabotype par des recherches qui prennent en considération les deux composantes.

Ainsi, mieux définir les groupes métaboliques ou métabotypes issus des flavan-3-ols et le rôle du microbiote dans ces groupes permettrait de corrélérer l'état de santé d'un individu à son métabotype, de prédire sa prédisposition à développer une pathologie, et éventuellement d'apporter des solutions nutritionnelles (pharmabiotiques) pour prévenir la pathologie. Par exemple, le métabotype B mis en évidence dans le métabolisme de l'acide ellagique serait corrélé à une dysbiose du microbiote intestinal, mais également à des cas de maladies métaboliques en nombre plus élevé que chez les personnes présentant un métabotype A et 0 (Selma et al. 2016; Tomás-Barberán et al. 2017).

Le microbiote joue un rôle important dans ce phénomène de stratification en groupes métaboliques avec la présence ou l'absence de micro-organismes (ou de gènes codant des enzymes) clés dans la dégradation des polyphénols. Il est donc impératif d'identifier l'ensemble des acteurs microbiens et/ou gènes impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols.

4. Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés

4.1. Dégradation des monomères

4.1.1. Ouverture du cycle C

Comme discuté dans la section 3.2.1, l'ouverture du cycle C des monomères est centrale dans le métabolisme microbien des flavan-3-ols (Figure 13) et donc beaucoup d'efforts ont été entrepris pour identifier les bactéries impliquées (Braune et Blaut, 2016). La grande majorité d'entre elles a été isolée de selles humaines et fait partie de la famille des *Eggerthellaceae* et du phylum des Actinobacteria (Figure 24). Seule *Lactobacillus plantarum* IFPL935 ne fait pas partie de la famille des *Eggerthellaceae* mais de la famille des *Lactobacillaceae* (phylum des Firmicutes) (Sánchez-Patán et al. 2012). Cette souche n'a pas été isolée chez l'Homme mais provient de la flore du fromage de chèvre (Fontecha et al. 1990). L'ouverture du cycle C ne se réduirait donc pas à la seule famille des *Eggerthellaceae*. Sachant que le genre *Lactobacillus* représente 0,3 % du total des micro-organismes du côlon (Heeney et al. 2018), il n'est pas impossible que certaines bactéries non encore isolées chez l'Homme et appartenant au genre *Lactobacillus* possèdent cette activité.

La co-incubation du microbiote colique avec les différents précurseurs monomériques a mis en évidence des différences dans la métabolisation de ceux-ci et notamment la vitesse de dégradation (Saura-Calixto et al. 2010; Serra et al. 2011). Ces différences sont également retrouvées avec les bactéries isolées. Par exemple, la souche *Eggerthella lenta* rK3 dégrade la totalité de la (+)-catéchine en 24 heures, alors qu'il lui faut 48 heures pour dégrader la (-)-épicatéchine (Kutschera et al. 2011). En revanche, les souches *Adlercreutzia equolifaciens* MT4s-5 et *E. lenta* DSM 2243 dégradent ces deux monomères à la même vitesse. Concernant les deux autres stéréoisomères, la (+)-épicatéchine et la (-)-catéchine, *A. equolifaciens* MT4s-5 et *E. lenta* DSM 2243 ne sont pas capable d'ouvrir le cycle C de la (+)-épicatéchine, alors que la (-)-catéchine est dégradée par seulement *A. equolifaciens* MT4s-5 (Figure 24) (Takagaki et Nanjo 2015a). Ces différences de spécificité de substrat ont aussi été observées avec les souches *Adlercreutzia equolifaciens subsp. celatus* JCM 14811, *Slackia isoflavoniconvertens* JCM 16137 et *Slackia equolifaciens* JCM 16059 (Takagaki et Nanjo, 2015b). L'ensemble de ces résultats montre que la stéréochimie des monomères de flavan-3-ols a un impact sur leur métabolisation et que la majorité des souches testées est active sur les formes (+)-catéchine et (-)-épicatéchine (Figure 24).

Le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle B des monomères a également une influence sur l'ouverture du cycle C. La souche *Adlercreutzia equolifaciens* JCM 14793 est capable d'ouvrir le cycle C de la (-)-épicatéchine, mais pas celui de la (-)-épigallocatéchine, qui possède un troisième groupement OH sur le cycle B. Inversement, cette souche n'est pas capable de cliver le cycle C de la (-)-catéchine mais peut cliver celui de la (-)-gallocatéchine (Figure 24) (Takagaki et Nanjo, 2015a; 2015b). Les mêmes auteurs ont aussi mis en évidence que le groupement 4'OH du cycle B est nécessaire à l'ouverture du

Etude bibliographique

Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés

cycle C par la souche *A. equolifaciens* MT4s-5, confirmant ainsi des résultats obtenus précédemment dans la littérature avec la souche *E. lenta* SDG-2 (Wang et al. 2001; Takagaki et al. 2014). De plus, la présence du résidu gallate sur le carbone C3 inhibe l'ouverture du cycle C (Wang et al. 2001), ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec le microbiote complet (Hackett et al. 1985; Meselhy et al. 1997).

En conclusion, un nombre limité de bactéries métaboliquement actives sur les monomères de flavan-3-ols ont été isolées. Comme l'illustre la Figure 24, ces bactéries divergent entre elles selon leurs capacités à dégrader les différents monomères. Ceci suggère que l'ouverture du cycle C met en jeu des systèmes enzymatiques plus ou moins complexes ou plus ou moins spécifiques selon les bactéries. On note cependant que la totalité des souches et espèces isolées sont capable de cliver le cycle C de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine. Ces deux monomères sont les plus fréquemment retrouvés dans notre alimentation, suivis de la (-)-épigallocatechine et la (-)-gallocatechine retrouvée en grande concentration dans le thé (Yang et al. 2000). Il est possible que les flavan-3-ols alimentaires exercent une pression de sélection sur le microbiote et que certaines bactéries au sein de ce microbiote conservent leurs activités hydrolytiques vis à vis des flavan-3-ols monomères les plus fréquemment rencontrés afin de survivre et se maintenir dans cet écosystème digestif extrêmement compétitif. La famille *Eggerthellaceae*, et plus particulièrement l'espèce *E. lenta* ferait partie de cette niche jouant un rôle majeur dans ce métabolisme (Braune et Blaut 2016; Maini Rekdal et al. 2020).

Phylum	Famille	Souches	Monomères de flavan-3-ols										Références				
			Ouverture du cycle C					Déshydroxylation du cycle B									
			(+)-catéchine	(+)-épicatéchine	(-)-catéchine	(-)-épicatéchine	(-)-gallocatechine	(-)-épigallocatechine	(+)-3',4'-diOHPP-2-ol	(-)-3',4'-diOHPP-2-ol	(-)-3',4',5'-triOHPP-2-ol	(-)-3',4',5'-triOHVal / (-)-3',4',5'-triOHVA		3',4'-diOHPPA	3',4'-diOHPA		
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> IFPL935	■			■				■	■					(Sánchez-Patán et al., 2012)	
Actinobacteria	<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Eggerthella lenta</i> SDG-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(Wang et al, 2001)	
		<i>Eggerthella lenta</i> rK3	■						■	■							(Kutschera et al, 2011)
		<i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243	■	■	■				■	■	■	■	■	■	■	■	(Takagaki et Nanjo, 2014; 2015a) (Maini Rekdal et al, 2020)
		<i>Eggerthella lenta</i> CAT-1	■						■	■							(Jin et Hattori, 2012)
		<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> JCM 16137	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(Takagaki et Nanjo 2015b; 2015c)
		<i>Slackia equolifaciens</i> JCM 16059	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(Takagaki et Nanjo 2015b; 2015c)
		<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> JCM 14793	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(Takagaki et Nanjo 2015b; 2015c)
		<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> MT4s-5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(Takagaki et Nanjo, 2014; 2015a; 2015c)
		<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> subsp. <i>celatus</i> JCM 14811	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	(Takagaki et Nanjo 2015b; 2015c)
		<i>Gordonibacter faecihominis</i> CAT-2							■	■							(Jin et al, 2014)
		<i>Gordonibacter</i> spp.							■					■	■		(Maini Rekdal et al, 2020)

Figure 24. Micro-organismes isolés impliqués dans l'ouverture du cycle C et la déshydroxylation du cycle B des monomères. L'activité enzymatique d'ouverture du cycle C et de déshydroxylation du groupement hydroxyle en C₄'OH ont été testées sur une dizaine de souches de la famille *Eggerthellaceae*, en utilisant comme substrats plusieurs monomères de flavan-3-ols et de composés

phénoliques (métabolites microbiens). En blanc, l'activité n'a pas été testée. En vert, une activité enzymatique a été observée. En rouge, aucune activité enzymatique n'a été observée.

(+)-3',4'-diOHPP-2-ol : (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(+)-3',4'-diOHPP-2-ol : (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4'-diOHPP-2-ol : (-)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4'-diOHPP-2-ol : (-)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4',5'-triOHPP-2-ol : (-)-1-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4',5'-triOHVal : (-)-5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)- γ -valérolactone ;

(-)-3',4',5'-triOHPVA : acide (-)-4-hydroxy-5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)valérique ;

3',4'-diOHPPA : acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique ;

3',4'-diOHPPAA : acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique.

4.1.2. Ouverture du cycle A

L'ouverture du cycle A ou groupement phloroglucinol est la deuxième étape majeure dans le métabolisme des monomères de flavan-3-ols (Figure 15). Malgré son rôle primordial, très peu d'études ont été menées pour identifier les bactéries impliquées dans ce métabolisme. A ce jour, seulement quatre souches de la même espèce bactérienne, *Flavonifractor plautii* (famille *Ruminococcaceae*), ont pu être isolées et possèdent cette activité de d'ouverture du cycle A (Figure 25) (Takagaki et Nanjo, 2015a; Braune et Blaut, 2016). Cette capacité de *F. plautii* à dégrader le groupement phloroglucinol n'intervient qu'après l'ouverture du cycle C des flavan-3-ols. De plus, l'activité de clivage n'est pas affectée par la stéréochimie des monomères de flavan-3-ols, ni par le nombre de groupement hydroxyle sur le cycle B (Takagaki et al. 2014; Takagaki et Nanjo, 2015a). Ces résultats montrent l'importance du groupement phloroglucinol dans ce métabolisme et suggèrent que ces souches de *F. plautii* pourraient aussi dégrader le phloroglucinol seul. Takagaki et Nanjo (2014) ont confirmé cette hypothèse en observant la disparition de cette molécule quand elle est incubée en présence de trois souches différentes de *F. plautii*.

Aucune autre espèce bactérienne capable d'ouvrir le cycle A des flavan-3-ols pour former les dérivés acides 4-hydroxy-phénylvalériques et phényl- γ -valérolactones n'a été isolée. Ce manque de diversité d'espèces bactériennes impliquées dans cette réaction pourrait s'expliquer par la difficulté à réaliser l'isolement de ces micro-organismes du fait que le substrat (monomère ouvert sur cycle C) n'est pas disponible commercialement. Ces molécules ne peuvent être produites que biologiquement, en incubant le précurseur monomérique avec une bactérie capable d'ouvrir le cycle C comme par exemple une souche de l'espèce *E. lenta* (Kutschera et al. 2011; Takagaki et al. 2014). Il a été démontré que l'espèce bactérienne *Eubacterium oxidoreducens* (famille des *Lachnospiraceae* proche de celle des *Ruminococcaceae* de *F. plautii*) peut utiliser le phloroglucinol comme source d'énergie en produisant de l'ATP (Krumholz et al. 1987). Il serait intéressant de déterminer si *E. oxidoreducens*, qui est capable de dégrader le phloroglucinol, a un possible rôle dans le catabolisme des formes ouvertes sur le cycle C des monomères de flavan-3-ols. Pour l'instant, l'espèce *F. plautii* reste un acteur important dans la

Etude bibliographique

Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés

dégradation des flavan-3-ols, mais également dans le métabolisme d'autres polyphénols (flavonols, flavones) (Braune et Blaut 2016).

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si d'autres espèces bactériennes sont impliquées dans l'ouverture du cycle A. Cette étape est une étape clef du métabolisme des flavan-3-ols qui est à l'origine de la stratification de cohortes d'individus (métabotypes) selon qu'ils sont plus ou moins producteurs des dérivés d'acides phénylvalériques et de phényl- γ -valérolactones (Mena et al. 2019; Cortés-Martín et al. 2019) (cf section 3.5). S'il s'avère que cette étape n'est assurée que par *F. plautii*, il sera alors intéressant de déterminer par des approches moléculaires (qPCR par exemple) la présence de cette espèce dans le microbiote des individus et de voir si la présence ou absence de cette espèce au sein du microbiote corrèle avec le métabotype de l'individu.

Phylum	Famille	Souches	Monomères de flavan-3-ols						Références
			Ouverture du cycle A						
			Phloroglucinol	(+)-3',4'-diOHPP-2-ol	(+)-3'-OHPP-2-ol	(-)-3',4'-diOHPP-2-ol	(-)-3'-OHPP-2-ol	(-)-3',4',5'-triOHPP-2-ol	
Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Flavonifractor plautii</i> aK2							(Kutschera et al, 2011)
		<i>Flavonifractor plautii</i> MT42							(Takagaki et Nanjo, 2014; 2015a)
		<i>Flavonifractor plautii</i> DSM 4000							(Takagaki et Nanjo, 2014; 2015a)
		<i>Flavonifractor plautii</i> DSM 6740							(Kutschera et al, 2011) (Takagaki et Nanjo, 2014; 2015a)

Figure 25. Micro-organismes isolés impliqués dans l'ouverture du cycle A des monomères. L'activité enzymatique d'ouverture du cycle A a été testée sur quatre souches de l'espèce *Flavonifractor plautii* en utilisant plusieurs monomères ouverts de flavan-3-ols et le phloroglucinol. En blanc, l'activité n'a pas été testée. En vert, une activité enzymatique a été observée. En rouge, aucune activité enzymatique n'a été observée.

(+)-3',4'-diOHPP-2-ol = (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(+)-3'-OHPP-2-ol = (+)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4'-diOHPP-2-ol = (-)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3'-OHPP-2-ol = (-)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',4',5'-triOHPP-2-ol = (-)-1-(3',4',5'-trihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(-)-3',5'-triOHPP-2-ol = (-)-1-(3',5'-trihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol.

4.1.3. Déshydroxylation du cycle B

Plusieurs bactéries possédant une activité de déshydroxylation du groupement catéchol (cycle B) ont été isolées de selles humaines (Figure 24). Ces bactéries font exclusivement parties de la famille des *Eggerthellaceae*, confirmant ainsi l'importance de cette famille bactérienne dans le métabolisme des flavan-3-ols (Braune et Blaut 2016; Maini Rekdal et al. 2020). Alors que le cycle B perd ses trois hydroxyles en présence de microbiote fécal complet (Le Bourvellec et al. 2019), les bactéries isolées à ce jour sont capables de déshydroxyler le cycle B uniquement sur le carbone C_{4'} (Figure 24).

Etude bibliographique

Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés

La déshydroxylation est une étape qui intervient majoritairement sur des métabolites avec groupement catéchol qui sont générés lors de la métabolisation des monomères de flavan-3-ols (Figure 13). Elle peut s'opérer sur un ensemble des métabolites ouverts quelle que soit leur stéréochimie (Figure 24). Cependant, il a été observé que *A. equolifaciens subsp. celatus* JCM 14811 et *Adlercreutzia equolifaciens* JCM 14793 peuvent également déshydroxyler les flavan-3-ols monomères préalablement "non métabolisés", tels que la (-)-épigallocatechine et la (-)-gallocatechine, mais pas la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine (Takagaki et Nanjo 2015b; 2015c). La déshydroxylation directe de flavan-3-ols semble cependant être un événement rare car elle n'a été observée que dans cette étude avec ces deux souches isolées. De plus, les produits de cette déshydroxylation s'accumulent dans le surnageant de culture, indiquant que ces deux bactéries ne sont plus capables d'ouvrir le cycle C.

La capacité de déshydroxylation varie pour certaines souches selon l'orientation du carbone 3 présent sur le cycle C. C'est le cas de la souche *E. lenta* SDG-2 qui est capable de déshydroxyler le métabolite ouvert ((-)-3',4'-diOHPP-2-ol) issu des monomères de (-)-catéchine et (-)-épicatéchine mais pas celui issu des formes (+) (Figure 24) (Takagaki et Nanjo 2015a). De plus, la présence d'un groupement hydroxyle en position C_{5'} du cycle B stimule la capacité de déshydroxylation en position C_{4'}. Cette activité de déshydroxylation des dérivés trihydroxylés est retrouvée chez cinq souches, alors que la déshydroxylation des dérivés dihydroxylés n'est retrouvée que chez trois souches (Figure 24), avec par exemple les souches *A. celatus* JCM 14811 et *A. equolifaciens* JCM 14793, qui ne sont capables de déshydroxyler que les métabolites trihydroxylés et non les métabolites dihydroxylés. Ces dernières présentent une grande variabilité sur leurs capacités à déshydroxyler les métabolites des monomères de flavan-3-ols et donc cela suggère que différents systèmes enzymatiques seraient impliqués. La comparaison des bactéries capables de cliver le cycle C et de déshydroxyler le groupement en C_{4'} montre qu'il n'y a aucun lien entre ces deux activités. La présence d'une des deux activités ne permet pas de prédire la présence de l'autre activité.

A. equolifaciens subsp. celatus JCM 14811 et *A. equolifaciens* JCM 14793 ont également la capacité de déshydroxyler le groupement en C_{4'} des métabolites issus de l'ouverture du cycle A de la (-)-épigallocatechine et la (-)-gallocatechine. Ces métabolites sont l'acide (-)-4-hydroxy-5-(3',4',5'-trihydroxyphényl) valérique et la (-)-5-(3',4',5'-trihydroxyphényl)- γ -valérolactone (Figure 24) (Takagaki et Nanjo 2015c).

La déshydroxylation d'autres métabolites phénoliques a également été recherchée. Un nombre important de souches de l'espèce *E. lenta* (21 souches sur 22) ont la capacité de déshydroxyler le groupement en C_{4'} de l'acide 5-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique, mais aucune d'elles n'a montré d'activité sur l'acide 5-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique (Wang et al. 2001; Maini Rekdal et al. 2020).

En revanche, la déshydroxylation de ce dernier métabolite a été observée chez deux souches du genre *Gordonibacter* qui font également parties des *Eggerthellaceae* (Maini Rekdal et al. 2020).

L'intérêt pour la bactérie de déshydroxyler le cycle B serait de régénérer ses coenzymes tel que le NADPH, le substrat polyphénolique jouant le rôle d'accepteur d'électrons (Takagaki et al. 2014). Dans un milieu dépourvu d'accepteurs d'électrons, il a été montré que des souches de *E. lenta* capables de déshydroxyler la dopamine, qui est une molécule possédant un groupement catéchol, ont une croissance bactérienne plus élevée que d'autres qui en sont incapables (Maini Rekdal et al. 2020). Bien que cela n'ait pas été vérifié sur un substrat polyphénolique, cette étude suggère que la déshydroxylation des métabolites de flavan-3-ols assurerait un fitness (survie, maintien) plus important à la bactérie.

En conclusion, les différentes souches isolées capables de déshydroxyler le groupement OH en C₄' du cycle B des métabolites de flavan-3-ols ont une spécificité de substrat très variable (très large ou très restreinte). Cette variabilité se retrouve probablement à l'échelle du microbiote de chaque individu et pourrait expliquer les différences de production de métabolites phénoliques observées dans les études *in vivo* et *in vitro* (cf. 3.2).

4.1.4. Clivage de la liaison ester liant l'acide gallique

Le clivage de la liaison ester liant l'acide gallique au cycle C de certains flavan-3-ols se fait très rapidement au contact du microbiote intestinal « complet ». Ce constat suggère que cette activité est apportée par plusieurs micro-organismes au sein du microbiote intestinal. En accord avec cette hypothèse, le criblage de plus d'une centaine de souches entériques de collection pour leur capacité à cliver la liaison ester de la (-)-épigallocatechine-3-O-gallate a permis de mettre en évidence quatre espèces bactériennes métaboliquement actives [*Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella planticola*, *K. pneumoniae*, *Bifidobacterium longum*] (Takagaki and Nanjo, 2010). D'autres études ont permis de montrer que le probiotique *Lactobacillus plantarum* IFPL935 peut hydrolyser la liaison ester sur plusieurs substrats, tel que la (-)-épicatéchine et les dimères de procyanidines de type B (Tabasco, 2011; Sánchez-Patán et al. 2012). Sur le plan phylogénétique, les bactéries identifiées sont réparties sur différentes branches du domaine bactérien. Ceci montre que cette capacité métabolique n'est pas restreinte à un genre ou une famille bactérienne, à l'inverse de ce que nous venons de voir pour l'ouverture des cycles C et A.

Il est à noter que l'impact de la stéréochimie des différents flavan-3-ols contenant l'acide gallique sur la capacité de ces bactéries à hydrolyser la liaison ester n'a pas été étudié. Cependant, le monomère (-)-épigallocatechine-3-O-gallate est la forme la plus fréquemment retrouvée dans notre alimentation

parmi les monomères galloylés, tel que dans le thé (Yang et al. 2000) et a donc fait l'objet de nombreuses études à l'instar des autres flavan-3-ols.

4.2. Dégradation des procyanidines

Actuellement, aucune étude n'a permis de mettre en évidence un micro-organisme capable de dégrader les procyanidines de type B ou de type A (Braune et Blaut 2016). Cependant, plusieurs équipes se sont intéressées aux probiotiques du genre *Lactobacillus* et ont émis l'hypothèse qu'ils pourraient être impliqués dans le métabolisme des procyanidines. Dans une étude *in vitro* où la souche *Lactobacillus rhammosus* ATCC 9595 a été incubée avec des extraits de marc de canneberge riches en procyanidines de type A, les auteurs ont mesuré une diminution de la concentration en procyanidines et une augmentation en monomères et métabolites phénoliques dans le milieu de culture (Rupasinghe et al. 2019). Cependant, ces résultats ne permettent pas de certifier que cette souche dégrade les procyanidines car la libération des monomères peut s'expliquer par une cassure interflavanique médiée par la baisse de pH du milieu (Spencer et al. 2000). Le rôle de la souche *Lactobacillus plantarum* IFPL935 dans le métabolisme des monomères de flavan-3-ols a déjà été établi, mais son rôle dans la dégradation des procyanidines reste à prouver. Quand cette souche est incubée avec des dimères de type B et A, aucune activité de dégradation n'a été observée (Sánchez-Patán et al. 2012). Cependant, l'ajout de cette souche à des selles humaines dans un système SHIME stimule la métabolisation des procyanidines (Barroso et al. 2013; 2014), montrant un lien indirect entre ce probiotique et la dégradation des procyanidines. Cet effet stimulateur de *Lactobacillus* sp. a également été observé dans un modèle *in vivo*. La supplémentation de *Lactobacillus casei*-01 et d'extraits de litchi à des rats induit une baisse de la concentration sanguine du monomère d'épicatéchine et de procyanidines de type A (dimère et trimère), suggérant une plus grande métabolisation microbienne de ces précurseurs dans le tube digestif (Li et al. 2017).

Pour conclure, ces études ont seulement mis en évidence un lien indirect entre certaines souches de *Lactobacillus* et le métabolisme des procyanidines et restent dans l'ensemble peu probantes. D'autres études sont donc nécessaires afin d'identifier des souches capables de dégrader les procyanidines.

4.3. Dégradation par les micro-organismes aérobies

Lors de cette thèse, je me suis focalisé sur la dégradation des flavan-3-ols par les micro-organismes du microbiote intestinal qui sont pour une grande part anaérobies stricts. Cependant, la majorité des flavan-3-ols se trouve dans la nature et plusieurs micro-organismes aérobies de l'environnement ont de ce fait développé la capacité de les utiliser en tant que source de carbone. Par exemple la dégradation aérobie de la catéchine est particulièrement bien décrite. La majorité des espèces identifiées sont des champignons, tel que *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium* sp. et une dizaine d'autres (Arunachalam et al. 2003). *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127 et *Burkholderia* sp. KTC-1

sont les seules bactéries aérobies décrites pour utiliser la (+)-catéchine comme source de carbone (Arunachalam et al. 2003; Matsuda et al. 2008). La première étape de dégradation par ces micro-organismes passe par la formation à partir de la catéchine de l'acide phloroglucinique et l'acide protocatéchique (Figure 26) (Arunachalam et al. 2003). Une autre voie de dégradation aérobie de la catéchine a été observée avec *Burkholderia* sp. KTC-1 et génère un métabolite intermédiaire, la taxifoline (Matsuda et al. 2008) qui est aussi un intermédiaire retrouvé dans la dégradation anaérobie de la quercétine (flavonol) (Braune et Blaut 2016).

Enfin, un gène de *A. calcoaceticus* MTC 127 code une oxygénase qui est impliquée dans la dégradation de la catéchine en acide phloroglucinique (Arunachalam et al. 2003).

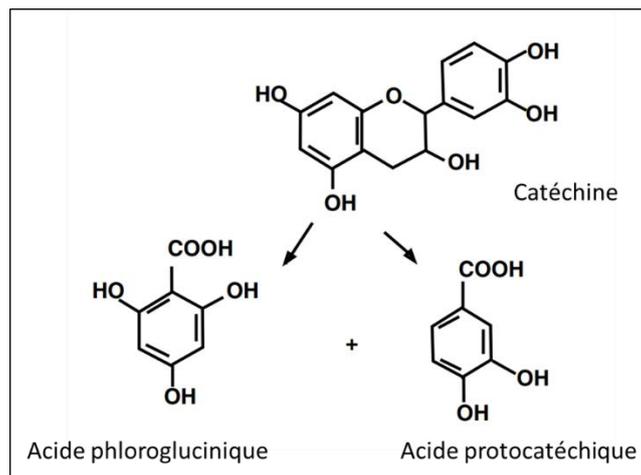


Figure 26. Dégradation de la catéchine par des micro-organismes aérobies

4.4. Gènes identifiés

La plupart des gènes bactériens identifiés comme étant impliqués dans le métabolisme des polyphénols l'ont été pour des polyphénols d'autres classes que les flavan-3-ols. Il s'agit de gènes identifiés chez l'espèce *Eubacterium ramulus* qui codent des enzymes impliquées dans la dégradation de la phlorétine, une dihydrochalcone produite à partir d'une flavone, l'apigénine et d'une flavanone, la naringénine, et dans l'isomérisation d'un flavanonol, la (+)-taxifoline (Schoefer et al. 2004; Braune et Blaut 2016). D'autre part, un gène codant une benzyl-ether-réductase (appelé gène *ber*) a été décrit chez *Eggerthella lenta*. L'enzyme codée par ce gène métabolise un lignane, le pinorésinol, en ouvrant les hétérocycles oxygénés de ce polyphénol (Figure 27) (Bess et al. 2020). Si cette enzyme est capable d'ouvrir un cycle oxygéné, on peut se demander si elle ne pourrait pas être active dans l'étape d'ouverture du cycle C des monomères de flavan-3-ols.

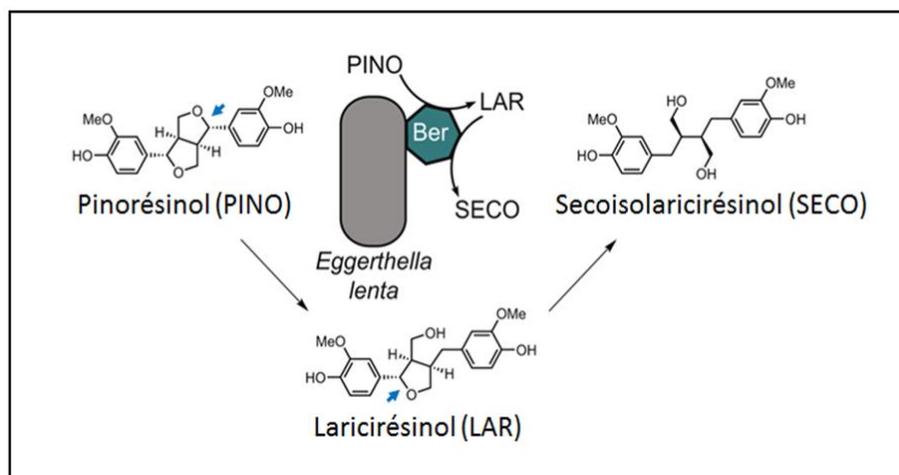


Figure 27. Implication de l'enzyme Ber dans l'ouverture des hétérocycles du Pinorésinol, adapté de Bess et al. (2020). Modèle de la dégradation du Pinorésinol par *Eggerthella lenta*. L'enzyme Ber permet l'ouverture d'un premier hétérocycle (flèche bleue) du pinorésinol pour former le métabolite Laricirésinol, puis l'ouverture du second hétérocycle (flèche bleue) pour former le métabolite Secoisolaricirésinol. Ber : Benzyl ether reductase.

Ce n'est que très récemment que des gènes impliqués dans le métabolisme de la (+)-catéchine (monomère de flavan-3-ols) ont été découverts (Maini Rekdal et al. 2020). Ces gènes ne sont pas impliqués dans l'étape initiale d'ouverture du cycle C de la (+)-catéchine, mais dans les étapes ultérieures qui consistent à déshydroxyler le cycle B de la forme ouverte de la (+)-catéchine ((+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol), mais aussi des acides 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique et 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique formés ultérieurement (Figure 28).

L'étude réalisée par Maini Rekdal et al. (2020) a ainsi permis de mettre en évidence par une approche transcriptomique (RNAseq) chez la souche *Eggerthella lenta* A2 un opéron de trois gènes appelé *cadh* (pour catechin dehydroxylation) qui est fortement exprimé après l'ajout de (+)-catéchine dans le milieu de culture (Figure 28b). Cet opéron serait impliqué dans la déshydroxylation du cycle B au niveau du carbone C_{4'} de (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol obtenu après l'ouverture du cycle C (Figure 28a). Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont montré qu'un opéron similaire (*dadh*) est impliqué dans la déshydroxylation de la dopamine, molécule possédant comme la catéchine un groupement catéchol (Maini Rekdal et al. 2020). Ces deux opérons de trois gènes ont une organisation identique et codent pour une protéine transmembranaire, une sous-unité ferrédoxine 4Fe-4S impliquée dans le transfert d'électrons et une enzyme molybdène-dépendante catalysant la déshydroxylation du groupement catéchol commun aux deux précurseurs. Les deux enzymes CadhA et DadhA présentent 50,9 % d'identité. Maini Rekdal et al. (2020) ont proposé un schéma d'organisation des trois protéines codées par l'opéron *cadh* à la surface de la bactérie (Figure 28c). La localisation extra-cellulaire de l'enzyme est proposée du fait que l'enzyme possède une séquence signal TAT (Twin-Arginine-Translocation) qui intervient dans la sécrétion des protéines bactériennes

(Sargent 1998). La protéine transmembranaire permettrait d'ancrer l'enzyme à la surface de la bactérie.

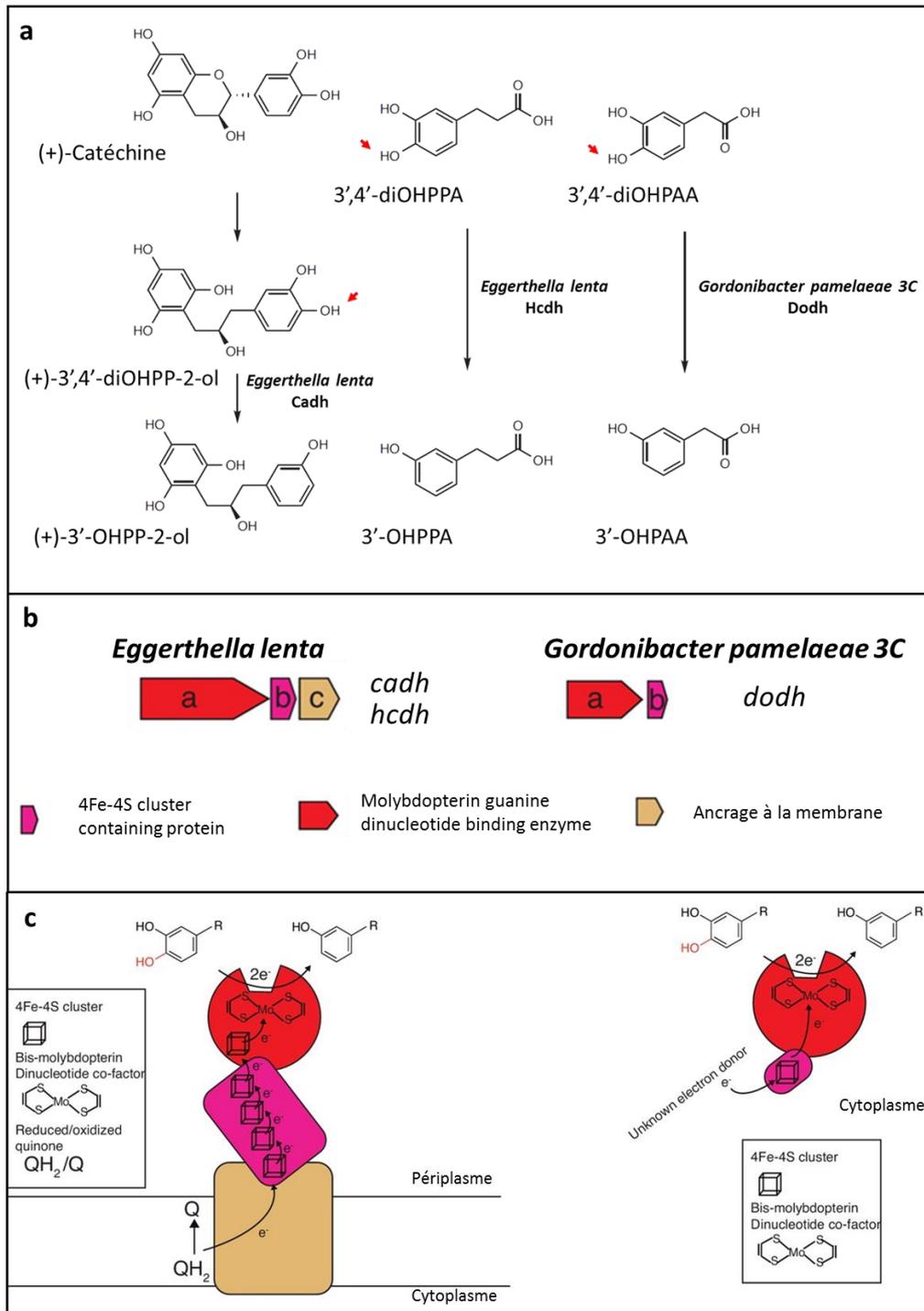


Figure 28. Implication de différents complexes enzymatiques dans la déshydroxylation de métabolites de flavan-3-ols. Adapté de Maini Redkal et al. (2020). *Eggerthella lenta* ouvre d'abord l'hétérocycle oxygéné pour former le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol. Les gènes impliqués dans cette étape ne sont pas connus. Ce métabolite va ensuite être déshydroxylé (flèche rouge) par l'enzyme Cadh pour former le (+)-3'-OHPP-2-ol. *E. lenta* est également capable de déshydroxylé (flèche rouge) le 3',4'-diOHPPA (flèche rouge) grâce à l'enzyme Hcdh pour former le 3'-OHPPA. Une autre bactérie, *Gordonibacter pamelaeeae* 3C déshydroxyle (flèche rouge) 3',4'-diOHPPA en 3'-OHPPA grâce à l'enzyme Dodh. Cadh : Catechin dehydroxylase, Hcdh : Hydrocafeic acid dehydroxylase, Dodh : DOPAC dehydroxylase.

Etude bibliographique

Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés

(+)-3',4'-diOHPP-2-ol = (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

(+)-3'-OHPP-2-ol = (+)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ;

3',4'-diOHPPA = acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique ;

3',4'-diOHPPA = acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique ;

3'-OHPPA = acide 3-(3'-dihydroxyphényl) propionique ;

3'-OHPPA = acide 2-(3'-dihydroxyphényl) acétique.

Cette activité de déshydroxylation sur le métabolite ouvert de la (+)-catéchine ((+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol, Figure 28a) ne serait cependant pas transposable à d'autres stéréoisomères. La souche *Eggerthella lenta* SDG-2 est capable de déshydroxyler la forme ouverte de la (-)-épicatéchine, mais pas celle de la (+)-catéchine (Figure 24) (Wang et al. 2001). L'activité de déshydroxylation semble donc spécifique d'un stéréoisomère et l'orientation du groupement hydroxyle sur le carbone asymétrique en C₃ jouerait un rôle important (Figure 12). L'importance de la stéréochimie du substrat sur l'activité d'une enzyme a déjà été observée avec d'autres polyphénols. La chalcone isomérase de *Eubacterium ramulus* est capable d'isomériser la (+)-taxifoline, mais pas la (-)-taxifoline (Braune et al. 2016). Des études plus approfondies sont nécessaires pour caractériser la Cdh et confirmer sa spécificité vis à vis de la (+)-catéchine.

En utilisant la même stratégie RNAseq, un autre opéron de trois gènes a été identifié chez *Eggerthella lenta* A2 (Figure 28b) et serait impliqué dans la déshydroxylation du cycle B de l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique (Maini Rekdal et al. 2020). Cet opéron appelé *hcdh* (pour hydrocaffeic acid dehydroxylation) possède une organisation similaire à l'opéron *cadh*. L'enzyme HcdhA serait aussi sécrétée grâce à sa séquence signal TAT. La purification de l'enzyme Hcdh a permis de confirmer son activité de déshydroxylation de l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique. De plus, le criblage d'une collection de 22 souches de *E. lenta* montre la présence de l'opéron *hcdh* chez 21 souches pour lesquelles la même activité de déshydroxylation est retrouvée. Par contre, cet opéron n'a pas été trouvé chez une souche de l'espèce *Paraeggerthella sp.* et deux souches de l'espèce *Gordonibacter sp.* (deux espèces de la famille des *Eggerthellaceae*), alors que ces bactéries possèdent cette activité. La déshydroxylation de l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique chez *Paraeggerthella sp.* et *Gordonibacter sp.* impliquerait donc un système enzymatique différent de celui d'*Eggerthella lenta* bien que ces espèces soient proches.

Toujours par RNAseq, un opéron de deux gènes appelé *dodh* (pour DOPAC dehydroxylation, DOPAC : 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) a été mis en évidence chez *Gordonibacter sp.* et serait impliqué dans la déshydroxylation de l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique (Figure 28a). Cet opéron possède le gène codant la sous-unité ferrédoxine 4Fe-4S et le gène codant une enzyme molybdenum-dépendante (Figure 28b). Par contre, il ne possède pas le gène codant la protéine d'ancrage à la membrane, et l'enzyme n'a pas la séquence signal TAT assurant son export. Le complexe protéique serait donc soluble dans le cytoplasme (Figure 28c). Le criblage de la même collection de

Etude bibliographique

Chapitre 4 : Métabolisme des flavan-3-ols par des micro-organismes isolés

souches de *E. lenta* (n=22) montre l'absence d'activité de déshydroxylation de ce précurseur pour l'ensemble des souches, résultat qui s'explique par l'absence de l'opéron *dodh*. Par contre, cet opéron est présent chez une souche de *Paraeggerthella sp.* et deux souches de *Gordonibacter sp.* qui sont capables de déshydroxyler l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique.

En conclusion, *Eggerthella lenta* mettrait en jeu un opéron de trois gènes *cadh* codant un complexe enzymatique exposé à la surface cellulaire et impliqué dans la déshydroxylation de la (+)-3'4'-diOHPP-2-ol. Les souches de *E. lenta* (21 souches sur 22) qui possèdent l'opéron de trois gènes *hcdh* sont aussi capables de déshydroxyler l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique. Les souches de *E. lenta* ne possèdent pas l'opéron de deux gènes (*dodh*) et ne déshydroxylent pas l'acide 2-(3',4'-dihydroxyphényl) acétique, contrairement à *Paraeggerthella sp.* (une souche) et *Gordonibacter sp.* (deux souches). Chez ces deux dernières espèces, la déshydroxylation de l'acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl) propionique ne met pas en jeu l'opéron *hcdh*, mais des gènes non encore identifiés.

Même si les données de transcriptomique par RNAseq ont mis en évidence certains gènes organisés en opéron et significativement induits en présence d'un polyphénol, la fonction de ces opérons reste à confirmer. Pour cela, il faudrait pouvoir muter chacun des gènes de l'opéron. Malheureusement, aucun outil génétique n'est disponible chez *E. lenta* ni chez *Paraeggerthella* et *Gordonibacter*. L'expression hétérologue chez *E. coli* a été envisagée pour les deux autres opérons *hcdh* et *dodh* mais s'est avérée impossible (Maini Rekdal et al. 2020). C'est pourquoi seules des preuves indirectes ont permis à ce jour de dire que l'opéron *cadh* est bien impliqué dans l'activité de déshydroxylation de la (+)-catéchine. Ces preuves sont la corrélation entre présence de l'opéron et activité enzymatique sur une collection de souches mais également l'inhibition de l'activité enzymatique de la culture bactérienne par le tungstate qui est un inhibiteur reconnu des enzymes molybdenum-dépendante.

Malgré ces avancées récentes sur les gènes impliqués dans la déshydroxylation de trois métabolites d'un monomère de flavan-3-ols, la (+)-catéchine, d'autres études sont nécessaires afin d'identifier l'ensemble des gènes microbiens impliqués dans ce métabolisme comme l'ouverture des cycles A et C, ou la déshydroxylation d'autres métabolites intermédiaires tels que les dérivés des acides phénylvalériques et phényl- γ -valérolactones (Takagaki et Nanjo 2010). L'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt de mieux caractériser le potentiel génétique des *Eggerthellaceae* qui semblent représenter une famille majeure impliquée dans le métabolisme des flavan-3-ols.

Bilan de l'étude bibliographique

L'étude bibliographique a permis de faire le point des connaissances sur les flavan-3-ols alimentaires et leur métabolisme par le microbiote intestinal humain. Les points clés de ces connaissances sont résumés ci-dessous.

- Un grand nombre d'aliments végétaux contiennent des flavan-3-ols avec des teneurs très variables d'un aliment à l'autre allant du milligramme au gramme pour 100g de matière fraîche. Sur le plan qualitatif, les monomères de flavan-3-ols sont très divers dans leur structure, il en est de même pour les polymères dont la structure varie en fonction de leur composition en unités constitutives, du type de liaisons interflavaniques (type B ou A), ou du degré de polymérisation. Les procyanidines de type B ayant des DP élevés sont fréquemment retrouvées quelle que soit l'origine botanique de l'aliment (fruits, céréales, légumineuses etc).
- La population humaine consomme en moyenne 900 mg/jour/personne de polyphénols, principalement sous la forme de flavonoïdes. Les flavan-3-ols sont les flavonoïdes les plus consommés (64-82 % des flavonoïdes totaux), sous la forme de monomères mais surtout d'oligomères et polymères. La quantité de flavan-3-ols consommée varie énormément selon les pays et les continents (156-1880 mg/jour/personne). La consommation de thé et de cacao y contribue fortement.
- Les monomères de flavan-3-ols sont reconnus comme étant peu biodisponibles mais ils sont beaucoup plus biodisponibles que leurs pendant galloylés ou les procyanidines. Une très faible proportion (native et conjuguée) atteint certains tissus et organes cibles (cerveau, rein, etc.) via la circulation sanguine mais plus de 95 % des flavan-3-ols migrent dans le tractus-digestif et atteignent le côlon qui héberge une population dense et diversifiée de micro-organismes c'est-à-dire le microbiote intestinal.
- La composition du microbiote intestinal est aujourd'hui bien décrite sur le plan taxonomique, avec des caractéristiques importantes comme les entérotypes (*Bactéroïdes*, *Prevotella*, *Ruminococcus*) possiblement liés au régime alimentaire, ou les dysbioses (déséquilibres irréversibles) corrélées à diverses pathologies. L'impact des flavan-3-ols sur la composition du microbiote intestinal n'est pas encore bien décrit mais quelques études suggèrent des effets prébiotiques et anti-pathogènes.
- Une fonction essentielle du microbiote intestinal est de dégrader les résidus alimentaires (fibres, protéines, lipides etc.) qui n'ont pas été digérés et absorbés en amont du tractus digestif. Le microbiote est capable de dégrader les flavan-3-ols via différentes voies métaboliques (ouverture des cycles A et C, déshydroxylation, α -oxydation, β -oxydation) et de générer une grande diversité de

Bilan de l'étude bibliographique

métabolites phénoliques, dont certains sont transitoires et d'autres vont s'accumuler tels que les dérivés d'acides phénylvalériques, propioniques, acétiques et benzoïques. Certains de ces métabolites sont spécifiques du métabolisme microbien des flavan-3-ols : les dérivés de phényl-γ-valérolactones et d'acides phénylvalériques.

- La biodisponibilité des métabolites microbiens de flavan-3-ols est équivalente voire supérieure à celle des flavan-3-ols précurseurs et comme eux, ils peuvent atteindre des organes cibles sous leur forme intacte ou conjuguée. Cette biodisponibilité varie d'un individu à l'autre et tend à mettre en évidence des groupes métaboliques (ou métabotypes) au sein de cohortes d'individus. A ce jour, rien ne permet de corrélérer la présence ou l'absence de micro-organismes impliqués dans les différentes voies de production de ces métabolites à un métabotype.
- De nombreuses études ont associé la consommation de flavan-3-ols à la prévention de pathologies cardio-vasculaires et neurologiques. Beaucoup de nutritionnistes s'accordent à dire que ces effets sont seulement dus aux activités biologiques des flavan-3-ols précurseurs. Compte tenu de l'importante biodisponibilité des métabolites phénoliques microbiens, on peut se demander si ce postulat reste vrai.
- Les connaissances sur les micro-organismes (et les gènes) impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols sont pour l'instant relativement limitées. Les genres *Eggerthella*, *Adlercreutzia*, *Slackia*, et *Gordonibacter* (famille *Eggerthellaceae*, phylum Actinobacteria) interviendraient dans l'ouverture du cycle C et la déshydroxylation du cycle B des monomères de flavan-3-ols. Une seule espèce, *Flavonifractor plautii* (famille *Ruminococcaceae*, phylum Firmicutes) serait capable d'ouvrir le cycle A des monomères de flavan-3-ols. Aucune bactérie active sur les oligomères n'a été décrite pour l'instant.
- En ce qui concerne les gènes impliqués dans ces réactions, les connaissances sont quasi-inexistantes. Seul un opéron de trois gènes (appelés *cadh*) a été identifié chez *Eggerthella lenta* et serait impliqué dans la déshydroxylation du métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol produit à partir de la (+)-catéchine.

Questions de recherche et approches expérimentales

L'étude bibliographique a mis en avant certains domaines pour lesquels les connaissances sont encore manquantes ou peu avancées (soulignées ci-dessus). Il semble ainsi impératif d'identifier l'ensemble des acteurs microbiens (et des gènes) impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols, ceci afin de mieux comprendre les liens entre flavan-3-ols, microbiote intestinal, métabotype et santé. Mieux comprendre ces liens permettrait à terme de définir la prédisposition d'un individu à se maintenir en bonne santé ou à développer une pathologie, et dans ce dernier cas, d'apporter des solutions nutritionnelles pour prévenir la pathologie.

Les questions posées sont donc les suivantes (Figure 29) :

- **Quels sont les micro-organismes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols monomères et oligomères ?**
- **Quels sont les métabolites microbiens générés par ces micro-organismes à partir des flavan-3-ols ?**
- **Quels sont les gènes fonctionnels (codant des enzymes) mis en jeu dans ces voies métaboliques ?**

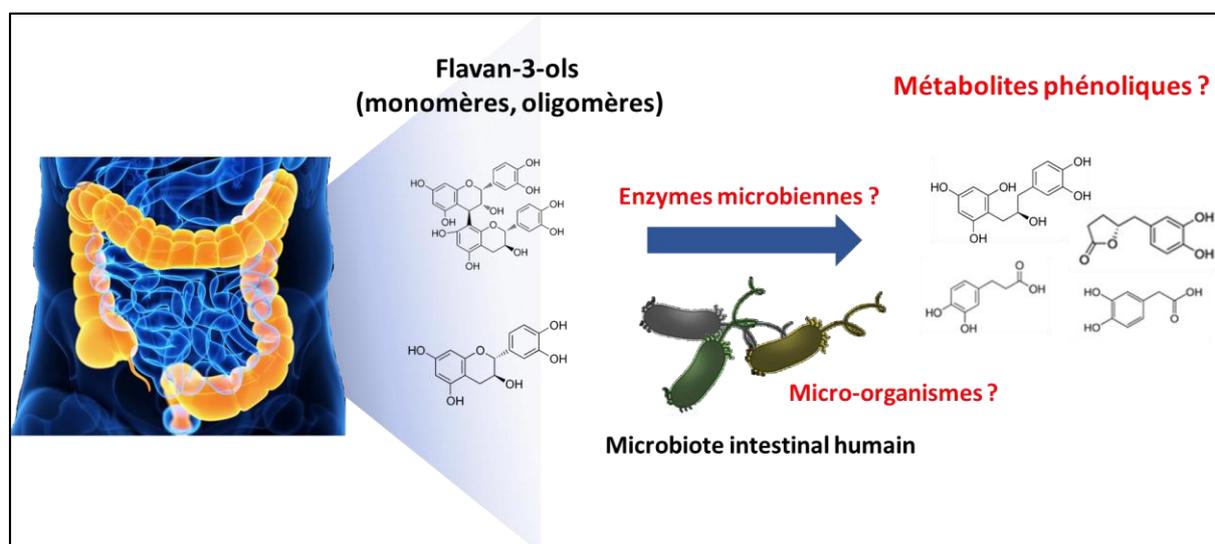


Figure 29. Questions de recherche de la thèse.

La thèse met en jeu des approches de culturomique, de biologie moléculaire et de bioinformatique, qui font l'expertise de l'UMR MEDIS avec l'encadrement de Pascale Mosoni et le co-encadrement de Pierre Peyret. Les approches analytiques (HPLC-DAD) de criblage métabolique des isolats bactériens ont été réalisées en collaboration avec Agnès Cornu (UMRH, INRAE Theix). Tout le volet biochimique de préparation de procyanidines purifiées et d'identification des métabolites microbiens par une approche métabolomique (LC-ESI-MS/MS) a été réalisé en collaboration avec Carine Le Bourvellec (co-encadrante) et Claire Dufour (SQPOV, INRAE Avignon).

Matériels et méthodes

1. Approches de culturomique

1.1. Echantillons biologiques, souches bactériennes et conditions de culture

Pour l'isolement bactérien, nous sommes partis de selles fraîches de deux donneurs (donneur P, homme âgé de 26 ans et donneur T, homme âgé de 27 ans) et de selles congelées et stockées à -80 °C en anaérobiose depuis 2014 (donneur O1, femme âgée de 49 ans). Les trois donneurs étaient en bonne santé ; ils avaient une alimentation variée (omnivore) et n'avaient pas reçu de traitement antibiotique pendant les trois mois précédant la collecte des selles, ni pris de prébiotiques ou probiotiques. Les donneurs ont été prévenus de l'objectif de l'étude et des procédures mises en œuvre. Ils ont fourni leur consentement écrit pour l'utilisation de leurs selles lors des expérimentations. Deux collectes ont été effectuées avec l'individu P et une collecte avec l'individu T.

Les souches *Eggerthella lenta* DSM 2243, *Eggerthella lenta* DSM 110913, *Eggerthella lenta* DSM 110914, *Eggerthella lenta* DSM 110915 et *Eubacterium ramulus* DSM 15684 ont été achetées auprès de l'organisme de collection de souches DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Les souches ont été cultivées en anaérobiose en utilisant le milieu MCR20 liquide ou gélosé (Tableau A2 en annexe).

1.2. Stratégie d'isolement de micro-organismes impliqués dans les voies métaboliques de dégradation des flavan-3-ols

La stratégie mise en place pour isoler des micro-organismes impliqués dans la dégradation de flavan-3-ols est adaptée des travaux de Kutschera et al. (2011) et est schématisée dans la Figure 30. Elle met en œuvre des enrichissements successifs de cultures bactériennes capables de dégrader le substrat d'intérêt ((+)-catéchine) et est basée sur le criblage de l'activité de métabolisation par les micro-organismes de ce substrat par HPLC-DAD (High Pressure Liquid Chromatography - Diode Array Detector) (Figure 31). Pour le criblage, nous avons sélectionné la (+)-catéchine car les souches décrites à ce jour comme étant capables de dégrader les flavan-3-ols sont capables de dégrader ce monomère qui est en outre moins onéreux que son stéréoisomère la (-)-épicatéchine. L'isolement est réalisé à partir de selle humaine (fraîche ou décongelée) maintenue en anaérobiose depuis la collecte. Une dilution sériée (10^{-1} à 10^{-10}) est réalisée dans un tampon anaérobie (cf. Tableau A1) et chaque dilution sert à inoculer (800 µl d'inoculum) 7,2 ml d'un milieu liquide riche à base de jus de rumen (MCR20, cf. Tableau A2) permettant à un plus grand nombre de micro-organismes de se développer.

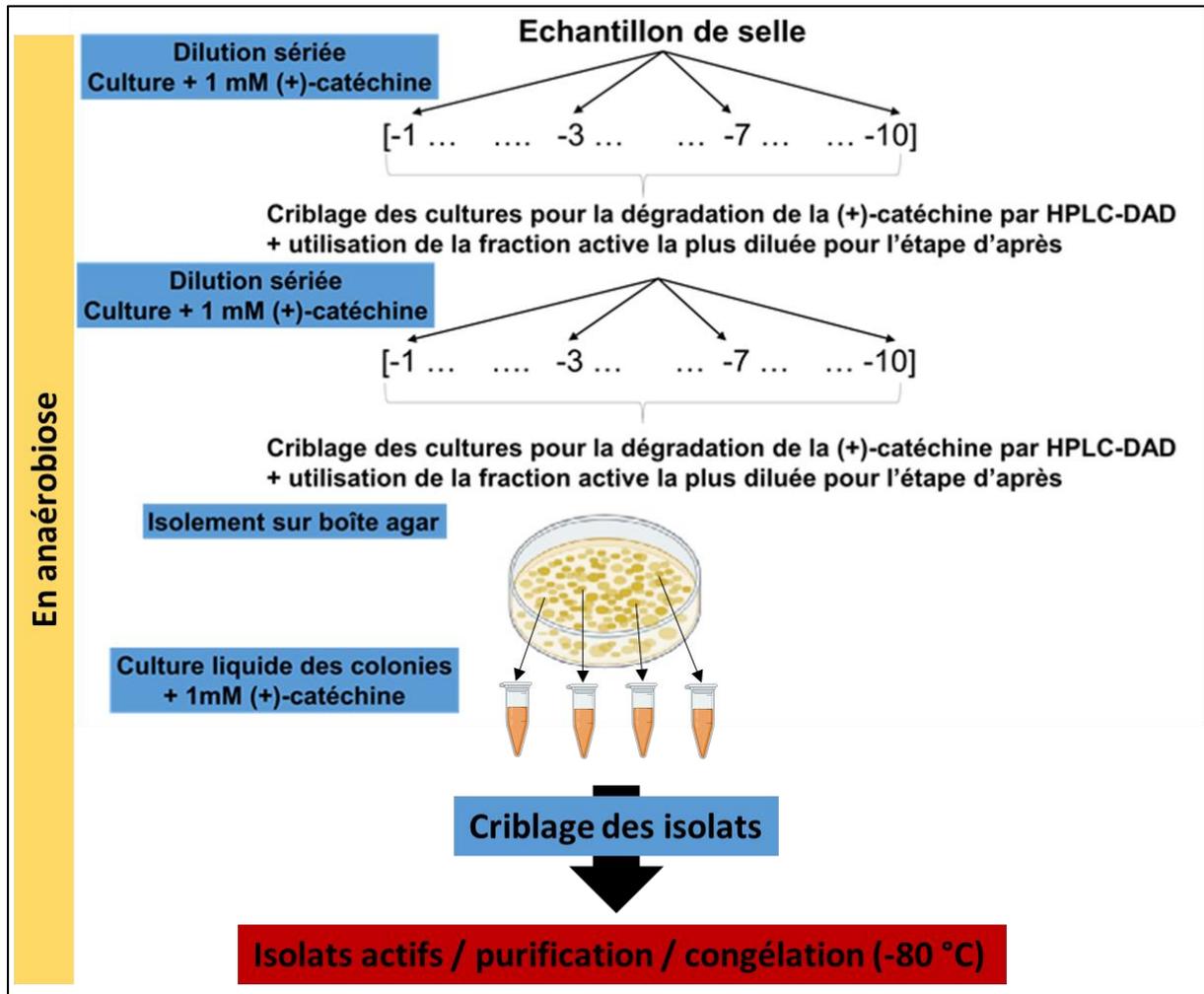


Figure 30. Schéma expérimental utilisé pour l'obtention d'isolats actifs sur la (+)-catéchine, issus de selles humaines. HPLC-DAD : High Pressure Liquid Chromatography - Diode Array Detector.

Toujours en anaérobiose, la (+)-catéchine est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 1 mM, et le mélange est incubé à 37 °C pendant 48 heures, sans agitation. Un aliquot de surnageant est ensuite analysé par HPLC-DAD comme décrit plus loin (cf. 2.3.1). On sélectionne ensuite la culture ayant été inoculée par la dilution microbienne la plus forte et qui présente encore une activité de dégradation. A partir de cette culture, on réalise une nouvelle dilution sériée et on répète le même protocole de culture et de criblage. Ce protocole répété deux fois permet d'enrichir la culture en micro-organismes capable de dégrader la (+)-catéchine. A la suite de cette deuxième étape et toujours à partir de la fraction active la plus diluée, l'isolement des micro-organismes est réalisé sur boîte de pétri en chambre anaérobie sur le milieu MCR20 gélosé. Après 48 à 72 heures d'incubation à 37 °C plusieurs dizaines voire centaines de colonies sont ensuite sélectionnées manuellement puis repiquées en milieu liquide avec et sans catéchine. Leur activité de dégradation de la (+)-catéchine est testée par HPLC-DAD après 48 h de culture à 37 °C. Si une activité de dégradation de la (+)-catéchine

est observée, l'isolat est purifié sur boîte de pétri, son activité de nouveau testée à partir d'une nouvelle culture liquide qui est ensuite congelée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en anaérobiose).

