

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Par

Cindy PENSEC

Impact de la chimiothérapie sur le microbiote intestinal à travers l'exemple du pemetrexed sur les modèles murins PDX

Thèse présentée et soutenue à NANTES, le 17 Décembre 2018

Unité de recherche : Biofortis Mérieux NutriSciences

CRCINA – Unité Inserm U1232

Thèse N° :

Rapporteurs :

Iradj SOBHANI, Professeur des Universités,
Université de Paris-Est-Créteil

Mathilde BONNET, Enseignant – Chercheur,
Université de Clermont

Composition du Jury :

Président :
Joël DORÉ, Directeur de Recherche, Micalis Institute

Marie-Christine MULTON, Docteur, Sanofi Recherche et Développement

Francine JOTEREAU, Professeur Émérite, Université de Nantes

Directeur de thèse :
Mario CAMPONE, Professeur des Universités, Université d'Angers

Co-encadrant de thèse :
Françoise LE VACON, Directeur Scientifique, Biofortis Mérieux NutriSciences

Invité :
Hervé BLOTTIÈRE, Directeur de Recherche, Micalis Institute

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Tout d'abord je remercie le **Professeur Joël DORÉ** de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie le **Professeur Iradj SOBHANI** et le **Docteur Mathilde BONNET** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci à vous pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit. Je remercie aussi les examinateurs, le **Docteur Marie-Christine MULTON** et le **Professeur Francine JOTEREAU**, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

J'adresse ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, le **Professeur Mario CAMPONE**, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse CIFRE.

J'adresse de chaleureux remerciements à ma co-encadrante de thèse le **Docteur Françoise LE VACON** pour m'avoir accueillie au sein de Biofortis Mérieux NutriSciences. Je tiens à lui témoigner ma reconnaissance pour tout ce qu'elle m'a apporté au cours de ces trois années de thèse comme son expertise, ses conseils avisés, son écoute et sa disponibilité. Je retiens toutes nos discussions et les précieux conseils grâce auxquels j'ai beaucoup appris. Merci également pour la confiance qu'elle m'a accordée pour mener à bien le projet IMODI.

Un immense merci au **Docteur Hervé BLOTTIÈRE** pour m'avoir accompagnée et soutenue dans ce travail de thèse. Merci pour son expertise scientifique et ses commentaires pertinents apportés lors de l'élaboration de cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour le temps qu'il m'a consacré, pour son soutien, son aide, et ses précieux conseils lors de nos échanges hebdomadaires. Un grand merci pour sa gentillesse, sa sympathie et pour tout ce que j'ai appris à ses côtés.

Merci à mon autre co-encadrante le **Docteur Alessandra DE MARTINO**, pour son aide précieuse dans ma recherche bibliographique. Je suis ravie d'avoir travaillé à ses côtés.

Merci à **Marc BONNEVILLE** et **Françoise PRAZ** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon projet.

Merci à toutes les personnes d'**IMODI**. Je suis très fière d'avoir participé avec vous à ce projet qui est si passionnant, si innovant et si ambitieux. J'ai énormément appris au cours de ces 3 ans.

Je remercie particulièrement **Olivier DUCHAMP**, **Damien FRANCE** et **Caroline MIGNARD** pour m'avoir accueillie à **Oncodesign** afin de participer à l'étude préclinique. Ce fut un réel plaisir de faire votre connaissance et de découvrir votre animalerie SPF.

Je remercie aussi l'équipe de Strasbourg, Inserm U113, avec qui j'ai beaucoup interagis au cours de ma thèse. Je remercie d'abord **Dominique GUENOT** pour ses conseils judicieux, ses corrections de l'article et pour son implication dans mon projet de thèse. Je remercie ensuite **Audrey GROH** pour son professionnalisme et son implication dans les expérimentations de microbiote sur les PDX de poumon.

Je remercie aussi **Lorely CALVET** pour ses judicieux conseils lors de l'écriture de l'article.

Je souhaite également remercier **Michel NEUNLIST** et **Anne BESSARD** pour l'accueil au sein de leur laboratoire, leur disponibilité et leur aide dans la réalisation des extractions d'ARN et de RT-qPCR.