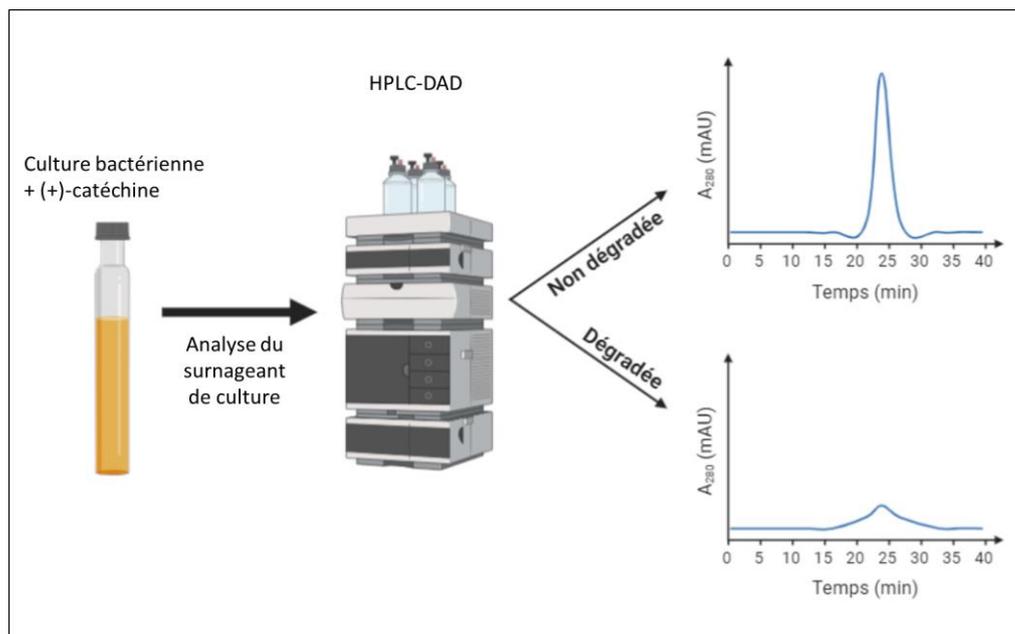


Figure 31. Criblage de l'activité de dégradation de la (+)-catéchine par les micro-organismes par HPLC-DAD (280 nm).

2. Approches biochimiques

2.1. Produits chimiques

La (+)-catéchine d'une pureté $\geq 98\%$ (référence C1251-10G) et la (-)-épicatéchine d'une pureté $\geq 90\%$ (référence E1753-1G) sont fournies par Sigma-Aldrich (Darmstadt, Allemagne). La (-)-épigallocatechine (référence BD42885), la (-)-épicatéchine-3-O-gallate (référence BD1457) et la (-)-épigallocatechine-3-O-gallate (référence BD42886) de puretés $\geq 98\%$ sont fournies par BLD pharmatech (Shanghai, China). Le dimère de procyanidines de type A d'une pureté $\geq 99\%$ (référence 0985 S) est fourni par Extrasynthèse (Lyon, France). L'acétonitrile et le méthanol de qualité chromatographique (HPLC) sont fournis par VWR (Fontenay-sous-bois, France). L'acide acétique de qualité chromatographique est fourni par Fischer Scientific (Pittsburgh, USA). Le toluène- α -thiol est fourni par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Préparation de procyanidines de type B purifiées à partir de parenchyme de pomme

Le parenchyme lyophilisé de pommes à cidre va subir deux extractions fractionnées solide-liquide successives permettant l'obtention d'une fraction de produits liposolubles qui seront écartés et d'une fraction polyphénolique riche en sucres, en acides et en polyphénols de faible poids moléculaires. Cette dernière fraction va subir une première étape de purification sur gel de silice en phase inverse afin d'éliminer les sucres et les acides et de l'enrichir en polyphénols. La fraction polyphénolique

obtenue va enfin subir une étape de fractionnement en phase normale de manière à purifier les procyanidines en fonction de leur degré de polymérisation croissant.

2.2.1. Extraction

Les polyphénols de pommes de la variété *Marie Ménéard* ont été extraits selon le protocole décrit par Guyot et al. (1998). Les polyphénols ont été extraits à partir de 150 g de parenchyme lyophilisé qui ont été mélangés avec 750 mL d'hexane pendant 15 min puis filtré sur un fritté G3. Le filtrat est éliminé et le résidu est mis en suspension dans 750 mL d'un mélange de méthanol/acide acétique (99/1 ; v/v). Cette suspension est mélangée pendant 15 min avant d'être filtrée sur le fritté G3. Cette extraction au méthanol acidifié est répétée 3 fois. Les fractions méthanoliques sont regroupées, évaporées sous pression réduite jusqu'à un volume de 250 mL puis stockées à -20 °C.

2.2.2. Purification sur C18 : élimination des sucres et concentration des polyphénols

Compte tenu de la forte teneur en sucres de la fraction méthanolique, cette dernière est préalablement diluée au demi dans un mélange eau milliQ/acide acétique (97.5/2.5 ; v/v), puis centrifugée à 16 000 g pendant 15 min.

Le surnageant de la fraction méthanolique est ensuite purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur une colonne Hibar[®] Lichrospher[®] 100 RP-18 (250 mm x 25 mm id., 5µm, Merck, Darmstadt, Allemagne) selon le protocole décrit par Guyot et al. (1998). Le système de chromatographie liquide à haute performance (Jasco, Tokyo, Japon) à l'échelle semi-préparative est constitué de : deux pompes haute pression modèle PU-2087 plus, d'un dégazeur, d'une interface LC-NETII/ADC, d'une vanne d'injection rhéodyne 3752i-038 (Rhonert Park, CA, USA) d'un volume de 20 mL, et d'un détecteur UV-visible UV-2077 plus. L'ensemble est contrôlé par le logiciel ChromNav (Jasco, Tokyo, Japon). La colonne est conditionnée avec la phase mobile A (eau milliQ/acide formique (100/0.1 ; v/v)) pendant 30 min à un débit de 20 mL/min. 60 mL de la solution méthanolique sont injectés sur la colonne (3 x 20 mL) via l'injecteur manuel. Afin de rincer la colonne et d'éliminer les glucides encore présents dans la fraction méthanolique, une élution avec le mélange d'eau milliQ/acide acétique (phase mobile A : 97,5/2,5 ; v/v) est réalisée jusqu'à absence de glucides dans l'éluat (détectée par un test au phénol, Dubois et al. 1956). Enfin, un gradient d'acétonitrile (phase mobile B) est appliqué (Tableau 4) à un débit de 15 mL/min afin d'éluer les polyphénols.

Tableau 4. Gradient d'élution utilisé pour la purification des polyphénols.

Temps (minutes)	0	5	20	22	27	30
Phase A (%)	100	70	70	10	10	50
Phase B (%)	0	30	30	90	90	50

Matériels et méthodes

L'élution de la fraction polyphénolique est suivie à 280 nm. Les polyphénols sont collectés à partir de 8 min après le début du gradient. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et l'extrait est congelé puis lyophilisé.

2.2.3. Purification sur Luna HILIC : isolement des procyanidines de degré de polymérisation défini

La fraction polyphénolique obtenue précédemment est soumise à une nouvelle étape de fractionnement sur une colonne Luna® HILIC 200 Å (250 mm x 21.2 mm i.d., 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) avec le matériel chromatographique décrit dans le paragraphe 2.2.2, selon une méthode adaptée de Robbins et al. (2009). L'extrait polyphénolique issu de la purification sur colonne C18 est dissous à la concentration de 150 mg/mL dans un mélange de phase mobile A à 5 % (méthanol/eau/acide acétique ; 95/ 3/ 2 ; v/v/v) et de phase mobile B à 95 % (acétonitrile). La colonne est préalablement équilibrée pendant 20 min à un débit de 21 mL/min avec un mélange de phases mobiles A et B (5/95 ; v/v). L'extrait est ensuite injecté sur la colonne et la séparation des différents monomères et oligomères est réalisée selon le gradient présenté dans le Tableau 5.

Tableau 5. Gradient d'élution utilisé pour la purification des procyanidines.

Temps (minutes)	0	3	57	60	67	70	75
Phase A (%)	5	5	67.6	100	100	5	5
Phase B (%)	95	95	32.4	0	0	95	95

La détection est réalisée à 280 nm. Le chromatogramme à 280 nm permet de suivre l'élution des procyanidines en fonction de leur degré de polymérisation. Le dimère est collecté de 13 min à 17 min d'élution après le début du gradient, le trimère de 20 à 24 min et le tétramère de 25 à 29 min. Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite, les fractions de procyanidines purifiées de DP2, DP3 et DP4 sont congelées, lyophilisées puis conservées sous vide à -20 °C avant utilisation.

2.2.4. Quantification et détermination du degré de polymérisation des procyanidines de type B

L'analyse des composés phénoliques, ainsi que leur quantification et la détermination du degré de polymérisation des procyanidines ont été réalisées après thioacidolyse par HPLC-DAD comme décrit par Guyot et al. (1998) (Figure 32). La thioacidolyse est réalisée en milieu anhydre, acide, à 40 °C en présence d'un nucléophile le benzyl thioéther. En milieu acide à chaud la liaison interflavanique des procyanidines est rompue entraînant la formation de 4-flavan-3-yl-carbocations à partir des unités d'extension tandis que les unités terminales sont libérées sous la forme de flavan-3-ols libres : (+)-catéchine et (-)-épicatéchine. Les 4-flavan-3-yl-carbocations sont des intermédiaires instables qui vont être piégés par le benzyl thioéther afin de former des dérivés 4-benzylthioether de flavan-3-ols. Afin

Matériels et méthodes

de faire la distinction entre les monomères natifs potentiellement présents dans les échantillons après purification et les monomères issus de la libération des unités terminales des procyanidines après thioacidolyse, une analyse directe sans thioacidolyse (extrait brut) est nécessaire.

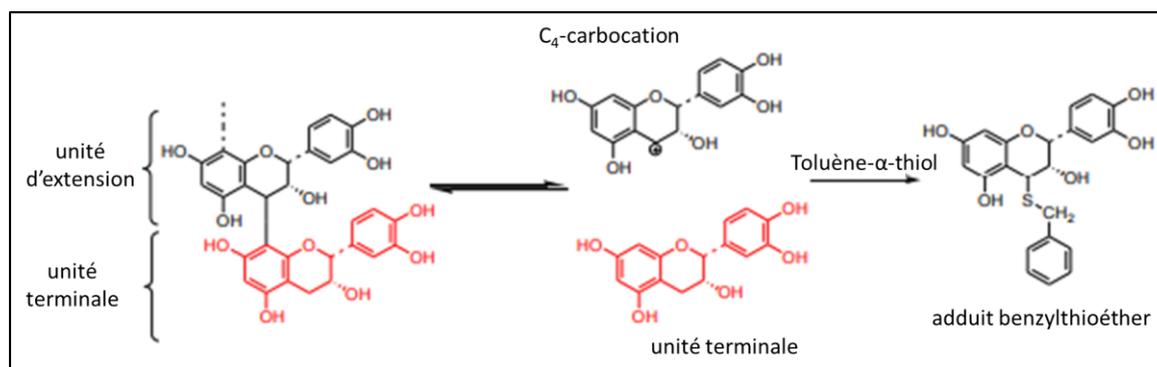


Figure 32. Schéma de la réaction de thioacidolyse. Adapté de Guyot et al. (1998).

Environ exactement 4 mg de procyanidines purifiés, sont dissous dans 1 mL de méthanol anhydre. Pour l'analyse sans thioacidolyse (extrait brut), 250 μ l de la solution de procyanidines sont prélevés et placés dans un vial d'injection puis dilués d'un facteur 4 par un mélange de méthanol/acide acétique (99/1 ; v/v). Le vial est fermé et placé dans un bain à ultrasons pendant 15 min, puis injecté (20 μ l) en HPLC-DAD pour analyse.

Pour l'analyse avec thioacidolyse, 250 μ l de la solution de procyanidines sont prélevés et placés dans un vial d'injection. A cette solution sont ajoutés 500 μ l de benzyl thioéther à 5 % dans du méthanol anhydre et 250 μ l de méthanol anhydre acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,4 N. Le vial est fermé hermétiquement et agité au vortex avant d'être incubé à 40 °C pendant 30 min avec une agitation toutes les 10 min. La réaction est ensuite arrêtée en plongeant le vial dans un bain de glace pendant 5 min. Le mélange réactionnel est injecté (20 μ l) en HPLC-DAD pour analyse.

La chaîne de chromatographie liquide à haute performance Shimadzu Prominence (Kyoto, Japon) est équipée de deux pompes LC-20AD Prominence UFLC, d'un dégazeur DGU-20A5 Prominence, d'un passeur automatique SIL-20AC HT, d'un four CTO20AC Prominence, d'un détecteur à barrettes de diodes SPD-M20A Prominence, d'un module de communication CBM-20A Prominence et le tout est contrôlé par le logiciel Lab Solution (Shimadzu, Kyoto, Japon). La séparation des molécules a été réalisée sur une colonne LiChroCART® 250-4 Lichrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4 mm i.d., 5 μ m, Merck, Darmstadt, Allemagne) équipée d'une pré-colonne de même caractéristique (LiChrospher RP18 guard cartridge, 5 μ m, Merck Darmstadt, Germany), à 30 °C. La phase mobile est constituée d'un mélange eau/acide acétique (97,5/2,5 ; v/v) phase A) et d'acétonitrile (phase B) à un débit est de 1 mL/min. Le gradient d'éluion est décrit dans le Tableau 6.

Tableau 6. Gradient d'élution utilisé pour la détermination du degré de polymérisation des procyanidines.

Temps (minutes)	0	5	15	45	48	52	55	60
Phase A (%)	97	91	84	50	10	10	97	97
Phase B (%)	3	9	16	50	90	90	3	3

Les longueurs d'ondes utilisées sont 280 nm pour les flavan-3-ols et les dihydrochalcones, et enfin 320 nm pour les acides hydroxycinnamiques. Les composés phénoliques ont été identifiés par comparaison de leurs spectres UV-visible et de leur temps de rétention par rapport à des solutions de composés standards. La (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine ont été quantifiés par étalonnage externe et sont exprimées en mg/g de matière sèche. La (-)-épicatéchine benzyl-thioéther est quant à elle quantifiée en équivalent (-)-épicatéchine. Les dihydrochalcones ont été quantifiées également par étalonnage externe, leurs teneurs sont exprimées en équivalent phloridzine. L'acide 5-caféoylquinique a été quantifié par étalonnage externe et sont exprimées en mg/g de matière sèche.

Le degré de polymérisation moyen (\overline{DPn}) des procyanidines est défini par la formule suivante :

$$\overline{DPn} = \frac{[CAT] + [EPI] + [EPISR] - [CATb] - [EPIb]}{[EPI] + [CAT] - [EPIb] - [CATb]}$$

Où [CAT] et [EPI] correspondent aux concentrations en unités terminales de flavan-3-ols obtenues après thioacidolyse ; [EPISR] correspond à la concentration en (-)-épicatéchine issues des unités d'extension liées au benzylthioéther après thioacidolyse ; [CATb] et [EPIb] correspondent aux concentrations des flavan-3-ols libres natifs potentiellement présents dans l'échantillon et déterminés par l'analyse directe sans thioacidolyse (extrait brut).

2.3. Analyse des flavan-3-ols et de leurs métabolites microbiens à partir des surnageants de culture microbiens

2.3.1. Analyses HPLC-DAD

2.3.1.1. Préparation des échantillons

A un volume V de culture microbienne prélevé (compris entre 0,1 et 1 ml) est ajouté un volume V/2 d'un mélange méthanol/acide acétique (98/2 ; v/v). L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 10000 g à température ambiante. Le surnageant est transféré dans un flacon opaque pour HPLC muni d'un bouchon à vis avec septum et stocké à 4 °C jusqu'à analyse.

2.3.1.2. Méthode d'analyse des échantillons

Les analyses en HPLC-DAD ont été effectuées sur une chaîne HPLC Agilent technologies 1200 séries, pilotée à l'aide du logiciel ChemStation (Agilent, Santa Clara, Etats-Unis). La phase mobile est constituée d'un mélange de trois phases : la phase mobile A est constitué d'un mélange eau/acide

Matériels et méthodes

formique (100/0,05 ; v/v), la phase mobile B correspondant à un mélange eau/acétonitrile/acide formique (30/70/0,05 ; v/v/v) et enfin la phase mobile C est composée d'un mélange acétonitrile/acide formique (100/0,05 ; v/v). Les échantillons ont été conservés à +10 °C dans le passeur d'échantillons dans un délai maximum de 24 à 48 heures avant analyse. Cinq µl d'échantillon sont injectés dans le système et la séparation des molécules est ensuite réalisée à l'aide d'une colonne LiChroCART® 125-4 Superspher® 60 RP-8 (125 mm x 4 mm i.d., 4 µm, Merck, Darmstadt, Allemagne) équipée d'une pré-colonne LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-8 (4 mm x 4 mm i.d., 5 µm, Merck, Darmstadt, Allemagne), l'ensemble est maintenu à 35 °C. Le débit est de 0.3 mL/min et le gradient d'élution est décrit dans le Tableau 7.

Tableau 7. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des échantillons microbiens.

Temps (minutes)	0	5	10	15	20	22	27
Phase A (%)	90	65	55	0	0	0	90
Phase B (%)	10	35	45	100	0	0	10
Phase C (%)	0	0	0	0	100	100	0

La détection est réalisée entre 190 et 400 nm, les flavan-3-ols et leurs métabolites microbiens ont été détectés à 280 nm, longueur d'onde optimale pour l'analyse des flavan-3-ols. Les composés ont été identifiés par comparaison de leurs spectres UV-visible et de leur temps de rétention par rapport à des solutions de composés standards. La quantification des monomères ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épigallocatechine, (-)-épicatéchine-3-O-gallate et la (-)-épigallocatechine-3-O-gallate) et des dimères et trimères de procyanidines purifiées a été réalisée par étalonnage externe à partir de produits purifiés et exprimée en mM. Les métabolites microbiens (Ac, Aec, Aegc, PCB-2A) sont quant à eux quantifiés en équivalent de leurs précurseurs à savoir (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épigallocatechine ou PCB-2.

2.3.2. Caractérisation par LC-ESI-MS/MS « Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric » des métabolites microbiens

L'identification des métabolites microbiens a été réalisée par chromatographie liquide ultra performance (UPLC, chaîne ACQUITY UPLC®, Waters Corp., Milford, MA, USA) couplé à un détecteur UV-Visible à barrette de diode (PDA, Waters) et à un spectromètre de masse de type ultra ion trap (HCT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). La phase mobile est constituée d'un mélange eau/acide formique (99/1 ; v/v ; phase A), et d'acétonitrile/acide formique (99/1 ; v/v ; phase B). Cinq µl d'échantillon ont été injectés dans le système avec un débit de phase mobile de 1 ml/min. La séparation des molécules a été réalisée sur une colonne LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP18 (250 mm x 4 mm i.d., 5 µm, Merck, Darmstadt, Germany) en présence d'une pré-colonne (LiChrospher RP18, 5 µm, Merck Darmstadt, Germany) chauffée à 35 °C, avec le gradient d'élution décrit dans le Tableau 8.

Tableau 8. Gradient d'élution utilisé dans l'identification des métabolites microbiens par LC-ESI-MS/MS.

Temps (minutes)	0	5	15	30	32	32.5	36
Phase A (%)	97	91	84	67	10	97	97
Phase B (%)	3	9	16	33	90	3	3

Les conditions de masses sont les suivantes : ionisation par électrospray (ESI) en mode négatif avec un balayage de masse de 100 à 2000 m/z. Le voltage du capillaire a été réglé à 2 kV, le débit d'azote à 12 L/min et la température du gaz de séchage était de 365 °C avec une pression de nébulisation de 60 psi. Les spectres de masse ont ensuite été traités à l'aide du logiciel Bruker Compass DataAnalysis v4.2 (Bruker Daltonik GmbH). L'identification des composés phénoliques a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masses avec la littérature.

3. Approches moléculaires et bioinformatiques

3.1. Extraction d'ADN génomique (ADNg)

A partir d'une colonie isolée, les isolats obtenus comme décrit ci-dessus sont mis en pré-culture pour une nuit dans du milieu MCR20 à 37 °C en anaérobiose. Le lendemain, ils sont inoculés à 2 % dans 30 ml ou 60 ml de MCR20 en fonction de la biomasse souhaitée pour l'extraction d'ADN. Les cultures sont alors incubées à 37 °C en anaérobiose pendant 24 h. Les cultures sont alors incubées à 37 °C en anaérobiose pendant 24 h. Elles sont ensuite centrifugées (10000 g, 10 min, RT) et le culot est lavé dans 1 ml de tampon phosphate salin (PBS 1X). Après une deuxième centrifugation (10000 g, 10 min, RT), le culot est repris dans 200 µl de PBS 1X et transféré dans un microtube Eppendorf de 1,5 ml. Après l'ajout de 100 mg de billes de zirconium 0,1 mm (BioSpec), les culots bactériens sont soumis à 3 minutes de lyse mécanique dans un broyeur/homogénéisateur réglé à l'amplitude maximale (30 battements/sec) (BeadBeater® MM 400, Retsch). Une lyse chimique est ensuite réalisée par l'ajout de 350 µl de tampon A du kit Easy-DNA™ (Invitrogen™) et une incubation à 65 °C pendant 10 minutes. Le mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 30 minutes avec la RNase du kit Easy-DNA™ (Invitrogen™). Une étape de précipitation des protéines est réalisée en ajoutant 150 µl de solution B, suivie d'une extraction phénol/chloroforme réalisée selon les instructions du kit Easy-DNA™ (Invitrogen™). Après récupération de la phase aqueuse, l'ADN génomique est précipité par l'ajout de V/10 d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et de deux volumes d'éthanol absolu glacial (-20 °C). L'ADN génomique se retrouve sous une forme de "pelote" et peut être récupérée à l'aide d'une pipette pasteur préalablement pliée à la flamme. Il est ensuite lavé dans une solution d'éthanol à 70 %, séché à température ambiante pendant 10 minutes, puis repris dans 100 µl de tampon d'élution (Tris/HCl 5 mM, pH de 8,5).

La qualité de l'ADNg a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %. La quantification de l'ADNg a été réalisée en mesurant la concentration en acide nucléique par la mesure de l'absorbance

à 260 nm à l'aide du NanoDrop One (Ozyme) et par fluorométrie avec le kit Qubit™ dsDNA BR et l'appareil Qubit (ThermoFisher Scientific) en suivant les instructions du fournisseur. Tout échantillon possédant un ratio de concentration en acides nucléiques NanoDrop/Qubit d'une valeur supérieure à 2 était considéré comme insuffisamment pur pour le séquençage ultérieur. Dans ce cas, l'ADNg a été soumis à un deuxième traitement RNase suivi d'une nouvelle extraction au phénol/chloroforme et lavages comme décrit plus haut. Les échantillons d'ADN ont ensuite été conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse par la plateforme de séquençage Gentyane (INRAE Clermont-Ferrand, France).

3.2. Amplification et séquençage de l'ADN ribosomal 16S

Une amplification de l'ADNr 16S a été effectuée par PCR à partir de l'ADNg extrait de nos isolats. Les réactions ont été effectuées avec un thermocycler Mastercycler® egradient S (Eppendorf) dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 5 µl de tampon 10X (Platinum™), 0,2 µM des amorces F27 (AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG) et 1492R (GNT ACC TTG TTA CGA CTT), 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2 unités de Taq polymérase Platinum™ (inVitrogen) et 0,5 µg d'ADNg matrice. Le programme utilisé consistait en une dénaturation initiale à 95 °C (30 s), suivie de 35 cycles comprenant une dénaturation à 95 °C (30 s), une hybridation à 45 °C (30 s) et une élongation à 72 °C (1 min 30), et était terminé par une élongation finale à 72 °C (7 min). Le fragment PCR (1466 pb) obtenu a ensuite été purifié avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) avant d'être séquençé par la société GATC Biotech (<http://www.gatc-biotech.com>) par la technique de Sanger. La séquence ainsi obtenue a été recherchée par blastn (megablast, paramètres par défauts) dans la base de données NCBI (« nucleotide collection », non redondante) pour identifier l'espèce la plus proche. Puis elle a été comparée (blastn) à la séquence de l'ADNr 16S de la souche de référence de cette espèce.

3.3. Arbres phylogénétiques

Des arbres phylogénétiques ont été réalisés en utilisant la séquence du gène codant l'ARNr 16S, marqueur phylogénétique chez les procaryotes. Les séquences d'ADNr 16S d'autres bactéries utilisées comme références ont été obtenues à partir de la base de données NCBI et correspondaient aux bactéries suivantes : *Eggerthella lenta* DSM 2243 (AF292375.1), *Eggerthella* sp. HF-4214 (VTFY01000027.1), *Eggerthella sinensis* strain HKU14 (AY321958.1), *Eggerthella timonensis* (LT598568.1), *Eggerthella* sp. HF-1101 (CP063310.1), *Eggerthella* sp. YY7918 (AP012211.1). L'ADNr 16S de *Escherichia coli* (J01859.1) a été utilisé comme séquence externe (racine de l'arbre). Pour positionner les souches de notre collection sur un arbre phylogénétique, les séquences des amplicons 16S obtenus ci-dessus ont été utilisées dans un premier temps. Par contre, une fois que les génomes ont été séquençés (en fin de thèse) les séquences d'ADNr 16S ont été extraites des génomes avec le logiciel disponible en ligne ContEst16S (<https://www.ezbiocloud.net/tools/contest16s>) (Lee et al.

2017). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la suite logicielle (pipeline) NGphylogeny (Lemoine et al. 2019) en gardant les paramètres par défaut. En bref, un alignement multiple a été réalisé avec MAFFT (v4.407_1), et le nettoyage de l'alignement a été effectué avec BMGE (v1.12_1). La matrice de distance a été obtenue grâce à FastME (v2.1.6.1_1) et le rendu graphique de l'arbre phylogénétique a été généré par Newick Display (v1.6).

3.4. Séquençage des génomes bactériens avec la technologie PacBio

Le séquençage de 3^{ème} génération de type « Single-molecule Real-time long reads » a été réalisé sur la plateforme de séquençage Gentyane (INRAE Clermont-Ferrand, France) avec un séquenceur PacBio Sequel II (Pacific Biosciences, USA). Les banques d'ADN grands fragments SMRTBell® ont été préparées avec le kit SMRTbell Express Template prep kit 2.0 en suivant les instructions du fournisseur pour la préparation de banques multiplexées d'ADN génomique microbien. En bref, l'ADNg (1 µg) de chaque souche a été cisailé en utilisant des g-tubes (Covaris, Angleterre), générant des fragments d'ADN d'environ 10 kb. Un test sur un analyseur de fragments (Agilent Technologies) a permis d'évaluer la distribution en taille des fragments. Les extrémités d'ADN simple brin ainsi que les dommages interne sur les fragments d'ADN ont été respectivement éliminés ou réparés par traitements enzymatiques. L'ajout d'une queue Adénosine (A-tailing) suivi de la ligature d'un adaptateur à code barre sur l'extrémité 3' des fragments d'ADN a permis de générer la banque d'ADN génomique de grands fragments SMRTBell®. Les banques ont ensuite été mélangées de façon équimolaire, puis le mélange a été purifié sur des billes magnétiques 0,45V AMPure® PB (Beckman Coulter). La banque SMRTBell® multiplexée a ensuite été vérifiée de manière qualitative avec l'analyseur de fragment (Agilent Technologies) et de manière quantitative avec un fluorimètre Qubit (Thermofisher Scientific) et le kit Qubit™ dsDNA HS. Un complexe [ADN polymérase - banque SMRTBell®] prêt à séquencer a ensuite été créé en utilisant le kit Binding 2.0 (Pacific Biosciences) et l'amorce de séquençage V4. Le protocole de chargement des matrices par diffusion a été suivi selon les instructions du fournisseur. Le séquenceur PacBio Sequel II a été programmé pour charger 100 pM de la banque d'ADN SMRTBell® sur un SMRTcell 8M avec le Sequencing Plate 2.0 (Pacific Biosciences) et pour séquencer en mode lecture longue continue (CLR) avec un programme de pré-extension de 2 heures et un temps d'acquisition de 15 heures.

3.5. Assemblage et analyse des génomes bactériens

L'assemblage des génomes a été réalisé par la plateforme Gentyane (INRAE Clermont-Ferrand, France). Le démultiplexage des séquences brutes a été effectué avec l'outil lima (v1.11.0). L'assemblage *de novo* des génomes a été réalisé avec l'outil « Microbial Assembly » de la suite logicielle SMRT Link v8.0 (PacBio) en suivant les recommandations du fournisseur. Le niveau de complétion des

génomomes a été évalué par checkM (v1.1.3) en utilisant les paramètres par défaut (Parks et al. 2015). L'annotation des génomes séquencés a été effectuée avec le logiciel prokka (v1.14.5) (Seemann 2014). Le calcul de l'ANI (« average nucleotide identity ») qui mesure le pourcentage de similitude au niveau nucléotidique entre deux génomes (entre paires de fragments orthologues) a été réalisé avec le logiciel OrthoANI (v0.93.1) (Lee et al. 2016). La recherche de plasmides sur les souches *Flavonifractor plautii* s'est faite avec l'outil mlplasmids (v1.0.0) et en utilisant *Escherichia coli* comme organisme modèle (Arredondo-Alonso et al. 2018). L'analyse du pangénoème a été réalisée avec le logiciel Roary (v3.11.2) (Page et al. 2015).

3.6. Analyse transcriptomique chez *Eggerthella lenta* DSM 2243

3.6.1. Culture bactérienne et induction par les flavan-3-ols

Les conditions de culture de *E. lenta* pour une analyse transcriptomique en présence de flavan-3-ols sont similaires à celles décrites par Bess et al (2020) et sont schématisées dans la (Figure 33). A partir d'une culture congelée à -80 °C de la souche type *E. lenta* DSM 2243, une première pré-culture est réalisée dans 10 ml de milieu MCR20 avec une inoculation à 2 % et croissance à 37 °C en anaérobiose sur la journée (environ 8h). Cette pré-culture est ensuite utilisée pour obtenir une seconde pré-culture incubée pendant une nuit (environ 16h) dans les mêmes conditions. Le lendemain matin, quatre flacons hermétiques munis de bouchons en butyl (bouchons de Balch) contenant chacun 40 ml de MCR20 en anaérobiose sont inoculés à 2 % à partir de la seconde pré-culture. Les flacons sont ensuite incubés à 37 °C jusqu'à ce que la culture soit en milieu de phase exponentielle (DO600nm = 0,3). Cent µl de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine ou dimère de procyanidines de type B, en solution dans du méthanol sont ensuite injectés en anaérobiose dans trois flacons, le quatrième flacon recevant 100 µl de méthanol seul (témoin). La concentration finale en chacun des trois flavan-3-ols dans le milieu de culture était de 0,5 mM. L'incubation à 37 °C est ensuite poursuivie pendant 1 h 45. Les flacons sont ensuite rapidement placés dans un bac de glace, puis centrifugés à 13000 g pendant cinq minutes à 4 °C. Après avoir éliminé le surnageant de culture, le culot bactérien est repris dans 1 ml d'une solution de conservation RNA-PLUS™ (MP Biomedicals) et conservé à -80 °C. Ce protocole a été réalisé trois fois de manière indépendante afin d'obtenir des triplicats biologiques.

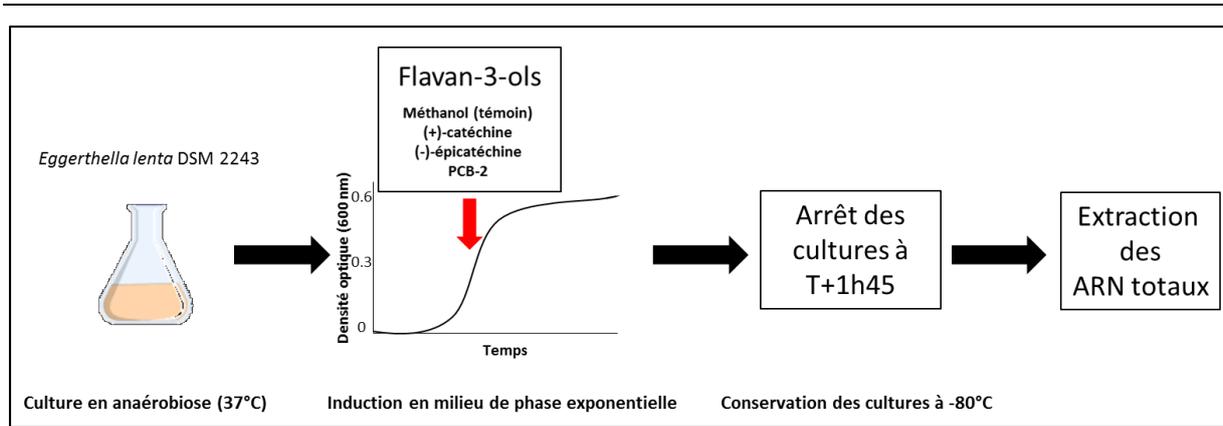


Figure 33. Schéma expérimental utilisé pour l'obtention des ARN totaux de la souche *E. lenta* DSM 2243 après induction par différents flavan-3-ols. PCB-2 : dimère de procyanidines de type B.

3.6.2. Extraction des ARN totaux

Les 12 culots bactériens de *E. lenta* DSM 2243 obtenus ci-dessus ont été envoyés sous carboglace à la société Genoscreen (Lille, France) à qui nous avons sous-traité les étapes 3.6.3 à 3.6.5 qui sont schématisées dans la Figure 34.

L'ARN total a été extrait en utilisant le kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant, avec une étape supplémentaire de broyage/homogénéisation (BeadBeater®) avec des billes d'oxyde de zirconium (0,15 mm, Nextadvance) en utilisant un Fastprep-96® (MP Biomedicals). La qualité et la concentration en ARN total ont été évaluées en utilisant respectivement le kit Bioanalyzer RNA nano 6000 (Agilent) et le 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent) et le kit Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay (Thermofisher scientific), en suivant les instructions des fabricants.

3.6.3. Séquençage RNAseq avec la technologie Illumina

A partir des 12 ARN totaux, le kit NEBNext® rRNA depletion (Bacteria) (New England Biolabs) a été utilisé afin d'enrichir le pool d'ARN en ARNm par élimination des ARNr en suivant les instructions du fabricant. Une banque d'ADNc de 150 nucléotides a ensuite été obtenue à l'aide du kit Truseq stranded total RNA sample prep (Illumina) avec l'ajout de codes-barres spécifiques à chaque échantillon en suivant les instructions du fabricant. Les douze banques ont ensuite été mélangées pour être à des concentrations équimolaires puis séquencées en pair-end (2x150 paires de bases) sur une plateforme NovaSeq (Illumina).

3.6.4. Traitement des données de séquençage RNAseq

Les données brutes de séquençage ont tout d'abord été analysées avec le pipeline Illumina CASAVA (Illumina) afin d'effectuer un démultiplexage basé sur les codes-barres spécifiques à chaque échantillon et une première filtration des lectures (= séquences) de qualité trop faible.

Les lectures ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel cutadapt v1.18 (Martin, 2011) pour retirer l'adaptateur en position 3' des séquences. Elles ont ensuite été nettoyées et filtrées avec le logiciel

prinseq v0.20.4 (Schmieder et Edwards 2011) en coupant les 15 premières bases en position 5' de chaque lecture, en supprimant les lectures de faible qualité (score phred moyen <30) et en éliminant les portions de séquences (7 bases) de mauvaise qualité en position 3' (score phred moyen <30). Les lectures ayant moins de 60 bases et les lectures non appariées ont été écartées. Les lectures restantes ont ensuite été traitées par le logiciel sortmerna v2.1 (Kopylova et al. 2012) en utilisant les bases de données 16S / 18S, 23S / 28S et 5 / 5,8S afin d'éliminer les séquences d'ARN ribosomal. A l'issue de cette dernière étape de nettoyage, seules les paires de lectures qui ne présentaient pas d'homologie de séquence significative avec des séquences d'ARN ribosomal connues ont été retenues pour l'analyse d'expression différentielle.

3.6.5. Analyse de l'expression différentielle

Les lectures nettoyées ont été alignées sur les régions codantes (CDS, Coding DNA Sequence) du génome de référence *Eggerthella lenta* DSM 2243 (Saunders et al. 2009) en utilisant le programme rsem-calculate-expression de la suite logicielle (pipeline) RSEM v1.3.1 (Li et Dewey 2011) avec bowtie2 v2.3.4 (Langmead et Salzberg 2012) utilisé comme logiciel d'alignement en gardant les options par défaut. Ce traitement a permis d'obtenir une matrice d'expression normalisée pour chaque CDS du génome et exprimée en FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads). Les matrices d'expressions normalisées ont ensuite été comparées deux à deux de la façon suivante : (+)-catéchine versus témoin, (-)-épicatéchine versus témoin, dimère de procyanidines de type B versus témoin. Les matrices à comparer ont été fusionnées en utilisant rsem-generate-data-matrix et l'analyse de l'expression différentielle a été réalisée en utilisant rsem-run-ebseq (options par défaut) du « package » EBseq R v1.2.0 (Leng et al. 2013). L'analyse d'expression différentielle a été filtrée en utilisant rsem-control-fdr et les seuils FDR (False Discovery Rate) de 0.05, 0.01, 0.005 et 0.001. Seuls les gènes différentiellement exprimés avec un seuil FDR de 0.001 ont finalement été retenus pour l'interprétation biologique des résultats. Le taux d'induction ou de répression d'un gène est généralement estimé en calculant le Log2 du « Fold Change » (FC) ; le FC correspondant au ratio du taux d'expression d'un gène exprimé en FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) entre la condition traitée et la condition témoin. Pour notre étude, nous avons sélectionné les gènes induits ou réprimés lorsque le Log2FC était respectivement supérieur ou inférieur à 2.

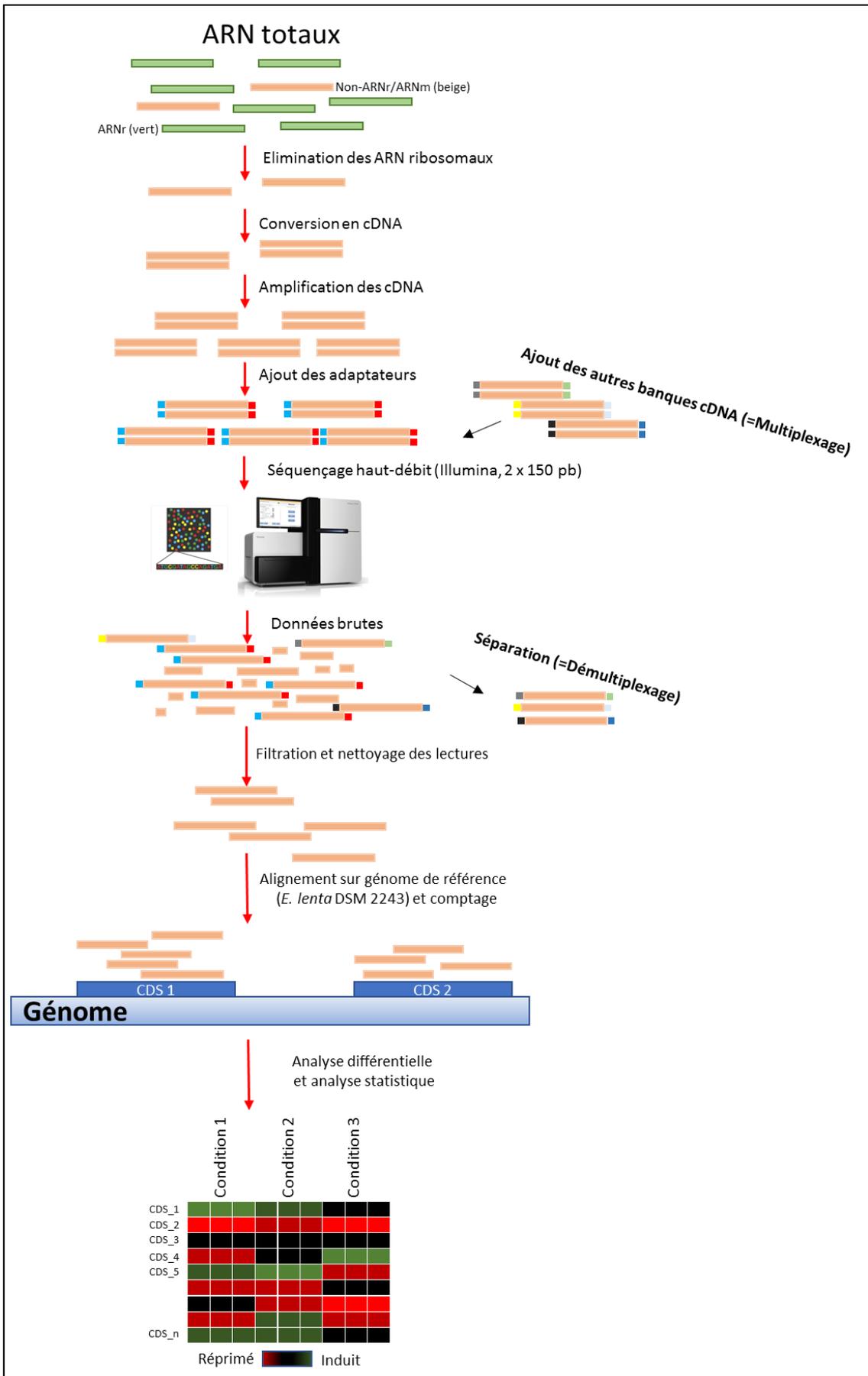


Figure 34. Schéma de l'approche RNAseq : des ARN totaux aux gènes différentiellement exprimés.

3.6.6. Analyse des gènes d'intérêts

La recherche de promoteurs et terminateurs de transcription ont été effectuées sur certains loci génomiques d'intérêt en utilisant respectivement les outils bio-informatiques iPro54-PseKNC (Lin et al. 2014), WebGeSTer DB (Mitra et al. 2011) et Arnold (<http://rssf.i2bc.paris-saclay.fr/toolbox/arnold>). La visualisation de la couverture des lectures RNAseq sur certains loci d'intérêt du génome d'*E. lenta* DSM 2243 a été réalisée avec le logiciel NCBI Genome Workbench v3.5.0 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/gbench/>). L'alignement multiple des séquences protéiques a été effectué avec Clustal Omega v1.2.4 (Sievers et al. 2011), en utilisant les paramètres de base et la visualisation a été obtenue par MView v1.63 (Brown et al. 1998). La recherche de domaines spécifiques a été réalisée sur les séquences protéiques de certains des gènes d'intérêt avec les logiciels SignalP-5.0 (Armenteros et al. 2019) et Pfam v33.1 (Finn et al. 2016).

3.7. Expression hétérologue des gènes d'intérêts chez *Escherichia coli*

3.7.1. Synthèse des gènes d'intérêt et clonage dans un vecteur d'expression

Les gènes d'intérêt ont été mis en évidence à partir de l'étude transcriptomique RNAseq avec la souche type *Eggerthella lenta* DSM 2243 et correspondent aux gènes les plus exprimés en présence de flavan-3-ols par comparaison à la condition témoin sans flavan-3-ols (*cf* Résultats). Il s'agit des gènes (et protéines) suivants : ELEN_RS00960 (WP_015759863.1), ELEN_RS01395 (WP_009305851.1), ELEN_RS01400 (WP_009305853.1) et ELEN_RS03100 (WP_009305152.1).

Nous avons sous-traité la synthèse de ces gènes, leur insertion dans un plasmide de réplication de *E. coli* (pMA), puis le sous-clonage dans le vecteur d'expression pBAD/Myc-His A (Invitrogen™) auprès de la société ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cloning/gene-synthesis.html>). Sachant que les quatre gènes à cloner sont riches en guanosine et cytosine (GC % compris entre 64 et 67 %), la synthèse *de novo* de ces gènes a permis de modifier leur séquence et ainsi d'optimiser les codons pour favoriser la synthèse protéique par *E. coli* tout en produisant des protéines identiques à celles produites par *E. lenta*. De plus, l'analyse des séquences protéiques codées par les quatre gènes d'intérêt avec le logiciel SignalP v5.0 (Armenteros et al. 2019) a révélé la présence de séquences signal TAT (Twin Arginine Translocation) pour trois protéines sur quatre. Ces séquences signal étaient codées par les 126, 141 et 108 premiers nucléotides des gènes ELEN_RS00960, ELEN_RS01395 et ELEN_RS03100. Nous avons alors fait le choix de faire produire à *E. coli* les protéines sans leurs séquences signal pour que celles-ci soient produites dans le cytoplasme de la bactérie (pas de sécrétion) et soient facilement libérées dans le milieu extra-cellulaire par lyse bactérienne.

Matériels et méthodes

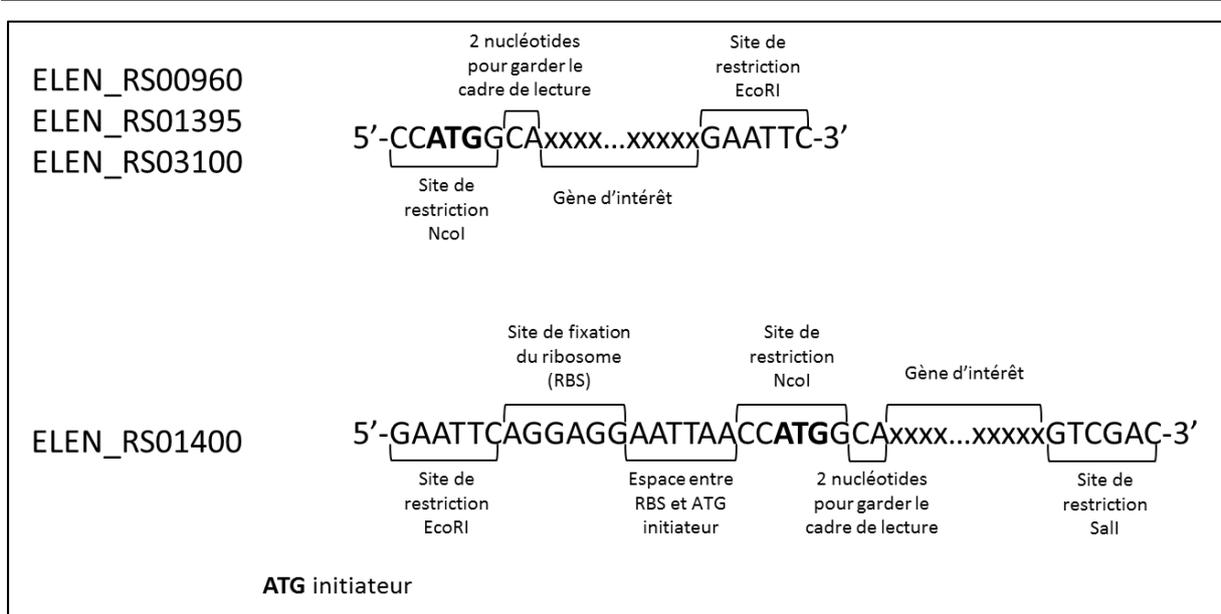


Figure 35. Schéma illustrant les régions flanquant les gènes d'intérêt pour le clonage hétérologue chez *Escherichia coli*.

Pour réaliser le sous-clonage dans le vecteur d'expression pBAD/Myc-His A (Invitrogen™), les trois séquences des gènes ELEN_RS00960, ELEN_RS01395 et ELEN_RS03100 ont été dessinées de telle sorte qu'ils contiennent à l'extrémité 5' le site de restriction NcoI (CCATGG), le codon ATG initiateur de traduction, ainsi que deux nucléotides pour maintenir le cadre de lecture pour la traduction. Le site de restriction EcoRI (GAATTC) a été ajouté à l'extrémité 3' (Figure 35). Pour le gène ELEN_RS01400, l'objectif était de cloner ce gène en aval du gène ELEN_RS01395 dans l'hypothèse où le gène ELEN_RS01400 soit nécessaire à la fonction enzymatique du premier. Pour ce faire, l'extrémité 5' du gène ELEN_RS01400 a été incrémentée du site de restriction EcoRI (GAATTC), du site de fixation du ribosome "RBS" (AGGAGG), de six nucléotides (AATTA) nécessaires entre le RBS et l'ATG initiateur, du site de restriction NcoI (CCATGG) contenant l'ATG initiateur et de deux nucléotides pour conserver le cadre de lecture. Le site de restriction Sall (GTCGAC) a été ajouté à l'extrémité 3' (Figure 35).

Enfin, pour réaliser le sous-clonage dans le vecteur d'expression pBAD/Myc-His A, une double digestion enzymatique (NcoI et EcoRI) a été réalisée sur ce plasmide (vide) ainsi que le plasmide de répllication pMA contenant les gènes ELEN_RS00960, ELEN_RS01395 et ELEN_RS03100. Les plasmides ainsi obtenus ont été nommés pBAD-RS00960, pBAD-RS01395 et pBAD-RS03100. La transcription de ces gènes est régulée par la présence d'un promoteur L-arabinose dose-dépendant appelé Pbad (Figure 36). Ensuite, le gène synthétisé ELEN_RS01400 a été sous-cloné dans le vecteur pBAD-RS01395 en réalisant une double digestion enzymatique (EcoRI et Sall), permettant d'avoir les deux gènes RS01395 et RS01400 en opéron sous le contrôle du promoteur inductible Pbad. Le nouveau plasmide est nommé pBAD-RS01395-RS01400.

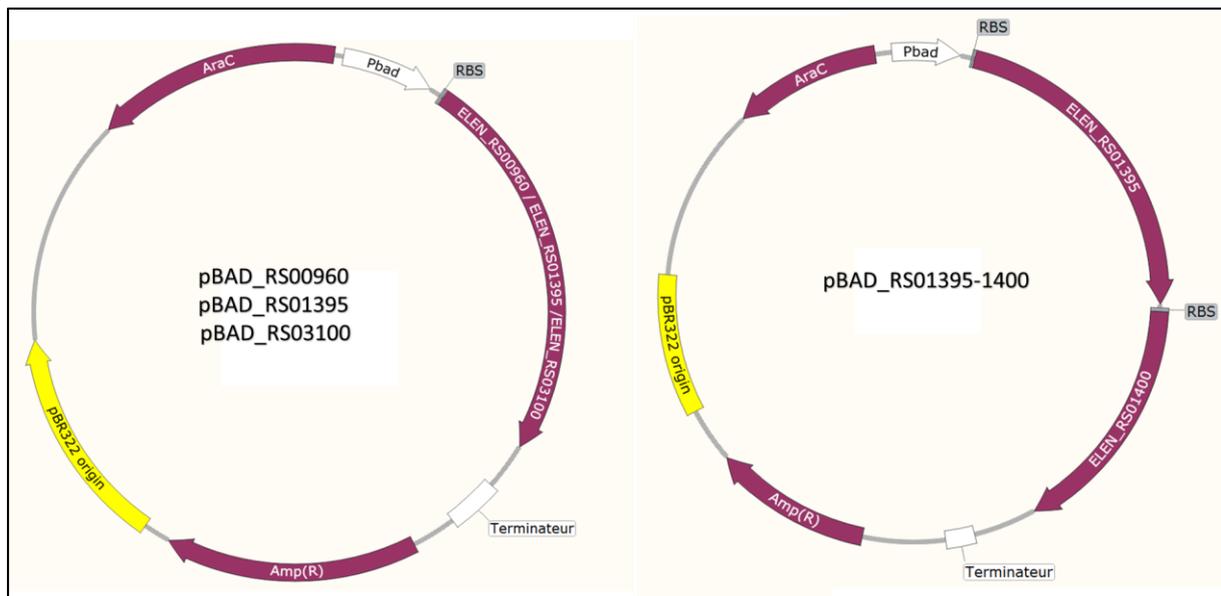


Figure 36. Constructions plasmidiques réalisées dans le vecteur pBAD pour l'expression hétérologue des gènes d'intérêt chez *E. coli*. Amp(R) : gène de résistance à l'ampicilline ; AraC : code la protéine régulatrice AraC possédant un domaine de liaison de l'arabinose ; pBad : promoteur sous l'influence de la protéine d'AraC. RBS : site de fixation du ribosome. En absence de L-arabinose, la protéine AraC agit comme répresseur et inhibe l'expression des gènes en amont du promoteur Pbad. En présence de L-arabinose, elle agit comme activateur.

3.7.2. Transformation chez *E. coli* TOP10

Des suspensions bactériennes de *Escherichia coli* One Shot® TOP10 Chemically Competent (Invitrogen™) ont été transformées par les plasmides pBAD-RS00960, pBAD-RS01395, pBAD-RS01395-RS01400, pBAD-RS03100 et le pBAD sans insert (Témoin négatif) en suivant les recommandations du fournisseur. Les colonies ayant inséré le plasmide ont été sélectionnées sur un milieu gélosé Luria Bertani contenant de l'ampicilline à la concentration de 100 µg/ml (LB^{amp}). Elles ont ensuite été cultivées en milieu liquide, la présence du plasmide a été vérifiée et les souches ont enfin été stockées à -80 °C dans du LB^{amp} contenant 30 % de glycérol.

3.7.3. Vérification de l'expression des protéines d'intérêt par les souches de *E. coli* recombinantes par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Les cinq souches de *E. coli* recombinantes contenant respectivement les plasmides pBAD-RS00960, pBAD-RS01395, pBAD-RS01395-RS01400, pBAD-RS03100 et pBAD sans insert (Témoin négatif) ont été cultivées dans du milieu LB^{amp} selon le protocole qui suit : A partir du stock de souches congelées à -80 °C, une première pré-culture a été réalisée à 37 °C sous agitation (150 rpm/min) sur la journée (6-8 h). Une seconde pré-culture sur la nuit (16h) a été obtenue à partir de la première (1 % d'inoculum). Le lendemain matin, la seconde pré-culture a été utilisée pour inoculer (1 % d'inoculum) 50 ml de LB^{amp}. Après 2H30 d'incubation à 37 °C sous agitation, du L-Arabinose (inducteur) à 0.002 % (p/v) final ou de l'eau ultrapure (témoin négatif) ont été ajoutés et l'incubation a été poursuivies pendant 3H30. Les suspensions bactériennes ont ensuite été concentrées cinq fois par centrifugation (10000 g, 5 min,

4 °C) et reprise du culot bactérien dans 10 ml de tampon phosphate PBS 1X. Les bactéries ont ensuite été lysées par traitement aux ultrasons (Vibra-Cell VC-300, Artisan Scientific) à la puissance maximale de 300 W avec un cycle de 20 secondes d'ultrasons suivi de 20 secondes de pause dans de l'eau glacé. Ce traitement aux ultrasons a été répété deux autres fois. Les débris cellulaires et cellules non lysées ont été éliminés en centrifugeant le lysat à 10000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant (env. 10 ml) contenant les protéines cytoplasmiques a été récupéré. L'analyse SDS-PAGE des protéines contenues dans les échantillons de surnageant a été réalisée sur des gels d'acrylamide à 12 % en chargeant dans chaque puit le mélange [10 µl d'échantillon et 10 µl de tampon de Laemmli 2X] préalablement portés à ébullition pendant 5 à 10 minutes.

3.7.4. Analyse des capacités de dégradation des flavan-3-ols par les souches *E. coli* recombinantes exprimant les gènes d'intérêts

Les cinq souches de *E. coli* recombinantes contenant respectivement les plasmides pBAD-RS00960, pBAD-RS01395, pBAD-RS01395-RS01400, pBAD-RS03100 et pBAD sans insert (Témoin négatif) ont été cultivées comme ci-dessus (cf. 3.7.3) jusqu'à l'obtention des culots bactériens qui ont ensuite été concentrés 10 fois dans du LB. Nous avons ensuite ajouté à la suspension bactérienne soit du méthanol (témoin négatif) soit un monomère de flavan-3-ol ((+)-catéchine / (-)-épicatéchine / (-)-épigallocatechine / (-)-épicatéchine-3-O-gallate / (-)-épigallocatechine-3-O-gallate) de telle sorte qu'ils soient à la concentration finale de 0,5 mM. Pour les procyanidines de type B (dimères et trimères) la concentration finale étaient aussi de 0,5 mM en équivalent (-)-épicatéchine (unité monomère principale des procyanidines). Les suspensions bactériennes ont ensuite été incubées à 37 °C sous agitation (150 rpm/min) pendant 48 h. Une condition témoin « sans bactérie » a été réalisée en parallèle. Un aliquot (100-500 µl) de chaque suspension bactérienne (ou témoin) a ensuite été conservé à -20 °C avant d'être traités et analysés par HPLC-DAD selon le protocole décrit plus haut (cf. 2.3.1.1 et 2.3.1.2). Les métabolites générés à partir des flavan-3-ols ont été validés par leur temps de rétention et leur spectre UV en comparant avec les métabolites préalablement caractérisés par LC-ESI-MS/MS en incubant les mêmes précurseurs avec *Eggerthella lenta* (cf. Résultats). Ce protocole a été répété trois fois afin d'exploiter les résultats à partir d'un triplicat biologique.

3.8. Analyse de la prévalence des gènes d'intérêt chez les *Eggerthellaceae*

La prévalence ainsi que le pourcentage de conservation des protéines codées par les gènes d'intérêts mis en évidence par l'analyse transcriptomique RNAseq ont été analysées en recherchant la présence de ces gènes (et protéines) dans les génomes de bactéries appartenant à la famille des *Eggerthellaceae*. Pour réaliser cette étude, nous avons travaillé avec les génomes de bactéries issues de prélèvements humains ou animaux disponibles dans la base de données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) au jour du 07 décembre 2020. Il s'agissait de 48 génomes de *E. lenta*,

Matériels et méthodes

8 génomes de *Eggerthella sp.*, 1 génome de *Eggerthella sinensis*, 1 génome de *Eggerthella timonensis*, 13 génomes de *Slackia*, 2 génomes de *Paraeggerthella*, 17 génomes de *Gordonibacter*, 20 génomes de *Adlercreutzia* et 1 génome de *Denitrobacterium*. La liste complète avec les numéros d'accessions des génomes utilisés pour cette analyse est présentée en annexe (Tableau A7). Nous avons recherché la séquence protéique d'intérêt dans ces génomes en utilisant le programme tblastN (séquences nucléotidiques traduites en séquences protéiques) sous NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les gènes que nous avons identifiés comme induits par les flavan-3-ols chez *E. lenta* DSM 2243 ont été classés dans les groupes A et B. Ces gènes étaient les suivants :

Groupe A: WP_009607964.1 (ELEN_RS02535), WP_009608072.1 (ELEN_RS02540), WP_015760017.1 (ELEN_RS02545), WP_009608048.1 (ELEN_RS02575), WP_009607966.1 (ELEN_RS02580), WP_041691699.1 (ELEN_RS02585);

Groupe B: WP_015759863.1 (ELEN_RS00960), WP_009305851.1 (ELEN_RS01395), WP_009305853.1 (ELEN_RS01400), WP_009305152.1 (ELEN_RS03100) et WP_009304480.1 (ELEN_RS06940).

Pour définir si ces protéines étaient codées par les génomes des bactéries sélectionnées au sein de la famille des *Eggerthellaceae*, nous nous sommes basés sur un pourcentage d'identité protéique d'au minimum 70 % pour les gènes du groupe A et d'au minimum 50 % pour les gènes du groupe B.

3.9. Analyse de la prévalence des gènes d'intérêts dans les métagénomes intestinaux humains

L'outil MetaQuery (<http://metaquery.docpollard.org>) a été utilisé afin d'analyser la prévalence des gènes d'intérêt dans un catalogue de 9,8 millions de gènes microbiens issus de 1962 métagénomes obtenus à partir de selles d'individus couvrant trois zones géographiques, l'Europe, la Chine et l'Amérique du Nord (Nayfach et al, 2015). Pour cette analyse, nous avons choisi de travailler avec les séquences protéiques codées par quatre gènes d'intérêt : WP_015759863.1 (ELEN_RS00960), WP_009305851.1 (ELEN_RS01395), WP_009305152.1, (ELEN_RS03100), WP_009607964.1 (ELEN_RS02535), WP_009608048.1 (ELEN_RS02575). Les séquences protéiques ont été utilisées soit seules, soit en combinaison, avec comme paramètres de recherche : 95 % d'identité au minimum, E-value de 1e-5 maximum, 70 % de couverture de la séquence requête sur la séquence cible au minimum.