Au sein de la Plateforme MicroPICell de l'Université de Nantes, je remercie **Stéphanie BLANDIN** pour avoir réalisé les coupes histologiques et **Philippe HULIN** pour son aide et sa disponibilité lors de l'analyse des images.

Merci à toute l'équipe du **labo Clinico-Microbiote** ! Déjà trois ans que je suis parmi vous ! Votre bonne humeur et votre gentillesse ont été un soutien sans faille au quotidien. Je retiens tous les moments de convivialité que l'on a partagé.

Au sein de cette équipe je remercie particulièrement **Thomas**, de m'avoir accueillie dans son équipe, pour sa formation sur mon projet et pour l'initiation à l'analyse du microbiote. Son expérience aura été précieuse pour l'avancement de ce projet. Je le remercie aussi pour sa disponibilité. Merci à **Clémentine**, ma formatrice au métagénomique, qui a toujours été disponible pour répondre à toutes mes questions. **Sophie**, **Sandra**, et **Fabien** auront toujours été à l'écoute et soucieux de l'avancé de

mon projet de thèse, c'est pourquoi je les remercie pour leur bienveillance. Merci à **Pauline** et **Steven**, pour leur soutien et leur aide sur IMODI humain. Je remercie aussi **Sidonie** pour ses nombreux conseils concernant la thèse. Et je remercie aussi toutes les personnes du laboratoire, **Morgane, Caroline, Pauline, Mélodie, Lou** et **Lucille** pour leur bonne humeur et les moments partagés.

Je souhaite remercier **Laure-Anne**, mon binôme sur la version clinique d'IMODI pour son professionnalisme et son aide précieuse pour l'avancée du projet. Merci également à **Basile** et **N'deye**.

Je remercie aussi toute l'équipe bio-informatique et bio-statistique, en particulier **Sébastien, Yao, Florence, Benoit** et **Pauline** avec qui j'ai étroitement collaboré pendant toute cette thèse. J'ai vraiment apprécié leur disponibilité pour la moindre question ou analyse urgente en lien avec cette étude complexe (entre IMODI murin et humain).

Il m'est impossible d'oublier l'équipe bio NGS ! Merci pour votre soutien infaillible et vos encouragements qui auront été vitaux. Sincèrement merci à **Jérôme** pour ses nombreux conseils. Je n'oublierai jamais son « coup de pouce » quelques mois après son arrivée. **Aurélien**, thésard lui aussi et acolyte d'aventures, toujours disponible pour me motiver et m'encourager ! Je suis très heureuse de vous avoir rencontrés et de vous compter parmi mes amis.

La réalisation de ce travail s'appuie aussi sur un environnement de travail agréable, c'est pourquoi je tiens à remercier l'ensemble de mes collègues de **Biofortis Mérieux NutriSciences**.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'**ANRT**, qui m'a accordé un financement de trois ans pour réaliser cette thèse CIFRE.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes hors labo qui m'ont soutenues dans la réalisation de cette thèse.

En premier lieu je souhaite remercier ceux qui auront été une réelle bouffée d'oxygène pour moi, à savoir l'ensemble de mes amis Nantais : **Alice, Elisa, Florian, Juan, Marjory**, et **Nolwenn**. Merci à eux pour leur soutien moral et leurs encouragements. Merci à tous mes amis proches mais physiquement loin, **Laure, Myriam**, la team de Brest (**Justyne, Steven, Vincent, Marie, Nathan**), **Manon, Romain**, vous restez pour moi les piliers d'une belle amitié.

Et c'est avec beaucoup d'émotion que je termine ces remerciements par les personnes qui comptent le plus pour moi et qui m'ont toujours soutenues dans ma vie et mes études.

Merci infiniment à **Mathieu**, de m'avoir accompagnée dans cette grande aventure ! Son soutien infaillible a contribué à la réussite de ma thèse.

Ma sœur, **Laura**, que je remercie de m'avoir épaulée et encouragée pendant ces trois années de thèse, même quand elle était à l'autre bout du monde.