Résultats

1. Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

1.1. Stratégie d'isolement bactérien à partir de selles humaines

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la dégradation des flavan-3-ols de l'alimentation. Les micro-organismes impliqués dans ce métabolisme se limitent à ce jour à quelques espèces bactériennes appartenant aux familles *Eggerthellaceae* et *Ruminococcaceae*. Dans le cadre de cette thèse, notre objectif est non seulement d'isoler des micro-organismes capables de dégrader les monomères de flavan-3-ols mais aussi de déterminer si ces isolats sont capables de dégrader les oligomères de flavan-3-ols. Notre approche expérimentale a donc été dans un premier temps d'obtenir une collection d'isolats bactériens capables de dégrader la (+)-catéchine, monomère de flavan-3-ols, pour ensuite tester ces micro-organismes sur monomère ((-)-épicatéchine) et oligomères (procyanidines de type B et A). Les isollements ont été effectués à partir de selles humaines de trois donneurs sains selon un protocole adapté de Kutschera et al. (2011) (cf Matériels et méthodes). La mise en évidence de micro-organismes actifs a nécessité la mise au point d'une méthode de criblage rapide (20 min) et fiable décrite ci-après.

1.2. Criblage de l'activité catalytique des isolats bactériens

1.2.1. Validation de la méthodologie de criblage par HPLC-DAD avec la souche de référence *E. lenta* DSM 2243

Une méthode permettant de cribler des micro-organismes purifiés ou en mélange pour leur capacité à dégrader le monomère de (+)-catéchine a été développée dans le cadre de cette étude. Notre choix s'est porté sur un criblage par HPLC-DAD qui est une méthode chromatographique permettant de séparer les molécules en fonction de leur équilibre de concentration entre la phase stationnaire solide (gel de silice avec greffons à huit carbone) et la phase mobile, de façon rapide et fiable. L'objectif est de suivre la dégradation du monomère de (+)-catéchine en culture avec les micro-organismes (Figure 31).

L'efficacité de ce criblage a été testée en comparant la présence de la (+)-catéchine dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation, en absence de bactérie (témoin) et avec la souche *E. lenta* DSM 2243, qui est capable de dégrader les principaux monomères de flavan-3-ols ((+)-catéchine / (-)-épicatéchine / (-)-épigallocatechine). Le pic de la (+)-catéchine a disparu en présence de la bactérie traduisant sa dégradation (Figure 37). En revanche, avec *Eubactérium ramulus* DSM 15684, espèce qui n'est pas décrite pour dégrader les flavan-3-ols, la quantité de (+)-catéchine est identique à celle du témoin négatif c'est-à-dire sans bactérie traduisant sa non dégradation (Schneider et Blaut 2000).

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

Il est donc possible de suivre la dégradation de la (+)-catéchine dans nos conditions de culture et de séparation des molécules par HPLC-DAD et de discriminer les souches capables ou non de dégrader le monomère.

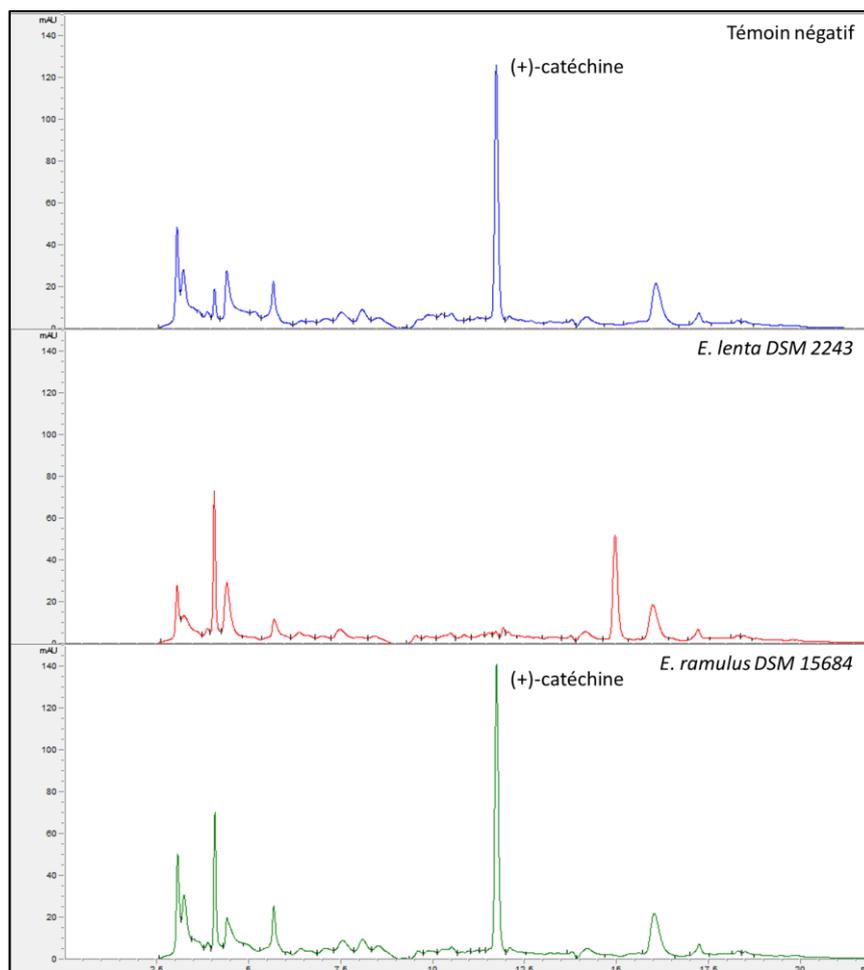


Figure 37. Suivi de la dégradation bactérienne de la (+)-catéchine par HPLC-DAD. Chromatogrammes obtenus après 24 heures d'incubation à 37 °C de la (+)-catéchine, dans le milieu de culture MCR20 sans bactérie (en bleu), avec *E. lenta* DSM 2243 (rouge) et avec *E. ramulus* DSM 15684 (vert). Temps de rétention de la (+)-catéchine (11,8 min). La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm.

1.2.2. Bilan de l'isolement de micro-organismes dégradant le monomère de (+)-catéchine

Quatre campagnes d'isolements bactériens à partir des selles de trois individus (O, P, T) ont été effectuées, dont deux campagnes à partir du même individu à deux mois d'intervalle (P1 : individu P-selle 1 et P3 : individu P-selle 3). Au total, 380 isolats bactériens ont été criblés pour leur capacité à dégrader la (+)-catéchine permettant d'obtenir 20 isolats capables de dégrader la (+)-catéchine (Tableau 9). Ils forment de petites colonies blanches sur gélose (~1 mm) et leur observation au microscope a mis en évidence une morphologie très similaire, se présentant sous la forme de petits bacilles à Gram positif. L'affiliation taxonomique des 20 isolats à partir de la séquence du gène exprimant l'ARNr 16S a permis de tous les assigner à l'espèce *Eggerthella lenta* avec 99 % - 100 %

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

d'identité de séquence entre les isolats et la souche de référence *E. lenta* DSM 2243 (données non montrées).

Tableau 9. Souches isolées de selles humaines dégradant la (+)-catéchine.

Individus (selles)	Selles (statut)	Date du prélèvement	Nombre d'isolats	
			Criblés	Actifs
O	Congelées à -80 °C	29/09/2014	80	3
P1	Fraîches	26/03/2018	80	4
P3	Fraîches	30/05/2018	150	3
T	Fraîches	30/11/2018	70	10

L'analyse des chromatogrammes obtenus par HPLC-DAD a montré l'apparition de deux métabolites après incubation de la (+)-catéchine avec les 20 isolats bactériens. La caractérisation métabolique des isolats a montré qu'ils peuvent être divisés en deux groupes. Les isolats issus des individus T et P3 capables de former un métabolite nommé « Ac » à partir de la (+)-catéchine et les isolats issus des individus O et P1 capables à la fois de former le métabolite Ac mais également de le dégrader en un métabolite nommé « Bc » (Figure 38).

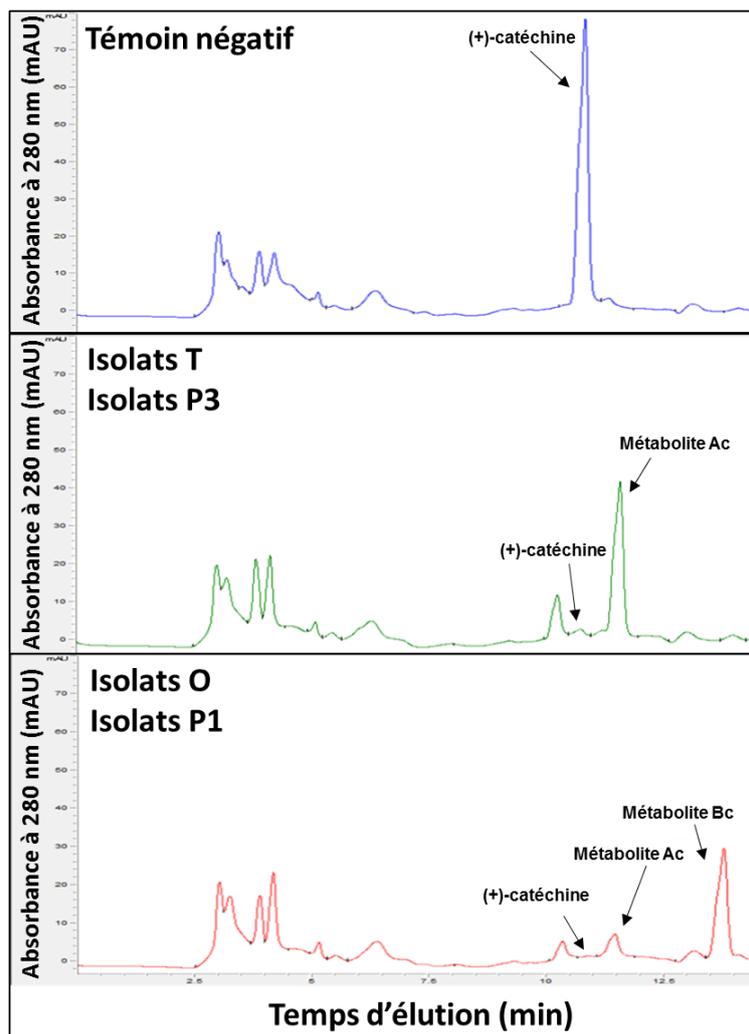


Figure 38. Comparaison de la dégradation de la (+)-catéchine par les isolats. Chromatogrammes obtenus après 48H de culture en présence de (+)-catéchine, en absence de bactérie (chromatogramme du haut), en présence d'un isolat représentatif T et P3 (chromatogramme du milieu) et en présence d'un isolat représentatif O et P1 (chromatogramme du bas). La (+)-catéchine, les métabolites Ac et Bc éluant respectivement à 10,6 ; 11,3 et 13,3 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm.

Tableau 10. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches *E. lenta* après dégradation de la (+)-catéchine. Les ions secondaires majoritaires sont en gras. Les spectres de masses sont joints en annexe.

Molécules	Ion parental (m/z)	MS ² Ions secondaires (m/z)	Composés identifiés	Abréviation
(+)-catéchine	289	271 - 245 - 231		
Métabolite Ac	291	247 - 205 - 167	(+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol	(+)-3',4'-diOHPP-2-ol
Métabolite Bc	275	231 - 217 - 191	(+)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol	(+)-3'-OHPP-2-ol

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

Afin d'identifier les métabolites obtenus après la dégradation de la (+)-catéchine par les isolats bactériens, les échantillons ont été analysés en couplage LC-ESI-MS/MS en mode négatif. Les spectres de masse fournis par l'analyse en LC-ESI-MS/MS ont permis de confirmer l'identité de la (+)-catéchine donnant un ion à m/z 289. Le spectre de masse du métabolite Ac présente un signal à m/z 291, correspondant à deux unités de masse supplémentaires par rapport à la (+)-catéchine. Cette différence de deux unités de masse indique que le métabolite Ac est formé à partir de la (+)-catéchine par un mécanisme de réduction. Au regard de sa fragmentation en MS^2 (Tableau 10) et des données de la littérature (Stoupi et al. 2010a; Takagaki et Nanjo 2013) ce métabolite a été identifié comme étant le (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol. Le spectre de masse du métabolite Bc présente quant à lui un signal à m/z 275, soit seize unités de masse en moins par rapport au métabolite Ac suggérant la perte d'un groupement hydroxyle par rapport au métabolite Ac. La fragmentation en MS^2 de l'ion m/z 275 indique que le groupement hydroxyle a été éliminé du cycle B, cependant en masse il n'est pas possible de définir s'il s'agit du groupement hydroxyle en position 3' ou 4'. En revanche, certains auteurs ont eu recours à la RMN (résonance magnétique nucléaire) et il apparaît que l'hydroxyle en 4' est préférentiellement éliminé (Takagaki et Nanjo 2013). En conséquence le métabolite Bc a été identifié comme étant le (+)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol comme précédemment décrit par Stoupi et al., (2010a) et Takagaki et Nanjo (2013).

Ces métabolites sont déjà connus dans le métabolisme des *Eggerthella lenta* à partir de la (+)-catéchine (Figure 13 ; Tableau 10) et le métabolisme de la (+)-catéchine par nos isolats a été récapitulé dans la Figure 39.

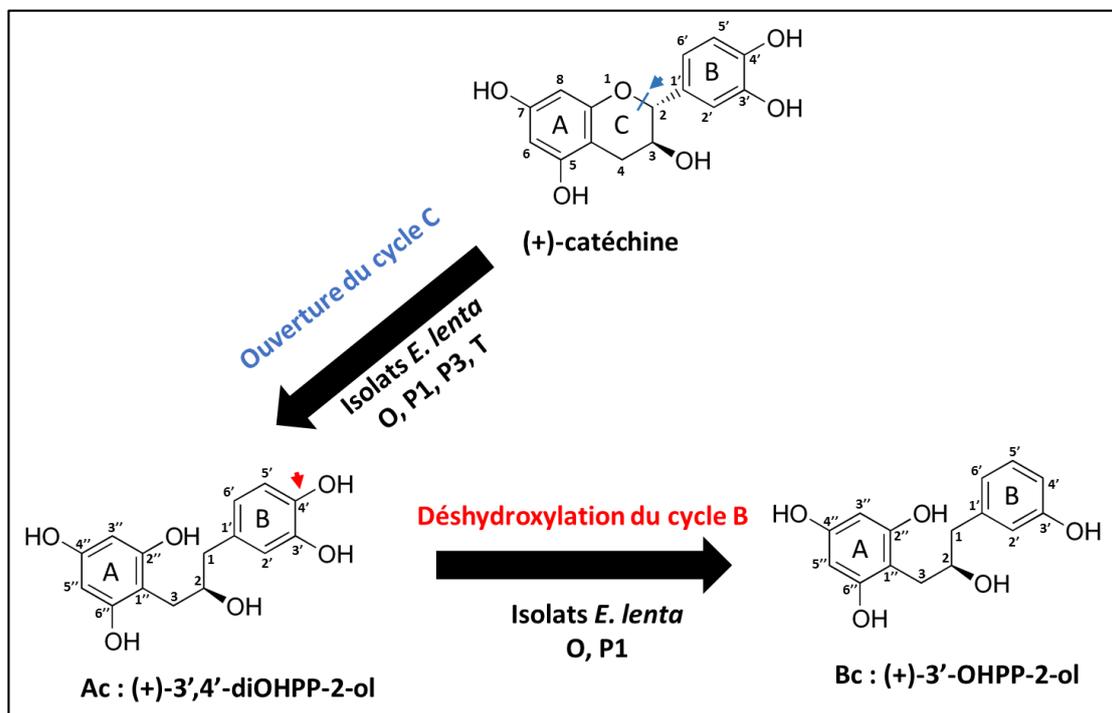


Figure 39. Bilan du métabolisme de la (+)-catéchine par nos isolats *E. lenta*. (+)-3',4'-diOHPP-2-ol : (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol ; (+)-3'-OHPP-2-ol : (+)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol. Les flèches montrent le site d'ouverture du cycle C (bleu) et le groupement déshydroxylé (rouge).

1.2.3. Activité de dégradation sur le stéréoisomère (-)-épicatéchine

Nous avons identifié des souches capables de dégrader la (+)-catéchine et de former deux métabolites distincts (Ac et Bc ; (+)-3',4'-diOHPP-2-ol et (+)-3'-OHPP-2-ol). Comme décrit dans l'étude bibliographique (cf. 4), les souches qui dégradent la (+)-catéchine sont également capables de dégrader son stéréoisomère, la (-)-épicatéchine. La capacité des isolats à dégrader ce monomère a donc été testée.

Les analyses HPLC-DAD ont montré que l'ensemble des isolats sont également capables de dégrader la (-)-épicatéchine (Figure 40). Comme pour la (+)-catéchine, les isolats peuvent être séparés en deux groupes métaboliques. Les isolats issus des individus T et P3 formant un métabolite nommé « Aec » à partir de la (-)-épicatéchine et les isolats issus des individus O et P1 pouvant former le métabolite Aec et le dégrader en un métabolite nommé « Bec ».

Ces deux métabolites (Aec et Bec) ont à la fois les mêmes temps de rétention et les mêmes spectres d'absorption que les métabolites issus de la (+)-catéchine (Ac et Bc) (Figure 40 ; annexe Figure A4). Ces métabolites Aec et Bec sont donc similaires à ceux obtenus après dégradation de la (+)-catéchine et sont respectivement :

- Aec : (-)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ((-)-3',4'-diOHPP-2-ol)
- Bec : (-)-1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol ((-)-3'-OHPP-2-ol).

Nous ne pouvons pas séparer les métabolites selon leur chiralité, qui nécessite de disposer d'une colonne énantiosélective. Cependant, les résultats obtenus avec la (-)-épicatéchine sont en accord avec la caractérisation obtenue par Stoupi et al. (2010a) et Takagaki et Nanjo (2015a). Le bilan du métabolisme de la (-)-épicatéchine par *E. lenta* est ainsi identique à celui de la figure 38 mis à part le fait que le groupement hydroxyle lié au carbone C₃ est orienté vers l'arrière. Il n'est donc pas représenté sous forme de figure.

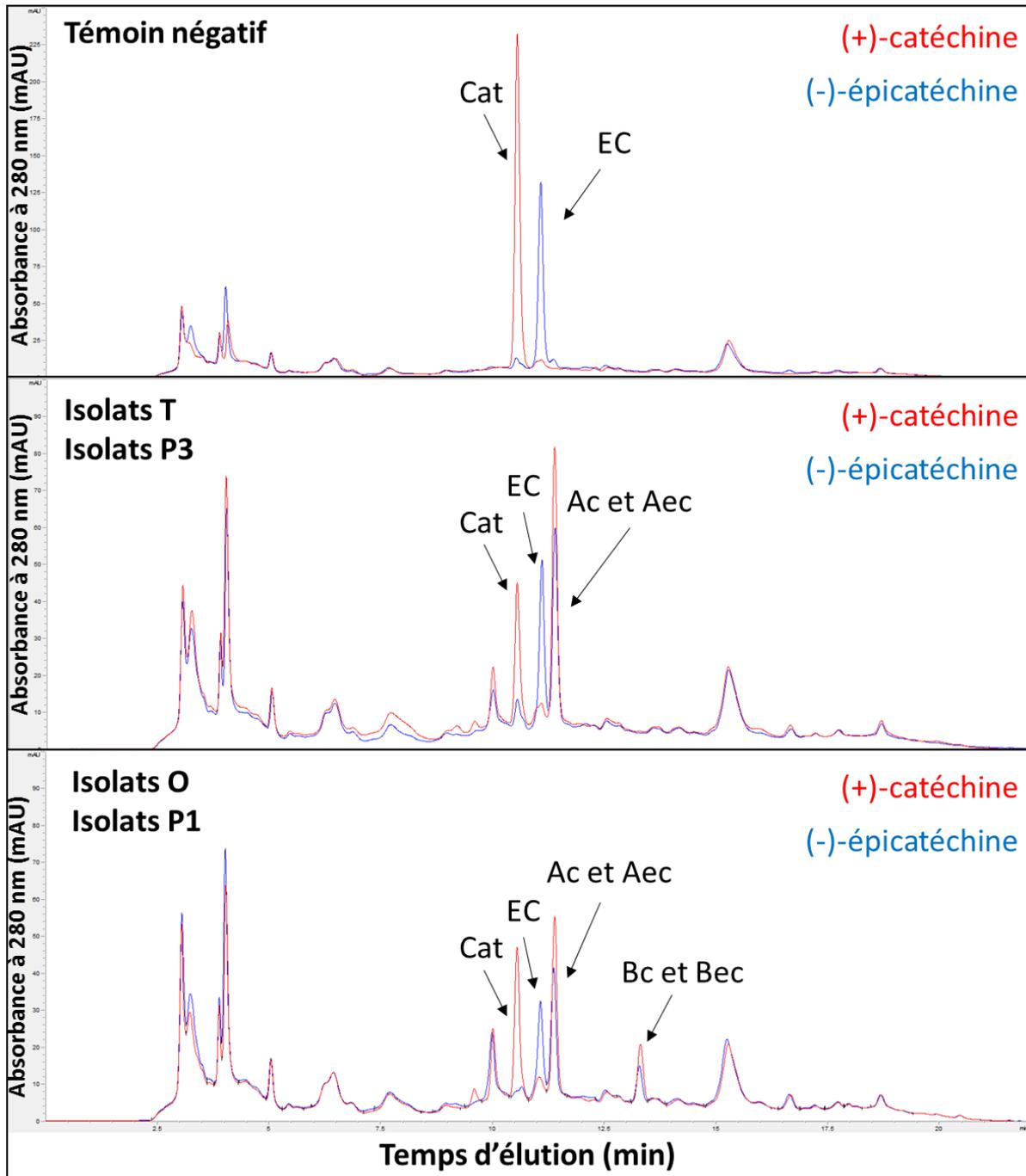


Figure 40. Comparaison de la dégradation de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine par les isolats. Chromatogrammes obtenus après 48 heures de culture en présence de (+)-catéchine (chromatogramme bleu) ou de (-)-épicatéchine (chromatogramme rouge), en absence de bactérie (chromatogrammes du haut), en présence d'un isolat représentatif T et P3 (chromatogrammes du milieu) et en présence d'un isolat représentatif O et P1 (chromatogrammes du bas). La (+)-catéchine, les métabolites Ac et Bc éluant respectivement à 10,6 ; 11,3 et 13,3 minutes. La (-)-épicatéchine, les métabolites Aec et Bec éluant respectivement à 11,1 ; 11,3 et 13,3 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm. Cat : (+)-catéchine ; EC : (-)-épicatéchine.

1.3. Bilan de l'isolement de micro-organismes dégradant le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol

Comme nous avons vu dans l'étude bibliographique, le microbiote intestinal est capable de poursuivre la dégradation des métabolites ouverts identifiés précédemment. Une seule espèce bactérienne a été

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

décrite comme étant capable de les métaboliser : *Flavonifractor plautii* (Figure 25) (Braune et Blaut 2016). Pour isoler des micro-organismes capables de métaboliser le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol, la même stratégie d'isolement que celle utilisée dans le cas de la (+)-catéchine a été mise en œuvre. (Figure 30). Etant donné que le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol n'est pas un produit chimique commercialisé, il a été généré par *E. lenta* à partir de la (+)-catéchine et mis en co-culture avec les isolats à tester. Nous n'avons effectué qu'une seule campagne d'isolement à partir de l'individu P. Cent cinquante isolats ont été criblés pour leur capacité à dégrader le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol et deux isolats actifs ont été obtenus (Tableau 11). Ces deux isolats forment des colonies blanches et translucides sur gélose (~3 mm) et au microscope, avec une morphologie très similaire, se présentant sous la forme de bacilles allongés à Gram positif.

Tableau 11. Résultats de l'isolement d'isolats bactériens avec le métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol.

Individu (selle)	Selles (statut)	Date du prélèvement	Nombre d'isolats	
			Criblés	Actifs
P3	Fraîches	30/05/2018	150	2

Nous avons ensuite réalisé l'affiliation taxonomique des deux isolats en séquençant le gène codant l'ARNr 16S. Cette affiliation a permis d'assigner ces isolats à l'espèce *Flavonifractor plautii* (anciennement *Eubacterium plautii* et *Clostridium orbiscindens*) avec 99 % d'identité avec la souche type *F. plautii* DSM 4000 (données non montrées).

Par la suite, nous avons voulu définir le rôle de chacun de ces deux isolats dans la dégradation de la (+)-catéchine. Les analyses HPLC-DAD montrent que les isolats *F. plautii* (isolat P3-I6) ne sont pas capables de dégrader le monomère de (+)-catéchine (Figure 41). Nous avons donc étudié la dégradation du métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol, produit par un de nos isolats *E. lenta* (P3-J7.5). La co-culture entre cet isolat et les isolats *F. plautii* montre que ce métabolite est dégradé en deux nouveaux métabolites nommés « Cc » et « Dc », le métabolite Cc étant majoritaire (Figure 41). Nous avons également testé la capacité des isolats *F. plautii* à dégrader le métabolite déshydroxylé c'est-à-dire le (+)-3'-OHPP-2-ol. Les analyses HPLC-DAD montrent que les isolats peuvent également dégrader le (+)-3'-OHPP-2-ol en deux autres métabolites nommés « Ec » et « Fc » (données non montrées).

De la même manière qu'avec les métabolites Ac et Bc issus de la métabolisation de la (+)-catéchine, les métabolites produits ont été identifiés par LC-ESI-MS/MS en mode négatif. Le métabolite Cc présente une masse m/z 225 et au regard de sa fragmentation en MS² (Tableau 12) et des données de la littérature (Stoupi et al. 2010a; Takagaki et Nanjo 2013), il a été identifié comme étant l'acide (+)-4-hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphényl) valérique. Le métabolite Dc présente quant à lui une masse m/z 207

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

(Tableau 12), soit 18 unités de masse en moins par rapport au métabolite Cc suggérant une lactonisation. En conséquence, le métabolite Dc a été identifié comme étant la (+)-5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone, au regard de sa fragmentation en MS² et comme décrit par Stoupi et al., (2010a) et Takagaki et Nanjo (2013) (Figure 42). Le métabolite Ec présente une masse m/z de 209 (Tableau 12), soit seize unités de masse en moins par rapport au métabolite Cc suggérant la perte d'un groupement hydroxyle par rapport au métabolite Cc. En conséquence le métabolite Ec a été identifiée comme étant l'acide (+)-4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl)-valérique comme précédemment décrit par Stoupi et al., (2010a) et Takagaki et Nanjo (2013).

En ce qui concerne le métabolite Fc, un spectre de fragmentation n'a pas pu être obtenu dû à la faible concentration de ce métabolite dans les cultures bactérienne. Cependant, sa masse m/z 191 (Tableau 12), la présence de l'acide 4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl)-valérique dans le milieu de culture et les données de la littérature nous conduisent à identifier le métabolite Fc comme étant la (+)-5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone, la forme lactonisée de l'acide 4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl)-valérique (Figure 42).

Ces quatre métabolites sont déjà connus dans le métabolisme de la (+)-catéchine par les *F. plautii* (Figure 13 ; Tableau 10) et sont issus de l'ouverture du cycle A des métabolites (+)-3',4'-diOHPP-2-ol et (+)-3'-OHPP-2-ol initialement générés par *E. lenta* à partir de la (+)-catéchine. Le métabolisme de ces deux dérivés (+)-hydroxyphényl-propan-2-ols par nos isolats a été récapitulé dans la Figure 42.

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

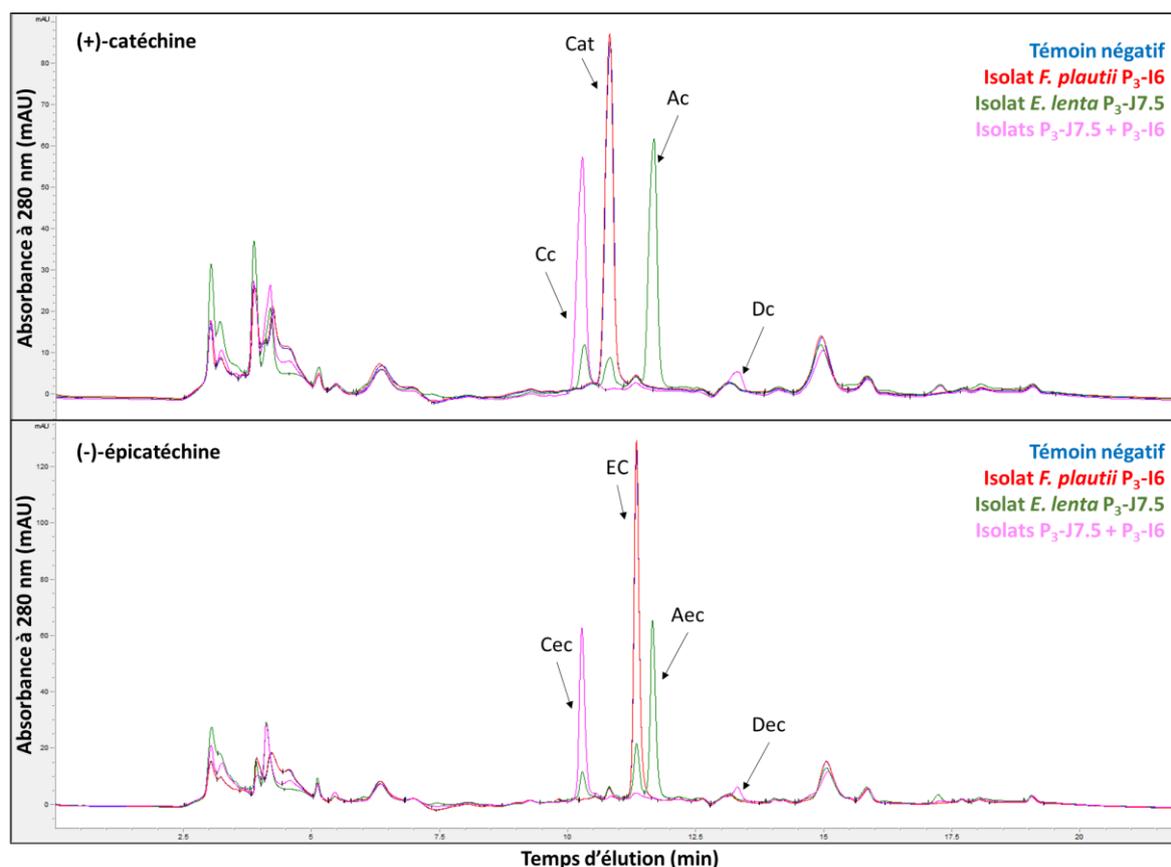


Figure 41. Dégradation des métabolites Ac et Aec par les isolats *F. plautii*. Chromatogrammes obtenus après 48 heures de culture en présence de (+)-catéchine (chromatogramme du haut) ou de (-)-épicatéchine (chromatogramme du bas), en absence de bactérie (chromatogrammes bleus), en présence d'un isolat *E. lenta* représentatif seul (P3-J7.5) (chromatogrammes verts), en présence de l'isolat seul P3-I6 (représentatif des deux isolats *F. plautii* obtenus) (chromatogrammes rouges) et en présence de la co-culture des deux isolats (chromatogrammes roses). La (+)-catéchine, les métabolites Ac, Cc et Dc éluant respectivement à 10,9 ; 11,2 ; 10,1 et 12,8 minutes. La (-)-épicatéchine, les métabolites Aec et Bec, Cec et Dec éluant respectivement à 11,2 ; 11,3 ; 10,1 et 12,8 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm.

Tableau 12. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches *F. plautii* après dégradation de la (+)-catéchine. Les ions secondaires majoritaires sont en gras. Le métabolite Fc n'a pas pu être fragmenté, étant donné sa faible concentration dans le milieu de culture. Les spectres de masses sont joints en annexe.

Molécules	Ion parental (m/z)	MS ² ions secondaires (m/z)	Composés identifiés	Abréviations
Métabolite Cc	225	207 - 163 - 101	Acide (+)-4-hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphényl) valérique	(+)-3',4'-diOHPVA
Métabolite Dc	207	163 - 122	(+)- 5-(3',4'- dihydroxyphényl)- γ -valérolactone	(+)-3',4'-diOHPval
Métabolite Ec	209	191 - 147 - 101	Acide (+)-4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl)-valérique	(+)-3'-OHPVA
Métabolite Fc	191		(+)-5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone	(+)-3'-OHPval

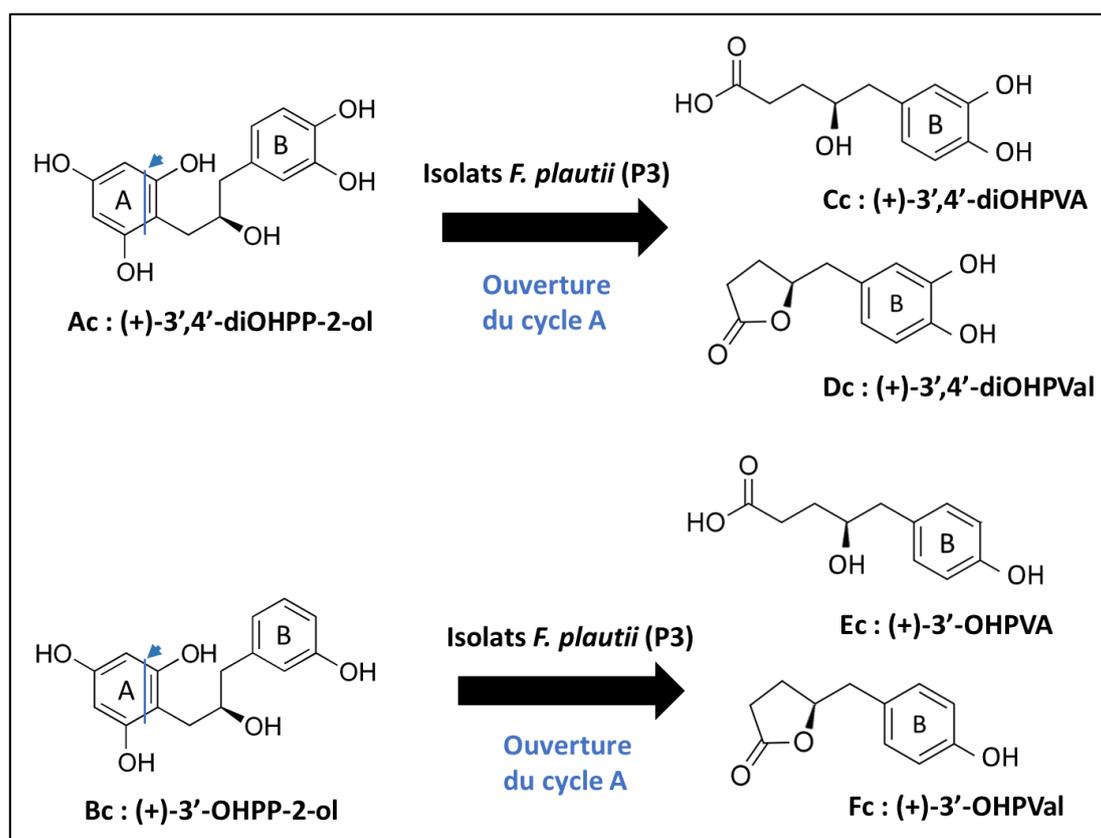


Figure 42. Bilan du métabolisme des dérivés (+)-hydroxyphényl-propan-2-ols, métabolites ouverts de la (+)-catéchine, par nos isolats *F. plautii*. Les flèches bleues montrent le site d'ouverture du cycle A (bleu). (+)-3',4'-diOHPP-2-ol : 1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol ; (+)-3'-OHPP-2-ol : 1-(3'-hydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl) propan-2-ol ; (+)-3',4'-diOHPVA : acide (+)-4-hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphényl) valérique ; (+)-3',4'-diOHPval : (+)-5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone ; (+)-3'-OHPVA : acide (+)-4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl) valérique ; (+)-3'-OHPval : (+)-5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone ;

1.3.1. Activité de dégradation sur les stéréoisomères (-)-3',4'-diOHPP-2-ol et (-)-3'-OHPP-2-ol

Nous avons identifié des souches capables de dégrader la (+)-3',4'-diOHPP-2-ol et la (+)-3'-OHPP-2-ol, pouvant former quatre métabolites distincts (Figure 42). Comme décrit dans l'étude bibliographique (cf. 4), les souches qui dégradent ces deux métabolites sont également capables de dégrader leurs stéréoisomères, le (-)-3',4'-diOHPP-2-ol et le (-)-3'-OHPP-2-ol issus de la dégradation de la (-)-épicatéchine. La capacité de nos deux isolats de *F. plautii* à dégrader ces métabolites et la (-)-épicatéchine a également été testée.

Nos analyses HPLC-DAD montrent que les isolats *F. plautii* (isolat P3-I6) ne sont pas capables de dégrader le monomère de (-)-épicatéchine (Figure 41), mais qu'ils sont capables de dégrader le métabolite (-)-3',4'-diOHPP-2-ol, produit par un isolat *E. lenta* (P3-J7.5). La co-culture entre cet isolat et les isolats *F. plautii* montre la formation de deux métabolites nommés « Cec » et « Dec », le

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

métabolite Cec étant majoritaire (Figure 41). Les analyses HPLC-DAD montrent que les isolats peuvent également dégrader le (-)-3'-OHPP-2-ol en deux autres métabolites nommés « Eec » et « Fec » (données non montrées).

Ces deux métabolites Cec et Dec ont à la fois les mêmes temps de rétention et les mêmes spectres d'absorptions que les métabolites (+)-3',4'-diOHPVA et (+)-3',4'-diOHPval (Figure 41 ; annexe Figure A9). Ces métabolites Cec et Dec sont donc similaires à ceux obtenus après la dégradation du (+)-3',4'-diOHPP-2-ol et sont respectivement :

- Cec : acide (-)-4-hydroxy-5-(3',4'-dihydroxyphényl) valérique
- Dec : (-)-5-(3',4'-dihydroxyphényl)- γ -valérolactone

De façon similaire, les métabolites Eec et Fec sont similaires à ceux obtenus après la dégradation du (-)-3'-OHPP-2-ol et sont respectivement :

- Eec : acide (-)-4-hydroxy-5-(3'-hydroxyphényl) valérique
- Fec : (-)-5-(3'-hydroxyphényl)- γ -valérolactone

Les résultats obtenus avec le (-)-3',4'-diOHPP-2-ol et le (-)-3'-OHPP-2-ol sont en accord avec la caractérisation obtenue par Stoupi et al., (2010) et Takagaki and Nanjo (2015a). Le bilan du métabolisme des dérivés (-)-hydroxyphényl-propan-2-ols, métabolites ouverts de la (-)-épicatéchine produits par *E. lenta*, par nos isolats *F. plautii* est identique à celui de la Figure 42 mis à part le fait que le groupement hydroxyle lié au carbone C₃ est orienté vers l'arrière. Il n'est donc pas représenté sous forme de figure.

1.4. Dégradation des procyanidines par les souches de notre collection

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, nous avons obtenu une collection de plusieurs isolats jouant un rôle dans la dégradation des monomères de flavan-3-ols. Les isolats *E. lenta* sont capables d'ouvrir le cycle C de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine et les isolats *F. plautii* vont ouvrir le cycle A des métabolites produits par les isolats *E. lenta*. Dans le cadre de cette thèse, notre objectif a été d'étudier l'activité catalytique de ces isolats sur les procyanidines. Les procyanidines de type B sont les plus fréquemment retrouvés dans notre alimentation, nous avons donc entrepris dans un premier temps d'étudier leur dégradation par les isolats.

1.4.1. Purification des procyanidines de type B

La purification des procyanidines de type B a été réalisée à partir de parenchyme de la variété de pomme à cidre Marie Ménéard. L'extrait méthanolique (réalisation par le doctorant Xuwei Liu, SQPOV INRAE Avignon) de parenchyme de pomme a été purifié une première fois en utilisant une colonne préparative C18 afin d'éliminer les sucres et acides organiques puis une seconde fois en utilisant une

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

colonne HILIC afin de purifier les procyanidines en fonction de leur degré de polymérisation. Trois fractions de procyanidines ont ainsi été obtenues. Chaque fraction a été caractérisée par HPLC-DAD après thioacidolyse ou pas.

Après deux étapes de purification, la fraction des procyanidines de DP2 est constituée à plus de 85 % de polyphénols et est constituée à la fois du dimère B₂ ((-)-épicatéchine-(4→8)-(-)-épicatéchine) et du dimère B₁ ((-)-épicatéchine-(4→8)-(+)-catéchine), ce dernier représentant 7 % des procyanidines (extrait brut). Après thioacidolyse, la (-)-épicatéchine représente 95 % des unités constitutives et la (+)-catéchine, présente uniquement en unité terminale représente seulement 5 % des unités constitutives (Tableau 13). Ce résultat est en accord avec la quantification des dimères B₂ et B₁ par HPLC-DAD sans thioacidolyse et avec les résultats de Watrelot et al. (2015). Des traces de dihydrochalcones (xyloglucoside de phlorétine) et d'acide hydroxycinnamique (acide 5-caféoylquinique), représentant moins de 1 % de la fraction ont également été détectées.

La fraction des procyanidines de DP3 est quant à elle constituée à plus de 75 % de polyphénols et de plusieurs isomères de DP3. Après thioacidolyse la (-)-épicatéchine représente 97 % des unités constitutives tandis que la (+)-catéchine, présente uniquement en unité terminale, représente 3 % des unités constitutives (Tableau 13). De la même manière que précédemment des traces de dihydrochalcones (xyloglucoside de phlorétine) et d'acide hydroxycinnamique (acide 5-caféoylquinique), représentant moins de 0,5 % de la fraction ont également été détectées.

Enfin la fraction des procyanidines de DP4 est constituée à plus de 75 % de polyphénols. La (-)-épicatéchine est l'unité majoritaire des procyanidines de DP4, présente à la fois en unité terminale et en unité d'extension (9 % des unités) (Tableau 13). La (+)-catéchine n'est présente qu'en unité terminale où elle représente 3 % des unités constitutives. Comme pour les fractions de DP2 et DP3 des traces de polyphénols c'est-à-dire dihydrochalcones (xyloglucoside de phlorétine) et acide hydroxycinnamique (acide 5-caféoylquinique) représentant moins de 0,1 % de la fraction ont été détectées.

Tableau 13. Teneur et composition des fractions de procyanidines de pommes purifiées.

DHC : dihydrochalcones ; HCA : acides hydroxycinnamiques ; MS : matière sèche

Fraction	Procyanidines					DHC (mg/g MS)	HCA (mg/g MS)	Polyphénols totaux (mg/g MS)
	Teneur en procyanidines (mg/g MS)	DPn calculé	% (+)-catéchine terminale	%(-)-épicatéchine terminale	%- (-)-épicatéchine intermédiaire			
DP2	847	2	5	46	49	2,2	1,1	850,3
DP3	750	2,7	3	34	63	0,2	0,4	751
DP4	753	3,4	3	27	70	0	0,2	753,2

1.4.2. Dégradation des procyanidines

1.4.2.1. Procyanidines de type B

Après obtention de fractions de dimères, trimères et tétramères de procyanidines de type B, l'activité catalytique des isolats *E. lenta* et *F. plautii* a été testée. Tous les isolats *E. lenta* sont capables de dégrader le dimère PCB-2 en un métabolite nommé « PCB-2A » (Figure 43a). En revanche, les isolats *F. plautii* seuls n'ont montré aucune activité catalytique sur le dimère PCB-2, ni sur le métabolite PCB-2A, quand il y a co-incubation avec un isolat *E. lenta* (Figure 43b).

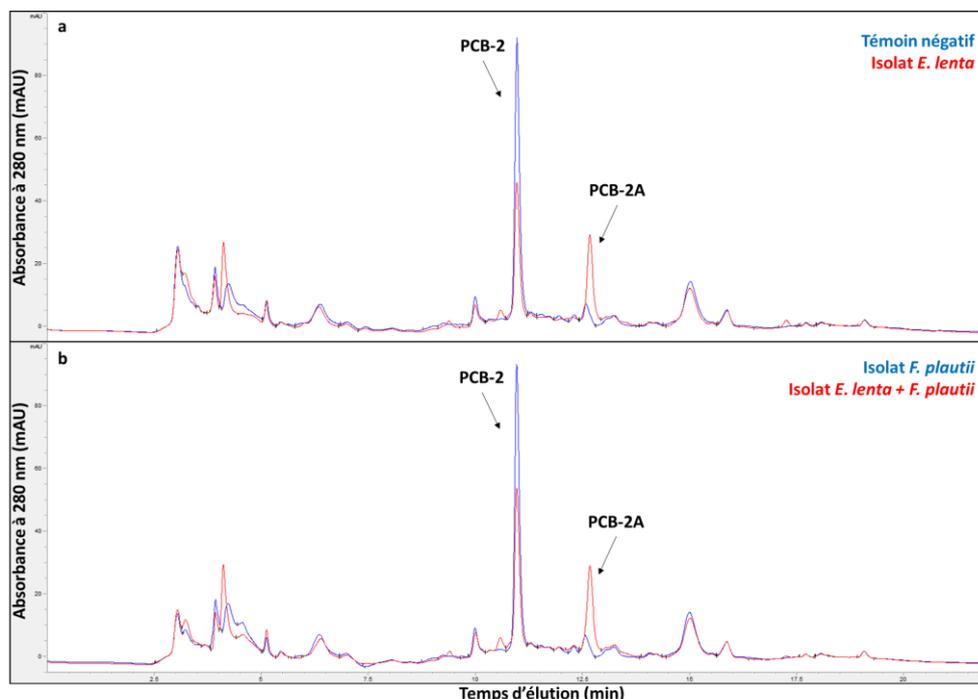


Figure 43. Dégradation du dimère PCB-2 par les isolats. Chromatogrammes obtenus après 48 heures de culture en présence de la fraction dimères de procyanidines de type B (PCB-2). **a.** Cultures réalisées en absence de bactérie (bleu) ou en présence d'un isolat *E. lenta* (rouge). **b.** Cultures réalisées en présence d'un isolat *F. plautii* (bleu) ou en présence d'un isolat *E. lenta* et *F. plautii*. Le dimère PCB-2 et le métabolite PCB-2A éluant respectivement à 11 et 12,7 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm. Les mêmes chromatogrammes ont été obtenus avec l'ensemble des isolats *E. lenta* (non montré).

Dans aucun cas d'incubation des isolats *E. lenta* avec les PCB-2, les monomères de flavan-3-ols, (-)-épicatéchine ou (+)-catéchine n'ont été identifiés dans le milieu de culture, suggérant que la conversion des procyanidines de DP2 en (-)-épicatéchine par rupture de la liaison interflavanique n'a pas eu lieu contrairement à ce qui a pu être rapporté dans certaines études avec microbiote fécal (Groenewoud et Hundt 1986). Ce résultat est cependant en accord avec ceux de Appeldoorn et al. (2009) et Le Bourvellec et al. (2019).

Cette activité de dégradation par *E. lenta* des dimères de procyanidines de type B a également été retrouvée sur les trimères et les tétramères de procyanidines de type B, comme le montre les analyses chromatographiques (Figure 44a ; Figure 45a). Les isolats *F. plautii* n'ont pas été capables non plus de

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

métaboliser les trimères et tétramères de procyanidines, ni leurs métabolites après co-incubation avec les isolats *E. lenta*.

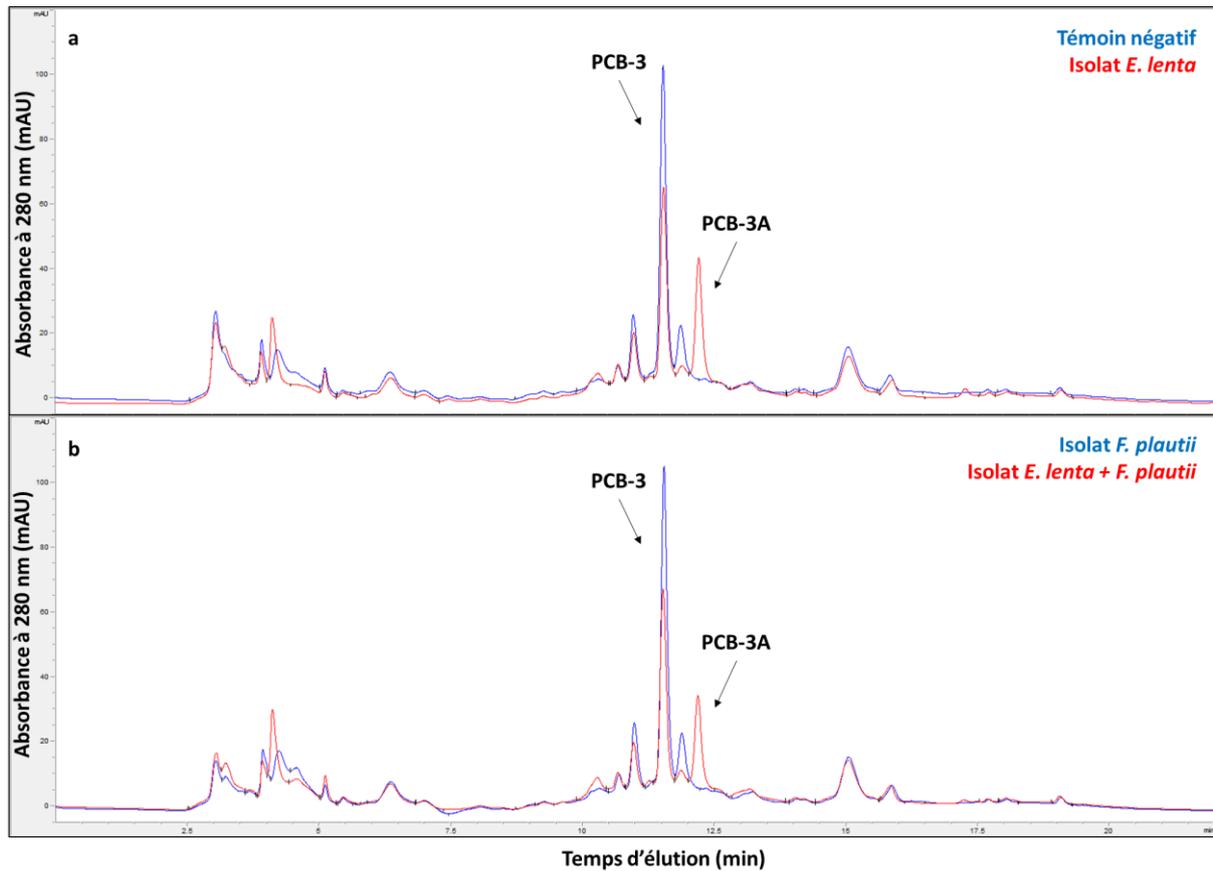


Figure 44. Dégradation du trimère PCB-3 par les isolats. Chromatogrammes obtenus après 48 heures de culture en présence de la fraction de trimères de procyanidines de type B (PCB-3). **a.** Cultures réalisées en absence de bactérie (bleu) ou en présence d'un isolat *E. lenta* (rouge). **b.** Cultures réalisées en présence d'un isolat *F. plautii* (bleu) ou en présence d'un isolat *E. lenta* et *F. plautii*. Le dimère PCB-3 et le métabolite PCB-3A éluant respectivement à 11,5 et 12,2 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm. Les mêmes chromatogrammes ont été obtenus avec l'ensemble des isolats *E. lenta* (non montré).

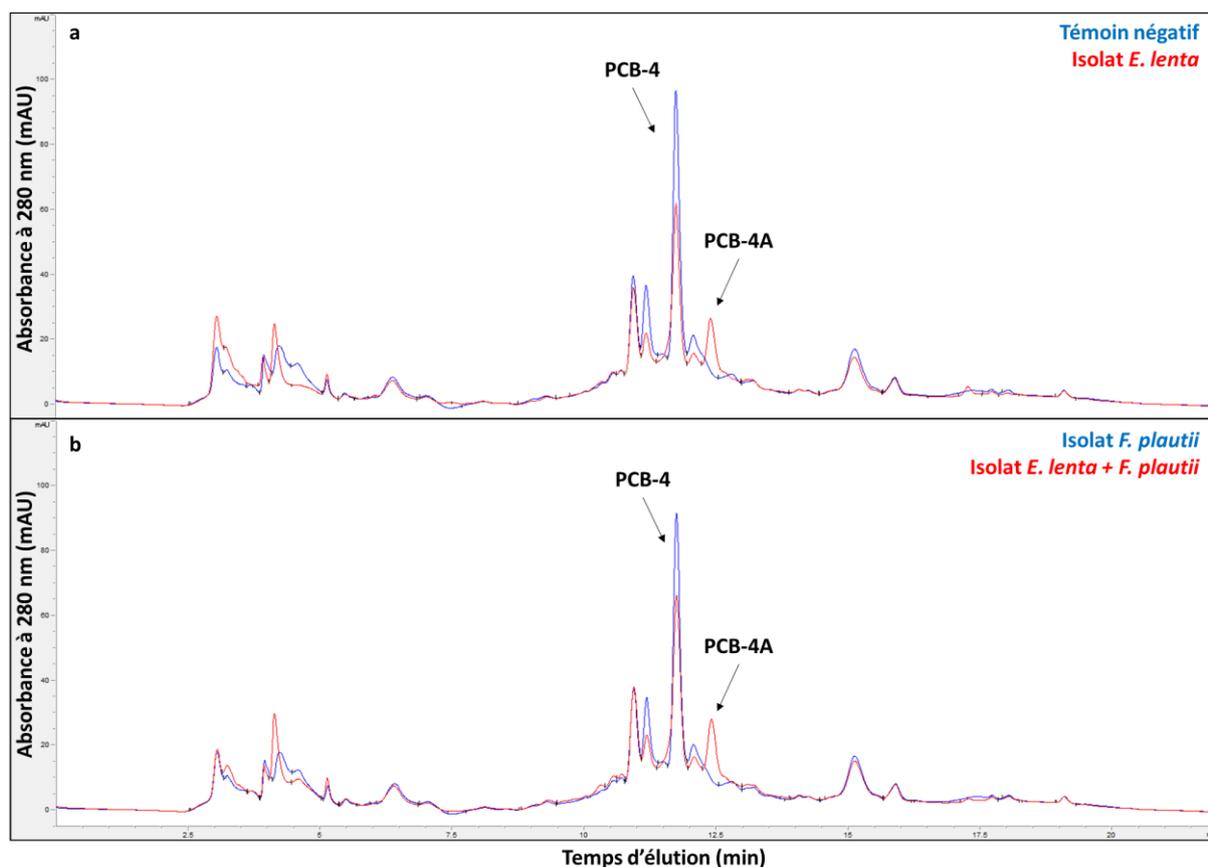


Figure 45. Dégradation du tétramère PCB-4 par les isolats. Chromatogrammes obtenus après 48 heures de culture en présence de la fraction de tétramères de procyanidines de type B (PCB-4). **a.** Cultures réalisées en absence de bactérie (bleu) ou en présence d'un isolat *E. lenta* (rouge). **b.** Cultures réalisées en présence d'un isolat *F. plautii* (bleu) ou en présence d'un isolat *E. lenta* et *F. plautii*. Le dimère PCB-4 et le métabolite PCB-4A éluant respectivement à 11,7 et 12,4 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm. Les mêmes chromatogrammes ont été obtenus avec l'ensemble des isolats *E. lenta* (non montré).

Ces résultats montrent que nos isolats de l'espèce *Eggerthella lenta* sont impliqués dans la dégradation des procyanidines de type B issus de la pomme et ayant des degrés de polymérisation de 2 à 4. Au contraire, nos isolats *F. plautii* n'ont pas montré d'activité sur les procyanidines précurseurs, ni sur les métabolites de procyanidines générés par *E. lenta*.

1.4.2.2. Procyanidines de type A

Qu'en est-il de l'activité métabolique des isolats *E. lenta* vis à vis des procyanidines de type A qui possèdent une liaison éther additionnelle, localisée en C₂-O-C₇ ou C₂-O-C₅ par rapport aux procyanidines de type B ? (Figure 4). Seule l'activité catalytique de quelques isolats (O1-56 et P3-J7.5, représentatifs des deux groupes d'isolats métaboliques identifiés) a pu être testée sur les dimères de procyanidines de type A (PCA-2), en raison de l'utilisation de produits commerciaux relativement chers.

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

Dans le milieu de culture stérile et dans nos conditions d'incubation (24 h, 37 °C, pH 6,9, anaérobiose) le dimère PCA-2 s'isomérisse spontanément (Lu et al. 2011) et ceci entraîne la formation de deux autres produits (Figure 46). Toutefois, une fraction du dimère PCA-2 reste présente dans sa forme initiale, ce qui permet d'évaluer sa métabolisation (Figure 46). Les analyses HPLC-DAD montrent que les deux isolats *E. lenta* (isolats O1-56 et P3-J7.5) sont capables de dégrader le dimère A₂ en un métabolite nommé PCA-2A.

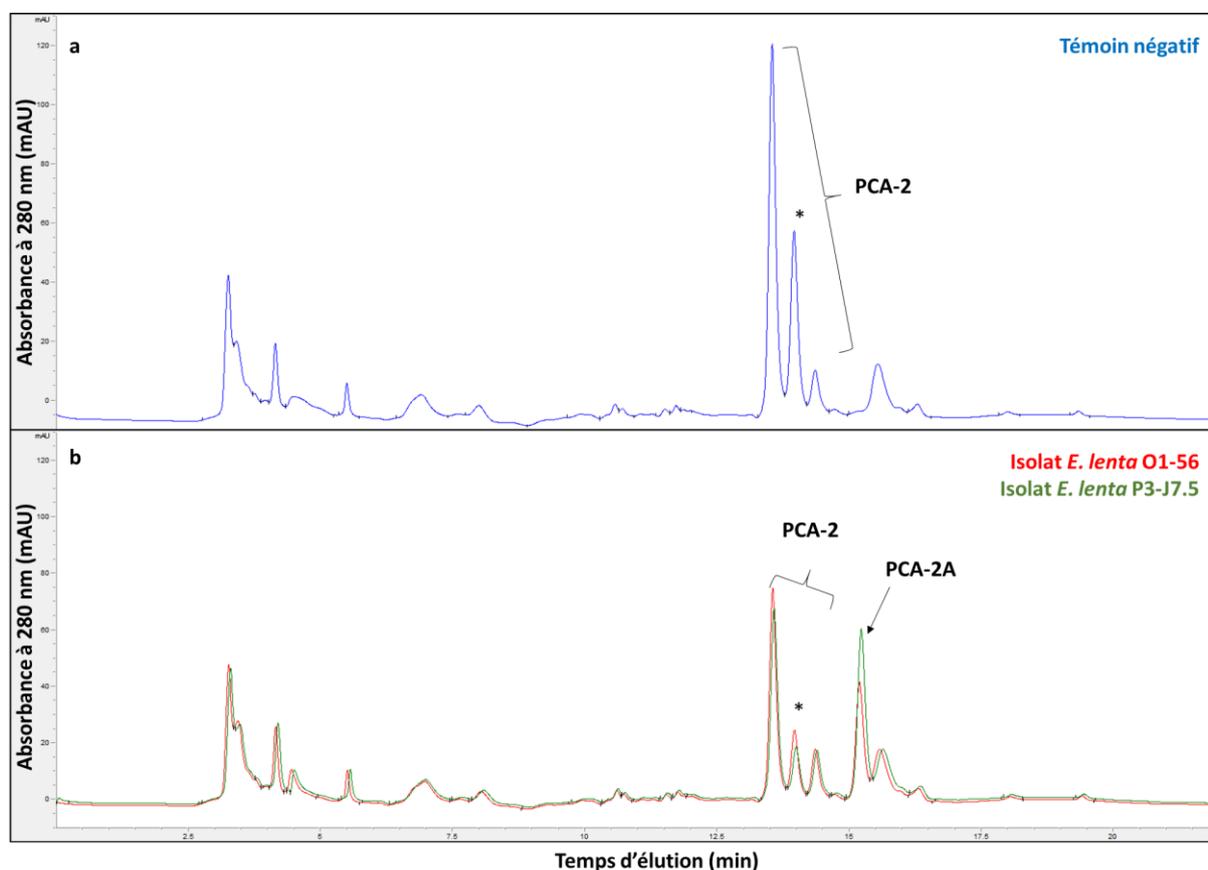


Figure 46. Dégradation du dimère PCA-2 par quelques isolats *E. lenta*. Chromatogrammes obtenus après 24 heures de culture en présence du dimère de procyanidines de type A (PCB-A) **a.** Cultures réalisées en absence de bactérie (bleu). **b.** Cultures réalisées en présence de l'isolat *E. lenta* O1-56 (rouge) et P3-J7.5 (vert). Dans nos conditions de culture, en absence de bactérie (témoin négatif) le dimère PCA-2 s'isomérisse pour former trois molécules sachant que la forme initiale de PCA-2 est marquée par un astérisque. Les trois isomères PCA-2 et le métabolite bactérien PCA-2A éluent respectivement à 13,5, 14*, 14,3 et 15,2 minutes. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 280 nm.

1.4.3. Caractérisation des métabolites microbiens produits à partir des procyanidines

Quatre métabolites PCB-2A, PCB-3A, PCB-4A et PCA-2A ont été identifiés après métabolisation par les isolats *E. lenta* des procyanidines de type B et A. Comme pour les métabolites issus des monomères, une caractérisation de ces métabolites par LC-ESI-MS/MS a été réalisée afin de les identifier.

Le spectre de masse du métabolite PCB-2A a été comparé à celui de son précurseur le PCB-2. Ainsi, le spectre de masse du métabolite PCB-2A présente un signal majoritaire à m/z 579 correspondant à

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

deux unités de masse supplémentaires par rapport au dimère de type B initial dont le signal majoritaire est à m/z 577. Cette augmentation de deux unités de masses est compatible avec la présence d'une unité de flavan-3-ol réduite. Au regard de sa fragmentation en MS^2 (Tableau 14) et des données de la littérature (Stoupi et al. 2010b) ce métabolite a été identifié comme étant la forme ouverte sur le cycle C de l'unité d'extension ou de l'unité terminale du dimère (Figure 47).

Tableau 14. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches *E. lenta* après dégradation du PCB-2. Les ions secondaires majoritaires sont en gras. Les spectres de masses sont joints en annexe. PCB-2 : dimère de procyanidines de type B.

Molécules	Ion parental (m/z)	MS^2 Ions secondaires (m/z)
PCB-2	577	559 - 451 - 425 - 407
Métabolite PCB-2A	579	561 - 453 - 427 - 409

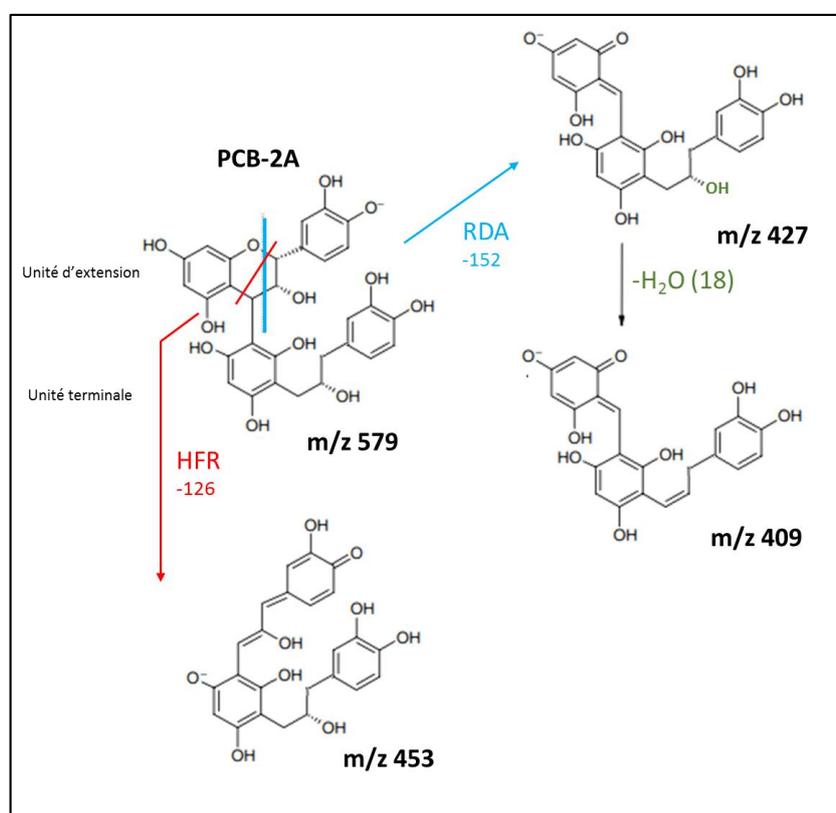


Figure 47. Hypothèse de fragmentation du métabolite PCB-2A avec une ouverture du cycle sur l'unité terminale, inspiré de Sun et Miller (2003). HFR : Heterocycle ring fission (rouge) ; RDA : retro-Diels–Alder (bleu).

Le schéma de fragmentation du métabolite PCA-2A (Figure 47, Tableau 14) est compatible avec une ouverture du cycle C sur l'unité terminale. Afin d'identifier l'unité portant l'ouverture du cycle C une analyse en LC-ESI-MS après thioacidolyse a été réalisée. La thioacidolyse est une réaction qui s'applique de manière spécifique aux procyanidines et qui permet de caractériser leurs unités

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

constitutives. Les liaisons interflavaniques des procyanidines sont rompues en milieu acide à chaud entraînant la formation de trois 4-flavanyl-carbocations à partir des unités d'extension tandis que les unités terminales sont libérées sous leurs formes flavan-3-ols. Les 4-flavanyl-carbocations sont des intermédiaires instables qui sont piégés par un réactif le toluène- α -thiol, pour former des dérivés 4-benzyl-thioéther de flavan-3-ols. Ainsi, si c'est l'unité terminale (du bas) qui subit l'ouverture du cycle C, alors cette dernière sera libérée sous la forme d'un monomère ouvert, c'est-à-dire le (-)-3',4'-diOHPP-2-ol. En revanche, si c'est l'unité d'extension (du haut) qui subit l'ouverture du cycle C, alors cette dernière sera libérée sous la forme d'une molécule ouverte liée au benzyl thioéther. Les masses correspondant à ces deux produits en plus de celles résultant de la dégradation par thioacidolyse des dimères initiaux ((-)-épicatéchine/(+)-catéchine et (-)-épicatéchine-benzyl-thioéther) résiduels également présents dans le milieu réactionnel ont été recherchées de manière spécifique (Tableau 15). Ainsi, a été identifié, le monomère ouvert, c'est-à-dire le (-)-3',4'-diOHPP-2-ol résultant donc de la libération de l'unité terminale du dimère. Ces résultats confirment donc l'ouverture du cycle C sur l'unité terminale du dimère de procyanidine de type B.

Tableau 15. Molécules recherchées en LC-ESI-MS/MS après thioacidolyse des échantillons PCB-2A.

Molécules recherchées	Ion parental (m/z)	Identifié
(-)-épicatéchine	289	Oui
(-)-épicatéchine + benzyl thioéther	447	Oui
(-)-3',4'-diOHPP-2-ol	291	Oui
(-)-3',4'-diOHPP-2-ol + benzyl thioéther	449	Non

La même logique a été utilisée pour identifier le métabolite PCB-3A. Ainsi, le spectre de masse du métabolite PCB-3A présente un signal majoritaire à m/z 867 correspondant à deux unités de masse supplémentaires par rapport au trimère de type B initial dont le signal majoritaire est à m/z 865. Au regard de sa fragmentation en MS² (Tableau 16) ce métabolite a été identifié comme étant la forme ouverte sur le cycle C de l'une des deux unités d'extension ou de l'unité terminale. Une tentative de caractérisation du métabolite a été réalisées par spectrométrie de masse après thioacidolyse, mais la quantité insuffisante de métabolite n'a pas permis sa caractérisation.

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

Tableau 16. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches *E. lenta* après dégradation du PCB-3. Les ions secondaires majoritaires sont en gras. Les spectres de masses sont joints en annexe. PCB-3 : trimère de procyanidines de type B.

Molécules	Ion parental (m/z)	MS ² Ions secondaires (m/z)
PCB-3	865	847 – 739 – 695 – 577 - 407
Métabolite PCB-3A	867	849 – 741 – 697 – 579 – 575 – 453 - 409

De la même manière, compte tenu de la faible quantité du métabolite PCB-4A disponible, il n'a pas été possible de le caractériser.

Enfin, la caractérisation du métabolite PCA-2A a également été réalisée par LC-ESI-MS/MS. Le spectre de masse du métabolite PCA-2A présente un signal majoritaire à m/z 577 correspondant à deux unités de masse supplémentaires par rapport au dimère de type A initial dont le signal majoritaire est à m/z 575. Son schéma de fragmentation en MS² (Tableau 17) est similaire à ce qui est retrouvé dans la littérature (Engemann et al. 2012) dans le cas de la dégradation du dimère PCA-2 par le microbiote fécal de porc. L'absence d'une masse de 425 (423+2) est conforme à ce qui est prédit pour une ouverture sur le cycle C de l'unité terminale (Figure 48). Le métabolite PCA-2A a donc été identifié comme étant la forme ouverte du cycle C de l'unité terminale du dimère PCA-2 (Figure 49).

Tableau 17. Fragmentation par LC-ESI-MS/MS des métabolites produits par les souches *E. lenta* après dégradation du PCA-2. Les ions secondaires majoritaires sont en gras. Les spectres de masses sont joints en annexe. PCA-2 : dimère de procyanidines de type A.

Molécules	Ion parental (m/z)	MS ² Ions secondaires (m/z)
PCA-2	575	557 – 539 – 449 - 423
Métabolite PCA-2A	577	559 – 541 – 451 – 409 – 291

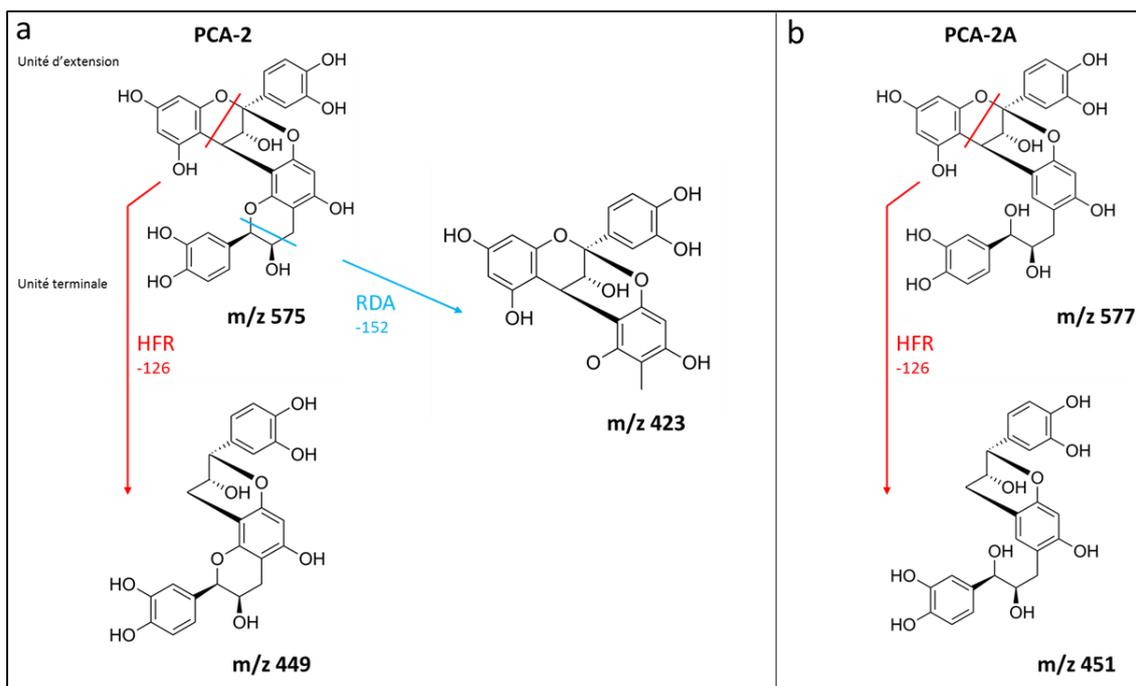


Figure 48. Comparaison de la fragmentation de PCA-2 et du métabolite PCA-2A avec une ouverture sur le cycle sur l'unité terminale, inspiré de Engemann et al. (2012). a. Hypothèse de fragmentation de PCA-2, avec la formation de deux ions m/z 423 et m/z 449 par les réactions respectivement RDA et HFR. b. Hypothèse de fragmentation de PCA-2A, avec la formation de l'ion m/z 451 par HFR, la réaction RDA ne pouvant pas se réaliser quand l'hétérocycle de l'unité terminale est ouvert. HFR : Heterocyclic ring fission (rouge) ; RDA : retro-Diels–Alder (vert).

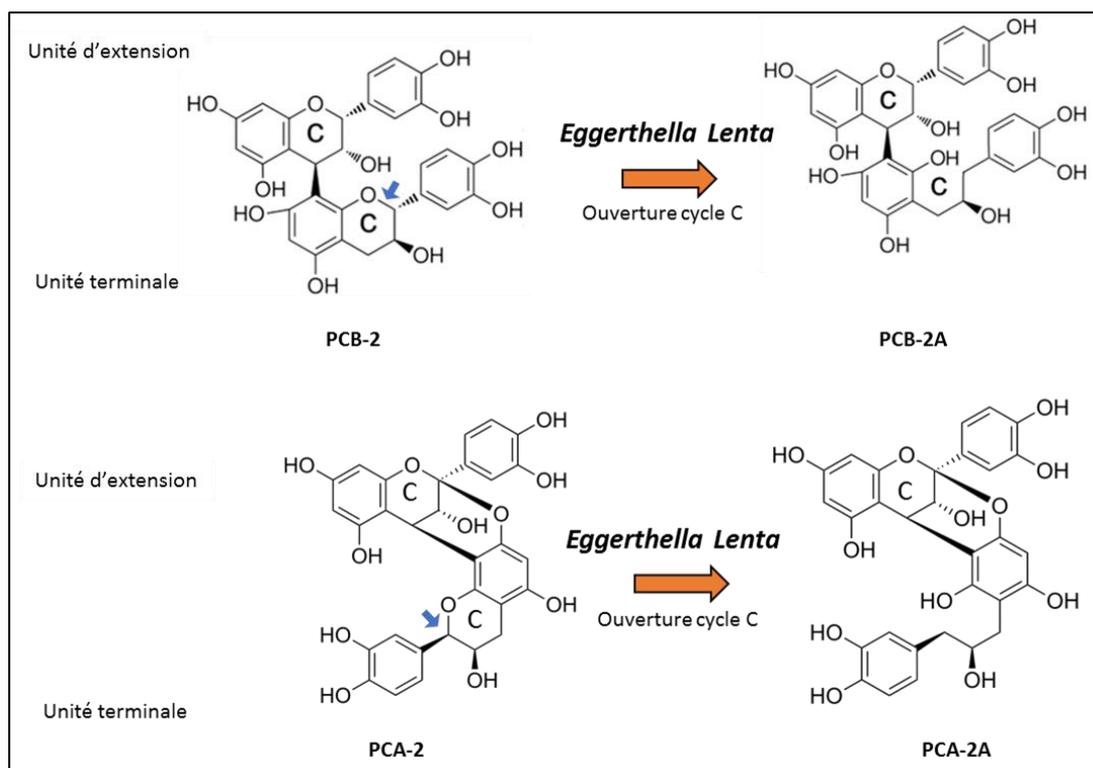


Figure 49. Bilan de la dégradation des dimères de procyanidines de type B et A par les *E. lenta*. Site d'ouverture du cycle C (flèche bleue). PCB-2 : dimère de procyanidines de type B ; PCB-2A : métabolite de PCB-2 ; PCA-2 : dimère de procyanidines de type A ; PCA-2A : métabolite de PCA-2.

Résultats

Chapitre 1 : Constitution d'une collection de souches dégradant les flavan-3-ols

En conclusion, nous avons montré que les isolats *E. lenta* de notre collection sont capables de dégrader les procyanidines de type B (DP 2, 3 et 4) et le dimère de procyanidines de type A. Par une analyse LC—ESI-MS, nous avons identifié les métabolites des deux dimères de type B et type A comme étant les formes ouvertes du cycle C de l'unité terminale. Malgré une activité sur les dérivés hydroxyphénylpropan-2-ols, les isolats *F. plautii* n'ont pas montré d'activité catalytique sur les procyanidines. Une activité de dégradation des PCB a également pu être observée avec la souche de référence *E. lenta* DSM 2243 (données non montrées).

Éléments à retenir

- ❖ L'isolement à partir de quatre selles humaines de volontaires sains a permis d'obtenir 20 isolats *E. lenta* et 2 isolats *F. plautii*, impliqués dans le métabolisme des monomères de flavan-3-ols que sont la (+)-catéchine et à la (-)-épicatéchine.
 - ❖ Les souches *E. lenta* peuvent être séparées en deux groupes métaboliques selon leur capacité à former les métabolites (+)-3'OHPP-2-ol et (-)-3'OHPP-2-ol.
 - ❖ Toutes les souches *E. lenta* isolées sont capables de dégrader les dimères, trimères et tétramères de procyanidines de type B. Deux souches testées (appartenant à chacun des groupes métaboliques) ont montré leur capacité à dégrader le dimère de procyanidines de type A.
 - ❖ La caractérisation par LC-ESI-MS/MS des métabolites formés PCB-2A et PCA-2A a montré que les souches *E. lenta* ouvrent le cycle C de l'unité terminale (Figure 49).
-

2. Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches

2.1. Séquençage génomique des isolats *Eggerthella lenta*

Notre approche de culturomique sans *a priori* nous a permis d'isoler 20 isolats bactériens d'une seule et même espèce, *Eggerthella lenta*, à partir de 3 individus (O, P, T). Il est malgré tout possible que certains de ces isolats appartiennent à une même souche et soient clonaux, en particulier lorsque ceux-ci ont été isolés à partir du même prélèvement de selles ou du même individu. Il est donc apparu nécessaire d'affilier ces isolats de manière plus résolutive afin de réduire le nombre de souches à étudier à plus long terme.

Pour identifier les souches, la séquence de l'ADNr 16S n'est pas suffisante car les souches d'une même espèce peuvent présenter une identité nucléotidique de 100 % sur ce marqueur mais pourtant peuvent diverger de manière significative en termes de composition génomique.

Avant d'envisager le séquençage complet des génomes des 20 isolats, nous avons testé une méthode de typage moléculaire appelée ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction) qui permet de générer des profils d'amplicons spécifiques d'un génome et donc d'une souche. Après plusieurs essais, cette approche s'est avérée peu reproductible et ne nous a pas permis de définir des critères robustes assurant un regroupement des différents isolats et donc d'identifier des souches différentes (Figure A13).

Nous avons donc opté pour le séquençage complet des génomes de nos 20 isolats, méthode la plus fiable pour identifier les souches au sein de notre collection et éventuellement mettre en évidence une diversité des souches au sein de l'espèce *E. lenta*.

Le séquençage de 3^{ème} génération avec la technologie PacBio Sequel II (deux appareils en Europe) permet de reconstruire plus facilement les génomes bactériens entiers grâce aux lectures de grandes longueurs (>10 kb) avec un très faible taux d'erreur suite aux corrections issues de multiples lectures d'une même molécule (CLR : Continuous Long Read). Nous avons donc séquencé les 20 isolats de la collection en utilisant cette technologie.

L'assemblage des fragments d'ADN séquencés a permis de reconstruire la presque totalité des génomes (1 unique contig = génome circulaire reconstitué), à l'exception de quatre isolats pour lesquels nous avons obtenu deux contigs. Pour l'isolat T1E11, les données de séquences n'étaient pas exploitables. Nous avons vérifié le niveau de reconstruction des génomes avec l'outil checkM (v1.1.3), qui l'a estimé entre 99 et 100 % pour chaque génome séquencé.

Les résultats obtenus pour les 19 autres isolats sont présentés dans le tableau 2. On observe au premier abord une divergence significative sur la taille des génomes [3,28 - 3,65 Mb] et le nombre de CDS identifiés [2780 - 3136]. Le pourcentage en GC [64,1 - 64,2 %] est quant à lui quasi identique.

Résultats

Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches

L'ensemble des génomes possèdent trois copies des gènes exprimant les ARN ribosomiques 5S, 16S et 23S et entre 50 et 52 gènes codant des ARN de transfert.

Tableau 18. Caractéristiques génomiques des isolats *E. lenta* après séquençage PacBio. O1 : Individu O, selle 1 ; P1 : Individu P, selle 1 ; P3 : individu P, selle 3 ; T1 : individu T, selle 1. CDS : « coding DNA sequence », ARNt : ARN de transfert, ARNr : ARN ribosomique (5S/16S/23S). Un contig correspond à une séquence génomique continue.

Origine des isolats	Nom des isolats	Nombre de contigs	Circularité	Taille du génome (nucléotides)	GC %	Nombre de CDS et de gènes exprimant (ARNr-ARNt)
O1	O1-56	2	Non	3437285	64.1	2949 (9-51)
	O1-65	2	Non	3443022	64.1	2931 (9-51)
	O1-66	2	Non	3439052	64.1	2921 (9-51)
P1	P1-35	1	Oui	3406309	64.2	2888 (9-51)
	P1-42	1	Oui	3635450	64.2	3110 (9-52)
	P1-43	2	Non	3652528	64.2	3136 (9-52)
	P1-71	1	Oui	3635483	64.2	3112 (9-52)
	P3-F10	1	Oui	3287004	64.1	2782 (9-50)
P3	P3-H6	1	Oui	3287041	64.1	2780 (9-50)
	P3-J7.5	1	Oui	3287018	64.1	2782 (9-50)
	T1E1	1	Oui	3350891	64.1	2812 (9-50)
T1	T1E5	1	Oui	3350880	64.1	2814 (9-50)
	T1E8	1	Oui	3350846	64.1	2813 (9-50)
	T1E14	1	Oui	3350871	64.1	2826 (9-50)
	T1Z1	1	Non	3350090	64.1	2811 (9-50)
	T1Z4	1	Oui	3350863	64.1	2815 (9-50)
	T1Z6	1	Oui	3350860	64.1	2810 (9-50)
	T1Z10	1	Oui	3350856	64.1	2810 (9-50)
	T1Z15	1	Oui	3350885	64.1	2810 (9-50)

Pour identifier la présence de souches différentes et donc réduire le nombre d'isolats à étudier, nous avons comparé les génomes deux à deux à l'aide du logiciel OrthoANI qui mesure le pourcentage de similitude au niveau nucléotidique entre les régions orthologues de deux génomes et génère une valeur appelée ANI ou « Average Nucleotide Identity », qui est un indice de parenté génomique. En général, une valeur d'ANI supérieure à 95 % permet d'assigner deux souches à une même espèce et plus cette valeur s'approche de 100 %, plus les deux souches sont proches génétiquement. Bisanz et al. (2018) ont défini une valeur d'ANI supérieure à 99,999 % pour considérer que deux isolats issus d'un même prélèvement soient une même souche clonale. Dans notre cas, nous avons fixé une valeur d'ANI supérieure à 99,99 % car nous avons estimé que deux souches clonales peuvent avoir des génomes qui évoluent (mutations spontanées) au fur et à mesure de transferts et de repiquages des souches. En dessous de ce seuil, deux isolats seront considérés comme deux souches différentes.

Résultats

Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches

Sur ces bases, cinq groupes de souches différentes sont confirmés par cette analyse, ceux regroupant les souches T1, P1 (à l'exception de P1-35) et P3 (Tableau 19). On remarque que les isolats O1-56, O1-65 et P1-35 se regroupent ensemble (ANI > 99,99 %), alors que l'isolat O1-66 est légèrement éloigné de ce groupe (ANI = 99,96 %).

En prenant un représentant de chaque groupe de souches précédemment identifié et en mesurant la valeur d'ANI contre un représentant d'un autre groupe, on observe des divergences de 1 à 2 % entre les groupes de souches, à l'exception de O1-66 et P1-35 qui montrent une valeur d'ANI > 99,98 % (Tableau 19).

Enfin, nous avons mesuré la valeur d'ANI entre un représentant de chaque groupe avec la souche type de *E. lenta* DSM 2243. La souche P1-71 est la plus proche de la souche type (ANI = 99,983 %) et la souche T1Z1 est la plus éloignée (ANI = 97,87 %) (Tableau 19). Ces résultats confirment également l'affiliation taxonomique (sur gène ARNr 16S) des souches à l'espèce *Eggerthella lenta* avec un ANI > 95 %.

Tableau 19. Comparaison des valeurs ANI entre les isolats *Eggerthella lenta*. Valeurs d'ANI obtenues à l'aide du logiciel OrthoANI Tool v0.93.1. ANI : Average nucleotide identity.

Comparaison	Génome 1	Génome 2	Valeur d'ANI (%)	Souches clonales (>99,99 %)	
Intra-groupe	T1E1	T1E5	99,993	9 isolats d'une même souche T1	
	T1E1	T1E8	99,997		
	T1E1	T1E14	99,998		
	T1E1	T1Z1	99,999		
	T1E1	T1Z4	99,993		
	T1E1	T1Z6	99,997		
	T1E1	T1Z10	99,999		
	T1E1	T1Z15	99,991		
		O1-56	O1-65	99,991	2 isolats O1 + 1 isolat P1
		O1-56	P1-35	99,994	
		O1-56	O1-66	99,96	1 isolat O1 très proche
		P1-42	P1-43	99,997	3 isolats d'une même souche P1
		P1-42	P1-71	99,996	
		P3-F10	P3-H6	99,997	3 isolats P3 clonales
		P3-F10	P3-J7.5	99,996	
Inter-groupe (Un représentant)	O1-66	P1-35	99,981	2 souches très proches	
	O1-66	P1-71	98,016		
	O1-66	P3-J7.5	99,048		
	O1-66	T1Z1	98,641		

Résultats

Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches

	P1-35	P1-71	97,952
	P1-35	P3-J7.5	99,048
	P1-35	T1Z1	98,64
	P1-71	P3-J7.5	98,22
	P1-71	T1Z1	97,885
	P3-J7.5	T1Z1	98,965
Contre la souche type <i>E. lenta</i> DSM 2243	O1-66	DSM 2243	99,077
	P1-35	DSM 2243	98,02
	P1-71	DSM 2243	99,983
	P3-J7.5	DSM 2243	98,056
	T1Z1	DSM 2243	97,87

Pour confirmer les résultats précédents et pour continuer l'analyse des génomes séquencés, une analyse du pangénoème (« core génome » + génome accessoire) a été réalisée avec l'ensemble des génomes des isolats. L'étude du pangénoème permet d'identifier la présence de CDS en commun entre plusieurs génomes séquencés et ceux retrouvés chez seulement quelques souches. Dans notre cas, elle permettra également d'évaluer la proximité génétique des isolats (CDS en commun) et d'évaluer la richesse génomique de notre collection de souches.

En se basant sur le nombre de CDS en commun, cette analyse confirme le regroupement réalisé précédemment des isolats P1 (à l'exception de P1-35), T1 et P3 en trois souches différentes (Figure 50). Les isolats P1 (à l'exception de P1-35) possèdent 98,9 % ($\frac{\text{Core génome}}{\text{Pangénoème}}$) de leurs CDS en commun, les isolats P3 possèdent 99,5 % de leurs CDS en commun et les isolats T1 possèdent 99 % de leurs CDS en commun.

En ce qui concerne les quatre isolats O1-56/O1-65/O1-66 et P1-35, cette analyse montre qu'ils possèdent 97,3 % de leurs CDS en commun. Le séquençage pourrait être une source de variabilité avec trois des isolats dont le génome est présent en deux contigs et non reconstitué et circulaire. Tout de même, ils constitueraient un groupe de souches très proches avec la possibilité que les souches O1 soient clonales et que la souche P1-35 soit en réalité une souche O1 et qu'il y ait eu au cours des différents repiquages une erreur de manipulation (erreur d'étiquetage de tube, inversion de tubes (Figure 50)).

La Figure 50 montre également la présence de légères variations dans la composition de gènes entre isolats de la même souche (par exemple les isolats de la souche T1). Ces différences pourraient provenir d'erreurs dans le séquençage et/ou assemblage.

Résultats

Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches

Cette analyse a mis en évidence un pangéome constitué de 4184 CDS, avec 2114 CDS présent chez l'ensemble des isolats (core génome) et 2070 CDS faisant partis du génome accessoire, c'est-à-dire, présent chez certains isolats spécifiques (Figure 50). On retrouve une grande diversité dans la composition génomique avec des gènes présents uniquement chez une seule souche (groupe d'isolats).

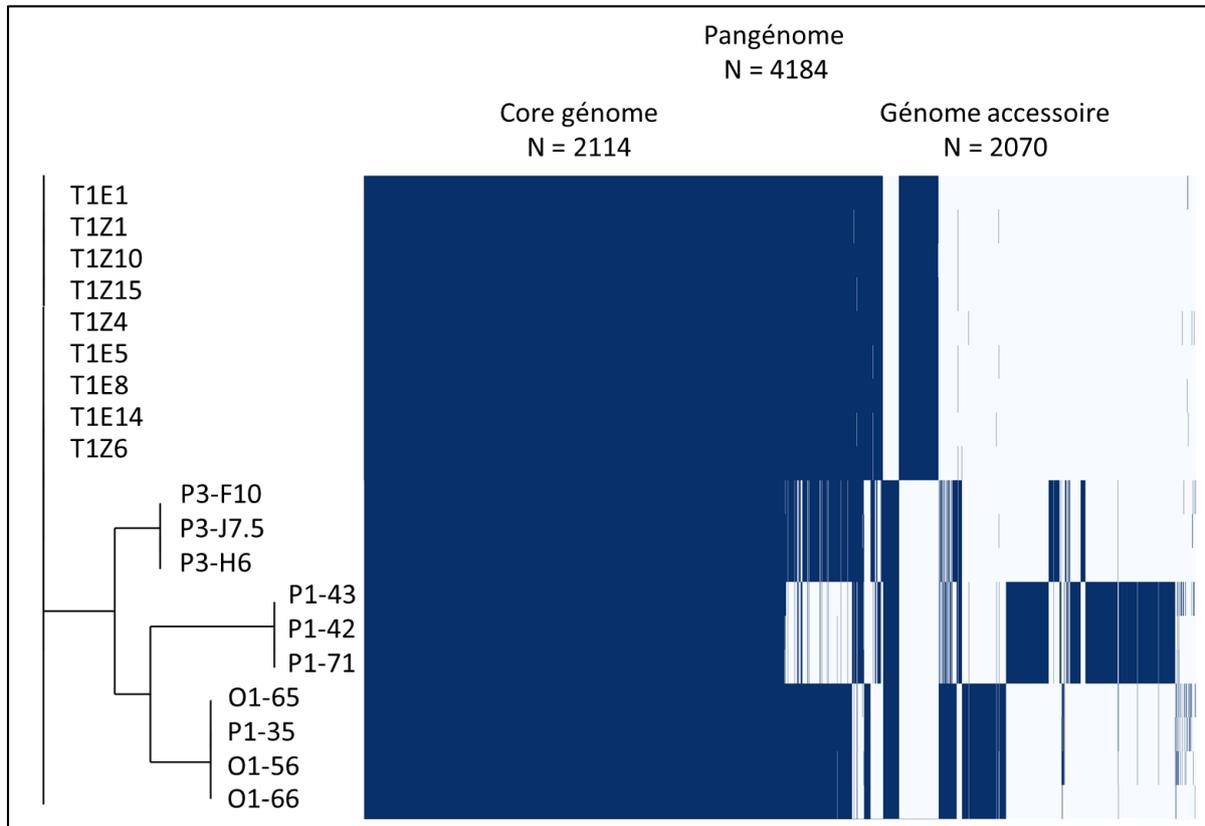


Figure 50. Analyse du pangéome de l'ensemble des souches *E. lenta* Roary (v3.11.2). Un trait bleu correspond à un CDS. Le « core génome » comprend l'ensemble des CDS communs à toutes les souches. Le génome accessoire comprend l'ensemble des CDS présents uniquement dans une ou plusieurs souches, mais pas toutes. Le pan-géome correspond à l'ensemble des CDS du core génome et du génome accessoire.

En conclusion, à l'issue des quatre isolements nous avons obtenu 20 isolats *Eggerthella lenta*, dont le génome a été séquencé complètement. Par une approche de génomique comparative (analyses ANI et du pangéome), nous avons pu mettre en évidence quatre souches différentes d'un point de vue génomique. D'autres analyses plus poussées doivent encore être menées afin de mieux caractériser ces souches, en particulier en étudiant les gènes accessoires qui sont le reflet d'une adaptation de ces souches à leur environnement digestif.

2.1. Séquençage génomique des isolats *Flavonifractor plautii*

Le séquençage complet du génome de nos deux isolats de *Flavonifractor plautii* a mis en évidence deux souches très proches génétiquement, avec un génome ayant une taille de 3,9 Mb (5 nucléotides différents entre les deux souches), un GC % de 60,6 et environ 3760 CDS, 3 copies des gènes exprimant

Résultats

Chapitre 2 : Analyse préliminaire des génomes de notre collection de souches

les ARNr 5S, 16S et 23S et 66 gènes codant des ARNt (Tableau 20). Les deux isolats possèdent un contig supplémentaire et identique en taille d'environ 46 kb (100 % d'identité nucléique). L'utilisation du logiciel mlplasmids (v1.0.0), qui permet de prédire la présence de plasmides, a montré qu'il y avait une probabilité de 0,997 pour que ce contig soit un plasmide possédant 43 CDS (Tableau 20). Une recherche (blastN) de cette séquence à priori plasmidique dans les bases de données du NCBI (National Center for Biotechnology information) n'a pas permis de retrouver ce plasmide dans d'autres bactéries. Une analyse plus poussée du plasmide n'a pas été entreprise. Le pourcentage de reconstruction des génomes a été estimé à 99,33 % par checkM (v1.1.3).

Le calcul du ANI entre les génomes (sans le plasmide) de ces deux isolats a révélé 99,975 % d'identité, score inférieur à notre seuil de 99,99 % pour conclure que ce sont des souches clonales. Cependant, l'analyse du pangéome (Roary v3.11.2) des deux souches montre qu'ils partagent 3758 CDS (99,9 %) en commun et qu'ils ne constitueraient donc qu'une seule souche.

Tableau 20. Caractéristiques génomiques des isolats *F. plautii* après séquençage PacBio.

Origine des isolats	Nom des isolats	Nombre de contigs	Taille du génome (nucléotides)	GC %	Nombre de CDS et de gènes exprimant (ARNr-ARNt)
P3	P3-I6	2	3900487 + 46502	60.6	3759 (9-66) + 43
	P3-VII7.4	2	3900482 + 46502	60.6	3761 (9-66) + 43

Éléments à retenir

- ❖ Le séquençage PacBio du génome des 22 isolats a permis de reconstruire la presque totalité des génomes (99-100 %)
- ❖ L'analyse ANI et du pangénome a permis de réduire le nombre d'isolats à étudier par la suite et les rassembler en quatre souches *E. lenta* et une souche *F. plautii*.
- ❖ Les souches *E. lenta* sont assez diverses d'un point de vue génomique avec une taille du génome comprise entre 3,28 et 3,65 Mb et un nombre de CDS identifiés entre 2780 et 3136, dont 2114 sont en communs et 2070 dans le génome accessoire.
- ❖ La souche *F. plautii* a un génome de 3,9 Mb et 3760 CDS identifiés. La présence d'un plasmide présumé de 46,5 kb a été détectée

3. Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols**3.1. Transcriptome de *E. lenta* en présence de flavan-3-ols****3.1.1. Approche transcriptomique mise en œuvre**

Les gènes codant les fonctions enzymatiques de dégradation des polyphénols et à fortiori des flavan-3-ols par les bactéries du microbiote intestinal sont très peu connus. Nous avons vu dans l'étude bibliographique de cette thèse que l'approche transcriptomique RNAseq a récemment été utilisée chez *E. lenta* pour identifier les gènes impliqués dans la dégradation des lignanes (Bess et al. 2020) ainsi que dans la déshydroxylation de certains métabolites de flavan-3-ols (Maini Rekdal et al. 2020). Nous avons aussi vu dans la partie 2 des résultats que *E. lenta* dégrade non seulement les monomères de flavan-3-ols (ouverture du cycle C et déshydroxylation du cycle B) mais est également capable de métaboliser les oligomères (ouverture du cycle C sur une unité de l'oligomère). L'objectif ici est donc d'utiliser l'approche RNAseq pour identifier les gènes impliqués dans ces voies métaboliques.

L'étude du transcriptome par séquençage haut débit (2ème génération) des ARNm est une approche exploratoire sans a priori qui est quantitative et qui permet de mesurer l'expression de l'ensemble des gènes codés par un génome. Cette méthodologie a peu à peu supplanté les puces pangénomiques à ARN qui sont moins résolutive sur le plan quantitatif. Nous avons donc choisi d'utiliser cette stratégie pour identifier chez *E. lenta* les gènes induits en présence de trois flavan-3-ols, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et le dimère de procyanidines de type B. L'expression des gènes dans ces trois conditions a été comparée à celle obtenue en absence de flavan-3-ols (condition témoin). Notre approche RNAseq est schématisée dans les Figure 33 et Figure 34. Nous avons travaillé avec la souche type de *E. lenta* issue de la collection DSMz car les génomes de nos souches n'étaient pas encore séquencés quand nous avons entrepris ce travail.

3.1.2. Analyse des données brutes issues du séquençage RNAseq

L'ensemble des étapes utilisées pour réaliser l'analyse transcriptomique RNAseq sur la souche *Eggerthella lenta* DSM 2243 est schématisé dans la Figure 34 et est décrit en détail dans le matériel et méthodes (cf. 3.6). Suite au séquençage des ARNs et après filtration et nettoyage des lectures, nous avons obtenus entre 19,9 et 31,7 millions de lectures par échantillon. Entre 46,5 et 59,7 % de ces lectures ont pu être alignées sur les régions codantes (CDS) du génome séquencé et annoté de *E. lenta* DSM 2243, ce qui a permis de couvrir entre 88,1 et 94,2 % des bases des CDS de la souche avec une profondeur (nombre moyen de lectures qui recouvrent chaque base des CDS) comprise entre 3074 et 16599 (Tableau 21). L'identification des gènes impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols est conditionnée par une couverture des CDS presque totale et une profondeur importante. Au vu de ces résultats, nous avons considéré que les données de séquençage obtenues pour les douze échantillons d'ARN étaient exploitables pour la suite des analyses transcriptomiques.

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Tableau 21. Alignement des séquences (= lectures) RNAseq sur les régions codantes du génome *Eggerthella lenta* DSM 2243. Données obtenues après filtration et nettoyage des séquences. PCB-2 : dimère de procyanidines de type B ; CDS : « Coding DNA sequence »

Molécule	Nombre de lectures	Pourcentage de lectures couvrant les CDS	Pourcentage de couverture des CDS	Profondeur
Témoin - 1	21.3E+06	46.5	88.1	16599
Témoin - 2	23.6E+06	56.0	92.5	14161
Témoin - 3	22.4E+06	57.8	94.5	15532
(+)-catéchine - 1	20.7E+06	56.0	92.0	5755
(+)-catéchine - 2	24.6E+06	59.7	92.9	3074
(+)-catéchine - 3	26.1E+06	57.8	93.2	4544
(-)-épicatéchine - 1	26.3E+06	56.9	93.2	12917
(-)-épicatéchine - 2	31.7E+06	58.7	94.1	1672
(-)-épicatéchine - 3	19.9E+06	57.4	92.1	8429
PCB-2 - 1	24.3E+06	57.7	93.1	7176
PCB-2 - 2	23.7E+06	57.1	92.3	11382
PCB-2 - 3	25.6E+06	55.9	94.2	10045

3.1.3. Expression génique différentielle chez *E. lenta* en présence de flavan-3-ols

L'analyse de l'expression de l'ensemble des gènes de *E. lenta* DSM 2243 suite à l'ajout de trois flavan-3-ols différents ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine et dimère de procyanidines de type B (PCB-2)) a mis en évidence un grand nombre de gènes induits ou réprimés dont le Log2 Fold-Change (condition traitée / condition témoin) est supérieur ou inférieur à 2 (Figure 51). En éliminant les faux positifs (FDR = False Discovery rate < 0.001), 34, 38 et 26 gènes ont été respectivement induits en présence de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et PCB-2, alors que 6, 7 et 3 gènes ont été réprimés en présence de ces trois flavan-3-ols. Ces gènes sont listés en annexe (Tableau A4, Tableau A5, Tableau A6) de la thèse.

Quand on balaye le génome de *E. lenta* DSM 2243 qui fait 3,6 Millions de paires de bases (Mpb), on observe deux régions particulièrement sur-exprimées ($\log_2FC > 4$) (Figure 51). La première région entre 0,3 et 0,8 Mpb est représentée par des gènes spécifiquement induits par chacun des trois flavan-3-ols utilisés avec des \log_2FC supérieurs à 2 ; La seconde région entre 2,1 et 2,2 Mpb contient plusieurs gènes induits quel que soit le flavan-3-ol utilisé (Figure 51).

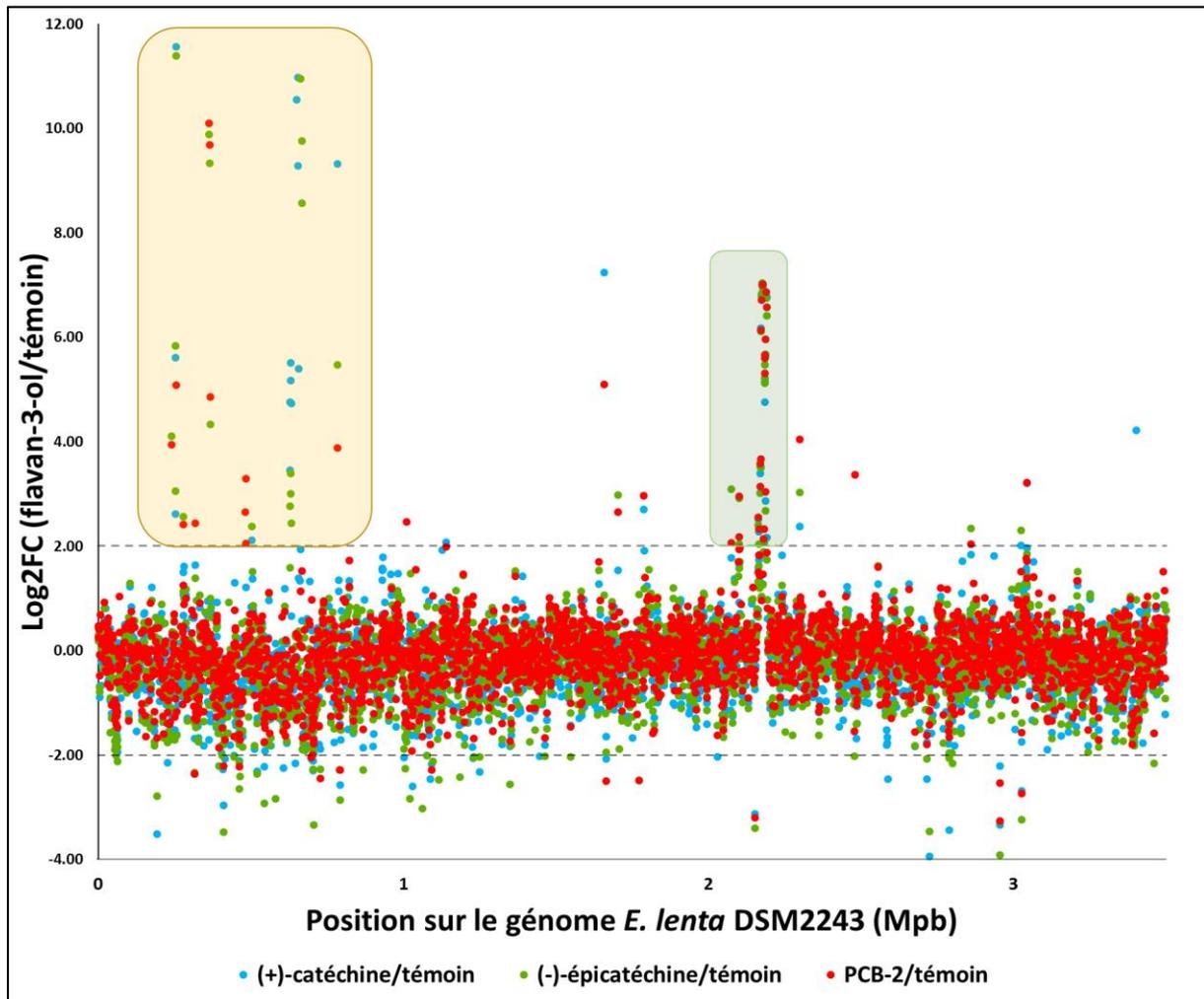


Figure 51. Expression différentielle de l'ensemble des gènes de *E. lenta* DSM 2243 en présence de flavan-3-ol par rapport à la condition témoin sans flavan-3-ol. Chaque gène, représenté par un point, est considéré comme induit ou réprimé quand le Log₂FC est respectivement > ou < à 2. FC = « Fold-Change » ou ratio du taux d'expression d'un gène (exprimé en FPKM = « Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads ») dans la condition traitée par rapport à la condition témoin. PCB-2 : dimère de procyanidines de type B. Deux régions d'intérêts ont été entourées (jaune et verte) avec plusieurs gènes induits. Chaque point représente la moyenne de 3 analyses réalisées en triplicat biologique.

En comparant le taux d'induction des gènes différentiellement exprimés en présence de flavan-3-ol par rapport à la condition témoin (sans flavan-3-ol) à leur taux d'expression absolue et normalisée en présence de chaque flavan-3-ol, nous avons pu mettre en évidence trois groupes de gènes (Figure 52). Le groupe A est constitué de six gènes très induits mais peu exprimés comparativement à d'autres gènes. Le groupe B est constitué de quatre gènes très induits et très exprimés. Le groupe C contient dix gènes un peu moins induits que les précédents et ayant des taux d'expression variables (Figure 52). Une analyse plus poussée de ces trois groupes de gènes a été entreprise par la suite.

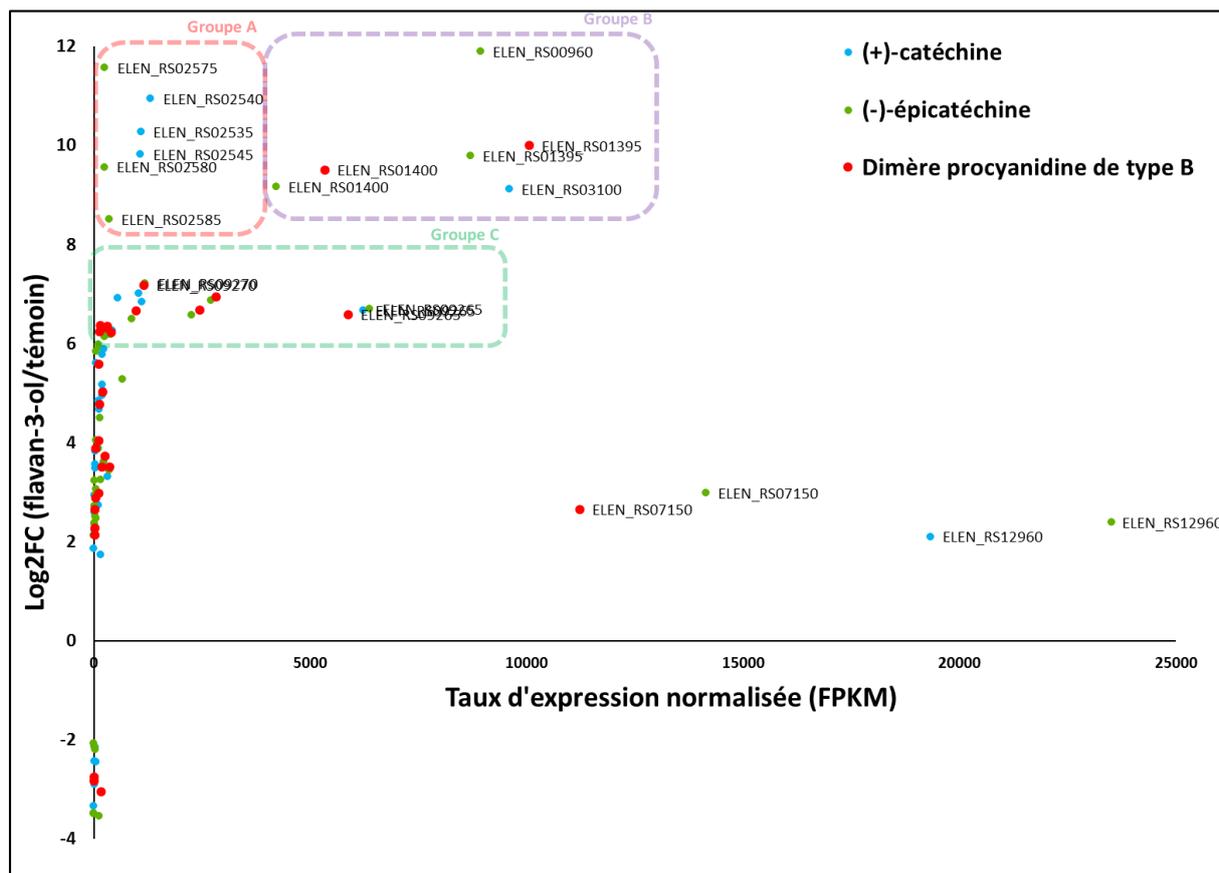


Figure 52. Gènes candidats potentiellement impliqués dans la métabolisation des flavan-3-ols. Chaque point représente un gène différentiellement exprimé (FDR < 0.001, Log2FC > ou < 2) en présence de flavan-3-ol par rapport à la condition témoin (en ordonné) et son taux d'expression absolu normalisé (FPKM) (en abscisse) en présence de (+)-catéchine (bleu), (-)-épicatéchine (vert) et dimère de procyanidines de type B (rouge). Trois groupes de gènes candidats ont été sélectionnés : Groupe A (log2FC > 8, Expression < 5000 FPKM), groupe B (log2FC > 8, Expression > 5000 FPKM), groupe C (6 < log2FC < 8, 1000 < Expression < 7000 FPKM).

3.1.4. Gènes du groupe A

Les six gènes du groupe A (Tableau 22) présentent comme caractéristique principale qu'ils sont faiblement exprimés (<1000 FPKM / gène) quelle que soit la condition testée, mais qu'ils sont fortement induits (log2FC>8) en présence de flavan-3-ol par rapport à la condition témoin sans flavan-3-ols (Figure 53). De plus ces gènes sont organisés en clusters de trois gènes consécutifs sur un locus génomique restreint (moins de 20 kb entre les deux clusters) (Figure 53).

Tableau 22. Gènes du groupe A induits en présence des flavan-3-ols.

ID_gène	ID_protéine	Identifiant	Induction	Annotation
ELEN_RS02535	WP_009607964.1	a	(+)-catéchine	molybdopterin-dependent oxidoreductase
ELEN_RS02540	WP_009608072.1	b	(+)-catéchine	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS02545	WP_015760017.1	c	(+)-catéchine	hypothetical protein
ELEN_RS02575	WP_009608048.1	d	(-)-épicatéchine	molybdopterin-dependent oxidoreductase
ELEN_RS02580	WP_009607966.1	e	(-)-épicatéchine	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS02585	WP_041691699.1	f	(-)-épicatéchine	hypothetical protein

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Le fait que chaque cluster de trois gènes soit transcrit à partir du même brin d'ADN (même direction), que le gène en 5' soit précédé d'un promoteur putatif, que le gène en 3' soit suivi d'un terminateur putatif, que les distances intergéniques entre les gènes du cluster soient très courtes (<5 bases), suggère qu'il s'agit de deux opérons, le fait que les transcrits obtenus par RNAseq couvrent aussi bien les régions codantes qu'intergéniques montre que ces trois gènes sont co-transcrits en un seul ARN messenger, et donc que nous avons affaire à deux opérons (Figure 53).

De plus, la Figure 53 montre que l'opéron constitué des gènes [Elen_RS02535, Elen_RS02540, Elen_RS02545] est fortement induit en présence de (+)-catéchine, mais pas des deux autres flavan-3-ols, alors que l'opéron [Elen_RS02575, Elen_RS02580, Elen_RS02585] est fortement induit en présence de (-)-épicatéchine et pas des deux autres flavan-3-ols (Figure 53). L'induction de ces deux opérons est donc dépendante de la fourniture à *E. lenta* de deux flavan-3-ols monomères, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine.

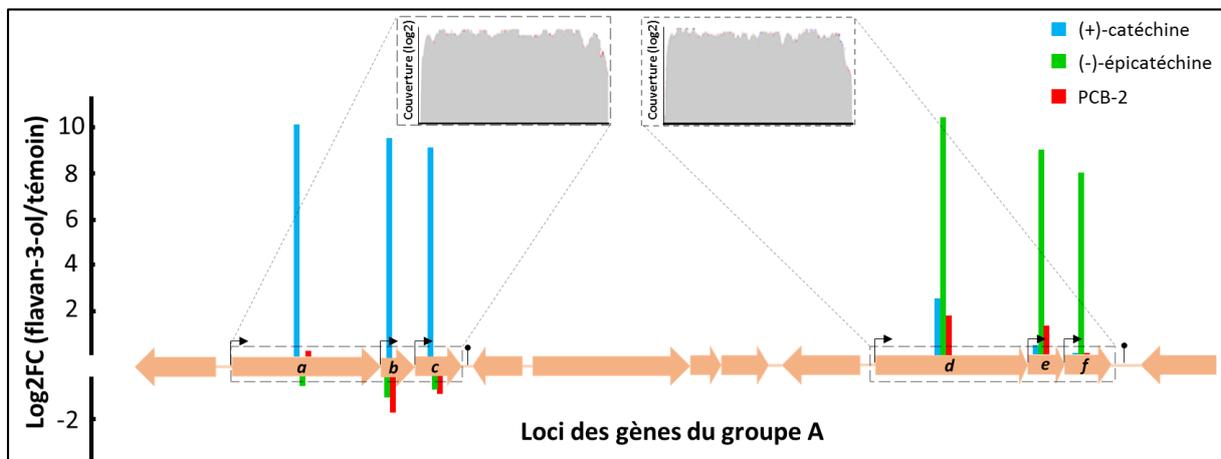


Figure 53. Organisation génomique et expression différentielle des gènes du groupe A en présence des flavan-3-ols. Région comprise entre les nucléotides 649428 et 670060 de l'ADN génomique de *E. lenta* DSM 2243, présentant l'organisation génomique des six gènes candidats du groupe A en deux opérons de trois gènes et leur taux d'expression en présence de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et du dimère de procyanidines de type B (PCB-2) par rapport à la condition témoin. Le Log₂FC (Fold-Change) met en évidence les gènes induits (Log₂FC>2) ou réprimés (Log₂FC<2) en présence des différents flavan-3-ols. Des flèches noires indiquent la présence de promoteurs putatifs à l'avant des gènes des deux opérons. Les symboles en tête d'aiguille (représentant un repliement en boucle de l'ARN) indiquent la présence de terminateurs putatifs à la fin des opérons. Les encadrés montrent la couverture des lectures RNAseq sur les loci génomiques d'intérêt visualisée avec NCBI Genome Workbench v3.5.0.

Les gènes de ces deux opérons codent des protéines dont l'annotation automatique est similaire (Tableau 22). Quand on compare deux à deux les protéines ayant la même annotation, on trouve respectivement 72 et 93 % d'identité en acides aminés entre les deux « 4Fe-4S dicluster domain-containing proteins » et les deux « hypothetical proteins » (Tableau 23). Par contre, les deux « molybdoterin-dépendant oxydoreductases » ne présentent que 53 % d'identité en acides aminés (Tableau 23). Donc, ces deux opérons très similaires en termes d'organisation génomique et codant

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

des protéines de même annotation dont deux d'entre elles ont des pourcentages d'identité élevés codent probablement une fonction métabolique très similaire, et pourtant spécifique d'un flavan-3-ol particulier. Par ailleurs, l'opéron de trois gènes [Elen_RS02535, Elen_RS02540, Elen_RS02545] induit par la (+)-catéchine chez la souche *E. lenta* DSM 2243 de notre étude correspond à l'opéron *cadh* (100 % d'identité protéique) identifié par Maini Rekdal et al. (2020) chez la souche A2. Pour rappel, cet opéron code un complexe enzymatique qui participe à la déshydroxylation du cycle B du métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol issu de la (+)-catéchine (cf. 4.4 de l'étude bibliographique).

Tableau 23. Pourcentages d'identités protéiques du groupe A. Comparaison deux à deux par blastP (ncbi) entre les séquences protéiques du groupe A qui ont la même annotation. En bleu, induit par la catéchine, en vert induit par l'épicatéchine, VS = *versus*.

Annotation	Comparaison blastP	Identité en acide aminé (%)
molybdopterin-dependent oxidoreductase	WP_009607964.1 (ELEN_RS02535) VS WP_009608048.1 (ELEN_RS02575)	53
4Fe-4S dicluster domain-containing protein	WP_009608072.1 (ELEN_RS02540) VS WP_009607966.1 (ELEN_RS02580)	72
hypothetical protein	WP_015760017.1 (ELEN_RS02545) VS WP_041691699.1 (ELEN_RS02585)	93

En conclusion, nous avons mis en évidence deux opérons distincts qui ont une organisation génomique similaire. Leur divergence est principalement portée par le premier gène de l'opéron qui code une enzyme annotée « molybdopterin-dependant oxydoreductase ». Le fait que l'opéron de trois gènes induit par la (+)-catéchine chez la souche DSM 2243 correspond à l'opéron *cadh* décrit par Maini Rekdal et al. (2020) chez la souche A2 permet de conclure que cet opéron participe à la déshydroxylation du cycle B du métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol issu de la (+)-catéchine chez les deux souches. Par analogie, l'opéron induit dans notre étude par la (-)-épicatéchine aurait la même fonction sur le métabolite (-)-3',4'-diOHPP-2-ol issu de la (-)-épicatéchine.