Mes plus profonds remerciements vont à ma **Mère** pour son soutien, ses encouragements et son aide tout au long de ma scolarité. Les valeurs qu'elle m'a transmises comme le travail, la volonté ou encore la persévérance ont été essentielles pour la réussite de cette thèse. Encore merci !

Je remercie de tout mon cœur ma **Grand-Mère** pour sa gentillesse et son soutien permanent.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES FIGURES.....	8
TABLES DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. CANCER DU POUMON	17
1. GENERALITES	17
1.1. <i>Epidémiologie</i>	17
1.2. <i>Facteurs de risques</i>	18
1.3. <i>Anatomie du poumon</i>	21
1.4. <i>Classifications des différents cancers du poumon</i>	22
2. THERAPIES POUR LE CANCER DU POUMON.....	24
2.1. <i>Chirurgie</i>	25
2.2. <i>Radiothérapie</i>	26
2.3. <i>Chimiothérapie</i>	26
2.4. <i>Thérapies ciblées</i>	28
2.5. <i>Immunothérapie</i>	31
3. PEMETREXED	32
3.1. <i>Mode d'action</i>	32
3.2. <i>Utilisation clinique</i>	35
3.3. <i>Effets secondaires du pemetrexed</i>	35
II. MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN	38
1. DEFINITION.....	38
2. LES DIFFERENTS MICROBIOTES	38
3. METHODES D'ETUDE	39
3.1. <i>L'ARN ribosomal 16S</i>	40
3.2. <i>Méthode d'analyse a priori</i>	42
3.3. <i>Méthodes d'analyse sans a priori</i>	43
4. MICROBIOTE INTESTINAL.....	45
4.1. <i>Distribution du microbiote le long du tractus gastro-intestinal</i>	45
4.2. <i>Etablissement du microbiote intestinal</i>	48
4.3. <i>Composition du microbiote adulte</i>	50

4.1.	<i>Principaux rôles et fonctions</i>	52
4.2.	<i>Dysbiose du microbiote</i>	55
III.	MICROBIOTE ET CANCER	58
1.	MICROBIOTE ET ETIOLOGIE DES CANCERS	58
1.1.	<i>Les micro-organismes carcinogènes</i>	58
1.2.	<i>Microbiote intestinal et carcinogénèse : effet direct</i>	59
1.3.	<i>Microbiote intestinal et effet systémique</i>	63
2.	MICROBIOTE ET CHIMIOTHERAPIES	65
2.1.	<i>Microbiote et efficacité des chimiothérapies</i>	66
2.2.	<i>Microbiote et toxicité des chimiothérapies</i>	68
3.	MICROBIOTE ET IMMUNOTHERAPIES.....	69
4.	MICROBIOTE ET CANCER DU POUMON.....	71
4.1.	<i>Le microbiote pulmonaire</i>	71
4.2.	<i>Axe Intestin-poumon</i>	74
4.3.	<i>Relation microbiote intestinal et cancer du poumon</i>	76
	OBJECTIFS DE THESE	77
	RÉSULTATS	80
I.	ARTICLE N°1 : “IMPACT OF PEMETREXED CHEMOTHERAPY ON GUT MICROBIOTA AND INTESTINAL INFLAMMATION OF PATIENT-LUNG-DERIVED TUMOR XENOGRAFT (PDX) MOUSE MODELS”	81
1.	ARTICLE	82
2.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	116
2.1.	<i>Impact of pemetrexed on the cecal microbiota</i>	116
2.2.	<i>Impact of pemetrexed on fecal microbiota composition at T03</i>	118
2.3.	<i>Impact of pemetrexed on gut inflammatory status at T03</i>	119
II.	ARTICLE N°2 : “PEMETREXED IMPACT ON THE GUT MICROBIOTA OF PATIENT-DERIVED TUMOR XENOGRAFTS”	121
	DISCUSSION PERSPECTIVES CONCLUSION	133
	VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE	145
I.	PUBLICATION	146
II.	PRESENTATION DES TRAVAUX	146
III.	COMMUNICATIONS AUTRES	147
	REFERENCES	148