3.1.5. Gènes du groupe B

Les quatre gènes du groupe B présentent comme caractéristique principale qu'ils sont fortement exprimés (>4000 FPKM / gène) et fortement induits (log₂FC>8) (Tableau 24, Figure 52). Nous avons ajouté à ce groupe un cinquième gène (Elen_RS06940) qui ne répond pas à ces critères mais qui est induit dans deux conditions sur trois et qui code une protéine dont l'annotation correspond aux protéines de ce groupe (Tableau 24).

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Tableau 24. Induction des gènes du groupe B par les flavan-3-ols. FC (Fold Change) : ratio du taux d'expression d'un gène exprimé en FPKM entre la condition traitée (flavan-3-ol) et la condition témoin. Les valeurs entre parenthèse correspondent au taux d'expression absolu du gène (en FPKM) en présence de flavan-3-ol. FPKM : Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads ; PCB-2 : Dimère de procyanidines de type B.

ID_gène	ID_protéine	Log2FC ((+)-catéchine/ témoin)	Log2FC ((-)-épicatéchine/ témoin)	Log2FC (PCB-2/ témoin)	Annotation
ELEN_RS00960	WP_015759863.1	12.1 (10134)	11.9 (8935)	5.6 (113)	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS01395	WP_009305851.1	-1.8 (3)	9.8 (8695)	10 (10061)	FAD-binding protein
ELEN_RS01400	WP_009305853.1	-1.4 (3)	9.2 (4200)	9.5 (5345)	hypothetical protein
ELEN_RS03100	WP_009305152.1	9.1 (9593)	5.3 (669)	3.7 (222)	FAD-binding protein
ELEN_RS06940	WP_009304480.1	6.9 (552)	0.7 (7.6)	4.8 (125)	FAD-dependent oxidoreductase

Parmi ces cinq gènes, trois sont indépendants et localisés sur différents loci du génome de *E. lenta* DSM 2243 (Elen_RS00960, Elen_RS03100, Elen_RS06940). Deux gènes (Elen_RS01395 et Elen_RS01400) sont consécutifs et distants des trois autres sur le génome. Ces deux gènes forment à priori un opéron. Comme pour les opérons du groupe A, ils sont précédés d'un promoteur putatif en 5' et suivis d'un terminateur putatif en 3'. On observe également la présence d'un promoteur putatif dans la région intergénique. L'hypothèse de l'opéron est cependant validée par le fait que les séquences obtenues par RNAseq couvrent aussi bien les régions codantes que la courte région intergénique (134 pb) (Figure 54).

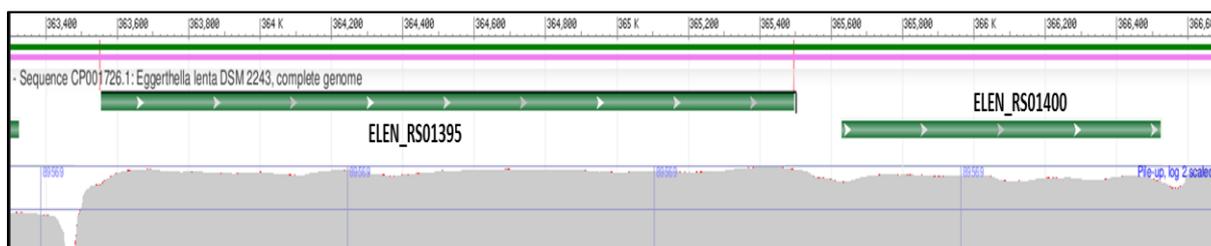


Figure 54. Couverture des lectures RNAseq sur le locus génomique des gènes Elen_RS01395 et Elen_RS01400. Visualisation de la couverture des données de RNAseq après induction par (-)-épicatéchine avec le logiciel NCBI Genome Workbench v3.5.0 entre les nucléotides 363300 et 366700 du génome *E. lenta* DSM 2243.

L'analyse des données de transcriptomique a mis en évidence que Elen_RS00960 est fortement induit et exprimé en présence de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine (Tableau 24). L'opéron Elen_RS01395/Elen_RS01400 est quant à lui très induit et exprimé en présence de (-)-épicatéchine et PCB-2. Elen_RS03100 est surtout induit et exprimé avec la (+)-catéchine (Tableau 24). Elen_RS06940 n'est pas autant exprimé que les quatre autres gènes et est surtout induit par la (+)-catéchine et PCB-2.

L'annotation automatique des protéines codées par ces cinq gènes montre qu'il s'agit soit d'une protéine inconnue soit d'enzymes de type oxydoréductases dépendantes du FAD, soit de protéines se liant au FAD (Tableau 24). Le FAD ou flavine adénine dinucléotide est un cofacteur d'oxydo-réduction

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

dérivant de la riboflavine (vitamine B2). C'est un groupement non protéique (Figure 55) souvent associé aux enzymes de la classe des oxydo-réductases auxquelles il est lié par une liaison covalente.

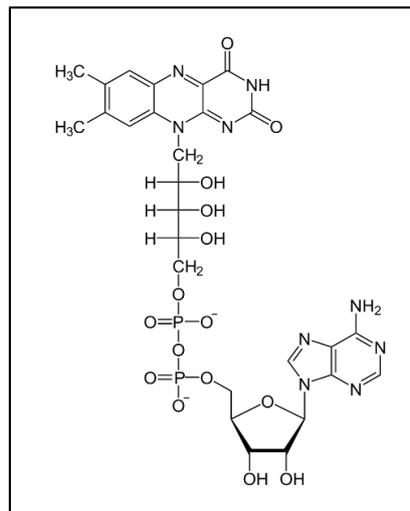


Figure 55. Structure chimique de la FAD (flavine adénine dinucléotide).

Nous avons ensuite tenté de comprendre l'importance et le rôle de ces protéines dans la métabolisation des Flavan-3-ols chez *E. lentia*. Le génome de la souche type de *E. lentia* (DSM 2243) possède 37 et 35 gènes codant respectivement des FAD oxydo-réductases et des FAD-binding proteins pour lesquelles la fonction enzymatique n'a pas été caractérisée, à l'exception d'un seul et unique gène identifié chez *E. lentia* souche A2 et codant une FAD oxydo-réductase capable d'ouvrir un cycle similaire (hétérocycle oxygéné) à ceux retrouvés chez les flavan-3-ols *i.e.* cycle C (cf. 4.1.1). Ce gène appelé *ber* code une benzyl ether reductase (ELEN_RS01850 ; WP_015759938.1) capable de couper les deux hétérocycles du pinorésinol (lignane) et former le laricirésinol, puis le secoisolaricirésinol (Figure 27). Dans les gènes du groupe B identifiés ci-dessus, nous avons quatre gènes codant pour des enzymes ou protéines dépendant ou se liant au cofacteur FAD qui pourraient, comme le gène *ber*, coder une enzyme ayant une activité benzyl ether reductase ciblant les flavan-3-ols. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons dans un premier temps comparé les séquences protéiques de nos quatre enzymes putatives (Groupe B) avec la protéine BER afin de mettre en évidence des similarités de séquence en acides aminés.

La comparaison deux à deux des séquences protéiques par blastP (NCBI) a en fait surtout mis en évidence une grande divergence entre ces 5 protéines, le pourcentage d'identité étant très bas et allant de 23,93 % à 32,35 % (Tableau 25).

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Tableau 25. Pourcentage d'identité entre la protéine BER et les protéines candidates (groupe B) obtenu avec blastP. BER = WP_015759938.1 (Elen_RS01850).

	ELEN_RS01850 WP_015759938.1	ELEN_RS06940 WP_009304480.1	ELEN_RS00960 WP_015759863.1	ELEN_RS01395 WP_009305851.1	ELEN_RS03100 WP_009305152.1
ELEN_RS01850 WP_015759938.1		23.93%	31%	25.32%	28.64%
ELEN_RS06940 WP_009304480.1	24.02%		28.29%	28.26%	28.11%
ELEN_RS00960 WP_015759863.1	30.65%	28.37%		27.73%	30.18%
ELEN_RS01395 WP_009305851.1	25.05%	28.34%	27.73%		32.35%
ELEN_RS03100 WP_009305152.1	28.64%	28.26%	30.08%	32.15%	

Malgré une forte divergence de séquences de protéines, des protéines peuvent posséder des motifs ou domaines riches en acides aminés conservés. Pour mettre en évidence ces acides aminés, nous avons réalisé un alignement multiple des 5 séquences protéiques avec Clustal Omega v1.2.4. L'alignement montre la présence d'acides aminés conservés entre les cinq protéines, avec des régions plus conservées (encadrées) que d'autres tout le long de la protéines (Figure 56).

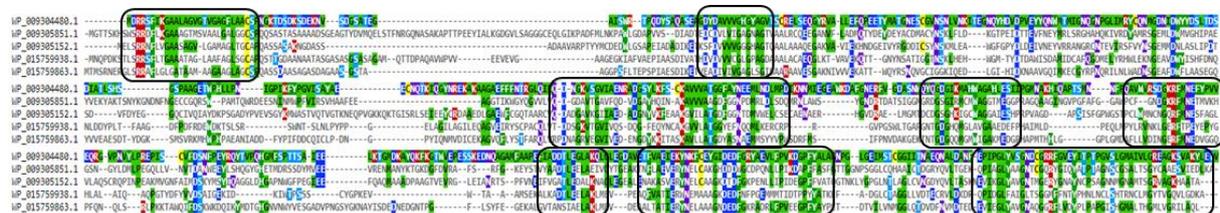


Figure 56. Alignement multiple des séquences de la protéine BER et des protéines candidates. Les séquences protéiques ont été alignées par Clustal Omega v1.2.4 et la visualisation a été obtenue par MView v1.63. Les régions encadrées montrent des zones plus conservées entre les cinq protéines.

Nous avons aussi recherché la présence de domaines spécifiques au sein de ces cinq protéines avec les outils SignalP-5.0 et Pfam v33.1. Ces domaines sont représentés dans la Figure 57. On observe que les cinq protéines possèdent en N-terminal une séquence signal TAT (Twin Arginine Translocation, en bleu) qui indique que ces protéines, une fois synthétisées dans le cytoplasme, sont prises en charge par le système de sécrétion TAT qui reconnaît le motif double arginine (RR) en N-terminal de la séquence et exporte la protéine soit dans le périplasma (pour les bactéries à Gram négatif) soit dans le milieu extra-cellulaire (pour les bactéries à Gram positif, cas de *E. lenta*).

On note également pour les cinq protéines la présence d'un domaine « FAD-binding » (en vert) qui occupe 75 à 85 % de la séquence (Figure 57). On note également la présence de deux courtes régions avant et après le domaine FAD-binding (en gris) dont le rôle n'est pas connu.

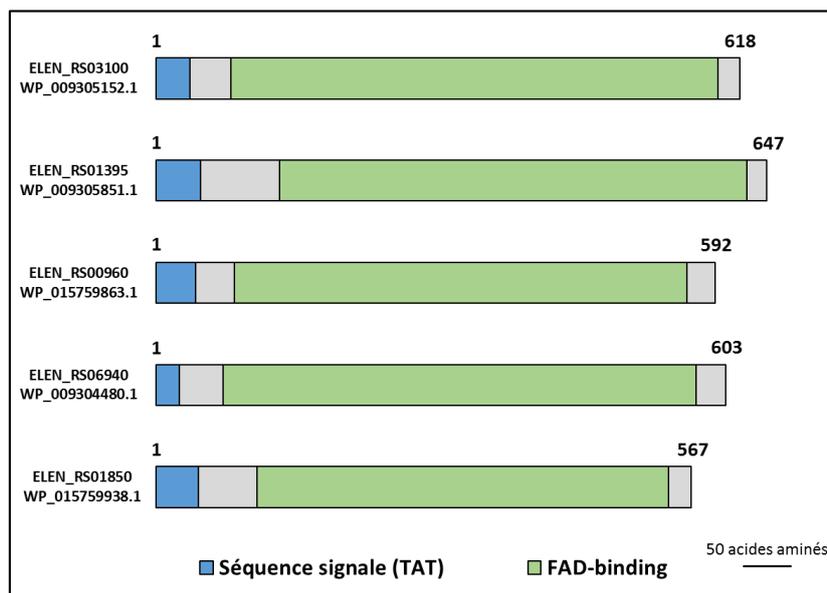


Figure 57. Représentation des différents domaines de la protéine BER et des protéines candidates. Séquence signal TAT (bleu), FAD-binding domain (vert) et régions sans domaines identifiés (gris).

Pour conclure sur l'analyse *in silico* des protéines codées par les gènes du groupe B, la comparaison de ces cinq protéines a permis de mettre en évidence une organisation protéique similaire malgré un faible pourcentage d'identité dans leur séquence en acides aminés. Ceci met en évidence une diversité de séquence au sein de la famille des FAD oxydo-réductases qui ne permet pas d'en déduire leur fonction biologique par simple analyse *in silico* telle que nous l'avons réalisée.

3.1.6. Gènes du groupe C

Ce groupe est constitué d'un ensemble de gènes localisés sur un locus génomique d'environ 20 kb (Figure 51). L'induction de chacun des gènes est similaire pour les trois flavan-3-ols testés (Tableau 26 ; Figure 58). Parmi les gènes sur-exprimés, certains codent des protéines qui seraient impliqués dans l'oxydoréduction (3 « Acyl-CoA déshydrogénases »), le transfert d'électrons (3 « electron transfer flavoprotein subunits »), mais également dans une protéine de la famille des transporteurs membranaires (Tableau 26). Ce groupe de gènes étant induit en présence des trois flavan-3-ols testés, nous ne nous sommes pas focalisés sur ces gènes pendant ma thèse.

Tableau 26. Gènes du groupe C induits en présence des flavan-3-ols.

ID_gène	ID_protéine	Identifiant	Annotation
ELEN_RS09255	WP_015760810.1	a	MFS transporter
ELEN_RS09265	WP_009304337.1	b	CoA transférase
ELEN_RS09270	WP_009304336.1	c	flavodoxin family protein
ELEN_RS09275	WP_009304335.1	d	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
ELEN_RS09295	WP_009304329.1	e	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS09300	WP_009304328.1	f	electron transfer flavoprotein subunit alpha/FixB family protein
ELEN_RS09305	WP_009304327.1	g	electron transfer flavoprotein subunit beta/FixA family protein
ELEN_RS09310	WP_015760814.1	h	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09320	WP_009304324.1	i	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09325	WP_009304323.1	J	NAD(P)-binding protein

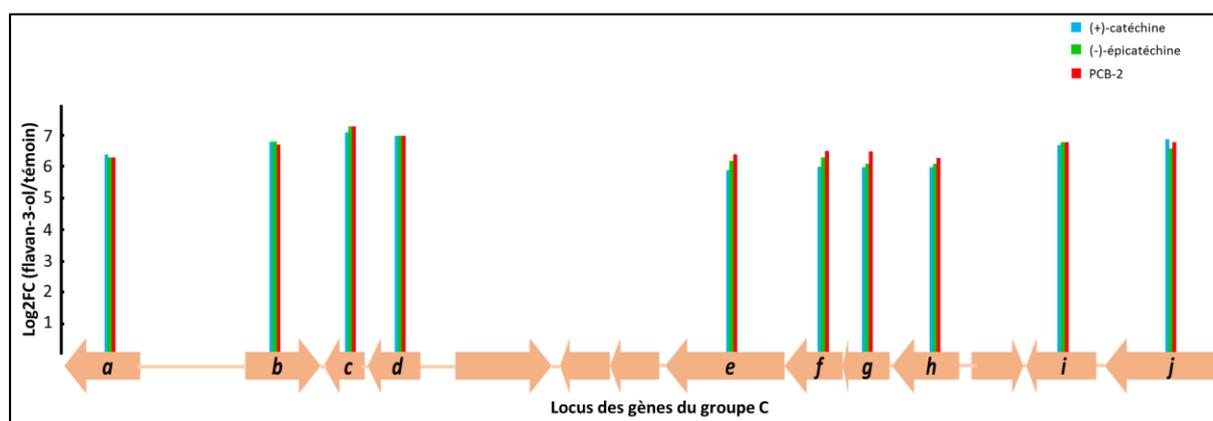


Figure 58. Organisation génomique et expression différentielle des gènes du groupe C en présence des flavan-3-ols. Région comprise entre les nucléotides 2172079 et 2191935 de l'ADN génomique de *E. lenta* DSM 2243, avec l'organisation génomique des gènes du groupe C et leur taux d'expression en présence de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et du dimère de procyanidines de type B (PCB-2) par rapport à la condition témoin. Le Log2FC (Fold-Change) met en évidence les gènes induits (Log2FC > 2) en présence des différents flavan-3-ols.

3.2. Expression hétérologue des gènes du groupe B chez *E. coli*

L'analyse transcriptomique RNAseq réalisée chez *E. lenta* DSM 2243 a mis en évidence certains gènes très induits (groupe B) qui sont de bons candidats pour être impliqués dans le métabolisme de dégradation des flavan-3-ols. Il restait cependant à démontrer l'activité enzymatique des protéines codées par ces gènes. Pour ce faire, nous avons choisi de faire exprimer chez *E. coli* les quatre gènes les plus induits, c'est-à-dire Elen_RS00960, Elen_RS01395, Elen_RS01400, Elen_RS03100. Nous avons fait le choix de ne pas prendre le gène Elen_RS06940. Pour rappel, nos analyses suggèrent que les gènes Elen_RS01395 et Elen_RS01400 seraient co-exprimés car organisés en opéron. De ce fait, le gène Elen_RS01395 a été cloné seul ou avec le gène Elen_RS01400. En effet, nous avons fait l'hypothèse que l'activité enzymatique était apportée par le gène Elen_RS01395 alors que le gène Elen_RS01400 coderait une protéine accessoire à la fonction enzymatique du premier.

L'obtention des souches de *E. coli* recombinantes hébergeant les plasmides pBAD portant les gènes d'intérêt a nécessité plusieurs étapes (Figure 59) qui sont décrites en détail dans le Matériel et Méthodes. Nous avons ainsi obtenu les quatre souches recombinantes suivantes : *E. coli* (pBAD-RS00960), *E. coli* (pBAD-RS01395), *E. coli* (pBAD-RS01395-RS01400) et *E. coli* (pBAD-RS03100). Les conditions d'induction de l'expression des gènes avec le L-arabinose ainsi que la préparation d'extraits protéiques (protéines cellulaires) contenant les protéines d'intérêt ont été optimisées (optimisation non présentée dans ce manuscrit de thèse). Les conditions expérimentales choisies ont été développées dans le matériel et méthodes.

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

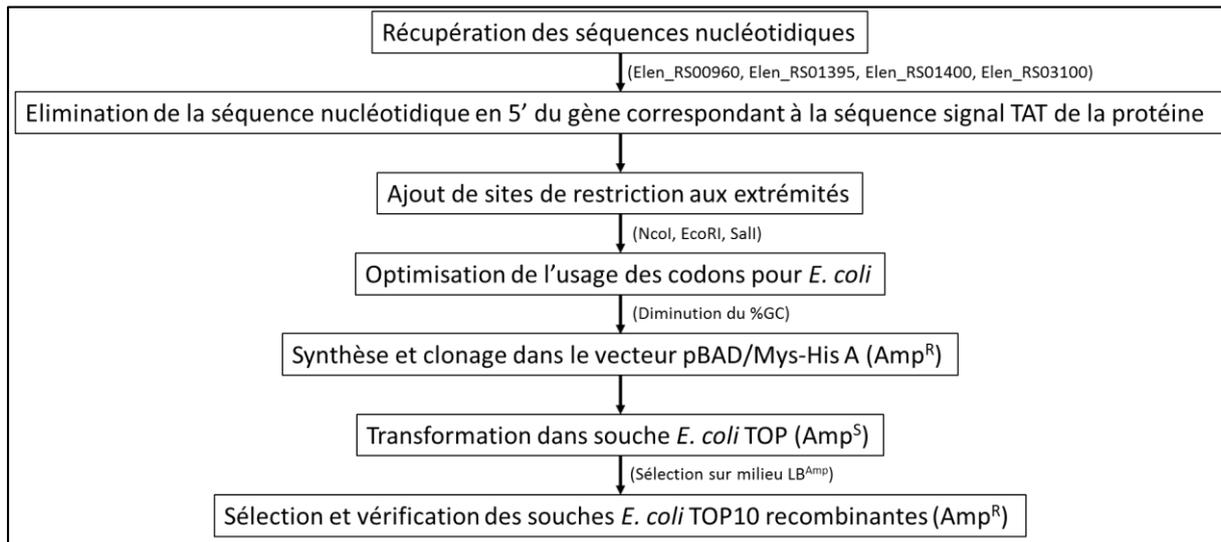


Figure 59. Schéma expérimental utilisé pour l'obtention de *E. coli* recombinants exprimant les gènes du groupe B.

Nous avons ensuite confirmé la production par *E. coli* des protéines d'intérêt par SDS-PAGE. Les extraits protéiques ont été préparés à partir des différentes souches recombinantes de *E. coli* en condition induite et non induite (témoin négatif). Les profils SDS-PAGE de ces extraits montrent que chaque extrait contient la ou les bandes protéiques supplémentaires (par rapport au témoin) à la taille attendue (Figure 60). Nos conditions expérimentales ont donc pu être utilisées pour produire les protéines d'intérêt pour ensuite valider (ou pas) leur activité enzymatique vis-à-vis des flavan-3-ols.

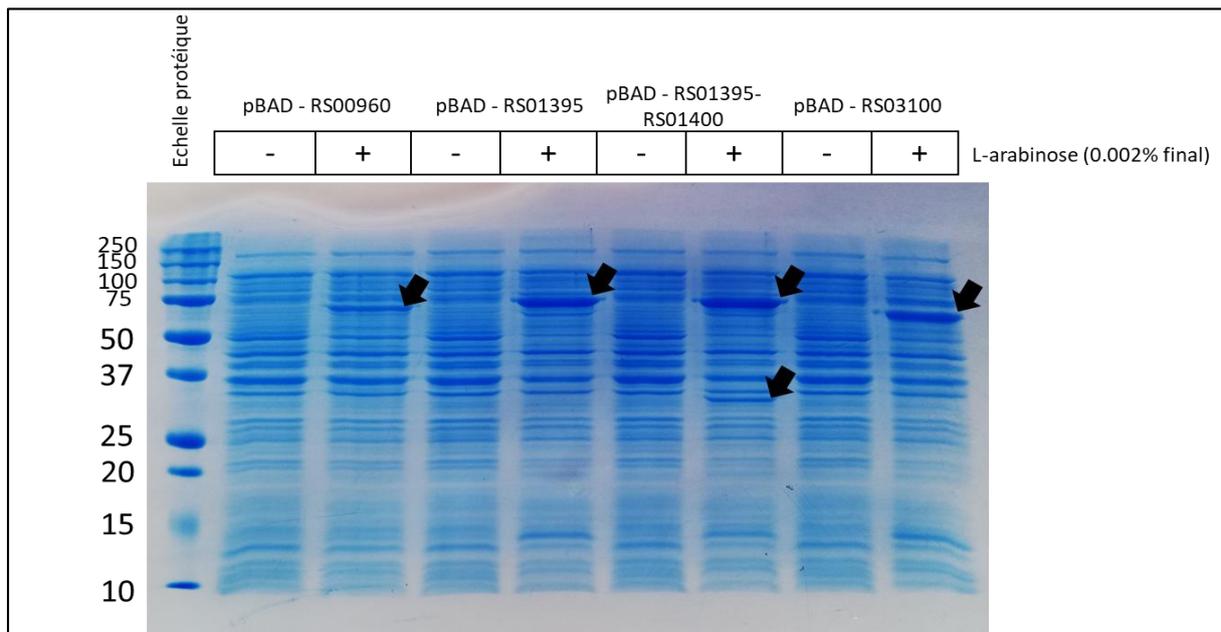


Figure 60. Analyse SDS-PAGE des protéines cellulaires des souches recombinantes de *E. coli* avec ou sans induction par le L-arabinose. Les souches hébergeant les constructions plasmidiques ont été cultivées en absence (-) ou en présence (+) de l'inducteur L-arabinose (0,002 % final). L'échelle protéique est en kilodalton (kDa). Les masses moléculaires théoriques des protéines attendues sont de 59,5 kDa pour *E. coli* (pBAD-RS00960), 64.1 kDa pour *E. coli* (pBAD-RS01395), 64.1 kDa + 32,1 kDa pour *E. coli* (pBAD- RS01395-RS01400) et 61.8 kDa pour *E. coli* (pBAD-RS03100). Les flèches indiquent la présence de bandes protéiques à la taille attendue et non détectées dans la condition non induite.

3.2.1. Activité enzymatique des protéines extraites des *E. coli* recombinantes sur différents flavan-3-ols

L'activité enzymatique des quatre souches recombinantes de *E. coli* (voir ci-dessus) a tout d'abord été testée sur trois monomères de flavan-3-ols, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine (monomères utilisés dans l'expérience de transcriptomique), et la (-)-épigallocatechine (Figure 61a). Ces trois molécules diffèrent de par l'orientation du carbone C3 et de la présence ou l'absence d'un groupement OH en C5'. L'activité enzymatique correspondant à la conversion des trois flavan-3-ols précurseurs en différents métabolites a été mise en évidence par HPLC-DAD (cf. Matériel et Méthodes). Les résultats montrent tout d'abord qu'avec les protéines de la souche portant le plasmide pBAD (vide) (témoin négatif), on note une légère diminution de la concentration des précurseurs dans le milieu sans apparition de métabolites (Figure 61b). Les résultats montrent que les souches possédant les plasmides pBAD-RS00960 et pBAD-RS03100 sont capables de dégrader la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et la (-)-épigallocatechine pour produire la forme ouverte au niveau du cycle C *i.e.* dérivés dihydroxyphényl propan-2-ols (Figure 61c, e). Le métabolite EGC-A n'a pas encore pu être identifié par LC-ESI-MS/MS. La souche portant le plasmide pBAD-RS01395 ne présente aucune activité enzymatique sur les trois substrats (Figure 61d). En revanche, la souche hébergeant le plasmide pBAD-RS01395-1400, qui produit les deux protéines codées par l'opéron Elen_RS01395/Elen_RS01400, a une activité enzymatique sur les trois monomères (Figure 61f).

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

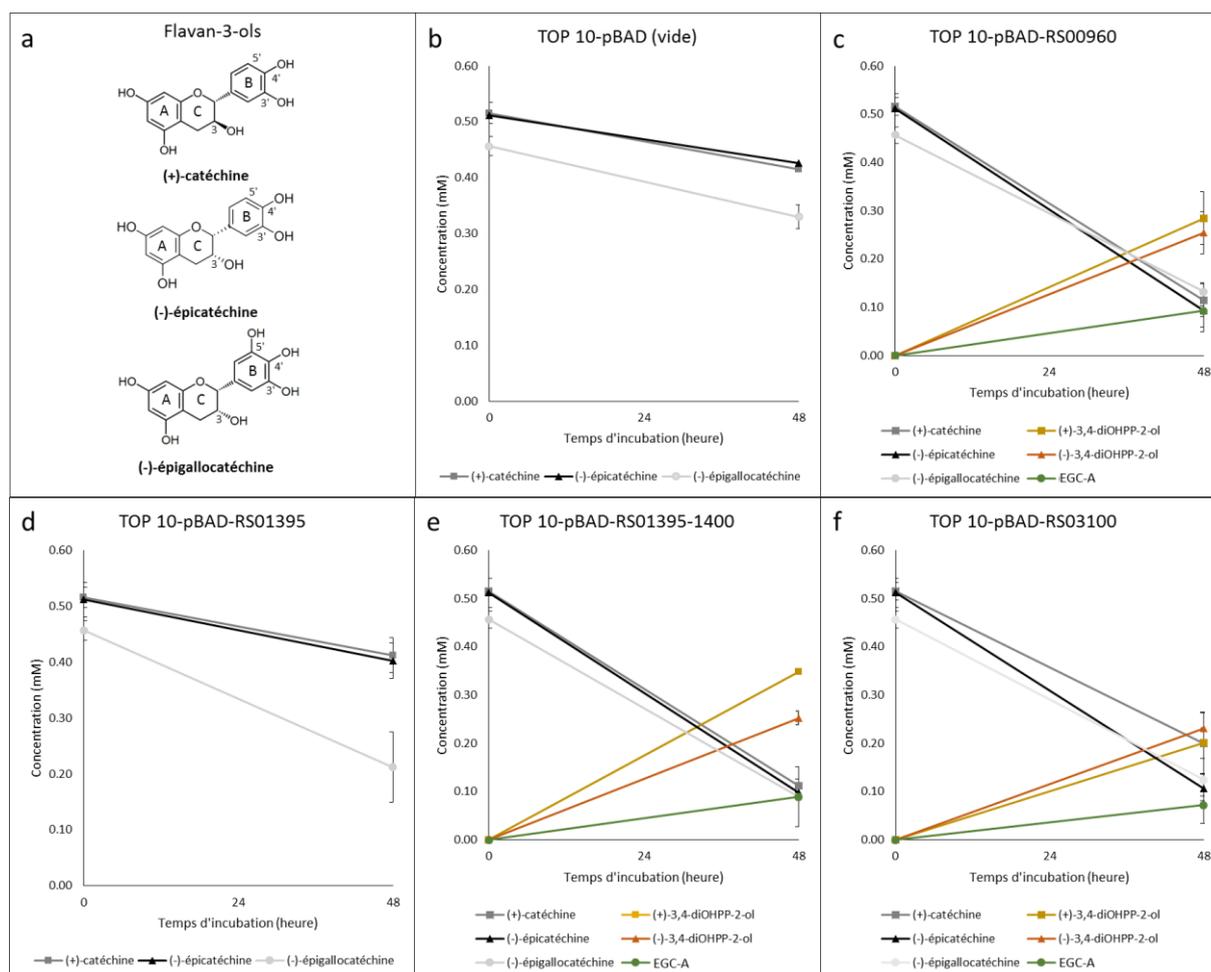


Figure 61. Dégradation des monomères de flavan-3-ols en présence des extraits protéiques obtenus à partir des *E. coli* exprimant les gènes du groupe B. a. Structure chimique des flavan-3-ols testés. b-f. Suivi de la dégradation de la (+)-catéchine (carré gris), (-)-épicatéchine (triangle noir) et (-)-épigallocatechine (rond gris clair) et de l'apparition de leurs métabolites respectifs (+)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol (carré jaune, (+)-3',4'-diOHP-2-ol), (-)-1-(3',4'-dihydroxyphényl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphényl)propan-2-ol (triangle orange, (-)-3',4'-diOHP-2-ol) et le métabolite de la (-)-épigallocatechine (rond vert, EGC-A) par HPLC-DAD à t = 48 h. Chaque point représente la moyenne (\pm écart-type) de 3 analyses réalisées en triplicat biologique.

Ensuite, pour tester l'importance du carbone C3 libre sur l'activité enzymatique, nous avons testés les deux molécules (-)-épicatéchine-3-O-gallate et (-)-épigallocatechine-3-O-gallate (Figure 62a). Les résultats montrent que l'ajout du résidu gallate inhibe toute activité enzymatique sur la (-)-épicatéchine et la (-)-épigallocatechine (Figure 62) puisqu'aucun métabolite n'est formé et que la concentration des précurseurs diminue aussi bien dans la condition témoin (pBAD vide, Figure 62b) que dans les conditions testées (pBAD hébergeant les gènes d'intérêt, Figure 62c-f).

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

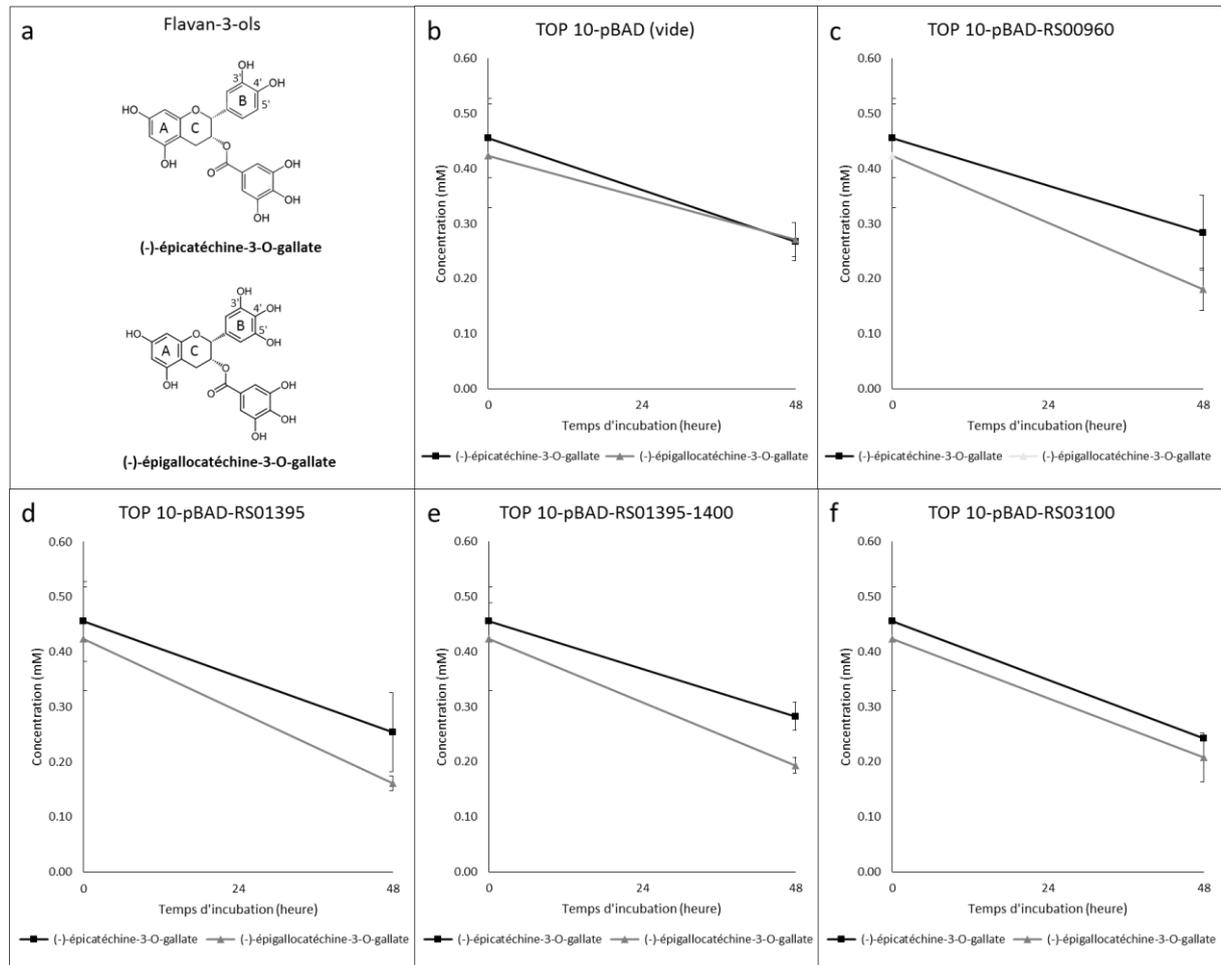


Figure 62. Dégradation des monomères gallatés de flavan-3-ols en présence des extraits protéiques obtenus à partir des *E. coli* exprimant les gènes du groupe B. a. Structure chimique des flavan-3-ols testés. b-f. Suivi de la dégradation de la (-)-épicatéchine-3-O-gallate (carré noir) et (-)-épigallocatechine-3-O-gallate (rond gris) par HPLC-DAD à t = 48 heures. Le profil de dégradation des monomères gallatés est similaire entre le témoin négatif sans bactéries et les souches *E. coli* transformées. Chaque point représente la moyenne (\pm écart-type) de 3 analyses réalisées en triplicat biologique.

Enfin, nous avons testé la capacité enzymatique des protéines d'intérêt sur des molécules de flavan-3-ols plus complexes, telles que le dimère et le trimère de procyanidines de type B (Figure 63a). Aucune des souches exprimant les enzymes d'intérêts n'a montré de capacité à dégrader ces deux flavan-3-ols (Figure 63b-f). Le fait de ne retrouver aucune activité enzymatique avec la souche *E. coli* (pBAD-RS01395-1400) est surprenant car les gènes de cet opéron étaient induits chez *E. lenta* en présence du PCB-2.

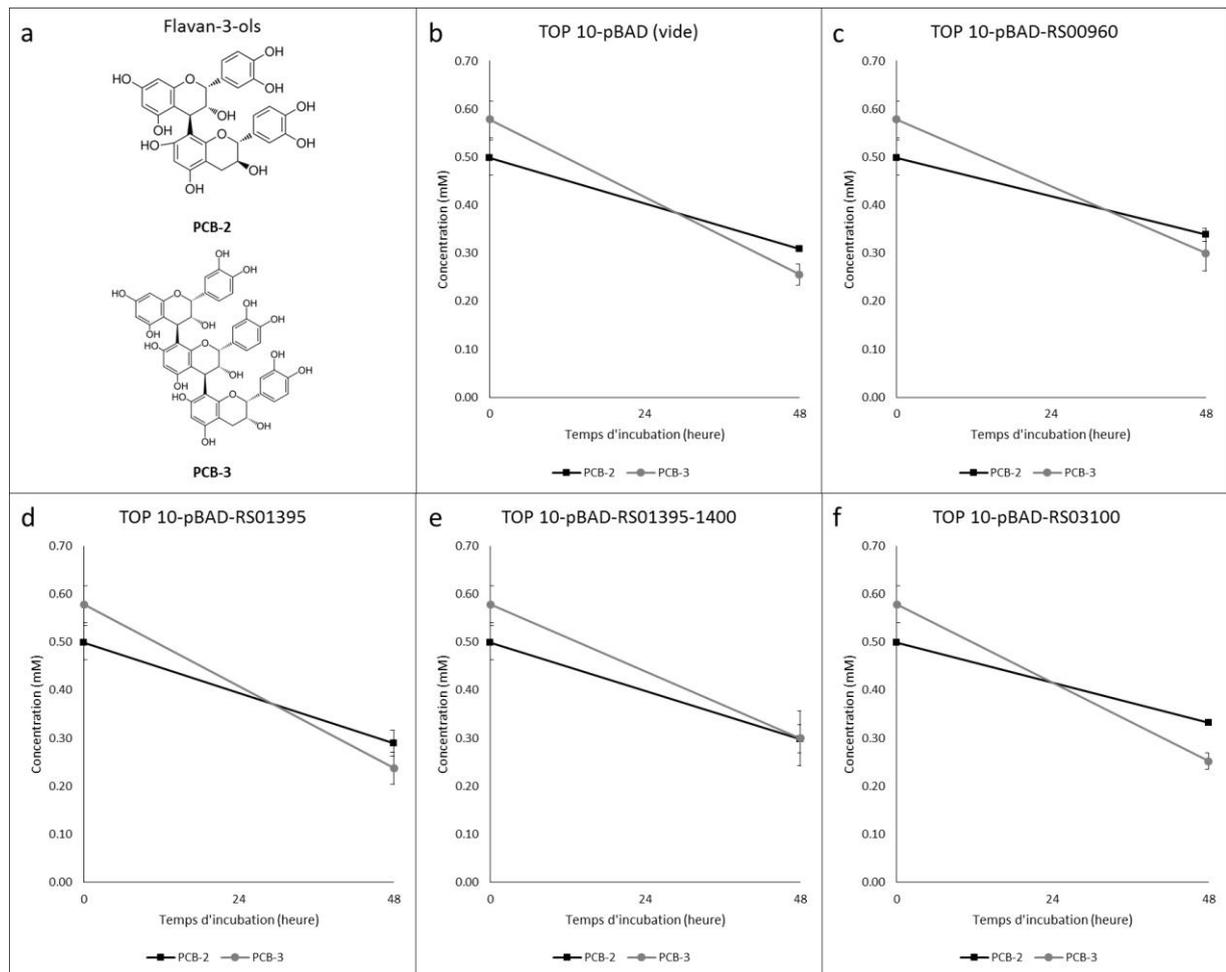


Figure 63. Dégradation des procyanidines de type B en présence des extraits protéiques obtenus à partir des *E. coli* exprimant les gènes du groupe B. a. Structure chimique des flavan-3-ols dimère (PCB-2) et trimère (PCB-3). b-f. Suivi de la dégradation du dimère (carré noir) et trimère (rond gris) PCB par HPLC-DAD à t = 48 heures. Le profil de dégradation des procyanidines est similaire entre le témoin négatif sans bactéries et les souches *E. coli* transformées. Chaque point représente la moyenne (\pm écart-type) de 3 analyses réalisées en triplicat biologique.

3.3. Rôle de l'opéron ELEN_RS01395-1400 dans l'activité de dégradation du dimère PCB-2

Les données de transcriptomique ont montré que les gènes Elen_RS01395 et Elen_RS01400 étaient fortement induits en présence du dimère de procyanidines de type B (PCB-2). Nous venons de voir qu'aucune activité enzymatique n'était observée sur le dimère et trimère quand ces deux gènes étaient co-exprimés chez *E. coli* alors qu'une activité enzymatique était observée sur les trois monomères ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine et (-)-épigallocatechine) de flavan-3-ols. Notre hypothèse est que les protéines codées par ces deux gènes jouent un rôle dans la dégradation des oligomères mais que dans les conditions testées avec *E. coli*, il manque d'autres facteurs codés par le génome de *E. lenta* qui sont nécessaires à l'expression de l'activité enzymatique. Pour mettre en évidence de façon indirecte le rôle de ces deux gènes dans la métabolisation des procyanidines, nous avons utilisé une autre stratégie qui a consisté à comparer l'activité enzymatique de souches hébergeant ou pas cet opéron dans leur génome. En effet, nous avons identifié deux souches de *E. lenta* disponibles dans la collection DSMz et

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

ne possédant pas cet opéron DSM 110914 et DSM110915. Ces deux souches ont été comparées à une souche témoin DSM 110913 ayant cet opéron (Figure 64.a) pour leur capacité à dégrader le dimère PCB-2. Comme le montre la Figure 64.c, en présence de l'opéron chez la souche *E. lenta* DSM 110913, il y a dégradation de PCB-2 avec la formation du métabolite PCB-2A (Figure 64c). En absence de cet opéron chez les deux autres souches, nous ne retrouvons pas d'activité de dégradation (Figure 64d-e). Donc l'activité de dégradation de PCB-2 serait bien portée par cet opéron bien que l'expression hétérologue chez *E. coli* n'ait pas permis de le mettre en évidence.

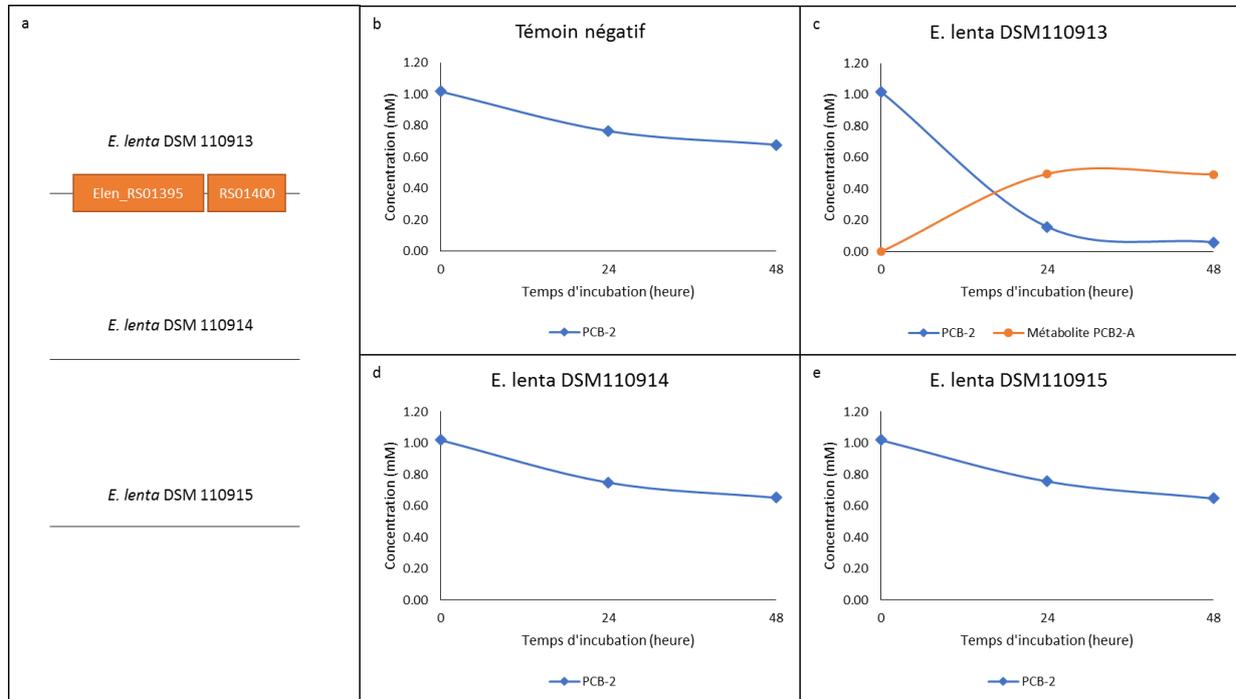


Figure 64. Dégradation du dimère PCB-2 par différentes souches de *E. lenta* portant ou non l'opéron *Elen_RS01395-RS01400*. a. Trois souches *E. lenta* utilisées, avec la souche DSM 110913 possédant l'opéron *Elen_RS01395-RS01400* et les souches DSM 110914 et 110915 ne le possédant pas. b-e. Suivi de la dégradation du dimère PCB-2 par HPLC-DAD aux temps 24 et 48 heures. b,d-e. Le témoin négatif sans bactéries et les souches *E. lenta* DSM 110914 et 110915 présentent le même profil. c. Après 24 heures de culture avec la souche *E. lenta* DSM 110913, il y a apparition du métabolite PCB2-A et diminution de la concentration en PCB-2 et stabilisation à 48 heures. Expérience réalisée en triplicat biologique.

3.4. Recherche des gènes d'intérêts dans les génomes et métagénomés intestinaux humains**3.4.1. Gènes du groupe A**

Nous avons analysé la prévalence des deux opérons du groupe A et le degré de conservation des protéines codées par ces deux opérons chez 52 souches de l'espèce *E. lenta*, dont quatre de notre collection de souches. On constate que les opérons sont présents dans les génomes de certaines souches et pas d'autres, et que les protéines traduites de ces gènes sont très conservées au sein de l'espèce *E. lenta* (99 à 100 % d'identité en acides aminés) (Tableau 27a), avec seulement quelques souches où la protéine codée par le troisième gène (Hypothetical protéin) est conservée à 90-93 %. On constate finalement que l'opéron induit par la (-)-épicatéchine est présent chez 40 % des souches alors que celui induit par la (+)-catéchine n'est retrouvé que dans 23 % des souches (Tableau 27b). Parmi les souches de notre collection, les souches *E. lenta* O₁-65 et P₁-71 possèdent les deux opérons, alors que les souches P₃-J7.5 et T₁Z1 en sont dépourvues (Tableau 27). On observe également que l'opéron induit en présence de la (+)-catéchine n'est jamais retrouvé seul ; sa présence est toujours liée à celle de l'opéron ciblant la (-)-épicatéchine (Tableau 27a).

Tableau 27. Prévalence et conservation des gènes du groupe A à travers les souches de l'espèce bactérienne *E. lenta*. **a.** Analyse de la présence des deux opérons et du taux de conservation (% identité en acide aminées) des protéines codées par ces six gènes chez l'espèce *Eggerthella lenta* (N=52). La protéine est considérée comme conservée si elle présente plus de 70 % d'identité en acides aminés avec les séquences protéiques (codées par les six gènes) de *E. lenta* DSM 2243 (analyses tblastN). Les carrés blancs indiquent que les deux clusters de gènes sont absents dans les génomes des souches de *E. lenta*. En gras et italique, souches de notre collection. **b.** Matrice de comptage du nombre de souches possédant les deux opérons ou ne possédant pas d'opéron.

a		ID_gène ID_protéine	ELEN_RS02535 WP_009607964.1	ELEN_RS02540 WP_009608072.1	ELEN_RS02545 WP_015760017.1	ELEN_RS02575 WP_009608048.1	ELEN_RS02580 WP_009607966.1	ELEN_RS02585 WP_041691699.1
Espèces	Souches	Opéron (+)- catéchine			Opéron (-)- épicatéchine			
<i>Eggerthella lenta</i>	DSM 2243*	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	SV_Bg7063_mod2							
	MGYG-HGUT-02544	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	
	C592				1.00	1.00	0.99	
	A2	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.98	
	CC8/2 BHI2	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	
	DSM 110913							
	19C							
	22C							
	RC4/6F							
	14A	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	
	32-6-I 6 NA							
	CC8/6 D5 4							
	AB12 #2					1.00	1.00	0.99
	11C	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.91	
	16A	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00	0.99	
	DSM 110914							
	DSM 11863					1.00	1.00	0.97
	W1 BHI 6							
	MR1 #12					1.00	1.00	0.96
	DSM 11767							
	DSM 110915							
	28B	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	
	FAA1-1-60AUCSF	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	
	DSM15644							
	SECO-MT75m2							
	Valencia							
	MRI-F 36							
	ResAG-88					1.00	0.99	0.92
	ResAG-49							
	MRI-F 37							
	ResAG-145					1.00	0.99	0.91
	ResAG-121					1.00	0.99	0.90
	MRI-F 40							
	TF05-28B-4							
	D33t1_170424_F11							
	J1101437_171009_A1					1.00	1.00	0.99
	1001302B_160321_A1					1.00	0.99	0.93
	1001095H_141210_C9							
	1001287H_170206_A6							
	1001713B170221_170320_D6							
	BSD2780120875_150330_C12							
	1001311H_170123_F12	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	
	BSD2780120874_150323_H10							
	1001136B_160425_H2							
D33t1_170424_B8								
1001713B170221_170320_C4								
1001095IJ_161003_H5								
O1-65	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
P1-71	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
P3-J7.5								
T1-Z1								

b

*Référence Identité en acide aminé (%) >95 % >90%

Eggerthella lenta (N=52)	Statut	Présence des opérons
	Aucun	60%
Opéron (+)-catéchine	23%	
Opéron (-)-épicatéchine	40%	

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Après avoir étudié la prévalence des gènes du groupe A chez les *Eggerthella lenta*, nous avons voulu étudier la prévalence de ces gènes à partir de catalogues de gènes issus de métagénomiques de microbiotes digestifs humains. Nous avons choisi de rechercher les enzymes « molybdotéridoxydoreductases » traduites des deux gènes Elen_RS02535 et Elen_RS02575 respectivement induits par la catéchine et l'épicatéchine. Cette recherche a été effectuée grâce à la plateforme en ligne MetaQuery (Nayfach et al, 2015) qui regroupe les métagénomiques intestinales de 1962 individus issus de plusieurs études. Pour cette recherche, nous avons sélectionné ces deux gènes car ils permettent de discriminer les deux opérons du fait que les deux enzymes traduites de ces gènes ne présentent que 53 % d'identité en acides aminés (Tableau 23) ; De plus, la présence de ce gène suffit pour déduire la présence de l'opéron (Tableau 27). Par cette analyse (identité protéique >95 %, couverture >70 %), nous avons pu mettre en évidence la faible prévalence de ces deux opérons dans la population humaine, avec 56 % des individus qui ne possèdent aucun des deux opérons, 20 % des individus qui possèdent les deux opérons et 25 % des individus qui ont soit l'un, soit l'autre (Figure 65).

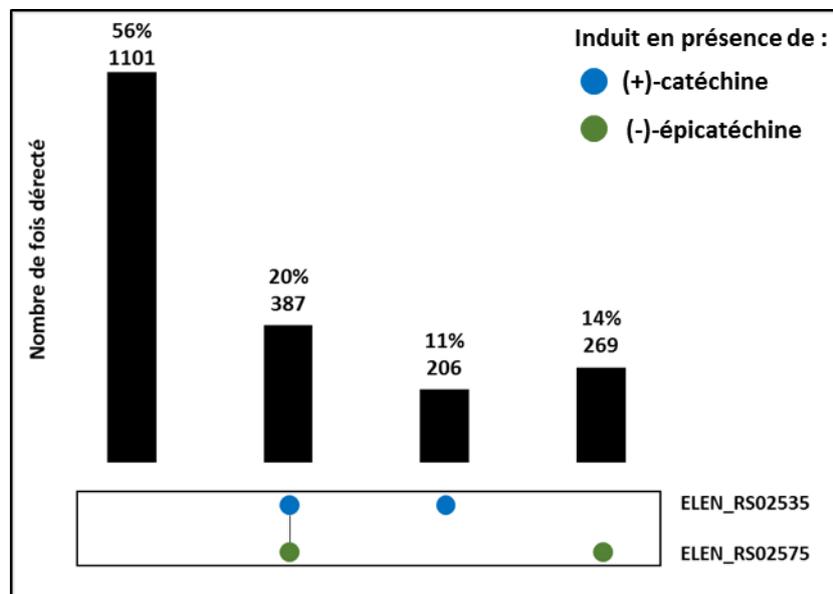


Figure 65. Prévalence des gènes de dégradation des flavan-3-ols du groupe A dans les métagénomiques intestinales humaines. Recherche des deux gènes d'intérêts dans les métagénomiques de 1962 individus via la plateforme MetaQuery (Nayfach et al. 2015). Les ronds de couleur indiquent la présence du gène, avec en bleu le gène ELEN_RS02535 (induit par la (+)-catéchine) et en vert le gène ELEN_RS02575 (induit par la (-)-épicatéchine). Sur les 1962 individus, 56 % ne présentent aucun des deux gènes d'intérêts, alors que 20 % présente l'association des deux. Les 25 % restant sont composés de l'un ou l'autre.

En conclusion, les deux opérons mis en évidence dans cette étude issue des gènes du groupe A sont fortement conservés (90-100 % d'identité protéique) à travers l'espèce *E. lenta*. L'opéron « catéchine » et l'opéron « épicatéchine » sont prévalents dans respectivement 23 et 40 % des 52 souches isolées de *E. lenta* dont les génomes ont été séquencés. Ils sont absents chez 56 % des individus et quand ils sont présents (44 % des individus), les individus hébergent l'un ou l'autre ou les deux opérons.

3.4.2. Gènes du groupe B

La présence des cinq gènes d'intérêt du groupe B a été analysée chez les bactéries de la famille des *Eggerthellaceae*, et plus particulièrement des genres *Adlercreutzia*, *Eggerthella*, *Gordonibacter* et *Slackia* décrits comme étant impliqués dans la métabolisation des flavan-3-ols (cf. 4.1). Nous avons utilisé la séquence protéique traduite des cinq gènes de *E. lenta* DSM 2243 pour rechercher des protéines homologues chez les *Eggerthellaceae* dont le génome était disponible dans les bases de données. Nous avons considéré que les protéines étaient codées par ces génomes en prenant comme seuil un pourcentage d'identité en acides aminés supérieur à 50 %.

Tableau 28. Prévalence et conservation des gènes du groupe B à travers les *Eggerthellaceae*.

a. Analyse de la présence des gènes du groupe B et du taux de conservation (% identité en acide aminées) en comparant les séquences protéiques des cinq gènes candidats de différentes souches et espèces d'*Eggerthella* (N=55) avec la souche type *E. lenta* DSM 2243 utilisée comme référence par tblastN (NCBI). Absence de la protéine si le taux de conservation <50 % (carré blanc). En gras et italique, souches de notre collection. **b.** Pourcentage de souches ayant plus de 80, 90 ou 95 % d'identité en acide aminé selon que les souches appartiennent à l'espèce *E. lenta*, ou à d'autres espèces du genre *Eggerthella* (non *lenta*).

a		ID_gène ID_protéine	ELEN_RS00960	ELEN_RS06940	ELEN_RS01395	ELEN_RS01400	ELEN_RS03100
			WP_015759863.1	WP_009304480.1	WP_009305851.1	WP_009305853.1	WP_009305152.1
Espèces	Souches						
<i>Eggerthella lenta</i>	DSM 2243*	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	SV_Bg7063_mod2	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	MGYG-HGUT-02544	1.00		1.00	1.00	1.00	
	C592	0.99		1.00	1.00	1.00	
	A2	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	CC8/2 BHI2	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	DSM 110913		1.00	1.00	1.00	1.00	
	19C	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	22C	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	RC4/6F	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	
	14A	1.00		1.00	1.00	1.00	
	32-6-16 NA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	CC8/6 D5 4	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	AB12#2	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	11C	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	16A	1.00		1.00	1.00	1.00	
	DSM 110914	0.99	1.00			1.00	
	DSM 11863	1.00	0.64	1.00	1.00	1.00	
	W1 BHI 6	0.98	1.00	1.00	1.00	0.99	
	MRI#12	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	DSM 11767	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	DSM 110915		1.00			1.00	
	28B	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	FAA1-1-60AUCSF	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	DSM15644	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	SECO-MT75m2	1.00	0.64			1.00	
	Valencia	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	MRI-F 36	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	ResAG-88	0.99		1.00	1.00	1.00	
	MRI-F 37	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	ResAG-145	0.99		1.00	1.00	1.00	
	ResAG-121	0.99		1.00	1.00	1.00	
	MRI-F 40	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	TF05-26B-4	0.99		1.00	1.00	1.00	
	D33r1_170424_F11	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	
	J1101437_171009_A1	0.99	0.64	1.00	1.00	1.00	
	1001302B_160321_A1	0.99				1.00	
	1001096H_141210_C9	0.99	1.00			0.99	
	1001287H_170206_A6	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	1001713B170221_170320_D6	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	BSD2780120875_150330_C12	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	
	1001311H_170123_F12	0.99	1.00			1.00	
	BSD2780120874_150323_H10	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	1001136B_160425_H2	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99	
	D33r1_170424_B8	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
1001096J_161003_H5	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00		
Q1-65	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99		
P1-71	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
P3-J7.5	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99		
T1-Z1	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99		
<i>Eggerthella sinensis</i>	DSM 16107	0.89	0.49	0.94	0.82	0.92	
<i>Eggerthella timonensis</i>	Marseille-P3135		0.52	0.96	0.85	0.93	
<i>Eggerthella sp.</i>	HF-1101	0.91	0.52	0.96	0.87	0.94	
	HF-4214	0.92	0.53			0.94	
	YY7918			0.89	0.67	0.69	

*Référence

Identité en acide aminé (%)	
>95 %	
>90%	
>80%	
>60%	
≥50%	

b	Présence des gènes						
		>95%	>90%	>80%	>60%	≥50%	
<i>Eggerthella lenta</i> (N=50)	>95%	96%	76%	88%	88%	100%	
	>90%	96%	76%	88%	88%	100%	
	>80%	96%	76%	88%	88%	100%	
<i>Eggerthella non lenta</i> (N=5)	>95%	0%	0%	40%	0%	0%	
	>90%	40%	0%	60%	0%	80%	
	>80%	60%	0%	80%	60%	80%	

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Cette analyse montre que les cinq gènes sont fortement présents chez *Eggerthella lenta* (N = 50) (Tableau 28a). Les gènes prévalents chez cette espèce sont le gène Elen_RS03100 retrouvé chez toutes les souches et le gène Elen_RS00960 présent chez 96 % des souches (Tableau 28b). On retrouve ensuite les gènes Elen_RS01395 et Elen_RS01400 qui sont retrouvés dans 87 % des souches de *E. lenta*. On observe que quand l'un de ces deux gènes est absent, l'autre l'est également (Tableau 28a). Comme décrit plus haut, ces deux gènes sont organisés en opéron. Enfin, le gène Elen_RS06940 est le moins prévalent puisqu'il est présent dans seulement 74 % des souches de *E. lenta*. Il faut noter que ce dernier gène était le moins induit des cinq en présence de flavan-3-ols (Tableau 24).

En plus d'une importante prévalence de ces gènes chez les souches de l'espèce *E. lenta*, on note que les protéines codées par chacun de ces gènes sont très conservées avec un pourcentage d'identité compris entre 99 et 100 % (Tableau 28a). Enfin, les souches représentatives de notre collection de *E. lenta* possèdent l'ensemble des gènes étudiés avec également une très forte conservation de la séquence protéique (99 à 100 % d'identité) (Tableau 28a).

Ces gènes sont également retrouvés chez d'autres *Eggerthella* telles que *E. sinensis* DSM 16107, *E. timonensis* Marseille-P135 et deux *Eggerthella* sp. (non affiliées au niveau de l'espèce) HF-1101 et HF-4212, mais présentent une certaine divergence dans leurs séquences protéiques (Tableau 28a). En effet, le pourcentage d'identité entre les protéines de *E. lenta* (souche type DSM 2243) et les protéines de ces autres espèces est autour de 90 % pour quatre des cinq protéines et d'environ 50 % pour la protéine codée par le gène Elen_RS06940 (Tableau 28a). On observe que la souche *Eggerthella* sp. YY7918 ne possède pas de gènes et protéines homologues. Cette divergence s'expliquerait par une mauvaise affiliation taxonomique de cette souche qui n'appartiendrait pas au genre *Eggerthella*, comme on peut le voir sur l'arbre phylogénétique basé sur la séquence de l'ADNr 16S où cette souche ne se regroupe pas avec les autres *Eggerthella* (Figure 66).

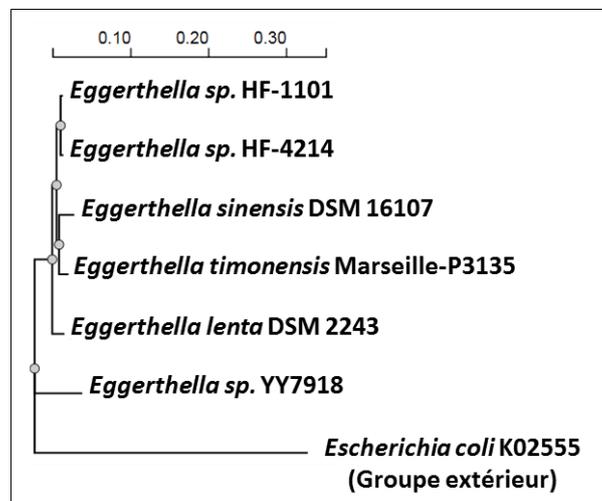


Figure 66. Arbre phylogénétique de quelques souches affiliées au genre *Eggerthella*. Généré à partir des séquences d'ADN ribosomique 16S. La souche *Escherichia coli* K02555 a été utilisée comme groupe extérieur aux *Eggerthella*.

Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Pour finir, la recherche des cinq gènes du groupe B chez d'autres genres bactériens qu'*Eggerthella* appartenant à la famille des *Eggerthellaceae* indique que seuls les gènes Elen_RS03100, Elen_RS00960 et Elen_RS01395 seraient présents chez 12 souches du genre *Adlercreutzia*, *Paraeggerthella*, *Denitrobacterium*, *Gordonibacter*, et *Slackia* sur un total de 53 souches testées appartenant à 21 espèces et six genres différents (Tableau 29). Les séquences protéiques sont néanmoins très divergentes de celles de *E. lenta* (50 à 84 % d'identité selon les souches et les protéines candidates) (Tableau 29).

En conclusion, la présence de ces gènes n'a pas pu être mise en évidence dans d'autres espèces que celles de la famille des *Eggerthellaceae*. Ces gènes sont donc uniques à cette famille de bactéries et principalement au genre *Eggerthella*.

Tableau 29. Prévalence et conservation des gènes du groupe B à travers les souches, espèces et genre bactériens de la famille des *Eggerthellaceae*. Analyse de la présence des gènes du groupe B et du taux de conservation (% identité en acide aminées) en comparant les séquences protéiques des cinq gènes candidats de différentes espèces de la famille des *Eggerthellaceae* (N=53) avec la souche type *E. lenta* DSM 2243 utilisée comme référence par tblastN (NCBI). Absence de la protéine si le taux de conservation <50 % (carré blanc).

Espèces	Souches	ID_gène ID_protéine				
		ELEN_RS00960 WP_015759863.1	ELEN_RS06940 WP_009304480.1	ELEN_RS01395 WP_009305851.1	ELEN_RS01400 WP_009305853.1	ELEN_RS03100 WP_009305152.1
<i>Adlercreutzia caecimuris</i>	1xD42-21	0.76				0.81
<i>Adlercreutzia mucosicola</i>	NM66_B29					0.83
<i>Adlercreutzia muris</i>	D2-1X-25	0.76				
	DSM 29508		0.57			
<i>Denitrobacterium detoxificans</i>	NPOH1					0.71
<i>Gordonibacter sp.</i>	An230	0.84	0.50			
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i>	RC2/2 A					0.83
<i>Slackia equolifaciens</i>	DSM 24851		0.51			
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	OB21 GAM31	0.60				
<i>Slackia piriformis</i>	MGYG-HGUT-01409		0.50			
	YIT 12062		0.50			
<i>Slackia sp.</i>	CM382			0.72		0.78
<i>Adlercreutzia sp.</i>	N = 5					
<i>Adlercreutzia caecicola</i>	N = 2					
<i>Adlercreutzia caecimuris</i>	NM80_B27					
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	N = 4					
<i>Adlercreutzia equolifaciens subsp. celatus</i>	N = 4					
<i>Gordonibacter pamelaee</i>	N = 3					
<i>Gordonibacter sp.</i>	N = 2					
<i>Gordonibacter urolithinifaciens</i>	N = 9					
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i>	DSM 16106					
<i>Slackia sp.</i>	N = 3					
<i>Slackia faecicanis</i>	DSM 17537					
<i>Slackia heliotrinireducens</i>	DSM 20476					
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	DSM 22006					

Identité en acide aminé (%)



Résultats

Chapitre 3 : Identification des gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols

Après avoir étudié la prévalence de ces gènes chez les *Eggerthellaceae*, nous avons voulu étudier la prévalence de ces gènes dans le microbiote intestinal humain. Cette étude s'est faite en recherchant (identité protéique >95 %, couverture >70 %) les trois gènes Elen_RS00960, Elen_1395 et Elen_3100 dans des métagénomés intestinal humain de 1962 individus disponibles par le biais de la plateforme en ligne MetaQuery (Nayfach et al, 2015). Par cette analyse, nous avons pu mettre en évidence la forte prévalence de ces gènes dans la population humaine, avec seulement 27 % des individus qui ne présentent aucun des trois gènes, alors que 73 % possèdent soit un, soit deux, soit les trois gènes (Figure 67). On a pu également observer que la présence des trois gènes chez un même individu est la situation la plus fréquemment retrouvée.

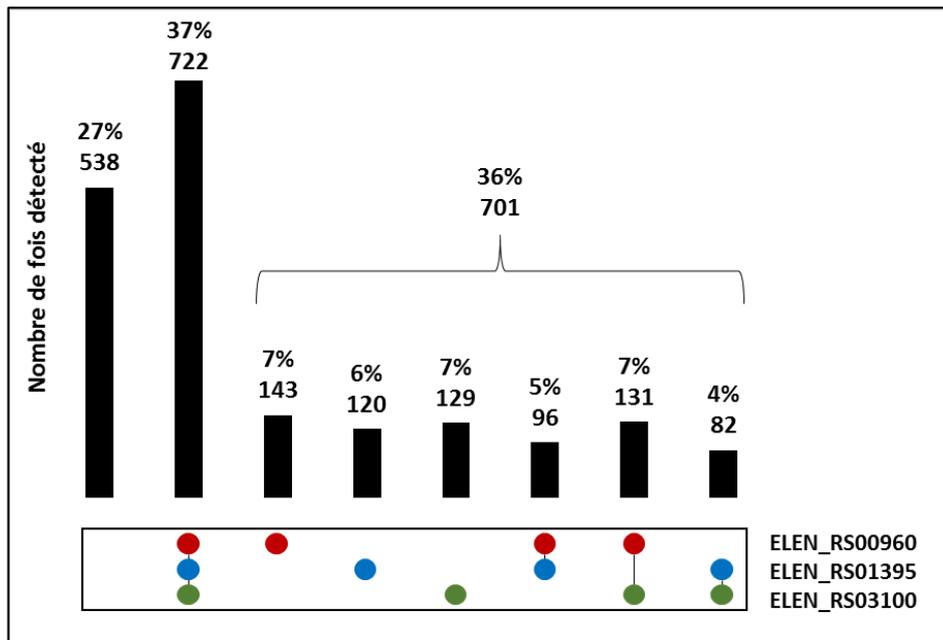


Figure 67. Prévalence des gènes de dégradation des flavan-3-ols du groupe B dans les métagénomés intestinaux humains. Recherche des trois gènes d'intérêts dans les métagénomés de 1962 individus via la plateforme MetaQuery (Nayfach et al, 2015). Les ronds de couleur indiquent la présence du gène, avec en rouge le gène ELEN_RS00960, en bleu le gène ELEN_RS01395 et en vert le gène ELEN_RS03100. Sur les 1962 individus, 27 % ne présentent aucun des trois gènes d'intérêts, alors que 37 % présentent l'association des trois. Les 36 % restant sont composés des différentes associations des gènes, soit seuls, soit en duo.

En conclusion, les gènes du groupe B mis en évidence dans cette étude sont fortement conservés (90-100 % d'identité protéique) et prévalents chez l'espèce *E. lenta* puisqu'on les trouve dans la majorité des souches *i.e.* 87 % des souches pour l'opéron [Elen_RS01395/Elen_RS01400], 96 % des souches pour le gène Elen_RS00960 et 100 % des souches pour le gène Elen_RS03100. Ils sont également spécifiques de l'espèce *E. lenta* (et semblent avoir des homologues dans d'autres espèces du genre *Eggerthella*). Ils sont absents chez environ un tiers des individus et quand ils sont présents (73 % des individus), la moitié seulement des individus hébergent l'ensemble de ces gènes.

Éléments à retenir

- ❖ L'analyse transcriptomique a mis en évidence chez la souche de référence *E. lenta* DSM 2243 trois groupes de gènes (A, B et C) induits en présence des monomères ((+)-catéchine et (-)-épicatéchine) et du dimère de procyanidines de type B (PCB-2). Nous avons surtout étudié les gènes des groupes A et B.

GROUPE A

- ❖ Ce groupe est constitué de deux opérons de trois gènes respectivement induits par la (+)-catéchine et par la (-)-épicatéchine. La divergence entre ces deux opérons est principalement portée par l'enzyme (molybdoptéridin-dépendant oxidoreductase) codée par le premier gène de l'opéron.
- ❖ L'opéron induit par la (+)-catéchine présente 100 % d'identité protéique avec les protéines de l'opéron *cadh* (catechin dehydroxylase) décrit chez une autre souche (A2) de *E. lenta* (Maini Rekdal et al. 2020). Par analogie, nous appellerons nos deux opérons *cadh* et *ecadh* (pour epicatechin dehydroxylase).
- ❖ Les protéines codées par les opérons *cadh* et *ecadh* sont très conservées au sein de l'espèce *E. lenta*. En termes de prévalence, ils ne sont respectivement présents que chez 23 et 40 % des souches de l'espèce *E. lenta* et ne sont respectivement retrouvés que dans 31 et 34 % des métagénomés intestinaux humains.

GROUPE B

- ❖ Ce groupe est constitué de cinq gènes fortement induits en présence d'un ou deux des trois flavan-3-ols étudiés ; quatre gènes codent des protéines de la famille des FAD oxydo-réductases qui présentent un faible pourcentage d'identité entre elles (~30 %). Deux gènes, dont un code pour une « hypothetical protein », sont organisés en opéron.
 - ❖ L'expression hétérologue des gènes Elen_RS03100, Elen_RS00960 et de l'opéron [Elen_RS01395/Elen_RS01400] chez *E. coli* a montré que ces gènes codaient pour des enzymes responsables de l'ouverture du cycle C de trois monomères de flavan-3-ols : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et (-)-épigallocatechine (à confirmer). Cette approche n'a pas permis de mettre en évidence l'ouverture du cycle C sur le dimère PCB-2. Une approche indirecte avec des souches de *E. lenta* hébergeant ou pas l'opéron [Elen_RS01395/Elen_RS01400] a permis de mettre en évidence son implication dans l'ouverture du cycle C de PCB-2.
 - ❖ Ces cinq gènes sont hautement prévalents (76-100 %) et conservés (99-100 %) à travers l'espèce *E. lenta*, mais également chez d'autres espèces du genre *Eggerthella*. Seulement 27 % des métagénomés intestinaux humains ne présentent aucun des trois gènes d'intérêts du groupe B (Elen_RS00960, Elen_RS03100, Elen_RS01395).
 - ❖ La moitié des souches de notre collection portent les deux opérons du groupe A, et la totalité possèdent l'ensemble des gènes du groupe B.
-

Discussion et perspectives

Cette thèse avait pour objectif d'approfondir les connaissances sur la dégradation des monomères et oligomères de flavan-3-ols (sous-classe de polyphénols) par le microbiote intestinal humain.

Les questions auxquelles nous avons voulu répondre :

- Quels sont les micro-organismes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols ?
- Quels sont les métabolites microbiens produits par ces microorganismes ?
- Quels sont les gènes fonctionnels mis en jeu dans ces voies métaboliques ?

Micro-organismes impliqués dans la dégradation des monomères de flavan-3-ol et identification des métabolites

En utilisant une stratégie d'isolement associée à un suivi de la métabolisation du monomère de (+)-catéchine par HPLC-DAD, nous avons pu obtenir 20 isolats de l'espèce bactérienne *Eggerthella lenta* à partir de 4 campagnes d'isollements effectuées à partir des selles (O, P1, P3, T) de trois individus en bonne santé et 2 isolats de l'espèce bactérienne *Flavonifractor plautii* à partir du prélèvement P3. L'analyse préliminaire des génomes de ces isolats a permis d'éliminer les souches clonales ou très proches génétiquement. Nous avons ainsi pu réduire notre collection de 20 à 4 souches de *E. lenta* et de 2 à 1 souche de *F. plautii*. Finalement, notre stratégie d'isolement a permis d'isoler une seule souche de *E. lenta* par prélèvement de selles, dont deux sont issues du même individu. Ces résultats soulignent le caractère laborieux et le rendement faible des isollements de bactéries anaérobies à partir d'un microbiote complexe quand on cible un phénotype métabolique particulier tel que la capacité à dégrader un polyphénol.

Nous avons mis en évidence que les quatre souches de *E. lenta* (nommées O, P1, P3, T d'après leur prélèvement d'origine) étaient capables d'ouvrir le cycle C de la (+)-catéchine et de son stéréoisomère la (-)-épicatéchine, pour former respectivement les métabolites ouverts ((+)-3',4'-diOHPP-2-ol et (-)-3',4'-diOHPP-2-ol) et que la moitié de nos souches (O et P1) était ensuite capable de déshydroxyler le cycle B au niveau du carbone C₄' des deux premiers métabolites pour former deux autres composés phénoliques ((+)-3'-OHPP-2-ol et (-)-3'-OHPP-2-ol) (Figure 68). Les quatre souches de notre collection de *E. lenta* peuvent donc être séparées en deux groupes métabolique selon leur capacité (souches O, P1) ou pas (souches P3, T) à déshydroxyler le cycle B.

Suite aux premières réactions de bioconversion de la (+)-catéchine par *E. lenta*, la souche *F. plautii* est quant-à-elle capable d'ouvrir le cycle A pour former deux métabolites ((+)-3',4'-diOHPVA et (+)-3',4'-diOHPval) à partir du (+)-3',4'-diOHPP-2-ol et deux autres métabolites ((+)-3'-OHPVA et (+)-3'-OHPval) à partir du (+)-3'-OHPP-2-ol (Figure 68). *F. plautii* est également capable de réaliser les mêmes

réactions à partir des métabolites produits par *E. lenta* en présence de la (-)-épicatechine. La structure chimique de tous ces métabolites a été validée par des analyses LC-ESI-MS/MS. En revanche, leur chiralité probablement similaire à celle de leurs précurseurs i.e. (+)-catéchine et (-)-épicatechine mériterait d'être validée par HPLC-DAD en utilisant une colonne énantiosélective, ce qui confirmerait les résultats obtenus par Takagaki et Nanjo (2015a).

L'ensemble de ces résultats (bactéries isolées et métabolites produits) est en adéquation avec ce qui est déjà décrit dans la littérature (Figure 24 ; Figure 25) (Kutschera et al., 2011; Takagaki et Nanjo 2015a; Braune et Blaut, 2016). En effet, *E. lenta* et *F. plautii* font partie des espèces connues pour métaboliser les monomères de flavan-3-ols. Par cette étude, nous confirmons expérimentalement la capacité de déshydroxylation du cycle B de certaines souches de *E. lenta* et pas d'autres, différences suggérées par Maini Rekdal et al. (2020) par des analyses des génomes de 22 souches de *E. lenta* pour la présence ou pas de l'opéron *cadh*. Ils n'ont toutefois pas séparé ces deux groupes métaboliques en deux groupes phylogénétiques distincts.

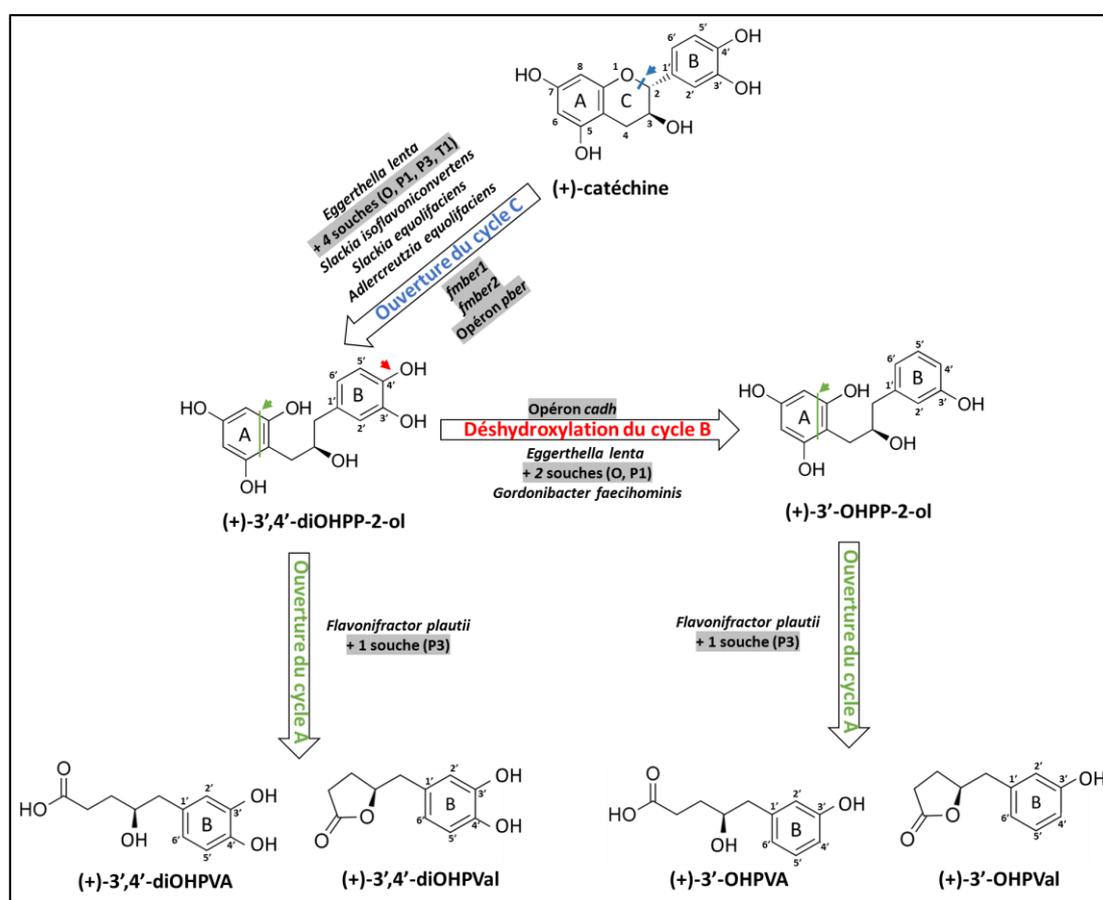


Figure 68. Bilan des espèces et gènes impliqués dans le métabolisme de la (+)-catéchine par des bactéries isolées du microbiote intestinal et décrites dans la littérature (cf. Etude bibliographique 4.1). Les souches *E. lenta* et *F. plautii* isolées dans notre étude, ainsi que les gènes de *E. lenta* codant les enzymes ou complexes enzymatiques impliqués dans les réactions hydrolytiques sont surlignés en gris. *E. lenta* et *F. plautii* réalisent les mêmes réactions à partir de la (-)-épicatechine tout en conservant la chiralité (-) des métabolites. Cette conservation de la chiralité a été montrée par Takagaki et Nanjo (2013).

On peut donc se demander pourquoi nous avons isolé des espèces déjà décrites. Est-ce que cela est lié à la méthodologie d'isolement que nous avons utilisée ? ou est-ce que nos résultats associés à ceux de la littérature reflètent une réalité biologique, c'est-à-dire que ces espèces seraient, avec les espèces du genre *Slackia*, *Adlercreutzia* et *Gordonibacter*, les seules espèces bactériennes cultivables capables de dégrader les flavan-3-ols ?

La stratégie d'isolement que nous avons utilisée était basée sur la stratégie de Kutschera et al. (2011), à l'exception du fait que ces auteurs avaient ajouté un antibiotique (tétracycline) dans leurs milieux de culture pour une raison qui n'est pas précisée dans leur protocole. Sans ajouter d'antibiotique, nous avons isolé les mêmes espèces bactériennes et identifié les mêmes voies métaboliques de dégradation de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine que ces auteurs. Les fortes prévalence et abondance de l'espèce *Eggerthella lenta* dans le microbiote fécal de l'Homme respectivement estimées à 81,6 % par qPCR ciblant *elnmrk1* (gène spécifique de cette espèce) et à 10^7 bactéries/g de selles sèches (Koppel et al. 2018) expliquerait que nous ayons isolé préférentiellement des souches de cette espèce. De plus, l'ajout dans nos milieux de culture de la L-arginine, acide aminé indispensable à la croissance de l'espèce *E. lenta* (Clavel et al. 2014) a aussi pu favoriser la sélection de cette espèce. Enfin, notre stratégie d'isolement basée sur le principe d'enrichissements successifs de suspensions bactériennes capables de dégrader la (+)-catéchine, suivi par la sélection de colonies isolées sur gélose a pu induire des biais. En effet, les micro-organismes à croissance faible, à densité faible, ou ceux actifs uniquement en consortium ont peut-être été perdus pendant ces étapes (Alain et Querellou, 2009). Malgré l'utilisation d'un milieu de culture riche en nutriments et micronutriments (acides aminés, sucres, vitamines, minéraux, oligoéléments, jus de rumen), certains co-facteurs essentiels à la croissance bactérienne de certaines souches peuvent être manquants. La culturomique haut débit décrite par Lagier et al. 2016, et qui met en œuvre une robotisation d'une grande partie des étapes (dilutions, étalements, piquage des colonies, typages phylogénétiques), permettrait de s'affranchir des étapes d'enrichissements et de travailler sur de grandes cohortes d'individus ($N > 100$). Par cette approche, Lagier et al. (2016) ont isolé plus de mille espèces procaryotiques dont environ 20 % seraient potentiellement des espèces nouvelles. A titre de comparaison, nous sommes partis de trois individus et avons piqué 380 isolats qui ont ensuite été criblés pour la dégradation des flavan-3-ols. Un problème lié à la culturomique haut débit est qu'en aval de l'isolement, elle n'inclut pas un criblage haut débit ciblant un métabolisme particulier. A notre connaissance, il existe des criblages haut débits qui ciblent le métabolisme des fibres alimentaires (Tasse et al. 2010) mais aucun n'a encore été mis au point pour cibler le métabolisme des polyphénols.

Dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence une autre espèce que *Flavonifractor plautii* qui serait impliquée dans le métabolisme des métabolites ouverts de la (+)-catéchine et de la

(-)-épicatéchine (Figure 68). Comme pour *E. lenta*, les fortes prévalence et abondance (respectivement 80 % des individus et 10^8 - 10^9 bactéries/g de selles sèches) de cette espèce chez l'Homme pourrait expliquer ce résultat (Schoefer et al. 2003). Une seule campagne d'isolement a été organisée pour identifier les micro-organismes impliqués dans ce métabolisme, réduisant ainsi nos chances d'identifier de nouvelles espèces. Il faut cependant considérer que cet isolement nécessite l'utilisation de substrats (dérivés hydroxyphényl-propan-2-ols) qui ne sont pas commercialisés. Nous avons donc dû recourir à la production *in vitro* du métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol en utilisant une de nos souches *E. lenta*, ce qui a fortement limité la quantité de métabolites obtenue et le nombre de campagne d'isolements.

En conclusion, nos résultats confirment l'importance de deux espèces du microbiote intestinal humain, *Eggerthella lenta* et *Flavonifractor plautii* dans le métabolisme des monomères de flavan-3-ol, espèces qui pourraient servir de marqueurs bactériens de ce métabolisme chez l'Homme.

Micro-organismes impliqués dans la dégradation des oligomères de flavan-3-ol et identification des métabolites

Pour tester la dégradation microbienne des oligomères de flavan-3-ols et identifier leurs métabolites, il fallait disposer de suffisamment de substrat pour réaliser les expérimentations. En l'occurrence, très peu de procyanidines purifiées (B_2 et A_2) sont commercialisées et elles sont très chères (de l'ordre de 200 € les 10 milligrammes). Par conséquent, nous avons choisi de préparer et purifier des procyanidines de type B avec des degrés de polymérisation précis à partir de parenchyme de pommes de la variété *Marie Menard*. La caractérisation par thioacidolyse des fractions purifiées a montré que nous avons purifié une fraction de dimères ($DP_n = 2$), trimères ($DP_n = 2,7$) et tétramères ($DP_n = 3,4$) de procyanidines de type B avec comme unité constitutive principale la (-)-épicatéchine. Nous disposons ainsi d'environ 500 mg de chacune des fractions.

En testant l'activité métabolique de nos souches sur les procyanidines de type B purifiés (DP 2 à 4), mais également de type A (dimère A_2) nous sommes les premiers à montrer que l'espèce *E. lenta* est capable de dégrader ces procyanidines. L'identification des métabolites produits par les souches *E. lenta* de notre collection a montré que les dimères B_2 et A_2 sont ouverts au niveau du cycle C sur l'unité terminale. Cette réaction est similaire à celle catalysée par *E. lenta* sur le monomère de (-)-épicatéchine.

Stoupi et al. (2010b) ont identifié par LC-(MS)ⁿ 24 métabolites issus de la dégradation du dimère B_2 par le microbiote humain, dont 4 métabolites caractérisés avec même m/z 579 que le métabolite PCB-2A. Ces 24 métabolites n'ont été détectés que sur les neuf premières heures d'incubation et représentent 20 % du substrat initial. L'espèce *E. lenta* serait donc impliquée dans la première étape de la dégradation des dimères B_2 en ouvrant le cycle C de l'unité terminale. En revanche, nous n'avons pas

mis en évidence une activité de dégradation de notre souche *F. plautii* sur les procyanidines de type B ni sur les formes ouvertes par *E. lenta*, alors que cette souche possède une activité métabolique (ouverture du cycle A) sur les formes ouvertes des monomères (Figure 68). Notre souche ne serait donc pas capable d'une telle activité sur les métabolites générés par *E. lenta* à partir de dimères de type B. Néanmoins, dans les métabolites identifiés par Stoupi et al. (2010b), certains métabolites du dimère B₂ présentent deux cycles C ouverts. On peut donc faire l'hypothèse que *F. plautii* intervienne sur les dimères qu'à partir du moment où les deux cycles C du dimère sont ouverts.

Le métabolite PCA-2A produit par nos souches *E. lenta* a également été décrit par Engemann et al. (2012) après incubation *in vitro* du dimère A₂ avec le microbiote fécal de porc. L'espèce *E. lenta* est aussi une espèce commensale du microbiote de porc ; elle pourrait être l'espèce impliquée dans la formation de ce métabolite chez le porc (Stewart 1997).

En ce qui concerne le trimère de type B, l'analyse par LC-ESI-MS du métabolite PCB-3A produit a montré qu'il était réduit par rapport au précurseur PCB-3, suggérant une ouverture de cycle. La position de cette ouverture n'a pas encore pu être déterminée par thioacidolyse. Le métabolite PCB-4A produit à partir du tétramère n'a pas encore pu être analysé par LC-ESI-MS. Ces analyses sont primordiales pour rendre compte du rôle majeur de *E. lenta* dans la dégradation des oligomères de type B.

Nos résultats confirment donc l'importance de l'espèce *E. lenta* dans le métabolisme des flavan-3-ols en montrant pour la première fois que cette espèce est impliquée dans les premières étapes de dégradation des procyanidines de type B et A en catalysant l'ouverture du cycle C de l'unité terminale.

Tableau 30. Bilan des gènes impliqués dans le métabolisme des flavan-3-ols. CAT : (+)-catéchine ; EC : (-)-épicatéchine ; EGC : (-)-épigallocatechine ; PCB-2 : dimère de procyanidines de type B ; *fmber* : flavanol monomer benzyl ether reductase ; *pber* : procyanidin benzyl ether reductase ; *cadh* : catechin dehydroxylase ; *ecadh* : epicatechin dehydroxylase.

Gènes	Groupe	Annotation automatique	Niveau d'expression des transcrits (FPKM)			Flavan-3-ols hydrolysés	Source	Réaction enzymatique	Nom de gène proposé (Notre collection)	Prévalence des gènes			
			Témoin	CAT	EC					PCB-2	<i>E. lentis</i> (N=50)	Métagnomes (<i>N=1962</i>)	
ELEN_RS00960	B	FAD-dépendent oxidoreductase	3	10134	8935	113	CAT, EC, EGC	Cette étude	Ouverture du cycle C	<i>fmber1</i>	O, P1, P3, T	96%	56%
ELEN_RS03100	B	FAD-binding protein	15	9593	669	222	CAT, EC, EGC	Cette étude	Ouverture du cycle C	<i>fmber2</i>	O, P1, P3, T	100%	54%
ELEN_RS01395	B	FAD-binding protein	9	3	8695	10061	CAT, EC, EGC, PCB-2	Cette étude	Ouverture du cycle C	<i>pber</i>	O, P1, P3, T	88%	52%
ELEN_RS01400	B	hypothetical protein	7	3	4216	5345							
Opéon													
ELEN_RS02535	A	molybdoptéin-dépendent oxidoreductase	1	1085	0	0							
ELEN_RS02540	A	4fe-4s-dicluster domain-containing protein	1	1315	1	1	CAT	Maini Rekdal et al. (2020)	Déshydroxylation du Ca ¹ du cycle B	<i>cadh</i>	O, P1	23%	30%
ELEN_RS02545	A	hypothetical protein	2	1083	1	1							
ELEN_RS02575	A	molybdoptéin-dépendent oxidoreductase	0	1	258	0							
ELEN_RS02580	A	4fe-4s-dicluster domain-containing protein	0	0	246	1	EC	Cette étude	Déshydroxylation du Ca ¹ du cycle B	<i>ecadh</i>	O, P1	40%	33%
ELEN_RS02585	A	hypothetical protein	1	1	350	1							

Légende	
Heatmap / transcrits (FPKM)	
0	4000
8900	
Heatmap / prévalences (%)	
0	50%
100%	

Gènes de *E. lenta* impliqués dans l'ouverture du cycle C des flavan-3-ols (Groupe B)

L'étude transcriptomique réalisée avec la souche type *E. lenta* DSM 2243 a mis en évidence quatre gènes très induits et très exprimés en présence d'un ou deux des trois flavan-3-ols testés, dont deux seraient organisés en opéron. Ces quatre gènes ont été plus particulièrement étudiés car jamais décrits jusqu'à présent (Tableau 30). Un cinquième gène (ELEN_RS06940), intégré au début dans ce groupe, n'a pas fait l'objet d'une étude aussi approfondie, et ne sera donc pas considéré dans cette discussion.

L'annotation automatique des protéines codées par trois des quatre gènes du groupe B et une analyse plus poussée des séquences protéiques suggèrent que les gènes ELEN_RS00960, ELEN_RS03100 et ELEN_RS01395 codent des enzymes appartenant à la famille des FAD oxydo-reductases. Ces enzymes seraient sécrétées par *E. lenta* via un système de sécrétion (Twin Arginin translocation) qui ne prend en charge que les protéines ayant pris leur conformation repliée et donc active avant d'être exportées de la cellule (Palmer et Stansfeld, 2020).

De manière surprenante, ces gènes sont induits soit par un des trois flavan-3-ols testés soit par deux flavan-3-ols (Tableau 30). Ainsi, le gène ELEN_RS00960 est induit par la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine et la protéine exprimée chez *E. coli* (TOP10) s'est avérée active sur ces deux monomères ainsi qu'un troisième monomère, la (-)-épigallocatechine. Nous proposons donc de nommer ce gène *flavanol monomer benzyl ether reductase 1 (fmber1)* puisque l'enzyme clive la liaison éther (C-O-C) du cycle C de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine (à confirmer pour la (-)-épigallocatechine). Le gène ELEN_RS03100 est surtout induit par la (+)-catéchine, et la protéine exprimée chez *E. coli* ouvre aussi le cycle C des trois monomères (à confirmer pour la (-)-épigallocatechine). Nous proposons donc de nommer ce gène *flavanol monomer benzyl ether reductase 2 (fmber2)*. L'opéron de deux gènes ELEN_RS01395 et ELEN_RS01400 est induit par la (-)-épicatéchine et le dimère PCB-2 et là aussi, la co-expression de ces protéines chez *E. coli* montre une activité d'ouverture du cycle C sur les trois monomères (à confirmer pour la (-)-épigallocatechine). Nous n'avons pas pu confirmer l'activité enzymatique sur le dimère PCB-2 par cette approche. Par contre, nous avons pu le faire de façon indirecte, en comparant des souches ayant ou pas cet opéron. Au regard de ces résultats, et du fait que cet opéron ciblerait les dimères de procyanidine de type B en plus de la (-)-épicatéchine (monomère prépondérant à 95 % dans les dimères PCB-2) nous avons nommé cet opéron *procyanidin benzyl ether reductase (pber)*. Le rôle respectif des protéines codées par cet opéron *pber* reste à préciser sachant que nous faisons l'hypothèse que le gène ELEN_RS01395 code l'enzyme et le gène ELEN_RS01400 code une protéine accessoire qui semble indispensable à la fonction enzymatique de la première.

Discussion et perspectives

Le fait que le gène *fmber1* soit induit par les deux stéréoisomères, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine, suggère que le senseur ou le régulon qui contrôle l'expression de ce gène ne distingue pas les formes chirales de la molécule. De la même façon, le fait que l'opéron *pber* soit induit par la (-)-épicatéchine et par son dimère suggère aussi que les deux molécules sont reconnues par un même senseur ou régulon. Par contre, ce qui est moins logique, c'est que les protéines codées par ces gènes et exprimées chez *E. coli* ne présentent pas de spécificité de substrat (Tableau 30). Ce type de résultat a déjà été observé par Braune et al. (2016) qui ont montré que la chalcone isomérase identifiée chez *Eubacterium ramulus* était capable d'isomériser plusieurs substrats (+)-taxifoline (flavanonol) et (+)-dihydrokaempferol (flavanonol) ; par contre, elle était stéréospécifique et ne pouvait pas isomériser la (-)-taxifoline. Une explication à nos résultats serait que les enzymes codées par les gènes *fmber* ou *pber* possèdent un site actif qui tolère les différentes formes chirales d'une molécule, mais également la présence d'un groupement OH supplémentaire sur le cycle B, ceci pour expliquer la dégradation observée du monomère (-)-épigalocatéchine. La comparaison des différentes enzymes a montré qu'elles avaient une structure similaire (domaines et tailles). En revanche, elles ne possèdent que 24 à 32 % d'identité protéique, avec quelques régions en acides aminés conservées. Ceci peut paraître surprenant compte tenu de leur activité enzymatique a priori identique. Une analyse plus poussée de chaque enzyme (modélisation, recherche de site actif) devra être menée pour comprendre le mode d'action de ces enzymes. Une autre explication serait que les enzymes exprimées chez *E. coli* ne prennent pas la conformation prise par ces mêmes enzymes produites et exportées à la surface de *E. lenta* par le système de sécrétion TAT, ce qui induirait une perte de spécificité. Nous n'avons pas pu restaurer l'activité de dégradation sur le PCB-2 par l'expression de l'opéron *pber* chez *E. coli*, montrant ainsi que nous ne répliquons pas à l'identique le système enzymatique mis en jeu dans la bactérie d'origine.

Enfin, nos observations montrent l'importance du groupement hydroxyle libre sur le C₃ du cycle C pour faciliter l'ouverture de ce dernier, puisque qu'aucune de nos enzymes exprimées chez *E. coli* n'est capable de dégrader les formes galloylées : (-)-épicatéchine-3-O-gallate et (-)-épigalocatéchine-3-O-gallate. Le clivage de la liaison ester est donc nécessaire pour qu'il y ait ouverture du cycle C (Hackett et al. 1985; Meselhy et al. 1997).

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois chez une bactérie du microbiote intestinal, *Eggerthella lenta*, des gènes impliqués dans l'ouverture du cycle C des monomères (gènes *fmber1* et *fmber2*) et des oligomères (opéron *pber*) de flavan-3-ols.

Gènes de *E. lenta* impliqués dans la déshydroxylation du cycle B des flavan-3-ols (Groupe A)

Notre étude transcriptomique chez *E. lenta* (souche DSM 2243) a également mis en évidence deux opérons de trois gènes (groupe A), induits en présence des deux monomères de flavan-3-ols testés. Ces deux opérons ont une organisation similaire, et c'est le premier gène qui code pour une enzyme annotée « molybdopterin-dependent oxidoreductase » qui porte l'essentiel de la divergence entre les protéines codées par ces opérons (Tableau 30).

L'opéron constitué des gènes [ELEN_RS02535 – ELEN_RS02540 – ELEN_RS02545] est induit en présence de la (+)-catéchine. L'induction de cet opéron par la (+)-catéchine a déjà été mise en évidence par une approche transcriptomique RNAseq chez une autre souche de *E. lenta* (souche A2) par Maini Rekdal et al. (2020). Ces auteurs ont suggéré que cet opéron codait un complexe enzymatique exposé à la surface de la bactérie et dont l'activité serait de déshydroxyler le métabolite (+)-3',4'-diOHPP-2-ol au niveau du C₄'. Ils ont appelé cet opéron *cadh* pour « catechin dehydroxylase », nom qui n'est pas forcément pertinent puisque la réaction hydrolytique ne se fait pas directement sur la (+)-catéchine mais sur son métabolite microbien, le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol. De façon similaire à l'opéron *pber* (caractérisé ci-dessus, groupe B), ils n'ont pas réussi à valider cette activité enzymatique par expression hétérologue chez *E. coli* mais ils l'ont déduite en comparant des souches de *E. lenta* qui portaient ou pas cet opéron. Les protéines codées par notre opéron [ELEN_RS02535 – ELEN_RS02540 – ELEN_RS02545] et les protéines codées par l'opéron *cadh* étant 100 % identiques, nous en avons déduit qu'il s'agissait du même opéron. Par conséquent, notre opéron a été renommé *cadh* (Tableau 30).

D'autre part, l'autre opéron que nous avons identifié comme étant induit en présence de la (-)-épicatéchine et qui est constitué des gènes [ELEN_RS02575 – ELEN_RS02580 – ELEN_RS02585] présente de très fortes similarités génomiques et protéiques avec l'opéron *cadh*. Notre collection de quatre souches de *E. lenta* comporte deux souches, O et P1, qui portent cet opéron et catalysent la déshydroxylation en C₄' du (-)-3',4'-diOHPP-2-ol alors que les souches P3 et T ne portent pas cet opéron et ne catalysent pas cette réaction. Il est donc très probable que cet opéron code pour un deuxième complexe enzymatique impliqué dans la déshydroxylation en C₄' du (-)-3',4'-diOHPP-2-ol. Par conséquent, même si l'activité enzymatique n'a pas été validé par une méthode plus directe comme l'expression hétérologue chez *E. coli* ou la mutagenèse dirigée chez *E. lenta*, nous avons nommé cet opéron *ecadh* pour « epicatechin dehydroxylase » (Tableau 30).

A la différence de ce que nous avons obtenu avec les gènes du groupe B (*fmber1*, *fmber2*, *pber*), le niveau d'expression des gènes *cadh* et *ecadh* est beaucoup moins élevé (Tableau 30). Une explication possible viendrait de la temporalité des réactions catalysées par *E. lenta* à partir des monomères de

Discussion et perspectives

flavan-3-ols. En effet, nous pensons que la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine induisent dans un premier temps les gènes *fmber1*, *fmber2*, *pber*, qui expriment les enzymes d'ouverture du cycle C des monomères pour produire les métabolites (+/-)-3',4'-diOHPP-2-ols, et que ce sont ces métabolites qui apparaissent ultérieurement dans le milieu de culture qui induisent les opérons *cadh* et *ecadh*. Il aurait donc fallu incubé *E. lenta* plus longtemps que 2 heures en présence des monomères précurseurs pour augmenter le niveau d'expression des gènes *cadh* et *ecadh*.

Nos résultats montrent aussi que l'induction des opérons *cadh* et *ecadh* est spécifique du stéréoisomère et dépend donc de l'orientation de l'hydroxyle sur le carbone C₃. Ces résultats sont en accord avec ceux de Wang et al. (2001) qui ont montré que la souche *E. lenta* SDG-2 pouvait déshydroxyler le (-)-3',4'-diOHPP-2-ol et pas le (+)-3',4'-diOHPP-2-ol.

Notre étude n'a pas révélé d'induction d'un opéron similaire qui serait impliqué dans la déshydroxylation du métabolite ouvert du dimère de procyanidine de type B (PCB-2A). Il est possible qu'un tel opéron ne soit pas présent chez la souche *E. lenta* DSM 2243 utilisée en transcriptomique, ni chez nos quatre souches *E. lenta* pour lesquelles nous n'avons pas observé cette activité. Ce résultat est en accord avec les travaux de Stoupi et al. (2010b) effectués à l'échelle du microbiote complet qui n'ont pas révélé de formes déshydroxylées des PCB-2 et de leurs métabolites. Par contre, la déshydroxylation d'autres métabolites tels que les (-)-3',4',5'-triOHPP-2-ol, (-)-3',4',5'-diOHPPval et (-)-3',4',5'-diOHPPVA générés par *F. plautii* a pu être observé par les espèces *E. lenta* mais aussi *Adlercreutzia equolifaciens* (Figure 24) (Takagaki et Nanjo 2015c). Maini Rekdal et al. (2020) ont aussi montré qu'il existe une grande variété de gènes codant des déshydroxylases chez *Eggerthella* et *Gordonibacter*. Les recherches doivent donc se poursuivre pour montrer l'implication de ces gènes dans la déshydroxylation des monomères et oligomères de flavan-3-ols.

En conclusion, nous avons découvert chez *E. lenta* un nouvel opéron (*ecadh*) qui serait responsable de la déshydroxylation du (-)-3',4'-diOHPP-2-ol, métabolite produit à partir de la (-)-épicatéchine. Nous confirmons aussi l'importance de l'opéron *cadh* décrit par Maini Rekdal et al. (2020) dans la déshydroxylation du (+)-3',4'-diOHPP-2-ol.

Prévalence des gènes du métabolisme des flavan-3-ols dans les génomes et métagénomes

Notre étude montre que les gènes *fmber1* et *fmber2* sont ubiquitaires chez *Eggerthella lenta* (présent respectivement chez 96 et 100 % des souches) et que l'opéron *pber* est également très prévalent chez cette espèce (présent chez 88 % des souches) (Tableau 30). Par comparaison, les opérons *cadh* et *ecadh* sont beaucoup moins retrouvés chez *Eggerthella lenta* puisque l'opéron *cadh* n'est présent que chez 23 % des souches de cette espèce et l'opéron *ecadh* chez 40 % des souches (Tableau 30).

Discussion et perspectives

On observe les mêmes tendances dans les métagénomés intestinaux humains où les gènes *fmber1*, *fmber2* et *pber* sont respectivement présents chez plus de la moitié des individus (52 à 56 %) alors que les opérons *cadh* et *ecadh* ne sont détectés que chez un tiers des individus (respectivement 30 et 33 %). Sachant que l'espèce *E. lenta* est prévalente dans la population humaine (détectée chez 80 % des individus) (Koppel et al. 2018) et que les gènes *fmber1*, *fmber2* et *pber* sont fortement présents chez cette espèce, il est possible que certains biais méthodologiques aient induits une sous-estimation de la prévalence de ces gènes dans les métagénomés, tel que suggéré par Bess et al. (2020).

Selon nos résultats, la présence des gènes *fmber1* et *fmber2* s'étendraient à d'autres espèces du genre *Eggerthella*. Sur la base des fortes homologies de séquence observées au niveau protéique (80 % d'identité), il est aussi possible que des gènes homologues à *fmber1* et *fmber2* soient présents chez d'autres *Eggerthellaceae* dégradant les monomères de flavan-3-ols tels que les genres bactériens *Adlercreutzia* et *Slackia*.

Nous avons donc découvert des marqueurs moléculaires liés au métabolisme de dégradation des monomères de flavan-3-ol et du dimère B₂ qui sont portés par l'espèce bactérienne *E. lenta*. Etudier la prévalence et l'abondance de ces gènes dans les microbiotes devrait permettre de mieux comprendre les différences interindividuelles de métabolisation microbienne des flavan-3-ols (Aura et al. 2008; Serra et Aida, 2012) et peut-être à terme corréler ces données au métabotypes des individus (Cortés-Martín et al. 2019; Mena et al. 2019).

PERSPECTIVES

A l'issue de ces travaux de thèse, de nombreuses perspectives sont envisagées et seront déclinées par ordre de priorité :

- Comme introduit au début de la thèse, des travaux antérieurs ont montré que le métabolome généré par le microbiote de volontaires sains à partir de flavan-3-ols de pommes présentait une activité anti-inflammatoire (Le Bourvellec et al. 2019). Une perspective directe sera de déterminer si les métabolites générés par *E. lenta* et *F. plautii* à partir de différents flavan-3-ols participent à cette activité anti-inflammatoire.
- Une analyse plus approfondie des génomes de *E. lenta* et *F. plautii* sera réalisée, avec notamment la comparaison de nos souches à celles déjà séquencées. Cette analyse permettra de dégager des caractéristiques propres à nos souches, afin notamment de valoriser leur utilisation, mais également d'optimiser leurs conditions de culture. La recherche de certains gènes (antibiorésistances, phages, transposons, facteurs de virulence, synthèse de toxines...) permettra de sélectionner les souches n'ayant potentiellement pas d'effets délétères pour une future utilisation de ces souches en tant que probiotiques.

- Les approches de transcriptomique seront poursuivies pour révéler d'autres gènes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols. Notre premier objectif sera de réaliser une étude transcriptomique RNAseq sur la souche *F. plautii* pour laquelle nous avons séquencé le génome afin d'identifier les gènes (et les enzymes) impliqués dans la genèse des métabolites microbiens de la série des phényl- γ -valérolactones et des acides phénylvalériques.
- Disposer de marqueurs moléculaires du métabolisme microbien des flavan-3-ols permettra de continuer à explorer les métagénomomes et les métatranscriptomes des individus afin de corrélérer l'absence ou la présence de ces marqueurs au statut physiopathologique des individus. Ces marqueurs seront peut-être à terme des critères essentiels pour définir si une nutrition personnalisée ou l'apport de bactéries probiotiques est à préconiser chez certains individus.
- Enfin, poursuivre l'effort de culturomique (en envisageant le haut débit) est également nécessaire pour identifier l'ensemble des microorganismes impliqués dans la dégradation des flavan-3-ols. Par exemple, il serait intéressant de savoir si seule l'espèce *Flavonifractor plautii* est capable de générer les dérivés phényl- γ -valérolactones et d'acides phénylvalériques, métabolites microbiens spécifiques du métabolisme des flavan-3-ol. Identifier les microorganismes qui dégradent ces dérivés pour former les dérivés d'acides phénylpropioniques nous semble tout aussi important. En effet tous ces métabolites microbiens sont biodisponibles et semblent être déterminants dans la stratification des individus en métabotypes, même si pour l'instant le lien entre métabotype et santé est loin d'être établi.

Références bibliographiques

- Abd El Mohsen, M. M.; Kuhnle, G.; Rechner, A. R.; Schroeter, H.; Rose, S.; Jenner, P. et Rice-Evans, C. A., 2002. « Uptake and Metabolism of Epicatechin and Its Access to the Brain after Oral Ingestion ». *Free Radical Biology and Medicine* 33 (12): 1693-1702. DOI : 10.1016/S0891-5849(02)01137-1.
- Abia, R. et Fry, S. C., 2001. « Degradation and Metabolism Of 14C-Labelled Proanthocyanidins from Carob (*Ceratonia Siliqua*) Pods in the Gastrointestinal Tract of the Rat ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (12): 1156-65. DOI : 10.1002/jsfa.924.
- Actis-Goretta, L.; Leveques, A.; Rein, M.; Teml, A.; Schafer, C.; Hofmann, U.; Li, H.; Schwab, M.; Eichelbaum, M. et Williamson, G., 2013. « Intestinal Absorption, Metabolism, and Excretion of (-)-Epicatechin in Healthy Humans Assessed by Using an Intestinal Perfusion Technique », *Am. J. Clin. Nutr.* 98 : 924-33. DOI : 10.3945/ajcn.113.065789.
- Alain, K. et Querellou, J., 2009. « Cultivating the Uncultured: Limits, Advances and Future Challenges ». *Extremophiles* 13 (4): 583-94. DOI : 10.1007/s00792-009-0261-3.
- Armenteros, A. J. J.; Tsirigos, K. D.; Sønderby, C. K.; Petersen T. N.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G. et Nielsen, H., 2019. « SignalP 5.0 Improves Signal Peptide Predictions Using Deep Neural Networks ». *Nature Biotechnology* 37 (4): 420-23. DOI : 10.1038/s41587-019-0036-z.
- Anesi, A.; Mena, P.; Bub, A.; Ulaszewska, M.; Del Rio, D.; Kulling, S. E. et Mattivi, F., 2019. « Quantification of Urinary Phenyl- γ -Valerolactones and Related Valeric Acids in Human Urine on Consumption of Apples ». *Metabolites* 9 (11): 254. DOI : 10.3390/metabo9110254.
- Angelino, D.; Carregosa, D.; Domenech-Coca, C.; Savi, M.; Figueira, I.; Brindani, N.; Jang, S. et al. 2019. « 5-(Hydroxyphenyl)- γ -Valerolactone-Sulfate, a Key Microbial Metabolite of Flavan-3-Ols, Is Able to Reach the Brain: Evidence from Different in Silico, In Vitro and In Vivo Experimental Models ». *Nutrients* 11 (11): 2678. DOI : 10.3390/nu11112678.
- Anhê, F. F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Matamoros, S; Varin, T.V.; Garofalo, C. et al. 2015. « A Polyphenol-Rich Cranberry Extract Protects from Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance and Intestinal Inflammation in Association with Increased *Akkermansia* Spp. Population in the Gut Microbiota of Mice ». *Gut* 64 (6): 872-83. DOI : 10.1136/gutjnl-2014-307142.
- Appeldoorn, M. M.; Sanders, M.; Vincken, JP.; Cheynier, V.; Le Guernevé, C.; Hollman, P.C.H et Gruppen, H., 2009. « Efficient Isolation of Major Procyanidin A-Type Dimers from Peanut Skins and B-Type Dimers from Grape Seeds ». *Food Chemistry* 117 (4): 713-20. DOI : 10.1016/j.foodchem.2009.04.047.
- Appeldoorn, M.M.; Vincken, JP.; Aura, AM.; Hollman, P.C.H. et Gruppen, H., 2009. « Procyanidin Dimers Are Metabolized by Human Microbiota with 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)Acetic Acid and 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -Valerolactone as the Major Metabolites ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (3): 1084-92. DOI : 10.1021/jf803059z.
- Appeldoorn, M. M.; Vincken, J.P.P.; Gruppen, H. et Hollman, P.C.H., 2009. « Procyanidin Dimers A1, A2, and B2 Are Absorbed without Conjugation or Methylation from the Small Intestine of Rats ». *The Journal of Nutrition* 139 (8): 1469-73. DOI : 10.3945/jn.109.106765.
- Aron, P. M. et Kennedy, J. A., 2008. « Flavan-3-Ols: Nature, Occurrence and Biological Activity ». *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (1): 79-104. DOI : 10.1002/mnfr.200700137.
- Arora, T.; Sharma, R. et Frost, G., 2011. « Propionate. Anti-Obesity and Satiety Enhancing Factor? » *Appetite* 56 (2): 511-15. DOI : 10.1016/j.appet.2011.01.016.
- Arredondo-Alonso, S.; Rogers, M.R.C.; Braat, J.C.; Verschuuren, T.D.; Top, J.; Corander, J.; Willems, R.J.L et Schürch, A.C., 2018. « Mlplasmids: A User-Friendly Tool to Predict Plasmid- and

Références bibliographiques

- Chromosome-Derived Sequences for Single Species ». *Microbial Genomics* 4 (11). DOI : 10.1099/mgen.0.000224.
- Arumugam, M.; MetaHIT Consortium; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R. et al. 2011. « Enterotypes of the Human Gut Microbiome ». *Nature* 473 (7346): 174-80. DOI : 10.1038/nature09944.
- Arunachalam, M.; Mohan, N.; Sugadev, R.; Chellappan, P. et Mahadevan, A., 2003. « Degradation of (+)-Catechin by *Acinetobacter Calcoaceticus* MTC 127 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1621 (3): 261-65. DOI : 10.1016/S0304-4165(03)00077-1.
- Arunachalam, M.; Raj, M.M.; Mohan, N. et Mahadevan, A., 2003. « Biodegradation of Catechin ». *Proc. Indian natn Sci Acad.* 4 : 353-370.
- Auger, C.; Mullen, W.; Hara, Y. et Crozier A., 2008. « Bioavailability of Polyphenon E Flavan-3-Ols in Humans with an Ileostomy ». *The Journal of Nutrition* 138 (8): 1535S-1542S. DOI : 10.1093/jn/138.8.1535S.
- Aura, AM.; Mattila, I.; Seppänen-Laakso, T.; Miettinen, J.; Oksman-Caldentey, KM. et Orešič, M., 2008. « Microbial Metabolism of Catechin Stereoisomers by Human Faecal Microbiota: Comparison of Targeted Analysis and a Non-Targeted Metabolomics Method ». *Phytochemistry Letters* 1 (1): 18-22. DOI : 10.1016/j.phytol.2007.12.001.
- Aziz, Q.; Doré, J.; Emmanuel, A.; Guarner, F. et Quigley E.M.M., 2013. « Gut Microbiota and Gastrointestinal Health: Current Concepts and Future Directions: Gut Microbiota and Gastrointestinal Health ». *Neurogastroenterology & Motility* 25 (1): 4-15. DOI : 10.1111/nmo.12046.
- Baba, S.; Osakabe, N. ; Natsume, M. et Terao, J., 2002. « Absorption and Urinary Excretion of Procyanidin B2 [Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin] in Rats ». *Free Radical Biology and Medicine* 33 (1): 142-48. DOI : 10.1016/S0891-5849(02)00871-7.
- Balzer, J.; Rassaf, T.; Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Lauer, T.; Merx, M.; Heussen, N. et al. 2008. « Sustained Benefits in Vascular Function Through Flavanol-Containing Cocoa in Medicated Diabetic Patients ». *Journal of the American College of Cardiology* 51 (22): 2141-49. DOI : 10.1016/j.jacc.2008.01.059.
- Barroso, E.; Sánchez-Patán, F.; Martín-Alvarez, P.J.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V.; Peláez, C.; Requena, T.; Van de Wiele, T. et Martínez-Cuesta, M.C., 2013. « *Lactobacillus Plantarum* IFPL935 Favors the Initial Metabolism of Red Wine Polyphenols When Added to a Colonic Microbiota ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (42): 10163-72. DOI : 10.1021/jf402816r.
- Barroso, E.; Van de Wiele, T.; Jiménez-Girón, A.; Muñoz-González, I.; Martín-Alvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B.; Peláez, C.; Martínez-Cuesta, M.C. et Requena, T., 2014. « *Lactobacillus Plantarum* IFPL935 Impacts Colonic Metabolism in a Simulator of the Human Gut Microbiota during Feeding with Red Wine Polyphenols ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (15): 6805-15. DOI : 10.1007/s00253-014-5744-1.
- Bate-Smith, E.C., 1954. « Leuco-Anthocyanins. 1. Detection and Identification of Anthocyanidins Formed from Leuco-Anthocyanins in Plant Tissues ». *Biochemical Journal* 58 (1): 122-25. DOI : 10.1042/bj0580122.
- Baumgart, M.; Dogan, B.; Rishniw, M.; Weitzman, G.; Bosworth, B.; Yantiss, R.; Orsi, R.H. et al., 2007. « Culture Independent Analysis of Ileal Mucosa Reveals a Selective Increase in Invasive *Escherichia Coli* of Novel Phylogeny Relative to Depletion of Clostridiales in Crohn's Disease Involving the Ileum ». *The ISME Journal* 1 (5): 403-18. DOI : 10.1038/ismej.2007.52.
- Bernalier-Donadille, A., 2010. « Activités métaboliques du microbiote intestinal humain ». *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 34 (4): 17-23. DOI : 10.1016/S0399-8320(10)70003-8.
- Bernatova, I., 2018. « Biological Activities of (-)-Epicatechin and (-)-Epicatechin-Containing Foods: Focus on Cardiovascular and Neuropsychological Health ». *Biotechnology Advances* 36 (3): 666-81. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2018.01.009.
-

Références bibliographiques

- Bess, E.N.; Bisanz, J.E.; Yarza, F.; Bustion, A.; Rich, B.E.; Li, X.; Kitamura, S. et al. 2020. « Genetic Basis for the Cooperative Bioactivation of Plant Lignans by Eggerthella Lenta and Other Human Gut Bacteria ». *Nature Microbiology* 5 (1): 56-66. DOI : 10.1038/s41564-019-0596-1.
- Bisanz, J. E.; Soto-Perez, P.; Lam, K.N.; Bess, E.N.; Haiser, H.J.; Allen-Vercoe, E.; Rekdal, V.M.; Balskus, E.P. et Turnbaugh, P.J., 2018. « Illuminating the Microbiome's Dark Matter: A Functional Genomic Toolkit for the Study of Human Gut Actinobacteria ». *bioRxiv*. DOI : 10.1101/304840.
- Bittner, K.; Rzeppa, S. et Humpf, H.U., 2013. « Distribution and Quantification of Flavan-3-Ols and Procyanidins with Low Degree of Polymerization in Nuts, Cereals, and Legumes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (38): 9148-54. DOI : 10.1021/jf4024728.
- Bo', C.D.; Bernardi, S.; Marino, M.; Porrini, M.; Tucci, M.; Guglielmetti, S.; Cherubini, A. et al. 2019. « Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is There Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? » *Nutrients* 11 (6): 1355. DOI : 10.3390/nu11061355.
- Bohn, T., 2014. « Dietary Factors Affecting Polyphenol Bioavailability ». *Nutrition Reviews* 72 (7): 429-52. DOI : 10.1111/nure.12114.
- Bolca, S.; Van de Wiele, T.; Possemier, S., 2013. « Gut Metabotypes Govern Health Effects of Dietary Polyphenols ». *Current Opinion in Biotechnology* 24: 220-225. DOI : 10.1016/j.copbio.2012.09.009.
- Borges, G.; van der Hooft, J.J.J. et Crozier A., 2016. « A Comprehensive Evaluation of the [2- 14 C](–)-Epicatechin Metabolome in Rats ». *Free Radical Biology and Medicine* 99 : 128-38. DOI : 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.001.
- Braune, A. et Blaut, M., 2016. « Bacterial Species Involved in the Conversion of Dietary Flavonoids in the Human Gut ». *Gut Microbes* 7 (3): 216-34. DOI : 10.1080/19490976.2016.1158395.
- Braune, A.; Engst, W.; Elsinghorst, P.W.; Furtmann, N.; Bajorath, J.; Gütschow, M. et Blaut, M., 2016. « Chalcone Isomerase from *Eubacterium Ramulus* Catalyzes the Ring Contraction of Flavanonols ». *Journal of Bacteriology* 198 (21): 2965-74. DOI : 10.1128/JB.00490-16.
- Brickman, A.M.; Khan, U.A.; Provenzano, F.A.; Yeung, L.K.; Suzuki, W.; Schroeter, H.; Wall, M.; Sloan, R.P. et Small, S.A., 2014. « Enhancing Dentate Gyrus Function with Dietary Flavanols Improves Cognition in Older Adults ». *Nature Neuroscience* 17 (12): 1798-1803. DOI : 10.1038/nn.3850.
- Brown, K.; DeCoffe, D.; Molcan, E. et Gibson, D.L., 2012. « Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease ». *Nutrients* 4 (8): 1095-1119. DOI : 10.3390/nu4081095.
- Brown, N. P.; Leroy, C. et Sander, C., 1998. « MView: A Web-Compatible Database Search or Multiple Alignment Viewer ». *Bioinformatics* 14 (4): 380-81. DOI : 10.1093/bioinformatics/14.4.380.
- Campos, E.M.; Stehle, P. et Simon, M.C., 2019. « Microbial Metabolites of Flavan-3-Ols and Their Biological Activity ». *Nutrients* 11 (10): 2260. DOI : 10.3390/nu11102260.
- Campos, E.M.; Jakobs, L. et Simon, M.C., 2020. « Antidiabetic Effects of Flavan-3-Ols and Their Microbial Metabolites ». *Nutrients* 12 (6): 1592. DOI : 10.3390/nu12061592.
- Chassard, C.; Dapoigny, M.; Scott, K.P.; Crouzet, L.; Del'homme, C.; Marquet, P.; Martin, J.C. et al., 2012. « Functional Dysbiosis within the Gut Microbiota of Patients with Constipated-Irritable Bowel Syndrome ». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35 (7): 828-38. DOI : 10.1111/j.1365-2036.2012.05007.x.
- Chen, H. et Sang S., 2014. « Biotransformation of Tea Polyphenols by Gut Microbiota ». *Journal of Functional Foods* 7: 26-42. DOI : 10.1016/j.jff.2014.01.013.
- Chen, X.; Xu, B.; Nie, L.; He, K.; Zhou, L.; Huang, X.; Spencer, P.; Yang, X. et Liu J., 2019. « Flavanol-Rich Lychee Fruit Extract Substantially Reduces Progressive Cognitive and Molecular Deficits in a Triple-Transgenic Animal Model of Alzheimer Disease ». *Nutritional Neuroscience*, 1-15. DOI : 10.1080/1028415X.2019.1673527.
- Cheng, M. et Ning K., 2019. « Stereotypes About Enterotype: The Old and New Ideas ». *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 17 (1): 4-12. DOI : 10.1016/j.gpb.2018.02.004.

Références bibliographiques

- Chuang, CC. et McIntosh, M.K., 2011. « Potential Mechanisms by Which Polyphenol-Rich Grapes Prevent Obesity-Mediated Inflammation and Metabolic Diseases ». *Annual Review of Nutrition* 31 (1): 155-76. DOI : 10.1146/annurev-nutr-072610-145149.
- Chung, W.S.F.; Meijerink, M.; Zeuner, B.; Holck, J.; Louis, P.; Meyer, A.S.; Wells, J.M.; Flint, H.J. et Duncan, S.H., 2017. « Prebiotic Potential of Pectin and Pectic Oligosaccharides to Promote Anti-Inflammatory Commensal Bacteria in the Human Colon ». *FEMS Microbiology Ecology* 93 (11). DOI : 10.1093/femsec/fix127.
- 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. DOI : 10.1124/pr.118.015768.
- Clavel, T.; Lepage, P. et Charrier, C., 2014. « The Family Coriobacteriaceae ». *The Prokaryotes*, 201-38. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI : 10.1007/978-3-642-30138-4_343.
- Cortés-Martín, A.; García-Villalba, R.; González-Sarrías, A.; Romo-Vaquero, M.; Loria-Kohen, V.; Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V. et Espín, J.C., 2018. « The Gut Microbiota Urolithin Metabotypes Revisited: The Human Metabolism of Ellagic Acid Is Mainly Determined by Aging ». *Food Funct.* 9(8):4100-4106. DOI : 10.1039/c8fo00956b.
- Cortés-Martín, A.; Selma, M.V.; Espín, J.C. et García-Villalba, R., 2019. « The Human Metabolism of Nuts Proanthocyanidins Does Not Reveal Urinary Metabolites Consistent with Distinctive Gut Microbiota Metabotypes ». *Molecular Nutrition & Food Research* 63 (2): 1800819. DOI : 10.1002/mnfr.201800819.
- Cortés-Martín, A.; Selma, M.V.; Tomás-Barberán, F.A.; González-Sarrías, A. et Espín, J.C., 2020. « Where to Look into the Puzzle of Polyphenols and Health? The Postbiotics and Gut Microbiota Associated with Human Metabotypes ». *Molecular Nutrition & Food Research* 64 (9): 1900952. DOI : 10.1002/mnfr.201900952.
- Crouzet, L.; Gaultier, E.; Del'Homme, C.; Cartier, C.; Delmas, E.; Dapoigny, M.; Fioramonti, J. et Bernalier-Donadille, A., 2013. « The Hypersensitivity to Colonic Distension of IBS Patients Can Be Transferred to Rats through Their Fecal Microbiota ». *Neurogastroenterology & Motility* 25 (4): e272-82. DOI : 10.1111/nmo.12103.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B. et Clifford, M.N., 2009. « Dietary Phenolics: Chemistry, Bioavailability and Effects on Health ». *Natural Product Reports* 26 (8): 1001. DOI : 10.1039/b802662a.
- Cueva, C.; Moreno-Arribas, M.V.; Martín-Álvarez, P.J.; Bills, G.; Vicente, M.F.; Basilio, A.; Rivas, C.L.; Requena, T.; Rodríguez, J.M.; et Bartolomé, B., 2010. « Antimicrobial Activity of Phenolic Acids against Commensal, Probiotic and Pathogenic Bacteria ». *Research in Microbiology* 161 (5): 372-82. DOI : 10.1016/j.resmic.2010.04.006.
- Curtius, H.C.; Mettler, M. et Ettlinger, L., 1976. « Study of the Intestinal Tyrosine Metabolism Using Stable Isotopes and Gas Chromatography-Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 126 (novembre): 569-80. DOI : 10.1016/S0021-9673(01)84102-9.
- Dall'Asta, M.; Calani, L.; Tedeschi, M.; Jechiu, L.; Brighenti, F. et Del Rio, D., 2012. « Identification of Microbial Metabolites Derived from in Vitro Fecal Fermentation of Different Polyphenolic Food Sources ». *Nutrition* 28 (2): 197-203. DOI : 10.1016/j.nut.2011.06.005.
- Das, N.P. et Griffiths, L.A., 1969. « Studies on Flavonoid Metabolism. Metabolism of (+)-[14C]Catechin in the Rat and Guinea Pig ». *Biochemical Journal* 115 (4): 831-36. DOI : 10.1042/bj1150831.
- Das, N.P. et Sothy, S.P., 1971. « Studies on Flavonoid Metabolism. Biliary and Urinary Excretion of Metabolites of (+)-[U-14C]Catechin ». *Biochemical Journal* 125 (2): 417-23. DOI : 10.1042/bj1250417.
- Davison, K.; Berry, N.M.; Misan, G.; Coates, A.M.; Buckley, J.D. et Howe, P.R.C., 2010. « Dose-Related Effects of Flavanol-Rich Cocoa on Blood Pressure ». *Journal of Human Hypertension* 24 (9): 568-76. DOI : 10.1038/jhh.2009.105.
- De Filippo, C.; Cavalieri, D.; Di Paola, M.; Ramazzotti, M.; Poullet, J.B.; Massart, S.; Collini, S.; Pieraccini, G. et Lionetti, P., 2010. « Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative

- Study in Children from Europe and Rural Africa ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (33): 14691-96. DOI : 10.1073/pnas.1005963107.
- Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G. et Crozier, A., 2013. « Dietary (Poly)Phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases ». *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (14): 1818-92. DOI : 10.1089/ars.2012.4581.
- Déprez, S.; Brezillon, C.; Rabot, S.; Philippe, C.; Mila, I.; Lapierre, C. et Scalbert, A., 2000. « Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids ». *The Journal of Nutrition* 130 (11): 2733-38. DOI : 10.1093/jn/130.11.2733.
- Dethlefsen, L.; et Relman, D.A., 2011. « Incomplete Recovery and Individualized Responses of the Human Distal Gut Microbiota to Repeated Antibiotic Perturbation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 : 4554-61. DOI : 10.1073/pnas.1000087107.
- DuBois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. et Smith, F., 1956. « Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances ». *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-56. DOI : 10.1021/ac60111a017.
- Duncan, S.H. et Flint, H.J., 2013. « Probiotics and Prebiotics and Health in Ageing Populations ». *Maturitas* 75 (1): 44-50. DOI : 10.1016/j.maturitas.2013.02.004.
- Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazzo, E.; Izzo, A.A; Novellino, E. et Santini, A., 2019. « Polyphenols: A Concise Overview on the Chemistry, Occurrence, and Human Health ». *Phytotherapy Research* 33 (9): 2221-43. DOI : 10.1002/ptr.6419.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2014. « Scientific Opinion on the Modification of the Authorisation of a Health Claim Related to Cocoa Flavanols and Maintenance of Normal Endothelium-dependent Vasodilation Pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006 Following a Request in Accordance with Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006 ». *EFSA Journal* 12 (5). DOI : 10.2903/j.efsa.2014.3654.
- Engemann, A.; Hübner, F.; Rzeppa, S. et Humpf, H.U., 2012. « Intestinal Metabolism of Two A-Type Procyanidins Using the Pig Cecum Model: Detailed Structure Elucidation of Unknown Catabolites with Fourier Transform Mass Spectrometry (FTMS) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (3): 749-57. DOI : 10.1021/jf203927g.
- Espín, J.C.; González-Sarriás, A. et Tomás-Barberán, F.A., 2017. « The Gut Microbiota: A Key Factor in the Therapeutic Effects of (Poly)Phenols ». *Biochemical Pharmacology* 139 : 82-93. DOI : 10.1016/j.bcp.2017.04.033.
- Favari, C.; Mena, P.; Curti, C.; Istas, G.; Heiss, C.; Del Rio, D. et Rodriguez-Mateos, A., 2020. « Kinetic Profile and Urinary Excretion of Phenyl- γ -Valerolactones upon Consumption of Cranberry: A Dose-Response Relationship ». *Food & Function* 11 (5): 3975-85. DOI : 10.1039/D0FO00806K.
- Favari, C.; Mena, P.; Curti, C.; Del Rio, D. et Angelino, D., 2020. « Flavan-3-ols: Catechins and Proanthocyanidins ». In *Dietary Polyphenols*, 1^{re} éd., 283-317. Wiley. DOI : 10.1002/9781119563754.ch8.
- Finn, R.D.; Coggill, P.; Eberhardt, R.Y.; Eddy, S.R.; Mistry, J.; Mitchell, A.L.; Potter, S.C. et al., 2016. « The Pfam Protein Families Database: Towards a More Sustainable Future ». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D279-85. DOI : 10.1093/nar/gkv1344.
- Flammer, A.J.; Sudano, I.; Wolfrum, M.; Thomas, R.; Enseleit, F.; Periat, D.; Kaiser, P. et al. 2012. « Cardiovascular Effects of Flavanol-Rich Chocolate in Patients with Heart Failure ». *European Heart Journal* 33 (17): 2172-80. DOI : 10.1093/eurheartj/ehr448.
- Flint, H.J.; Scott, K.P.; Louis, P. et Duncan, S.H., 2012. « The Role of the Gut Microbiota in Nutrition and Health ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9 (10): 577-89. DOI : 10.1038/nrgastro.2012.156.
- Fontecha, J.; Peláez, C.; Juárez, M.; Requena, T.; Gómez, C. et Ramos, M., 1990. « Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goat's Cheese ». *Journal of Dairy Science* 73 (5): 1150-57. DOI : 10.3168/jds.S0022-0302(90)78776-0.

Références bibliographiques

- Foo, L.Y.; Lu, Y.; Howell, A.B. et Vorsa, N., 2000. « The Structure of Cranberry Proanthocyanidins Which Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated Escherichia Coli in Vitro ». *Phytochemistry* 54 (2): 173-81. DOI : 10.1016/S0031-9422(99)00573-7.
- Frankenfeld, C.L., 2011. « O-Desmethylangolensin: The Importance of Equol's Lesser Known Cousin to Human Health ». *Advances in Nutrition* 2 : 317-324. DOI : 10.3945/an.111.000539.
- Frankenfeld, C.L., 2017. « Cardiometabolic Risk and Gut Microbial Phytoestrogen Metabolite Phenotypes ». *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (1): 1500900. DOI : 10.1002/mnfr.201500900.
- Gagnière, J., 2016. « Gut Microbiota Imbalance and Colorectal Cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (2): 501. DOI : 10.3748/wjg.v22.i2.501.
- García-Villalba, R.; Vissenaekens, H.; Pitart, J.; Romo-Vaquero, M.; Espín, J.C.; Grootaert, C.; Selma, M.V. et al., 2017. « Gastrointestinal Simulation Model TWIN-SHIME Shows Differences between Human Urolithin-Metabotypes in Gut Microbiota Composition, Pomegranate Polyphenol Metabolism, and Transport along the Intestinal Tract ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (27): 5480-93. DOI : 10.1021/acs.jafc.7b02049.
- Ge, Z.Z.; Dong, X.Q.; Zhu, W.; Zhang, Y. et Li, C.M., 2015. « Metabolites and Changes in Antioxidant Activity of A-Type and B-Type Proanthocyanidin Dimers after Incubation with Rat Intestinal Microbiota ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (41): 8991-98. DOI : 10.1021/acs.jafc.5b03657.
- Gérard, P. et Bernalier-Donadille, A., 2007. « Les fonctions majeures du microbiote intestinal ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42 (avril): 28-36. DOI : 10.1016/S0007-9960(07)91318-8.
- Ghedira, K., 2005. « Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique ». *Phytothérapie* 3 (4): 162-69. DOI : 10.1007/s10298-005-0096-8.
- Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K. et al., 2017. « Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14 (8): 491-502. DOI : 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gonthier, M.P.; Donovan, J.L.; Texier, O.; Felgines, C.; Remesy, C. et Scalbert, A., 2003. « Metabolism of Dietary Procyranidins in Rats ». *Free Radical Biology and Medicine* 35 (8): 837-44. DOI : 10.1016/S0891-5849(03)00394-0.
- González-Sarrías, A.; Espín, J.C. et Tomás-Barberán, F.A., 2017. « Non-Extractable Polyphenols Produce Gut Microbiota Metabolites That Persist in Circulation and Show Anti-Inflammatory and Free Radical-Scavenging Effects ». *Trends in Food Science & Technology* 69 (novembre): 281-88. DOI : 10.1016/j.tifs.2017.07.010.
- Goszcz, K.; Deakin, S.J.; Duthie, G.G.; Stewart, D.; Leslie, S.J. et Megson, I.L., 2015. « Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2 . DOI : 10.3389/fcvm.2015.00029.
- Griffiths, L.A. et Barrow, A., 1972. « Metabolism of Flavonoid Compounds in Germ-Free Rats ». *Biochemical Journal* 130 (4): 1161-62. DOI : 10.1042/bj1301161.
- Groenewoud, G. et Hundt, H.K.L., 1986. « The Microbial Metabolism of Condensed (+)-Catechins by Rat-Caecal Microflora ». *Xenobiotica* 16 (2): 99-107. DOI : 10.3109/00498258609043512.
- Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S. et Prior, R.L., 2004. « Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption ». *The Journal of Nutrition* 134 (3): 613-17. DOI : 10.1093/jn/134.3.613.
- Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D. et Prior, R.L., 2003. « Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (25): 7513-21. DOI : 10.1021/jf034815d.
- Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P. et Drilleau, J.F., 1998. « Reversed-Phase HPLC Following Thiolysis for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus Domestica* Var.

- Kermerrien) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (5): 1698-1705. DOI : 10.1021/jf970832p.
- Hackett, A.M.; Griffiths, L.A. et Wermeille, M., 1985. « The Quantitative Disposition of 3- O -Methyl-(+)-[U-¹⁴C]Catechin in Man Following Oral Administration ». *Xenobiotica* 15 (11): 907-14. DOI : 10.3109/00498258509045044.
- Heeney, D.D.; Gareau, M.G. et Marco, M.L., 2018. « Intestinal Lactobacillus in Health and Disease, a Driver or Just along for the Ride? » *Current Opinion in Biotechnology* 49 (février): 140-47. DOI : 10.1016/j.copbio.2017.08.004.
- Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Dejam, A.; Perré, S.; Schroeter, H.; Sies, H. et Kelm, M. 2005. « Acute Consumption of Flavanol-Rich Cocoa and the Reversal of Endothelial Dysfunction in Smokers ». *Journal of the American College of Cardiology* 46 (7): 1276-83. DOI : 10.1016/j.jacc.2005.06.055.
- Hellström, J.K.; Törrönen, A.R. et Mattila, P.H., 2009. « Proanthocyanidins in Common Food Products of Plant Origin ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (17): 7899-7906. DOI : 10.1021/jf901434d.
- Hemingway, R.W.; Karchesy, J.J. et Branham, S.J. 1989. *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Boston, MA: Springer US.
- Henning, S.M.; Fajardo-Lira, C.; Lee, H.W.; Youssefian, A.A.; Go, V.L.W. et Heber, D., 2003. « Catechin Content of 18 Teas and a Green Tea Extract Supplement Correlates With the Antioxidant Capacity ». *Nutrition and Cancer* 45 (2): 226-35. DOI : 10.1207/S15327914NC4502_13.
- Hollands, W.J.; Philo, M.; Perez-Moral, N.; Needs, P.W.; Savva, G.M. et Kroon, P.A., 2020. « Monomeric Flavanols Are More Efficient Substrates for Gut Microbiota Conversion to Hydroxyphenyl- γ -Valerolactone Metabolites Than Oligomeric Procyanidins: A Randomized, Placebo-Controlled Human Intervention Trial ». *Molecular Nutrition & Food Research* 64 (10): 1901135. DOI : 10.1002/mnfr.201901135.
- Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Sullards, M.C.; Zhu, Q.Y.; Schramm, D.D.; Hammerstone, J.F.; Fraga, C.G.; Schmitz, H.H. et Keen, C.L., 2002. « Procyanidin Dimer B2 [Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin] in Human Plasma after the Consumption of a Flavanol-Rich Cocoa ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 76 (4): 798-804. DOI : 10.1093/ajcn/76.4.798.
- Hosseini, E.; Grootaert, C.; Verstraete, W. et Van de Wiele, T., 2011. « Propionate as a Health-Promoting Microbial Metabolite in the Human Gut: Nutrition Reviews® Vol. 69(5):245-258 ». *Nutrition Reviews* 69 (5): 245-58. DOI : 10.1111/j.1753-4887.2011.00388.x.
- Howell, A.B.; Reed, J.D.; Krueger, C.G.; Winterbottom, R.; Cunningham, D.G. et Leahy, M., 2005. « A-Type Cranberry Proanthocyanidins and Uropathogenic Bacterial Anti-Adhesion Activity ». *Phytochemistry* 66 (18): 2281-91. DOI : 10.1016/j.phytochem.2005.05.022.
- Iacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P. et Sebastiani, L., 2008. « Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, in Vitro Antioxidant Activity and Interactions ». *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (8): 589-98. DOI : 10.1016/j.jfca.2008.03.011.
- Ichikawa, M.; Yamamoto, S.; Ishihara, C.; Nonobe, S.; Hattori, Y.; Umezawa, K.; Fujii, H. et Makabe, H., 2018. « Synthesis of Epigallocatechin Trimer, (Epigallocatechin)₂-Epicatechin, and (Epigallocatechin)₂-Catechin via a Lewis Acid Mediated One-Pot Condensation and Their Antitumor Activities in Prostate Cancer Cells ». *Tetrahedron* 74 (27): 3534-42. DOI : 10.1016/j.tet.2018.04.089.
- Iino, C.; Shimoyama, T.; Iino, K.; Yokoyama, Y.; Chinda, D.; Sakuraba, H.; Fukuda, S. et Nakaji, S., 2019. « Daidzein Intake Is Associated with Equol Producing Status through an Increase in the Intestinal Bacteria Responsible for Equol Production ». *Nutrients* 11 (2): 433. DOI : 10.3390/nu11020433.
- Janecki, A. et Kolodziej, H., 2010. « Anti-Adhesive Activities of Flavan-3-Ols and Proanthocyanidins in the Interaction of Group A-Streptococci and Human Epithelial Cells ». *Molecules* 15 (10): 7139-52. DOI : 10.3390/molecules15107139.

Références bibliographiques

- Jin, J.S.; Touyama, M.; Hisada, T. et Benno, Y., 2012. « Effects of Green Tea Consumption on Human Fecal Microbiota with Special Reference to *Bifidobacterium* Species: Effects of Green Tea on Fecal Microbiota ». *Microbiology and Immunology* 56 (11): 729-39. DOI : 10.1111/j.1348-0421.2012.00502.x.
- Jung, M.; Triebel, S.; Anke, T.; Richling, E. et Erkel, G., 2009. « Influence of Apple Polyphenols on Inflammatory Gene Expression ». *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (10): 1263-80. DOI : 10.1002/mnfr.200800575.
- Kahle, K.; Huemmer, W.; Kempf, M.; Scheppach, W.; Erk, T. et Richling, E., 2007. « Polyphenols Are Intensively Metabolized in the Human Gastrointestinal Tract after Apple Juice Consumption ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (26): 10605-14. DOI : 10.1021/jf071942r.
- Kamada, N.; Chen, G.Y. Inohara, N. et Núñez, G., 2013. « Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota ». *Nature Immunology* 14 (7): 685-90. DOI : 10.1038/ni.2608.
- Kappas, A. et Alvares, A.P., 1975. « How the Liver Metabolizes Foreign Substances ». *Scientific American* 232 (6): 22-31. DOI : 10.1038/scientificamerican0675-22.
- Kawahara, S.I.; Ishihara, C.; Matsumoto, K.; Senga, S.; Kawaguchi, K.; Yamamoto, A.; Suwannachot, J.; Hamazu, Y.; Makabe, H. et Fujii, H., 2019. « Identification and Characterization of Oligomeric Proanthocyanidins with Significant Anti-Cancer Activity in Adzuki Beans (*Vigna Angularis*) ». *Heliyon* 5 (10): e02610. DOI : 10.1016/j.heliyon.2019.e02610.
- Knaze, V.; Zamora-Ros, R.; Luján-Barroso, L.; Romieu, I.; Scalbert, A.; Slimani, N.; Riboli, E. et al., 2012. « Intake Estimation of Total and Individual Flavan-3-Ols, Proanthocyanidins and Theaflavins, Their Food Sources and Determinants in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study ». *British Journal of Nutrition* 108 (6): 1095-1108. DOI : 10.1017/S0007114511006386.
- Kofink, M.; Papagiannopoulos, M. et Galensa, R., 2007. « Enantioseparation of Catechin and Epicatechin in Plant Food by Chiral Capillary Electrophoresis ». *European Food Research and Technology* 225 (3-4): 569-77. DOI : 10.1007/s00217-006-0455-1.
- Koppel, N.; Bisanz, J.E.; Pandelia, M.E.; Turnbaugh, P.J. et Balskus, E.P., 2018. « Discovery and Characterization of a Prevalent Human Gut Bacterial Enzyme Sufficient for the Inactivation of a Family of Plant Toxins ». *ELife* 7 (mai): e33953. DOI : 10.7554/eLife.33953.
- Kopylova, E.; Noé, L. et Touzet, H., 2012. « SortMeRNA: Fast and Accurate Filtering of Ribosomal RNAs in Metatranscriptomic Data ». *Bioinformatics* 28 (24): 3211-17. DOI : 10.1093/bioinformatics/bts611.
- Krumholz, L.R.; Crawford, R.L.; Hemling, M.E. et Bryant, M.P., 1987. « Metabolism of Gallate and Phloroglucinol in *Eubacterium Oxidoreducens* via 3-Hydroxy-5-Oxohexanoate. » *Journal of Bacteriology* 169 (5): 1886-90. DOI : 10.1128/JB.169.5.1886-1890.1987.
- Kutschera, M.; Engst, W.; Blaut, M. et Braune, A., 2011. « Isolation of Catechin-Converting Human Intestinal Bacteria: Catechin-Converting Bacteria ». *Journal of Applied Microbiology* 111 (1): 165-75. DOI : 10.1111/j.1365-2672.2011.05025.x.
- Lagier, J.C.; Khelaifia, S.; Alou, M.T.; Ndongo, S.; Dione, N.; Hugon, P.; Caputo, A. et al., 2016. « Culture of Previously Uncultured Members of the Human Gut Microbiota by Culturomics ». *Nature Microbiology* 1 (12): 16203. DOI : 10.1038/nmicrobiol.2016.203.
- Langmead, B. et Salzberg, S.L., 2012. « Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2 ». *Nature Methods* 9 (4): 357-59. DOI : 10.1038/nmeth.1923.
- Le Bourvellec, C.; Boas, P.B.V.; Lepercq, P.; Comtet-Marre, S.; Auffret, P.; Ruiz, P.; Bott, R. et al., 2019. « Procyanidin—Cell Wall Interactions within Apple Matrices Decrease the Metabolization of Procyanidins by the Human Gut Microbiota and the Anti-Inflammatory Effect of the Resulting Microbial Metabolome In Vitro ». *Nutrients* 11 (3): 664. DOI : 10.3390/nu11030664.
- Lee, C.C.; Kim, J.H.; Kim, J.S.; Oh, Y.S.; Han, S.M.; Park, J.H.Y.; Lee, K.W. et Lee, C.Y., 2017. « 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -Valerolactone), a Major Microbial Metabolite of Proanthocyanidin, Attenuates THP-1 Monocyte-Endothelial Adhesion ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1363. DOI : 10.3390/ijms18071363.

Références bibliographiques

- Lee, H.S.; Cho, Y.H.; Park, J.; Shin, H.Y. et Sung, M.K., 2013. « Dietary Intake of Phytonutrients in Relation to Fruit and Vegetable Consumption in Korea ». *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 113 (9): 1194-99. DOI : 10.1016/j.jand.2013.04.022.
- Lee, H.C.; Jenner, A.M.; Low, C.S. et Lee, Y.K., 2006. « Effect of Tea Phenolics and Their Aromatic Fecal Bacterial Metabolites on Intestinal Microbiota ». *Research in Microbiology* 157 (9): 876-84. DOI : 10.1016/j.resmic.2006.07.004.
- Lee, I.; Chalita, M.; Ha, S.M.; Na, S.I.; Yoon, S.H. et Chun, J., 2017. « ContEst16S: An Algorithm That Identifies Contaminated Prokaryotic Genomes Using 16S RNA Gene Sequences ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (6): 2053-57. DOI : 10.1099/ijsem.0.001872.
- Lee, I.; Kim, Y.O.; Park, S.C. et Chun, J., 2016. « OrthoANI: An Improved Algorithm and Software for Calculating Average Nucleotide Identity ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (2): 1100-1103. DOI : 10.1099/ijsem.0.000760.
- Lemoine, F.; Correia, D.; Lefort, V.; Doppelt-Azeroual, O.; Mareuil, F.; Cohen-Boulakia, S. et Gascuel, O., 2019. « NGPhylogeny.Fr: New Generation Phylogenetic Services for Non-Specialists ». *Nucleic Acids Research* 47 (W1): W260-65. DOI : 10.1093/nar/gkz303.
- Leng, N.; Dawson, J.A.; Thomson, J.A.; Ruotti, V.; Rissman, A.I.; Smits, B.M.G.; Haag, J.D.; Gould, M.N.; Stewart, R.M. et Kendzierski, C., 2013. « EBSeq: An Empirical Bayes Hierarchical Model for Inference in RNA-Seq Experiments ». *Bioinformatics* 29 : 1035-1043 DOI : 10.1093/bioinformatics/btt087.
- Li, B. et Dewey, C.N., 2011. « RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome ». *BMC Bioinformatics* 12 (1): 323. DOI : 10.1186/1471-2105-12-323.
- Li, J.; MetaHIT Consortium; Jia, H.; Cai, X.; Zhong, H.; Feng, Q.; Sunagawa, S. et al., 2014. « An Integrated Catalog of Reference Genes in the Human Gut Microbiome ». *Nature Biotechnology* 32 (8): 834-41. DOI : 10.1038/nbt.2942.
- Li, S.; Li, X.; Shpigelman, A.; Lorenzo, J.M.; Montesano, D. et Barba, F.J., 2017. « Direct and Indirect Measurements of Enhanced Phenolic Bioavailability from Litchi Pericarp Procyanidins by *Lactobacillus Casei*-01 ». *Food & Function* 8 (8): 2760-70. DOI : 10.1039/C7FO00749C.
- Lin, H.; Deng, E.Z.; Ding, H.; Chen, W. et Chou, K.C., 2014. « IPro54-PseKNC: A Sequence-Based Predictor for Identifying Sigma-54 Promoters in Prokaryote with Pseudo k-Tuple Nucleotide Composition ». *Nucleic Acids Research* 42 (21): 12961-72. DOI : 10.1093/nar/gku1019.
- Liu, H.; Han, M.; Li, S.C.; Tan, G.; Sun, S.; Hu, Z.; Yang, P. et al., 2019. « Resilience of Human Gut Microbial Communities for the Long Stay with Multiple Dietary Shifts ». *Gut* 68 (12): 2254-55. DOI : 10.1136/gutjnl-2018-317298.
- Liu, X.; Le Bourvellec, C. et Renard, C.M.G.C., 2020. « Interactions between Cell Wall Polysaccharides and Polyphenols: Effect of Molecular Internal Structure ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (6): 3574-3617. DOI : 10.1111/1541-4337.12632.
- Loo, Y.T.; Howell, K.; Chan, M.; Zhang, P. et Ng, K., 2020. « Modulation of the Human Gut Microbiota by Phenolics and Phenolic Fiber-rich Foods ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (4): 1268-98. DOI : 10.1111/1541-4337.12563.
- Lozupone, C.A.; Stombaugh, J.I.; Gordon, J.I.; Jansson, J.K. et Knight, R., 2012. « Diversity, Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota ». *Nature* 489 (7415): 220-30. DOI : 10.1038/nature11550.
- Lu, H.; Meng, X.; Li, C.; Sang, S.; Patten, C.; Sheng, S.; Hong, J. et al., 2003. « Glucuronides of Tea Catechins: Enzymology of Biosynthesis and Biological Activities ». *Drug Metabolism and Disposition* 31 (4): 452-61. DOI : 10.1124/dmd.31.4.452.
- Lu, W.C.; Huang, W.T.; Kumaran, A.; Ho, C.T. et Hwang, L.C., 2011. « Transformation of Proanthocyanidin A2 to Its Isomers under Different Physiological PH Conditions and Common Cell Culture Medium ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (11): 6214-20. DOI : 10.1021/jf104973h.

Références bibliographiques

- Maini Rekdal, V.; Bernadino, P.N.; Luescher, M.U.; Kiamehr, S.; Le, C.; Bisanz, J.E.; Turnbaugh, P.J.; Bess, E.N. et Balskus, E.P., 2020. « A Widely Distributed Metalloenzyme Class Enables Gut Microbial Metabolism of Host- and Diet-Derived Catechols ». *ELife* 9 (février): e50845. DOI : 10.7554/eLife.50845.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. et Jimenez, L., 2004. « Polyphenols: Food Sources and Bioavailability ». *Am J Clin Nutr* 79 : 727–47. DOI : 10.1093/ajcn/79.5.727
- Marchiosi, R.; Dantas dos Santos, W.; Polimeni Constantin, R.; Barbosa de Lima, R.; Soares, A.R.; Finger-Teixeira, A.; Mota, T.R. et al., 2020. « Biosynthesis and Metabolic Actions of Simple Phenolic Acids in Plants ». *Phytochem Rev*, 42. DOI : 10.1007/s11101-020-09689-2
- Margalef, M.; Pons, Z.; Bravo, F.I.; Muguerra, B. et Arola-Arnal, A., 2015. « Tissue Distribution of Rat Flavanol Metabolites at Different Doses ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (10): 987–95. DOI : 10.1016/j.jnutbio.2015.04.006.
- Martin, M., 2011. « Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads ». *EMBnet.journal* 17 (1): 10. DOI : 10.14806/ej.17.1.200.
- Martín, M.A.; Goya, L. et de Pascual-Teresa, S., 2020. « Effect of Cocoa and Cocoa Products on Cognitive Performance in Young Adults ». *Nutrients* 12 (12): 3691. DOI : 10.3390/nu12123691.
- Matsuda, M.; Otsuka, Y.; Jin, S.; Wasaki, J.; Watanabe, J.; Watanabe, T. et Osaki, M., 2008. « Biotransformation of (+)-Catechin into Taxifolin by a Two-Step Oxidation: Primary Stage of (+)-Catechin Metabolism by a Novel (+)-Catechin-Degrading Bacteria, Burkholderia Sp. KTC-1, Isolated from Tropical Peat ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366 (2): 414–19. DOI : 10.1016/j.bbrc.2007.11.157.
- Mena, P.; Bresciani, L.; Brindani, N.; Ludwig, I.A.; Pereira-Caro, G.; Angelino, D.; Llorach, R. et al., 2019. « Phenyl- γ -Valerolactones and Phenylvaleric Acids, the Main Colonic Metabolites of Flavan-3-Ols: Synthesis, Analysis, Bioavailability, and Bioactivity ». *Natural Product Reports* 36 (5): 714–52. DOI : 10.1039/C8NP00062J.
- Mena, P.; Ludwig, I.A.; Tomatis, V.B.; Acharjee, A.; Calani, L.; Rosi, A.; Brighenti, F. et al., 2019. « Inter-Individual Variability in the Production of Flavan-3-Ol Colonic Metabolites: Preliminary Elucidation of Urinary Metabotypes ». *European Journal of Nutrition* 58 (4): 1529–43. DOI : 10.1007/s00394-018-1683-4.
- Meng, F.; Abedini, A.; Plesner, A.; Verchere, C.B. et Raleigh, D.P., 2010. « The Flavanol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide, Disaggregates Amyloid Fibrils, and Protects Cultured Cells against IAPP-Induced Toxicity ». *Biochemistry* 49 (37): 8127–33. DOI : 10.1021/bi100939a.
- Meselhy, M.R.; Nakamura, N. et Hattori, M., 1997. « Biotransformation of (-)-Epicatechin 3-O-Gallate by Human Intestinal Bacteria. » *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 45 (5): 888–93. DOI : 10.1248/cpb.45.888.
- Mitra, A.; Kesarwani, A.K.; Pal, D. et Nagaraja, V., 2011. « WebGeSTer DB—a Transcription Terminator Database ». *Nucleic Acids Research* 39 (suppl_1): D129–35. DOI : 10.1093/nar/gkq971.
- Miura, S.; Watanabe, J.; Tomita, T.; Sano, M. et Tomita, I., 1994. « The Inhibitory Effects of Tea Polyphenols (Flavan-3-Ol Derivatives) on Cu²⁺ Mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. » *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 17 (12): 1567–72. DOI : 10.1248/bpb.17.1567.
- Monagas, A.; Go, C.; Bartolome, A. et Laureano, O., 2003. « Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-Ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis Vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon ». *J Agric Food Chem*. 51 : 6475–6481. DOI : 10.1021/jf030325+.
- Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sánchez-Patán, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gómez-Cordovés, C.; Andres-Lacueva, C. et Bartolomé, B., 2010. « Insights into the Metabolism and Microbial Biotransformation of Dietary Flavan-3-Ols and the Bioactivity of Their Metabolites ». *Food & Function* 1 (3): 233. DOI : 10.1039/c0fo00132e.
- Monfoulet, L.E.; Buffière, C.; Istas, G.; Dufour, C.; Le Bourvellec, C.; Mercier, S.; Bayle, D. et al., 2020. « Effects of the Apple Matrix on the Postprandial Bioavailability of Flavan-3-Ols and

- Nutrigenomic Response of Apple Polyphenols in Minipigs Challenged with a High Fat Meal ». *Food & Function* 11 (6): 5077-90. DOI : 10.1039/D0FO00346H.
- Moraes, A.C.F. de; Fernandes, G.R.; da Silva, I.S.; Almeida-Pititto, B.; Gomes, E.P.; Pereira, A. da C. Ferreira, S.R.G., 2017. « Enterotype May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. DOI : 10.3389/fcimb.2017.00047.
- Morand, C. et Milenkovic, C., 2014. « Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire ». *Innovations Agronomiques* 42: 47-62.
- Najmanová, I.; Pourová, J.; Vopršalová, M.; Pilařová, V.; Semecký, V.; Nováková, L. et Mladěnka, P., 2016. « Flavonoid Metabolite 3-(3-Hydroxyphenyl)Propionic Acid Formed by Human Microflora Decreases Arterial Blood Pressure in Rats: Mol. Nutr. Food Res ». *Molecular Nutrition & Food Research* 60 (5): 981-91. DOI : 10.1002/mnfr.201500761.
- Nanjo, F.; Goto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M. et Hara, Y., 1996. « Scavenging Effects of Tea Catechins and Their Derivatives on 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radical ». *Free Radical Biology and Medicine* 21 (6): 895-902. DOI : 10.1016/0891-5849(96)00237-7.
- Nayfach, S.; Fischbach, M.A. et Pollard, K.S., 2015. « MetaQuery: A Web Server for Rapid Annotation and Quantitative Analysis of Specific Genes in the Human Gut Microbiome ». *Bioinformatics* 31 (20): 3368-70. DOI : 10.1093/bioinformatics/btv382.
- Nehlig, A., 2013. « The Neuroprotective Effects of Cocoa Flavanol and Its Influence on Cognitive Performance: Cocoa Flavanol and Cognition ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 75 (3): 716-27. DOI : 10.1111/j.1365-2125.2012.04378.x.
- Neveu, V.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D. et Scalbert, A., 2010. « Phenol-Explorer: An Online Comprehensive Database on Polyphenol Contents in Foods » Database, 2010. DOI : 10.1093/database/bap024.
- Neyrinck, A.M.; Van Hée, V.F.; Bindels, L.B.; De Backer, F.; Cani, P.D. et Delzenne, N.M., 2013. « Polyphenol-Rich Extract of Pomegranate Peel Alleviates Tissue Inflammation and Hypercholesterolaemia in High-Fat Diet-Induced Obese Mice: Potential Implication of the Gut Microbiota ». *British Journal of Nutrition* 109 (5): 802-9. DOI : 10.1017/S0007114512002206.
- Nicholson, J.K.; Holmes, E.; Kinross, J.; Burcelin, R.; Gibson, G.; Jia, W. et Pettersson, S., 2012. « Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions ». *Science* 336 (6086): 1262-67. DOI : 10.1126/science.1223813.
- Nishiwaki, H.; Ito, M.; Ishida, T.; Hamaguchi, T.; Maeda, T.; Kashihara, K.; Tsuboi, Y. et al., 2020. « META-ANALYSIS of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease ». *Movement Disorders* 35 (9): 1626-35. DOI : 10.1002/mds.28119.
- Noreen, Y.; Serrano, G.; Perera, P. et Bohlin, L., 1998. « Flavan-3-Ols Isolated from Some Medicinal Plants Inhibiting COX-1 and COX-2 Catalysed Prostaglandin Biosynthesis ». *Planta Medica* 64 (06): 520-24. DOI : 10.1055/s-2006-957506.
- Otaki, N.; Kimira, M.; Katsumata, S.; Uehara, M.; Watanabe, S. et Suzuki, K., 2009. « Distribution and Major Sources of Flavonoid Intakes in the Middle-Aged Japanese Women ». *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 44 (3): 231-38. DOI : 10.3164/jcfn.08-231.
- Ottaviani, J.I.; Momma, T.Y.; Heis, C.; Kwik-Urbe, C.; Schroeter, H. et Keen, C.L., 2011. « The Stereochemical Configuration of Flavanols Influences the Level and Metabolism of Flavanols in Humans and Their Biological Activity in Vivo ». *Free Radical Biology & Medicine* 50 : 237-244. DOI : 10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.005.
- Ottaviani, J.I.; Balz, M.; Kimball, J.; Ensunsa, J.L.; Fong, R.; Momma, T.Y.; Kwik-Urbe, C.; Schroeter, H. et Keen, C.L., 2015. « Safety and Efficacy of Cocoa Flavanol Intake in Healthy Adults: A Randomized, Controlled, Double-Masked Trial ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 102 (6): 1425-35. DOI : 10.3945/ajcn.115.116178.
- Ottaviani, J.I.; Borges, G.; Momma, T.Y.; Spencer, J.P.E.; Keen, C.L.; Crozier, A. et Schroeter, H., 2016. « The Metabolome of [2-14C](–)-Epicatechin in Humans: Implications for the Assessment of

- Efficacy, Safety and Mechanisms of Action of Polyphenolic Bioactives ». *Scientific Reports* 6 (1): 29034. DOI : 10.1038/srep29034.
- Ottaviani, J.I.; Britten, A.; Lucarelli, D.; Luben, R.; Mulligan, A.A.; Lentjes, M.A.; Fong, R. et al., 2020. « Biomarker-Estimated Flavan-3-Ol Intake Is Associated with Lower Blood Pressure in Cross-Sectional Analysis in EPIC Norfolk ». *Scientific Reports* 10 (1): 17964. DOI : 10.1038/s41598-020-74863-7.
- Ottaviani, J.I.; Fong, R.; Kimball, J.; Ensunsa, J.L.; Britten, A.; Lucarelli, D.; Luben, R. et al., 2018. « Evaluation at Scale of Microbiome-Derived Metabolites as Biomarker of Flavan-3-Ol Intake in Epidemiological Studies ». *Scientific Reports* 8 (1): 9859. DOI : 10.1038/s41598-018-28333-w.
- Ottaviani, J.I.; Kwik-Urbe, C.; Keen, C.L. et Schroeter, H., 2012. « Intake of Dietary Procyanidins Does Not Contribute to the Pool of Circulating Flavanols in Humans ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 95 (4): 851-58. DOI : 10.3945/ajcn.111.028340.
- Ou, K.; Sarnoski, P.; Schneider, K.R.; Song, K.; Khoo, C. et Gu, L., 2014. « Microbial Catabolism of Procyanidins by Human Gut Microbiota ». *Mol. Nutr. Food Res.*, 58 : 2196-2205. DOI : 10.1002/mnfr.201400243.
- Ozidal, T.; Sela, D.A.; Xiao, J.; Boyacioglu, D.; Chen, F. et Capanoglu, E., 2016. « The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility ». *Nutrients* 8 (2): 78. DOI : 10.3390/nu8020078.
- Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A. et Parkhill, J., 2015. « Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis ». *Bioinformatics* 31 (22): 3691-93. DOI : 10.1093/bioinformatics/btv421.
- Palmer, T., et Stansfeld, P.J., 2020. « Targeting of Proteins to the Twin-arginine Translocation Pathway ». *Molecular Microbiology* 113 (5): 861-71. DOI : 10.1111/mmi.14461.
- Parkar, S.G.; Stevenson, D.E. et Skinner, M.A., 2008. « The Potential Influence of Fruit Polyphenols on Colonic Microflora and Human Gut Health ». *International Journal of Food Microbiology* 124 (3): 295-98. DOI : 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.017.
- Parks, D.H.; Imelfort, M.; Skennerton, C.T.; Hugenholtz, P. et Tyson, G.W., 2015. « CheckM: Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered from Isolates, Single Cells, and Metagenomes ». *Genome Research* 25 (7): 1043-55. DOI : 10.1101/gr.186072.114.
- Pascual-Teresa, S. de; Santos-Buelga, C. et Rivas-Gonzalo, J.C., 2000. « Quantitative Analysis of Flavan-3-Ols in Spanish Foodstuffs and Beverages ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5331-37. DOI : 10.1021/jf000549h.
- Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P. et Scalbert, A., 2011. « Dietary Intake of 337 Polyphenols in French Adults ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 93 (6): 1220-28. DOI : 10.3945/ajcn.110.007096.
- Prior, R.L. et Gu, L., 2005. « Occurrence and Biological Significance of Proanthocyanidins in the American Diet ». *Phytochemistry* 66 (18): 2264-80. DOI : 10.1016/j.phytochem.2005.03.025.
- Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T. et al., 2010. « A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59-65. DOI : 10.1038/nature08821.
- Queipo-Ortuño, M.I.; Boto-Ordóñez, M.; Murri, M.; Gomez-Zumaquero, J.M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R.; Diaz, F.C.; Andrés-Lacueva, C. et Tinahones, F.J., 2012. « Influence of Red Wine Polyphenols and Ethanol on the Gut Microbiota Ecology and Biochemical Biomarkers ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 95 (6): 1323-34. DOI : 10.3945/ajcn.111.027847.
- Quercia, S.; Candela, M.; Giuliani, C.; Turrioni, S.; Luiselli, D.; Rampelli, S.; Brigidi, P. et al., 2014. « From lifetime to evolution: timescales of human gut microbiota adaptation ». *Frontiers in Microbiology* 5 (novembre). DOI : 10.3389/fmicb.2014.00587.
- Rajilić-Stojanović, M.; Heilig, H.G.H.J.; Tims, S.; Zoetendal, E.G. et de Vos, W.M., 2013. « Long-Term Monitoring of the Human Intestinal Microbiota Composition: Long-Term Monitoring of the

Références bibliographiques

- Human Intestinal Microbiota ». *Environmental Microbiology* 15 (4): 1146-59. DOI : 10.1111/1462-2920.12023.
- Rane, H.S.; Bernardo, S.M.; Howell, A.B. et Lee, S.A., 2014. « Cranberry-Derived Proanthocyanidins Prevent Formation of *Candida Albicans* Biofilms in Artificial Urine through Biofilm- and Adherence-Specific Mechanisms ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (2): 428-36. DOI : 10.1093/jac/dkt398.
- Ras, R.T.; Zock, P.L. et Draijer, R., 2011. « Tea Consumption Enhances Endothelial-Dependent Vasodilation; a Meta-Analysis ». *PLoS ONE* 6 (3): e16974. DOI : 10.1371/journal.pone.0016974.
- Rechner, A., 2004. « Colonic Metabolism of Dietary Polyphenols: Influence of Structure on Microbial Fermentation Products ». *Free Radical Biology and Medicine* 36 (2): 212-25. DOI : 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022.
- Ren, J.; Jiaqi, A.; Mengyuan, C.; Haiyue, Y. et Yuxia, M., 2021. « Effect of Proanthocyanidins on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials », 35. *Pharmacological Research* 165. DOI : 10.1016/j.phrs.2020.105329.
- Ribić, R.; Meštrović, T.; Neuberg, M. et Kozina, G., 2018. « Effective anti-adhesives of uropathogenic *Escherichia coli* ». *Acta Pharmaceutica* 68 (1): 1-18. DOI : 10.2478/acph-2018-0004.
- Robbins, R.J.; Leonczak, J.; Johnson, J.C.; Li, J.; Kwik-Urbe, C.; Prior, R.L. et Gu, L., 2009. « Method Performance and Multi-Laboratory Assessment of a Normal Phase High Pressure Liquid Chromatography–Fluorescence Detection Method for the Quantitation of Flavanols and Procyanidins in Cocoa and Chocolate Containing Samples ». *Journal of Chromatography A* 1216 (24): 4831-40. DOI : 10.1016/j.chroma.2009.04.006.
- Rodriguez-Mateos, A.; Toro-Funes, N.; Cifuentes-Gomez, T.; Cortese-Krott, M.; Heiss, C. et Spencer, J.P.E., 2014. « Uptake and Metabolism of (–)-Epicatechin in Endothelial Cells ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559 (octobre): 17-23. DOI : 10.1016/j.abb.2014.03.014.
- Roowi, S.; Stalmach, A.; Mullen, W.; Lean, M.E.J.; Edwards, C.A. et Crozier, A., 2010. « Green Tea Flavan-3-Ols: Colonic Degradation and Urinary Excretion of Catabolites by Humans ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2): 1296-1304. DOI : 10.1021/jf9032975.
- Rupasinghe, H.P.V.; Parmar, I. et Neir, S.V., 2019. « Biotransformation of Cranberry Proanthocyanidins to Probiotic Metabolites by *Lactobacillus Rhamnosus* Enhances Their Anticancer Activity in HepG2 Cells *In Vitro* ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (juin): 1-14. DOI : 10.1155/2019/4750795.
- Sadeghi Ekbatan, S.; Sleno, L.; Sabally, K.; Khairallah, J.; Azadi, B.; Rodes, L.; Prakash, S.; Donnelly, D.J. et Kubow, S., 2016. « Biotransformation of Polyphenols in a Dynamic Multistage Gastrointestinal Model ». *Food Chemistry* 204 (août): 453-62. DOI : 10.1016/j.foodchem.2016.02.140.
- Sánchez-Patán, F.; Barroso, E.; Van de Wiele, T.; Jiménez-Girón, A.; Martín-Alvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V.; Martínez-Cuesta, M.C.; Peláez, C.; Requena, T. et Bartolomé, B., 2015. « Comparative *In Vitro* Fermentations of Cranberry and Grape Seed Polyphenols with Colonic Microbiota ». *Food Chemistry* 183 (septembre): 273-82. DOI : 10.1016/j.foodchem.2015.03.061.
- Sánchez-Patán, F.; Cueva, C.; Monagas, M.; Walton, G.E.; Gibson, G.R.; Martín-Álvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V. et Bartolomé, B., 2012. « Gut Microbial Catabolism of Grape Seed Flavan-3-Ols by Human Faecal Microbiota. Targetted Analysis of Precursor Compounds, Intermediate Metabolites and End-Products ». *Food Chemistry* 131 (1): 337-47. DOI : 10.1016/j.foodchem.2011.08.011.
- Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.M. et Escribano-Bailón, M.T., 1995. « Comparative Flavan-3-Ol Composition of Seeds from Different Grape Varieties ». *Food Chemistry* 53 (2): 197-201. DOI : 10.1016/0308-8146(95)90788-9.
- Sargent, F., 1998. « Overlapping Functions of Components of a Bacterial Sec-Independent Protein Export Pathway ». *The EMBO Journal* 17 (13): 3640-50. DOI : 10.1093/emboj/17.13.3640.

- Saunders, E.; Pukall, R.; Abt, B.; Lapidus, A.; Del Rio, T.G.; Copeland, A.; Tice, H. et al., 2009. « Complete Genome Sequence of Eggerthella Lenta Type Strain (IPP VPI 0255T) ». *Standards in Genomic Sciences* 1 ((2)): 174-82. DOI : 10.4056/sigs.33592.
- Saura-Calixto, F.; Pérez-Jiménez, J.; Touriño, S.; Serrano, J.; Fuguet, E.; Torres, J.L. et Goñi, I., 2010. « Proanthocyanidin Metabolites Associated with Dietary Fibre from in Vitro Colonic Fermentation and Proanthocyanidin Metabolites in Human Plasma ». *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (7): 939-46. DOI : 10.1002/mnfr.200900276.
- Saura-Calixto, F.; Serrano, J. et Goñi, I., 2007. « Intake and Bioaccessibility of Total Polyphenols in a Whole Diet ». *Food Chemistry* 101 (2): 492-501. DOI : 10.1016/j.foodchem.2006.02.006.
- Scalbert, A., 1991. « Antimicrobial Properties of Tannins ». *Phytochemistry* 30 (12): 3875-83. DOI : 10.1016/0031-9422(91)83426-L.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. et Jiménez, L., 2005. « Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (4): 287-306. DOI : 10.1080/1040869059096.
- Scalbert, A. et Williamson, G., 2000. « Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols ». *The Journal of Nutrition* 130 (8): 2073S-2085S. DOI : 10.1093/jn/130.8.2073S.
- Schaffer, S. et Halliwell, B., 2012. « Do Polyphenols Enter the Brain and Does It Matter? Some Theoretical and Practical Considerations ». *Genes & Nutrition* 7 (2): 99-109. DOI : 10.1007/s12263-011-0255-5.
- Schmieder, R. et Edwards, R., 2011. « Quality Control and Preprocessing of Metagenomic Datasets ». *Bioinformatics* 27 (6): 863-64. DOI : 10.1093/bioinformatics/btr026.
- Schneider, H. et Blaut, M., 2000. « Anaerobic degradation of flavonoids by Eubacterium ramulus ». *Archives of Microbiology* 173 (1): 71-75. DOI : 10.1007/s002030050010.
- Schoefer, L.; Braune, A. et Blaut, M., 2004. « Cloning and Expression of a Phloretin Hydrolase Gene from Eubacterium Ramulus and Characterization of the Recombinant Enzyme ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 6131-37. DOI : 10.1128/AEM.70.10.6131-6137.2004.
- Schoefer, L.; Mohan, R.; Schwiertz, A.; Braune, A. et Blaut, M., 2003. « Anaerobic Degradation of Flavonoids by Clostridium Orbiscindens ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (10): 5849-54. DOI : 10.1128/AEM.69.10.5849-5854.2003.
- Seemann, T., 2014. « Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation ». *Bioinformatics* 30 (14): 2068-69. DOI : 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sei-ichi, K.; Toda, K.; Matsumoto, K.; Ishihara, C.; Nonobe, S.; Matsunaga, C.; Gomi, Y.K. et al., 2019. « Isolation and Characterization of a Novel Oligomeric Proanthocyanidin with Significant Anti-Cancer Activities from Grape Stems (Vitis Vinifera) ». *Scientific Reports* 9 (1): 12046. DOI : 10.1038/s41598-019-48603-5.
- Selma, M.V.; Espín, J.C. et Tomás-Barberán, F.A., 2009. « Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15): 6485-6501. DOI : 10.1021/jf902107d.
- Selma, M.V.; Romo-Vaquero, M.; García-Villalba, R.; González-Sarrías, A.; Tomás-Barberán, F.A. et Espín, J.C., 2016. « The Human Gut Microbial Ecology Associated with Overweight and Obesity Determines Ellagic Acid Metabolism ». *Food & Function* 7 (4): 1769-74. DOI : 10.1039/C5FO01100K.
- Serra, A.; Macià, A.; Romero, M.P.; Reguant, J.; Ortega N. et Motilva, M.J., 2012. « Metabolic Pathways of the Colonic Metabolism of Flavonoids (Flavonols, Flavones and Flavanones) and Phenolic Acids ». *Food Chemistry*, 130 : 383-393. DOI : 10.1016/j.foodchem.2011.07.055.
- Serra, A.; Macià, A.; Romero, M.P.; Anglés, N.; Morelló, J.R. et Motilva, M.J., 2011. « Metabolic Pathways of the Colonic Metabolism of Procyanidins (Monomers and Dimers) and Alkaloids ». *Food Chemistry* 126 (3): 1127-37. DOI : 10.1016/j.foodchem.2010.11.145.

Références bibliographiques

- Shen, L.; Song, L.G.; Ma, H.; Jin, C.N.; Wang, J.A. et Xiang, M.X., 2012. « Tea Consumption and Risk of Stroke: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies ». *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 13 (8): 652-62. DOI : 10.1631/jzus.B1201001.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R. et al., 2011. « Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega ». *Molecular Systems Biology* 7 (1): 539. DOI : 10.1038/msb.2011.75.
- Spencer, J.P.E.; Chaudry, F.; Pannala, A.S.; Srai, S.K.; Debnam, E. et Rice-Evans, C., 2000. « Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu ». *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 272 (1): 236-241. DOI : 10.1006/bbrc.2000.2749.
- Stalmach, A.; Edwards, C.A.; Wightman, J.D. et Crozier, A., 2013. « Colonic Catabolism of Dietary Phenolic and Polyphenolic Compounds from Concord Grape Juice ». *Food Funct.* 4 (1): 52-62. DOI : 10.1039/C2FO30151B.
- Stalmach, A.; Mullen, W.; Steiling, H.; Williamson, G.; Lean, M.E.J. et Crozier, A., 2010. « Absorption, Metabolism, and Excretion of Green Tea Flavan-3-Ols in Humans with an Ileostomy ». *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (3): 323-34. DOI : 10.1002/mnfr.200900194.
- Stewart, 1997. « Microorganisms in hindgut fermentors ». *Gastrointestinal microbiology* 2: 142-86.
- Stoupi, S.; Williamson, G.; Drynan, J.W.; Barron, D. et Clifford, M.N., 2010a. « A Comparison of the *in Vitro* Biotransformation of (-)-Epicatechin and Procyanidin B2 by Human Faecal Microbiota ». *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (6): 747-59. DOI : 10.1002/mnfr.200900123.
- . 2010b. « Procyanidin B2 Catabolism by Human Fecal Microflora: Partial Characterization of 'Dimeric' Intermediates ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501 (1): 73-78. DOI : 10.1016/j.abb.2010.02.009.
- Sun, W. et Miller, J.M., 2003. « Tandem Mass Spectrometry of the B-Type Procyanidins in Wine and B-Type Dehydrocatechins in an Autoxidation Mixture of (+)-Catechin and (?)-Epicatechin ». *Journal of Mass Spectrometry* 38 (4): 438-46. DOI : 10.1002/jms.456.
- Tabasco, R.; Sánchez-Patán, F.; Monagas, M.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V.; Peláez, C. et Requena, C., 2011. « Effect of Grape Polyphenols on Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Growth: Resistance and Metabolism ». *Food Microbiology* 28 : 1345-1352. DOI : 10.1016/j.fm.2011.06.005.
- Tai, B.H.; Trung, T.N.; Nhiem, N.X.; Ha, D.T.; Men, C.V.; Duong, V.B.; Luong, H.V.; Song, S.; Bae, K. et Kim, Y.H., 2011. « A New Flavan-3-Ol and the Anti-Inflammatory Effect of Flavonoids from the Fruit Peels of *Wisteria Floribunda* ». *Journal of Asian Natural Products Research* 13 (11): 1061-68. DOI : 10.1080/10286020.2011.603306.
- Takagaki, A.; Kato, Y. et Nanjo, F., 2014. « Isolation and Characterization of Rat Intestinal Bacteria Involved in Biotransformation of (-)-Epigallocatechin ». *Archives of Microbiology* 196 (10): 681-95. DOI : 10.1007/s00203-014-1006-y.
- Takagaki, A.; et Nanjo, F. 2010. « Metabolism of (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat Intestinal Flora », *J. Agric. Food Chem.* 58 : 1313-1321. DOI : 10.1021/jf903375s.
- . 2013. « Catabolism of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin by Rat Intestinal Microbiota ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (20): 4927-35. DOI : 10.1021/jf304431v.
- . 2015a. « Bioconversion of (-)-Epicatechin, (+)-Epicatechin, (-)-Catechin, and (+)-Catechin by (-)-Epigallocatechin-Metabolizing Bacteria ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38 (5): 789-94. DOI : 10.1248/bpb.b14-00813.
- . 2015b. « Biotransformation of (-)-Epicatechin, (+)-Epicatechin, (-)-Catechin, and (+)-Catechin by Intestinal Bacteria Involved in Isoflavone Metabolism ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80 (1): 199-202. DOI : 10.1080/09168451.2015.1079480.
- . 2015c. « Biotransformation of (-)-Epigallocatechin and (-)-Gallocatechin by Intestinal Bacteria Involved in Isoflavone Metabolism ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38 (2): 325-30. DOI : 10.1248/bpb.b14-00646.

Références bibliographiques

- Tamanai-Shacoori, Z.; Smida, I.; Bousarghin, L.; Loreal, O.; Meuric, V.; Fong, S.B.; Bonnaure-Mallet, M. et Jolivet-Gougeon, A., 2017. « *Roseburia* Spp.: A Marker of Health? » *Future Microbiology* 12 (2): 157-70. DOI : 10.2217/fmb-2016-0130.
- Tarascou, I.; Souquet, J.M.; Mazauric, J.P.; Carrillo, S.; Coq, S.; Canon, F.; Fulcrand, H. et Cheynier, V., 2010. « The Hidden Face of Food Phenolic Composition ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501 (1): 16-22. DOI : 10.1016/j.abb.2010.03.018.
- Tasse, L.; Bercovici, J.; Pizzut-Serin, S.; Robe, P.; Tap, J.; Klopp, C.; Cantarel, B.L. et al., 2010. « Functional Metagenomics to Mine the Human Gut Microbiome for Dietary Fiber Catabolic Enzymes ». *Genome Research* 20 (11): 1605-12. DOI : 10.1101/gr.108332.110.
- Theriot, C.M. et Young, V.B., 2015. « Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium Difficile* ». *Annual Review of Microbiology* 69 (1): 445-61. DOI : 10.1146/annurev-micro-091014-104115.
- Thursby, E. et Juge, N., 2017. « Introduction to the Human Gut Microbiota ». *Biochemical Journal* 474 (11): 1823-36. DOI : 10.1042/BCJ20160510.
- Tomás-Barberán, F.A.; González-Sarrías, A.; García-Villalba, R.; Núñez-Sánchez, M.A.; Selma, M.V.; García-Conesa, M.T. et Espín, J.C., 2017. « Urolithins, the Rescue of “Old” Metabolites to Understand a “New” Concept: Metabotypes as a Nexus among Phenolic Metabolism, Microbiota Dysbiosis, and Host Health Status ». *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (1): 1500901. DOI : 10.1002/mnfr.201500901.
- Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V. et Espín, J.C., 2016. « Interactions of Gut Microbiota with Dietary Polyphenols and Consequences to Human Health ». *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 19 (6): 471-76. DOI : 10.1097/MCO.0000000000000314.
- Tremaroli, V. et Bäckhed, F., 2012. « Functional Interactions between the Gut Microbiota and Host Metabolism ». *Nature* 489 (7415): 242-49. DOI : 10.1038/nature11552.
- Tsao, R.; Yang, R.; Young, J.C. et Zhu, H., 2003. « Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (21): 6347-53. DOI : 10.1021/jf0346298.
- Tzounis, X.; Vulevic, J.; Kuhnle, G.G.C.; George, T.; Leonczak, J.; Gibson, G.R.; Kwik-Urbe, C. et Spencer, J.P.E., 2008. « Flavanol Monomer-Induced Changes to the Human Faecal Microflora ». *British Journal of Nutrition* 99 (4): 782-92. DOI : 10.1017/S0007114507853384.
- Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M. et González, S., 2015. « The Relationship between Phenolic Compounds from Diet and Microbiota: Impact on Human Health ». *Food & Function* 6 (8): 2424-39. DOI : 10.1039/C5FO00322A.
- Vieira-Silva, S.; Falony, G.; Belda, E.; Nielsen, T.; Aron-Wisnewsky, J.; Chakaroun, R.; Forslund, S.K. et al., 2020. « Statin Therapy Is Associated with Lower Prevalence of Gut Microbiota Dysbiosis ». *Nature* 581 (7808): 310-15. DOI : 10.1038/s41586-020-2269-x.
- Vieira-Silva, S.; Sabino, J.; Valles-Colomer, M.; Falony, G.; Kathagen, G.; Caenepeel, C.; Cleynen, I.; van der Merwe, S.; Vermeire, S. et Raes, J., 2019. « Quantitative Microbiome Profiling Disentangles Inflammation- and Bile Duct Obstruction-Associated Microbiota Alterations across PSC/IBD Diagnoses ». *Nature Microbiology* 4 (11): 1826-31. DOI : 10.1038/s41564-019-0483-9.
- Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.M. et García-Parrilla, M.C., 2007. « Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds towards DPPH Free Radical ». *Talanta* 71 (1): 230-35. DOI : 10.1016/j.talanta.2006.03.050.
- Voreades, N.; Kozil, A. et Weir, T.L., 2014. « Diet and the development of the human intestinal microbiome ». *Frontiers in Microbiology* 5 (septembre). DOI : 10.3389/fmicb.2014.00494.
- Vostalova, J.; Vidlar, A.; Simanek, V.; Galandakova, A.; Kosina, P.; Vacek, J.; Vrbkova, J.; Zimmermann, B.F.; Ulrichova, J. et Student, V., 2015. « Are High Proanthocyanidins Key to Cranberry Efficacy in the Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection?: Are High PAC Key to Cranberry Efficacy in the Prevention RUTI? » *Phytotherapy Research* 29 (10): 1559-67. DOI : 10.1002/ptr.5427.
- Wang, L.Q.; Meselhy, M.R.; Li, Y.; Nakamura, N.; Min, B.S.; Qin, G.W. et Hattori, M., 2001. « The Heterocyclic Ring Fission and Dehydroxylation of Catechins and Related Compounds by

- Eubacterium Sp. Strain SDG-2, a Human Intestinal Bacterium. » *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 49 (12): 1640-43. DOI : 10.1248/cpb.49.1640.
- Wang, ZM.; Zhou, B.; Wang, YS.; Gong, QY.; Wang, QM.; Yan, JJ.; Gao, W. et Wang, LS., 2011. « Black and Green Tea Consumption and the Risk of Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis ». *American Journal of Clinical Nutrition* 93 (3): 506-15. DOI : 10.3945/ajcn.110.005363.
- WatreLOT, A.A.; Renard, C.M.G.C. et Le Bourvellec, C., 2015. « Comparison of Microcalorimetry and Haze Formation to Quantify the Association of B-Type Procyanidins to Poly-l-Proline and Bovine Serum Albumin ». *LWT - Food Science and Technology* 63 (1): 376-82. DOI : 10.1016/j.lwt.2015.03.064.
- Wiese, S.; Esatbeyoglu, T.; Winterhalter, P.; Kruse, HP.; Winkler, S.; Bub, A. et Kulling, S.E., 2015. « Comparative Biokinetics and Metabolism of Pure Monomeric, Dimeric, and Polymeric Flavan-3-Ols: A Randomized Cross-over Study in Humans ». *Molecular Nutrition & Food Research* 59 (4): 610-21. DOI : 10.1002/mnfr.201400422.
- Williamson, G. et Clifford, M.N., 2010. « Colonic Metabolites of Berry Polyphenols: The Missing Link to Biological Activity? ». *British Journal of Nutrition* 104 (S3): S48-66. DOI : 10.1017/S0007114510003946.
- Winter, S.E. et Bäumlér, A.J., 2014. « Dysbiosis in the Inflamed Intestine: Chance Favors the Prepared Microbe ». *Gut Microbes* 5 (1): 71-73. DOI : 10.4161/gmic.27129.
- Wisnuwardani, R.W.; Henauw, S. De; Androustos, O.; Forsner, M.; Gottrand, F.; Huybrechts, I.; Knaze, V. et al., 2018. « Estimated Dietary Intake of Polyphenols in European Adolescents: The HELENA Study ». *European Journal of Nutrition* 58 (6): 2345-63. DOI : 10.1007/s00394-018-1787-x.
- Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, YY.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M. et al., 2011. « Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes ». *Science* 334 (6052): 105-8. DOI : 10.1126/science.1208344.
- Wu, Q.; Li, S.; Xiao, J.; Sui, Y.; Xie, B. et Sun, Z., 2017. « Analysis of Distribution and Pharmacokinetics of Litchi Pericarp Procyanidins in Rat Plasma and Organs by Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *European Food Research and Technology* 243 (1): 167-76. DOI : 10.1007/s00217-016-2733-x.
- Xiao, Y.; Hu, Z.; Yin, Z.; Zhou, Y.; Liu, T.; Zhou, X. et Chang, D., 2017. « Profiling and Distribution of Metabolites of Procyanidin B2 in Mice by UPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn Technique ». *Frontiers in Pharmacology* 8 (mai): 231. DOI : 10.3389/fphar.2017.00231.
- Xicota, L.; Rodriguez-Morato, J.; Dierssen, M. et de la Torre, R., 2016. « Potential Role of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in the Secondary Prevention of Alzheimer Disease ». *Current Drug Targets* 18 (2): 174-95. DOI : 10.2174/1389450116666150825113655.
- Xu, Z.; Wei, LH.; Ge, ZZ.; Zhu, W. et Li, CM., 2015. « Comparison of the Degradation Kinetics of A-Type and B-Type Proanthocyanidins Dimers as a Function of PH and Temperature ». *European Food Research and Technology* 240 (4): 707-17. DOI : 10.1007/s00217-014-2375-9.
- Yang, C.S.; Chung, J.Y.; Yang, GY.; Chhabra, S.K. et Lee, MJ., 2000. « Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention ». *The Journal of Nutrition* 130 (2): 472S-478S. DOI : 10.1093/jn/130.2.472S.
- Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.A.; Hémon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A. et al., 2016. « Dietary Polyphenol Intake in Europe: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study ». *European Journal of Nutrition* 55 (4): 1359-75. DOI : 10.1007/s00394-015-0950-x.
- Zhang, X.; Zhu, X.; Sun, Y.; Hu, B.; Sun, Y.; Jabbar, S. et Zeng, X., 2013. « Fermentation in Vitro of EGCG, GCG and EGCG³Me Isolated from Oolong Tea by Human Intestinal Microbiota ». *Food Research International* 54 (2): 1589-95. DOI : 10.1016/j.foodres.2013.10.005.
- Zhang, X.; Zhang, D.; Jia, H.; Feng, Q.; Wang, D.; Liang, D.; Wu, X. et al., 2015. « The Oral and Gut Microbiomes Are Perturbed in Rheumatoid Arthritis and Partly Normalized after Treatment ». *Nature Medicine* 21 (8): 895-905. DOI : 10.1038/nm.3914.

Références bibliographiques

Zhou, K., 2017. « Strategies to Promote Abundance of Akkermansia Muciniphila, an Emerging Probiotics in the Gut, Evidence from Dietary Intervention Studies ». *Journal of Functional Foods* 33: 194-201. DOI : 10.1016/j.jff.2017.03.045.

Annexes

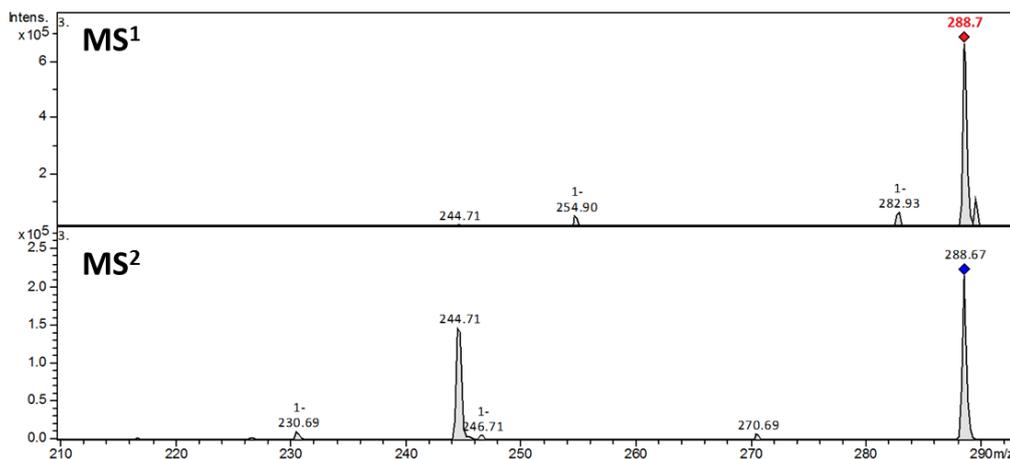


Figure A1. Spectres de masse en mode négatif de la (+)-catéchine. En haut, détection des molécules par spectrométrie de masse. En bas, spectre de masse après fragmentation de l'ion parental 288,7 m/z ((+)-catéchine).

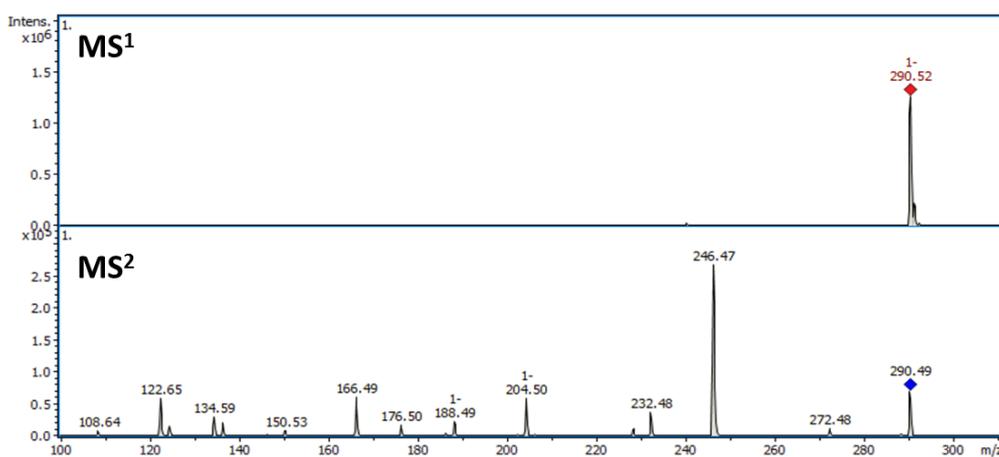


Figure A2. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Ac. En haut, détection des molécules par spectrométrie de masse. En bas, spectre de masse après fragmentation de l'ion parental 290,52 m/z (métabolite Ac).

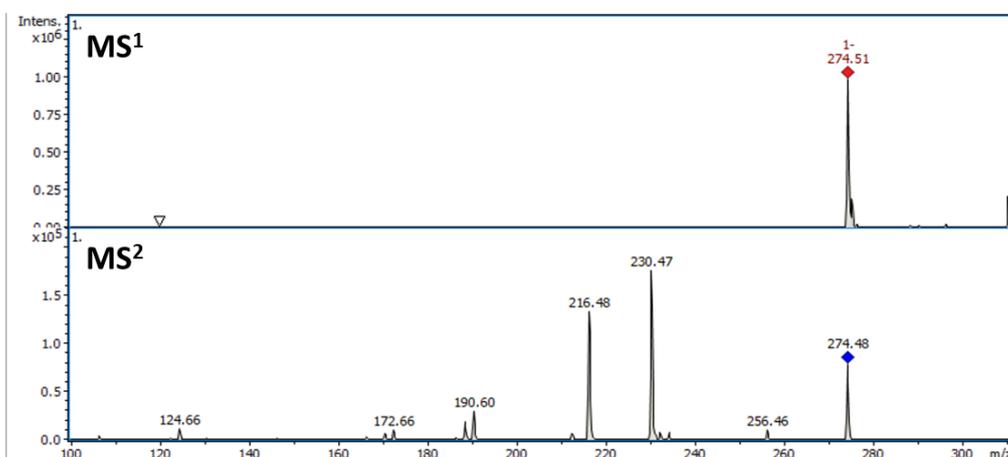


Figure A3. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Bc. En haut, détection des molécules par spectrométrie de masse. En bas, spectre de masse après fragmentation de l'ion parental 274,51 m/z (métabolite Bc).

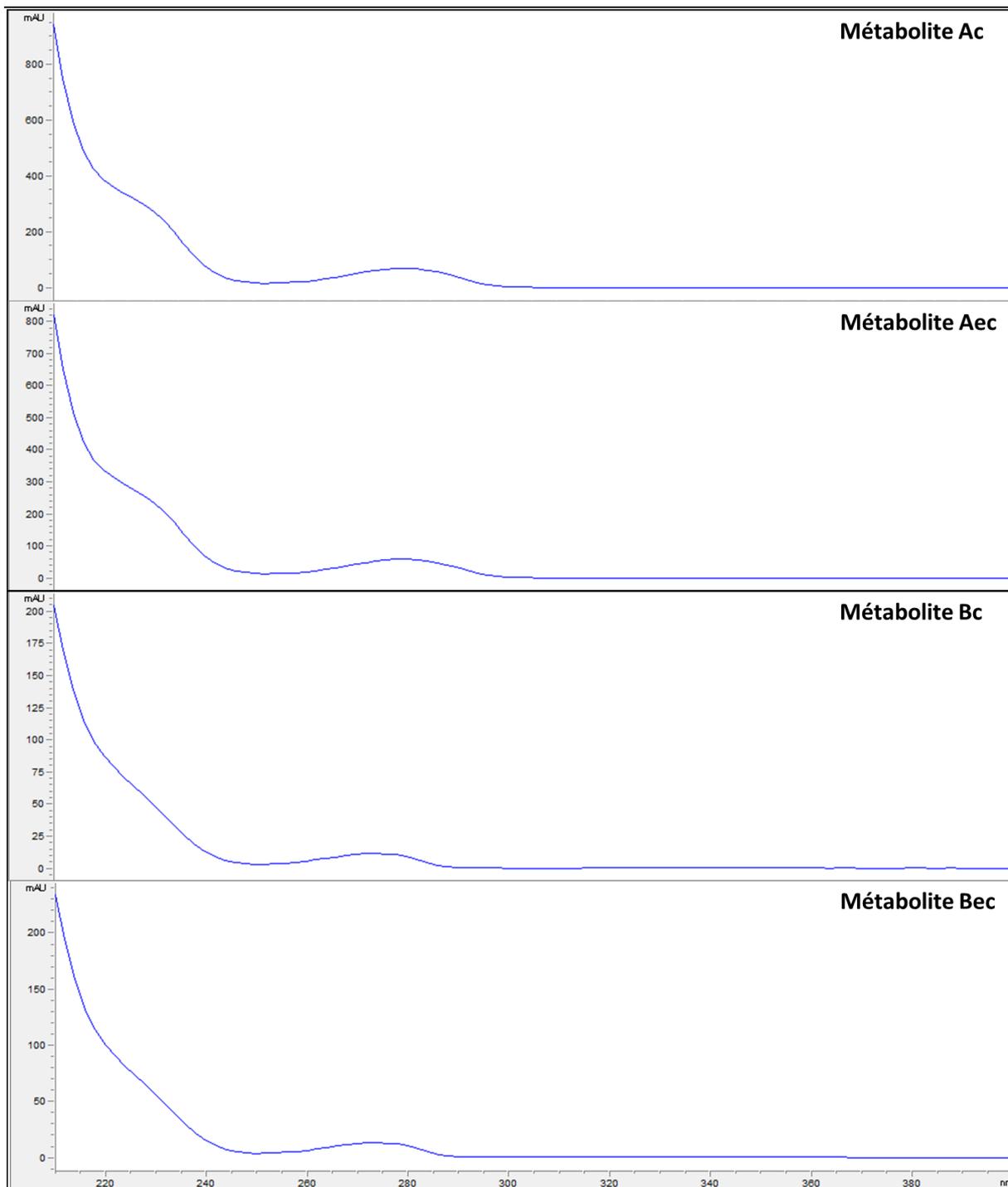


Figure A4. Spectres d'absorbance des métabolites A et B. L'absorbance a été mesurée entre 200 et 400 nm et exprimée en mAU (unité arbitraire).

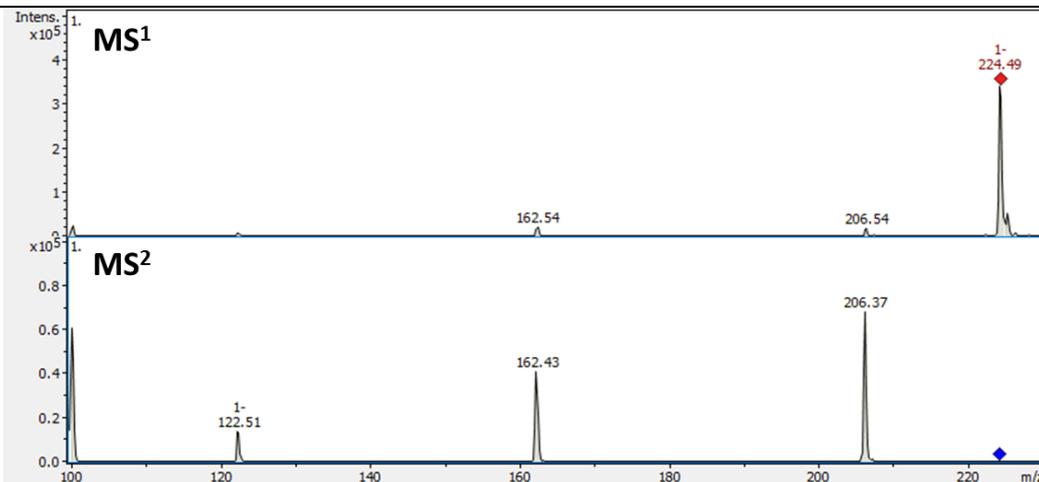


Figure A5. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Cc. En haut, détection de molécules par spectrométrie de masse. En bas, spectre de masse après fragmentation de l'ion parental 224,49 m/z (métabolite Cc).

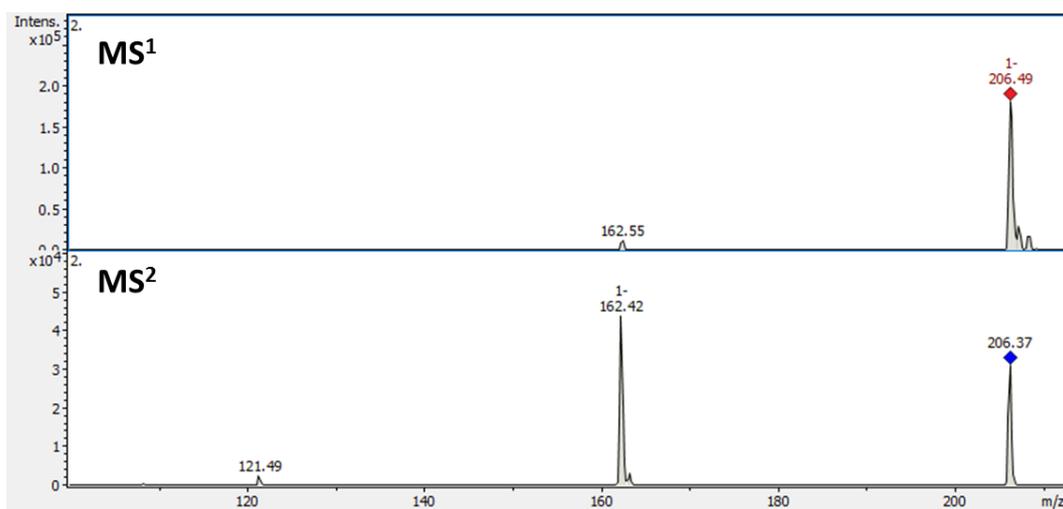


Figure A6. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Dc. En haut, détection des molécules par spectrométrie de masse. En bas, spectre de masse après fragmentation de l'ion parental 206,49 m/z (métabolite Dc).

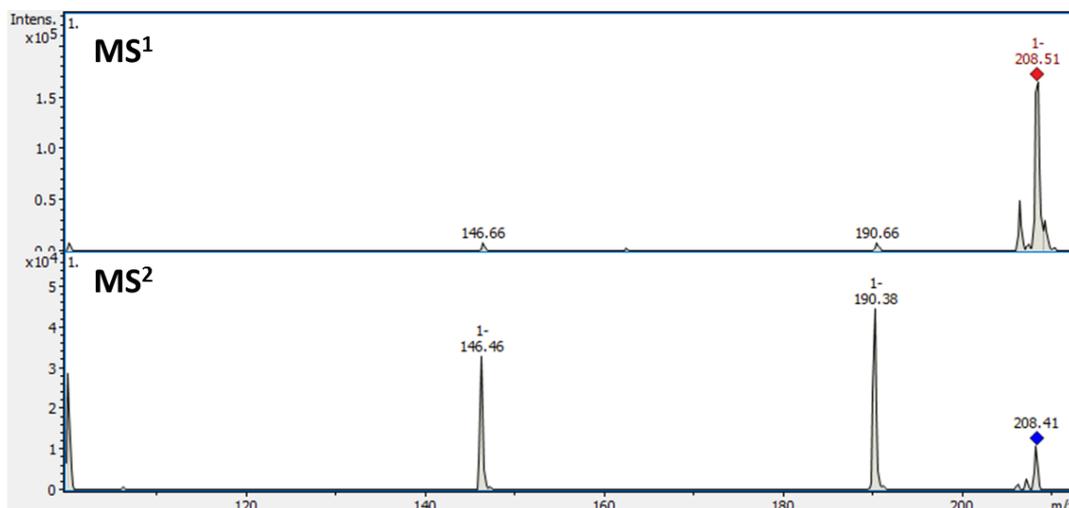


Figure A7. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Ec. En haut, détection des molécules par spectrométrie de masse. En bas, spectre de masse après fragmentation de l'ion parental 208,51 m/z (métabolite Ec).

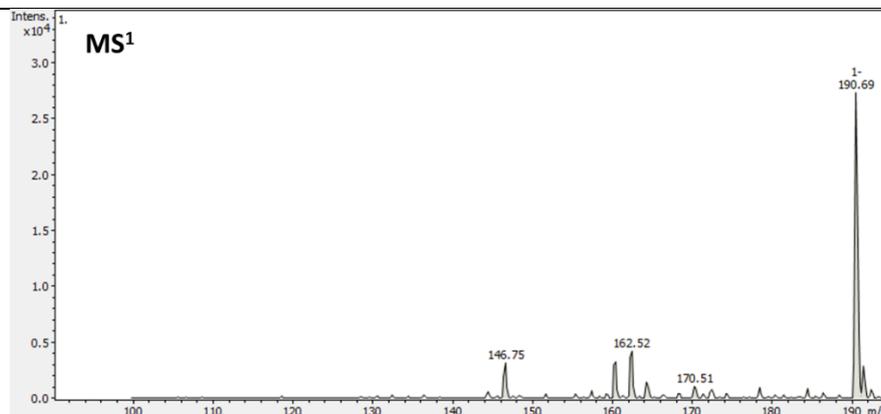


Figure A8. Spectres de masse en mode négatif du métabolite Fc. Ion de 190,69 m/z (métabolite Fc).

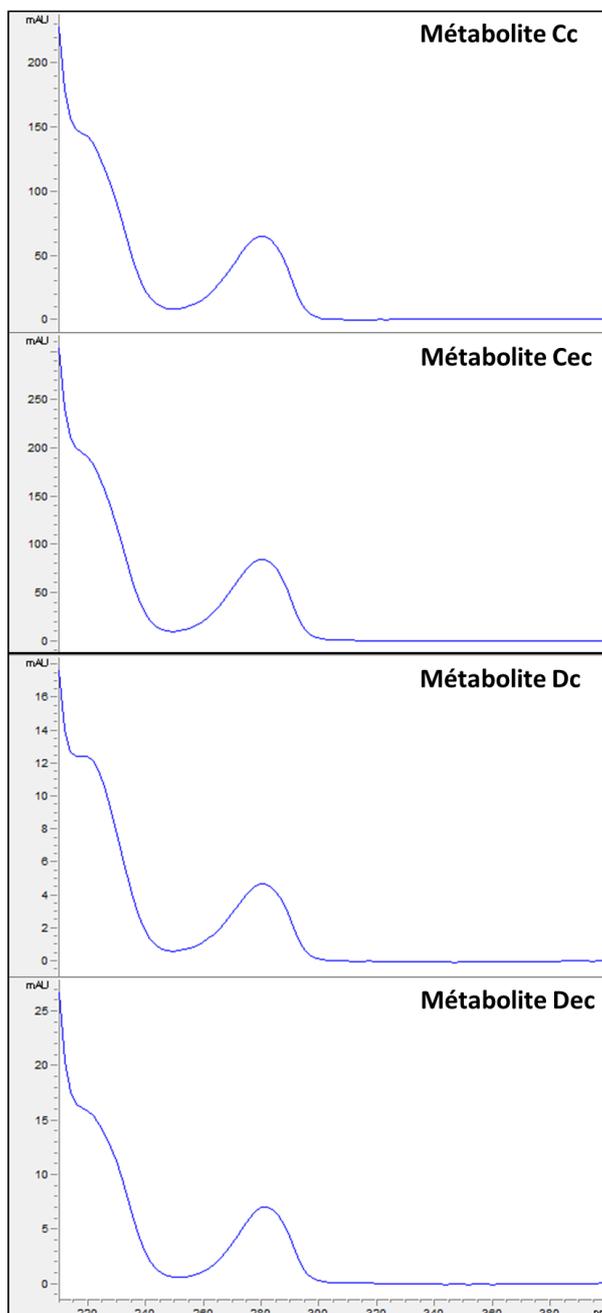


Figure A9. Spectres d'absorbance des métabolites C et D. L'absorbance a été mesurée entre 200 et 400 nm et exprimée en mAU (unité arbitraire).

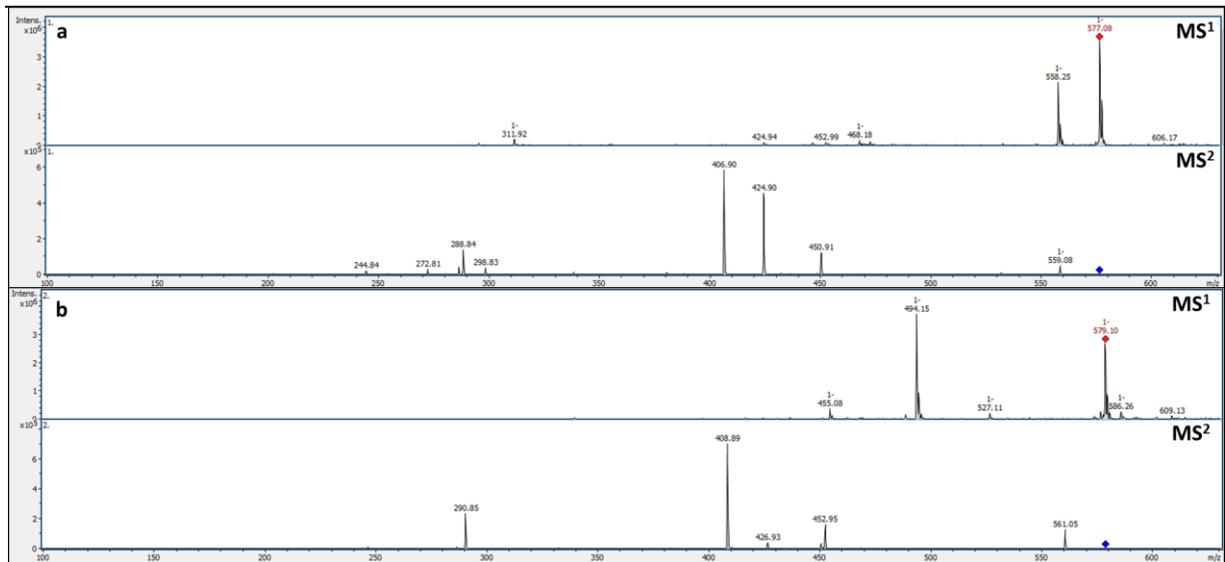


Figure A10. Comparaison des spectres de masse en mode négatif de PCB-2 et de son métabolite PCB-2A. a. Fragmentation du dimère de procyanidines de type B (PCB-2), avec un ion parental à 577 m/z. **b.** Fragmentation du métabolite PCB-2A, avec un ion parental à 579 m/z.

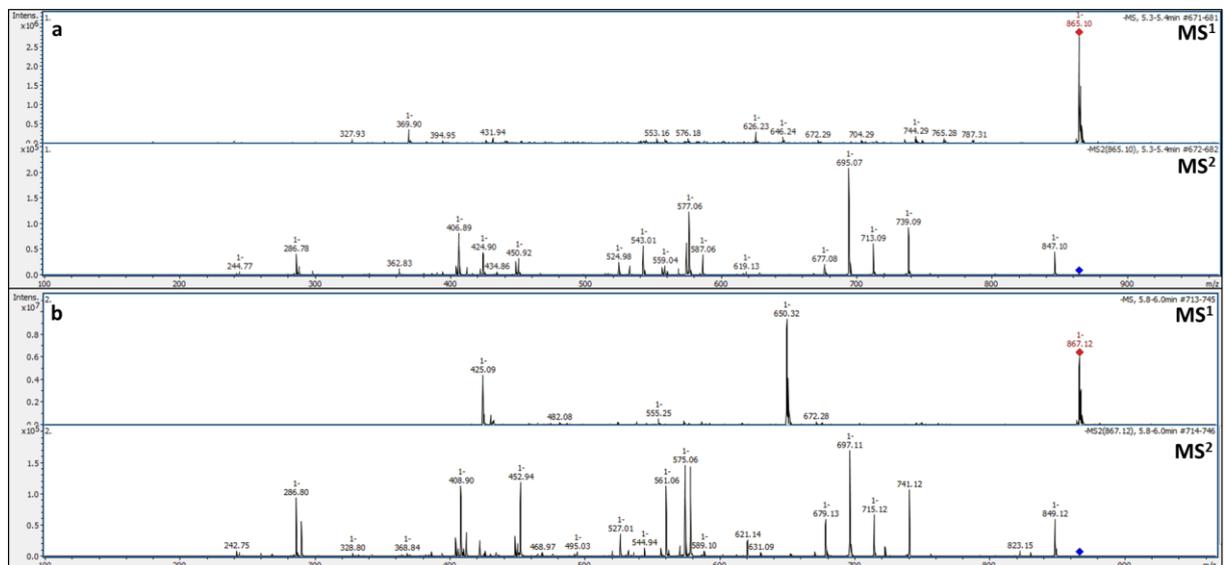


Figure A11. Comparaison des spectres de masse en mode négatif de PCB-3 et de son métabolite PCB-3A. a. Fragmentation du trimère de procyanidines de type B (PCB-3), avec un ion parental à 865 m/z. **b.** Fragmentation du métabolite PCB-3A, avec un ion parental à 867 m/z.

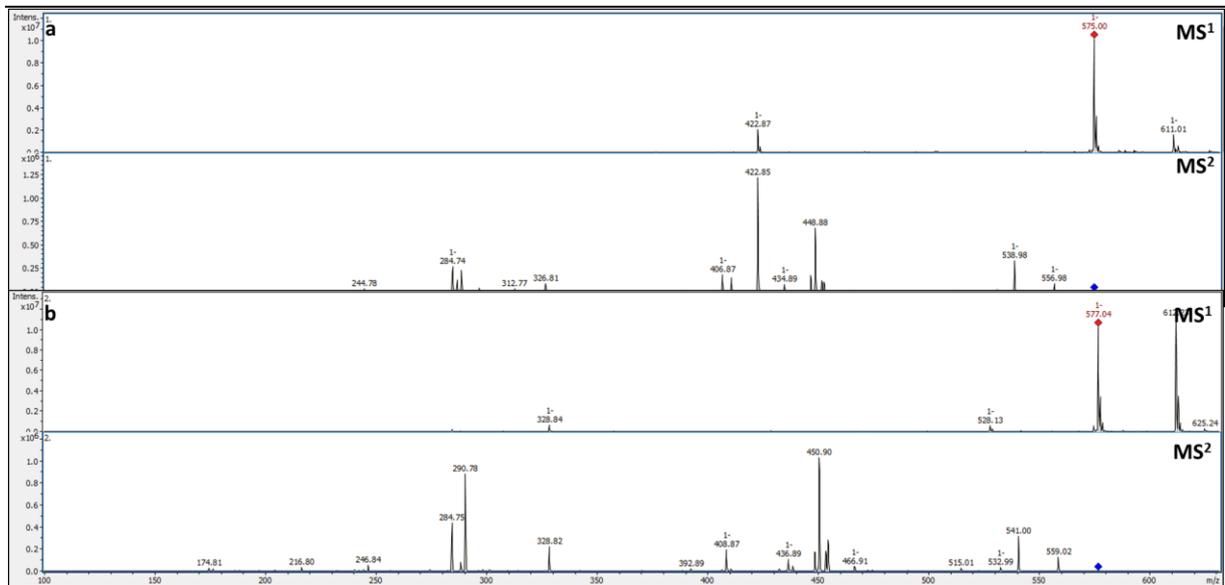


Figure A12. Comparaison des spectres de masse en mode négatif de PCA-2 et de son métabolite PCA-2A. a. Fragmentation du dimère de procyanidines de type A (PCA-2), avec un ion parental à 575 m/z. b. Fragmentation du métabolite PCA-2A, avec un ion parental à 577 m/z.

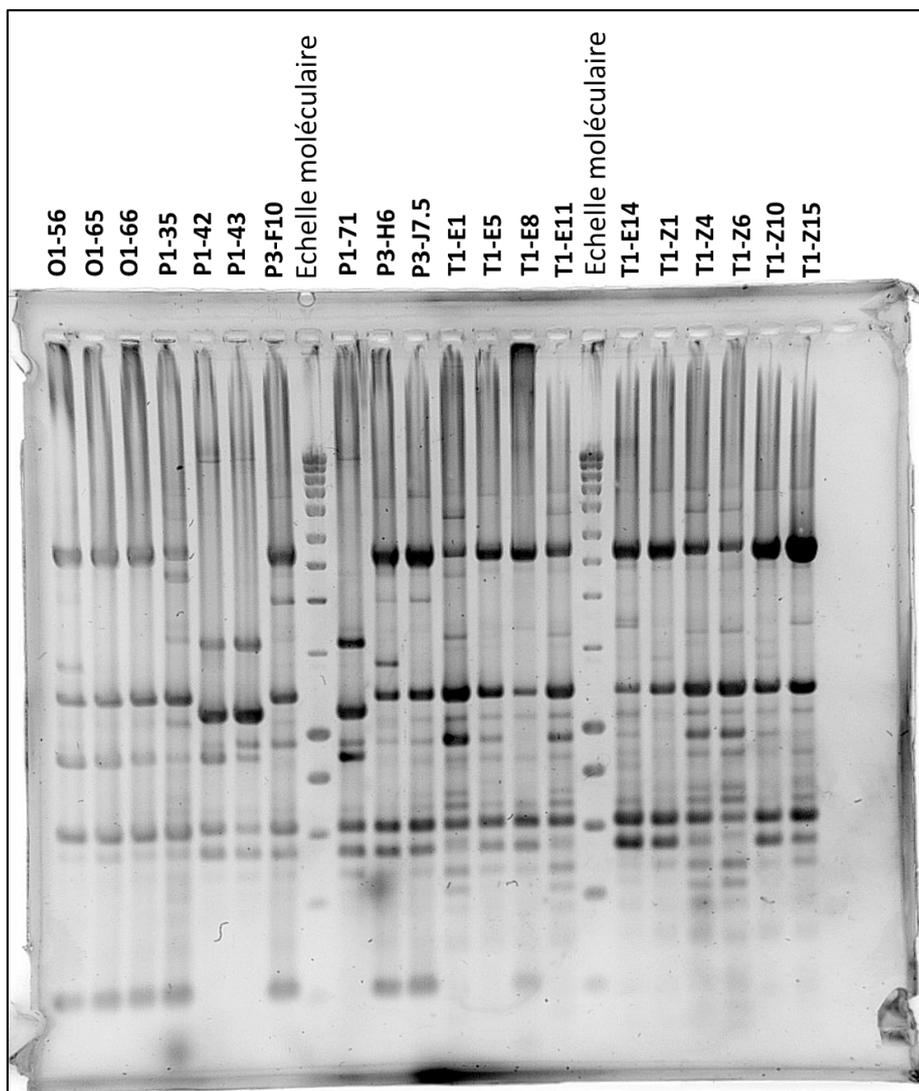


Figure A13. Gel d'agarose après amplification par ERIC-PCR sur les 20 souches *E. lenta* isolées.

Tableau A1. Tampon anaérobie utilisé pour l'isolement.

Tampon anaérobie
Hydrogénophosphate de potassium trihydraté : 0,59 mg/L
Potassium dihydrogénophosphate dihydraté : 0,57 mg/L
Sulfate d'ammonium: 0,9 mg/L
Chlorure de sodium : 0,9 mg/L
Sulfate de magnésium heptahydraté : 0,19 mg/L
Chlorure de calcium dihydraté : 0,12 mg/L
Résazurine (0,1 %) : 0,1 %
pH : 6,8
Porter à ébullition pendant 10 minutes
Refroidir sous CO ₂ , maintenir la température à 60 °C
Bicarbonate de sodium : 4 g/L
L-Cystéine hydrochloride : 0,5 g/L

Tableau A2. Milieu de culture anaérobies pour isolement et souches pures.

Milieu complet à 20 % de jus de rumen (MCR20)
Jus de rumen centrifugé : 20 %
Hydrogénophosphate de potassium trihydraté : 0,59 mg/L
Potassium dihydrogénophosphate dihydraté : 0,57 mg/L
Sulfate d'ammonium: 0,9 mg/L
Chlorure de sodium : 0,9 mg/L
Sulfate de magnésium heptahydraté : 0,19 mg/L
Chlorure de calcium dihydraté : 0,12 mg/L
Hémine (0,5 %) : 0,5 %
Résazurine (0,1 %) : 0,1 %
L-arginine : 5 g/L
Glucose : 2 g/L
Cellulose : 2 g/L
Maltose : 2 g/L
pH : 6,9
Porter à ébullition pendant 10 minutes
Refroidir sous CO ₂ , maintenir la température à 60 °C
Solution vitamine K1 : 2 mg/L
Bicarbonate de sodium : 4 g/L
L-Cystéine hydrochloride : 0,5 g/L

Tableau A3. Milieu de culture aérobie pour *Escherichia coli*

Luria Bertani (LB)
Tryptone 10 g/L
Chlorure de sodium : 10 g/L
Extrait de levures : 5 g/L
pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C : 7,0

Tableau A4. Gènes de *Eggerthella lenta* DSM 2243 surexprimés en présence de (+)-catéchine. Ce tableau contient uniquement les gènes significativement (FRD < 0.001) induits ou réprimés en prenant comme seuil LogFC>2 ou <2. Les gènes en gras correspondent aux gènes sélectionnés pour notre étude. ID : Identifiant ; FC (Fold Change) : ratio du taux d'expression d'un gène exprimé en FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) entre la condition traitée et la condition témoin.

ID_gène	ID_protéine	Log2FC (+)-catéchine/ témoin)	Annotation
ELEN_RS00960	WP_015759863.1	12.08	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS02540	WP_009608072.1	10.94	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS02535	WP_009607964.1	10.27	molybdopterin-dependent oxidoreductase
ELEN_RS02545	WP_015760017.1	9.82	hypothetical protein
ELEN_RS03100	WP_009305152.1	9.12	FAD-binding protein
ELEN_RS09270	WP_009304336.1	7.02	flavodoxin family protein
ELEN_RS09275	WP_009304335.1	6.93	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
ELEN_RS06940	WP_009304480.1	6.92	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS09325	WP_009304323.1	6.85	NAD(P)-binding protein
ELEN_RS09320	WP_009304324.1	6.67	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09265	WP_009304337.1	6.67	CoA transferase
ELEN_RS09255	WP_015760810.1	6.26	MFS transporter
ELEN_RS09305	WP_009304327.1	5.92	electron transfer flavoprotein subunit beta
ELEN_RS09310	WP_015760814.1	5.92	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09300	WP_009304328.1	5.89	electron transfer flavoprotein subunit alpha
ELEN_RS09295	WP_009304329.1	5.78	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS15840	WP_081434177.1	5.61	hypothetical protein
ELEN_RS02460	WP_009306121.1	5.17	molecular chaperone TorD family protein
ELEN_RS02455	WP_009306120.1	5.05	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS02450	WP_009306119.1	4.95	4Fe-4S binding protein
ELEN_RS02550	WP_009608113.1	4.84	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS02465	WP_009306122.1	4.67	hypothetical protein
ELEN_RS09250	WP_009304340.1	3.89	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS14690	WP_015761463.1	3.83	FAD-binding protein
ELEN_RS09245	WP_009304341.1	3.60	hypothetical protein
ELEN_RS02445	WP_009608027.1	3.57	AAA family ATPase
ELEN_RS15185	WP_015761510.1	3.48	hypothetical protein
ELEN_RS09240	WP_009304342.1	3.31	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS16245	WP_143924751.1	2.93	hypothetical protein
ELEN_RS09285	WP_009304332.1	2.73	MBL fold metallo-hydrolase
ELEN_RS09315	WP_009304325.1	2.70	phage tail protein
ELEN_RS09220	WP_009304346.1	2.60	electron transfer flavoprotein FixB
ELEN_RS09215	WP_009304347.1	2.24	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS12960	WP_009609359.1	2.10	cytochrome c3 family protein
ELEN_RS05140	WP_015760361.1	-2.13	alpha/beta hydrolase
ELEN_RS02055	WP_015759964.1	-2.15	helix-turn-helix transcriptional regulator
ELEN_RS12670	WP_015761233.1	-2.43	P-II family nitrogen regulator
ELEN_RS11075	WP_009607775.1	-2.45	ABC transporter substrate-binding protein
ELEN_RS12675	WP_015761234.1	-2.90	ammonium transporter
ELEN_RS11900	WP_015761124.1	-3.34	hypothetical protein

Tableau A5. Gènes de *Eggerthella lenta* DSM 2243 surexprimés en présence de (-)-épicatechine. Ce tableau contient uniquement les gènes significativement (FRD < 0.001) induits ou réprimés en prenant comme seuil LogFC>2 ou <2. Les gènes en gras correspondent aux gènes sélectionnés pour notre étude. ID : Identifiant ; FC (Fold Change) : ratio du taux d'expression d'un gène exprimé en FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) entre la condition traitée et la condition témoin.

ID_gène	ID_protéine	Log2FC (-)-épicatechine/ témoin)	Annotation
ELEN_RS00960	WP_015759863.1	11.90	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS02575	WP_009608048.1	11.57	molybdopterin-dependent oxidoreductase
ELEN_RS01395	WP_009305851.1	9.78	FAD-binding protein
ELEN_RS02580	WP_009607966.1	9.56	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS01400	WP_009305853.1	9.16	FAD-binding protein
ELEN_RS02585	WP_041691699.1	8.51	hypothetical protein
ELEN_RS09270	WP_009304336.1	7.22	flavodoxin family protein
ELEN_RS09275	WP_009304335.1	6.87	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
ELEN_RS09265	WP_009304337.1	6.70	CoA transferase
ELEN_RS09320	WP_009304324.1	6.57	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09325	WP_009304323.1	6.50	NAD(P)-binding protein
ELEN_RS09255	WP_015760810.1	6.19	MFS transporter
ELEN_RS09300	WP_009304328.1	6.17	electron transfer flavoprotein subunit alpha
ELEN_RS09295	WP_009304329.1	6.14	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS09305	WP_009304327.1	5.99	electron transfer flavoprotein subunit beta
ELEN_RS09310	WP_015760814.1	5.95	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS15840	WP_081434177.1	5.84	hypothetical protein
ELEN_RS03100	WP_009305152.1	5.27	FAD-binding protein
ELEN_RS15845	WP_009305855.1	4.49	hypothetical protein
ELEN_RS00905	WP_015759859.1	4.04	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS09250	WP_009304340.1	3.88	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS09245	WP_009304341.1	3.61	hypothetical protein
ELEN_RS09240	WP_009304342.1	3.44	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS09290	WP_015760813.1	3.25	NUDIX hydrolase
ELEN_RS15185	WP_015761510.1	3.23	hypothetical protein
ELEN_RS02460	WP_009306121.1	3.06	molecular chaperone TorD family protein
ELEN_RS07150	WP_009609125.1	2.99	translocase
ELEN_RS02450	WP_009306119.1	2.95	4Fe-4S binding protein
ELEN_RS02455	WP_009306120.1	2.88	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS16245	WP_143924751.1	2.72	hypothetical protein
ELEN_RS09315	WP_009304325.1	2.51	phage tail protein
ELEN_RS08970	WP_009307188.1	2.47	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD
ELEN_RS12960	WP_009609359.1	2.38	cytochrome c3 family protein
ELEN_RS02465	WP_009306122.1	2.38	hypothetical protein
ELEN_RS09220	WP_009304346.1	2.36	electron transfer flavoprotein FixB
ELEN_RS01030	WP_015759876.1	2.29	gamma carbonic anhydrase family protein
ELEN_RS01995	WP_015759959.1	2.13	molybdopterin-dependent oxidoreductase
ELEN_RS09215	WP_009304347.1	2.12	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS03445	WP_015760096.1	-2.07	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS15300	WP_009305406.1	-2.13	response regulator transcription factor
ELEN_RS02055	WP_015759964.1	-2.20	helix-turn-helix transcriptional regulator

ELEN_RS02150	WP_015759974.1	-2.83	Tat proofreading chaperone DmsD
ELEN_RS12675	WP_015761234.1	-3.48	ammonium transporter
ELEN_RS12670	WP_015761233.1	-3.50	P-II family nitrogen regulator
ELEN_RS12965	WP_009306706.1	-3.55	ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase

Tableau A6. Gènes de *Eggerthella lenta* DSM 2243 surexprimés en présence du PCB-2. Ce tableau contient uniquement les gènes significativement (FRD < 0.001) induits ou réprimés en prenant comme seuil LogFC>2 ou <2. Les gènes en gras correspondent aux gènes sélectionnés pour notre étude. ID : Identifiant ; FC (Fold Change) : ratio du taux d'expression d'un gène exprimé en FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) entre la condition traitée et la condition témoin. PCB-2 : Dimère de procyanidines de Type B

ID_gène	ID_protéine	Log2FC (PCB-2/témoin)	Annotation
ELEN_RS01395	WP_009305851.1	9.99	FAD-binding protein
ELEN_RS01400	WP_009305853.1	9.51	hypothetical protein
ELEN_RS09270	WP_009304336.1	7.18	flavodoxin family protein
ELEN_RS09275	WP_009304335.1	6.93	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
ELEN_RS09320	WP_009304324.1	6.68	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09325	WP_009304323.1	6.66	NAD(P)-binding protein
ELEN_RS09265	WP_009304337.1	6.58	CoA transferase
ELEN_RS09305	WP_009304327.1	6.36	electron transfer flavoprotein subunit beta
ELEN_RS09300	WP_009304328.1	6.35	electron transfer flavoprotein subunit alpha
ELEN_RS09295	WP_009304329.1	6.32	4Fe-4S dicluster domain-containing protein
ELEN_RS09310	WP_015760814.1	6.24	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS09255	WP_015760810.1	6.22	MFS transporter
ELEN_RS00960	WP_015759863.1	5.59	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS15845	WP_009305855.1	5.02	hypothetical protein
ELEN_RS06940	WP_009304480.1	4.77	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS09250	WP_009304340.1	4.03	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS00905	WP_015759859.1	3.88	FAD-dependent oxidoreductase
ELEN_RS09245	WP_009304341.1	3.73	hypothetical protein
ELEN_RS09240	WP_009304342.1	3.51	LysR family transcriptional regulator
ELEN_RS09290	WP_015760813.1	3.50	NUDIX hydrolase
ELEN_RS09285	WP_009304332.1	2.98	MBL fold metallo-hydrolase
ELEN_RS09315	WP_009304325.1	2.88	phage tail protein
ELEN_RS07150	WP_009609125.1	2.65	translocase
ELEN_RS09220	WP_009304346.1	2.65	electron transfer flavoprotein FixB
ELEN_RS09215	WP_009304347.1	2.27	acyl-CoA dehydrogenase
ELEN_RS01030	WP_015759876.1	2.13	gamma carbonic anhydrase family protein
ELEN_RS12670		-2.75	P-II family nitrogen regulator
ELEN_RS12675		-2.83	ammonium transporter
ELEN_RS12965		-3.05	ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase

Tableau A7. Eggerthellaceae utilisées pour les analyses de génomes.

Espèces	Souches	Numéro d'accèsion (WGS)
<i>Adlercreutzia caecicola</i>	NM48_B13	SSTM01
	DSM 22242	JACHYA01
<i>Adlercreutzia caecimuris</i>	NM80_B27	SSTJ01
	1xD42-21	QZEA01
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	KCTC 15235	QVOJ01
	ResAG-91	WPOO01
	IPLA 37004	VJNE01
	DSM 19450	NC_022567.1 (RefSeq)
<i>Adlercreutzia equolifaciens subsp. celatus</i>	JCM 14811	QVPV01
	AP38TSA	PPUU01
	OB21 GAM 11	PPUT01
<i>Adlercreutzia mucosicola</i>	NM66_B29	WSRR01
<i>Adlercreutzia muris</i>	DSM 29508	WAJS01
	D2-1X-25	QZDZ01
<i>Adlercreutzia sp.</i>	8CFCBH1	NZ_AP022829.1 (RefSeq)
	ZJ473	JAAVTO01
	ZJ176	JAAKEC01
	ZJ242	JAAKEE01
	ZJ305	JAAKED01
<i>Asaccharobacter celatus</i>	DSM 18785	AP024470.1 (RefSeq)
<i>Denitrobacterium detoxificans</i>	NPOH1	NZ_CP011402.1 (RefSeq)
<i>Eggerthella lenta</i>	DSM 2243	PPUA01
	SV_Bg7063_mod2	CABHNG01
	MGYG-HGUT-02544	CABMOO01
	C592	NZ_CP021140.1 (RefSeq)
	A2	PPUL01
	CC8/2 BHI2	PPUF01
	DSM 110913	PPUJ01
	19C	PPUP01
	22C	PPUO01
	RC4/6F	PPTW01
	14A	PPUR01
	32-6-I 6 NA	PPUM01
	CC8/6 D5 4	PPUE01
	AB12 #2	PPUK01
	11C	PPUS01
	16A	PPUQ01
	DSM 110914	PPUG01
	DSM 11863	PPUC01
	W1 BHI 6	PPTU01
	MR1 #12	PPTX01
DSM 11767	PPUD01	
DSM 110915	PPUI01	
28B	PPUN01	

	FAA1-1-60AUCSF	PPTY01
	DSM 15644	PPUB01
	SECO-MT75m2	VEVP01
	Valencia	PPTV01
	MRI-F 36	WPOJ01
	ResAG-88	WPOM01
	MRI-F 37	WPOI01
	ResAG-145	WPOK01
	ResAG-121	WPOL01
	MRI-F 40	WPOH01
	TF05-26B-4	QSSL01
	D33t1_170424_F11	JADNJW01
	J1101437_171009_A1	JADNJK01
	1001302B_160321_A1	JADNIO01
	1001095H_141210_C9	JADNER01
	1001287H_170206_A6	JADNCP01
	1001713B170221_170320_D6	JADMYQ01
	BSD2780120875_150330_C12	JADMOT01
	1001311H_170123_F12	JADNMJ01
	BSD2780120874_150323_H10	JADNKN01
	1001136B_160425_H2	JADNNT01
	D33t1_170424_B8	JADNOB01
	1001095IJ_161003_H5	JADMUV01
<i>Eggerthella sinensis</i>	DSM 16107	PPTT01
<i>Eggerthella sp.</i>	YY7918	NC_015738.1 (RefSeq)
	HF-1101	NZ_CP063310.1 (RefSeq)
	HF-4214	VTFY01
<i>Eggerthella timonensis</i>	Marseille-P3135	FXXA01
<i>Gordonibacter massiliensis</i>	N22	JACMSE01
	Marseille-P2775	LT827128.1
<i>Gordonibacter pamelaee</i>	3C	PPTS01
	BIOML-A2	WKPN01
	7-10-1-bT	NC_021021.1 (RefSeq)
<i>Gordonibacter sp.</i>	Marseille-P4307	UWPD01
	28C	PPTR01
	An230	NFJP01
<i>Gordonibacter urolithinfaciens</i>	JCM 16058	QIBV01
	DSM 27213	QIBW01
	BIOML-A1	WKZA01
	An234A	NFJN01
	ResAG-26	WPOF01
	ResAG-50	WPOD01
	ResAG-5	WPOG01
	ResAG-43	WPOE01
	ResAG-59	WPOC01
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i>	RC2/2 A	PPTQ01
	DSM 16106	QICD01
<i>Slackia equolifaciens</i>	DSM 24851	NZ_QIBX00000000.1(RefSeq)

<i>Slackia exigua</i>	NCTC12994	UGGM01
	ATCC 700122	ACUX02
<i>Slackia faecicanis</i>	DSM 17537	NZ_QICB00000000.1(RefSeq)
<i>Slackia heliotrinireducens</i>	DSM 20476	NC_013165.1 (RefSeq)
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	DSM 22006	JACHYQ01
	OB21 GAM31	PPTO01
<i>Slackia piriformis</i>	MGYG-HGUT-01409	CABKRI01
	YIT 12062	ADMD01
<i>Slackia sp.</i>	UBG103	RKDH01
	CM382	ALNO01
	ZJ119	JAAKEN01
	ZJ350	JAAKEO01