Table des figures

Figure 1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du poumon selon le sexe de 1980 à 2012 en France Métropolitaine.....	18
Figure 2 : Schéma de l'anatomie du poumon	21
Figure 3 : Classification des cancers du poumon	23
Figure 4 : Différentes classes d'agents chimiothérapeutiques et leurs cibles cellulaires	27
Figure 5 : Répartition des mutations dans le CBNPC	29
Figure 6 : Schéma de la mutation EGFR dans le cancer du poumon	30
Figure 7 : Schéma du réarrangement des gènes ALK-EML4 dans le cancer du poumon	30
Figure 8 : Mécanismes de dérégulation des lymphocytes T par les cellules cancéreuses par les voies CTLA-4 et PD-1 et inhibition de ces voies par les 3 types d'immunothérapies.	31
Figure 9 : Structure chimique du pemetrexed	32
Figure 10 : Schéma des transporteurs de folate permettant au pemetrexed de rentrer dans la cellule	33
Figure 11 : Mécanisme d'action du pemetrexed	34
Figure 12 : Schéma des voies de biosynthèse du Folate, de l'Homocystéine, des Vitamine B12 et B6	36
Figure 13 : Composition du microbiote en fonction du site anatomique	38
Figure 14 : Composition du ribosome procaryote	40
Figure 15 : Structure de l'ARNr 16S d' <i>Escherichia coli</i> avec la présence des 6 régions composées de régions conservées et variables.....	41
Figure 16 : Aperçu des approches utilisées pour caractériser le microbiote.....	43
Figure 17 : Aperçu des différentes étapes clés des deux méthodes de séquençage à haut débit, le séquençage ciblé sur les gènes codant l'ARNr 16S et le séquençage du génome entier, à partir de l'extraction d'ADN jusqu'à l'obtention des résultats	45
Figure 18 : Abondance et composition du microbiote le long du tractus gastro-intestinal	46
Figure 19 : Schéma représentant les étapes clés de l'établissement du microbiote chez l'enfant	48
Figure 20 : Abondance des phyla et des 30 plus abondants genres bactériens	51
Figure 21 : Abondance des principaux contributeurs de chaque entérotype	52
Figure 22 : Schématisation des interactions et facteurs pouvant entraîner une dysbiose	55
Figure 23 : Comparaison de la composition du microbiote fécal de patients témoins (noir) à des patients atteints d'un CCR (rouge) par un analyse en composantes principales (PCA).....	60

Figure 24: Schéma représentant les mécanismes impliqués dans la carcinogenèse du CCR	62
Figure 25: Effets locaux et systémiques du microbiote intestinal	64
Figure 26: Schéma TIMER présentant une vue d'ensemble des interactions entre le microbiote-l'hôte modulant l'efficacité et la toxicité des chimiothérapies	66
Figure 27 : Métabolisme de l'Irinotecan (CPT-11) à travers ses différentes phases de biotransformation : activation, inactivation et son interaction avec les β -glucuronidases du microbiote	68
Figure 28: Potentielles voies d'interaction entre le microbiote intestinal et pulmonaire	75
Figure 29 : Impact of the tumor on microbiota composition	Erreur ! Signet non défini.
Figure 30 : Impact of pemetrexed on cecal microbiota	116
Figure 31: Microbiota composition at the family level at T03.....	118
Figure 32 : RNA expression of inflammatory cytokines at T03.....	119

Tables des Tableaux

Tableau 1 : Classification TNM et correspondance avec le stade des CBNPC	24
Tableau 2 : Description de chaque composantes T, N et M.....	25
Tableau 3 : Synthèse des toxicités observées chez des patients traités au pemetrexed d'après l'étude de	36
Tableau 4 : Liste non exhaustive des maladies pour lesquelles une dysbiose a été mise en évidence adaptée de	57
Tableau 5 : Nombre d'incidence de cancer par infection en 2012	58
Tableau 6 : Principales bactéries impliquées dans l'initiation et la progression de la carcinogène du CCR	61
Tableau 7 : Composition bactérienne des différentes parties du système respiratoire de sujets sains.....	72
Tableau 8 : Tableau synthétique présentant les différents taxa du microbiote pulmonaire caractéristiques des différentes pathologies	73

Liste des abréviations

3D :	Trois Dimensions
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AGCC :	Acide Gras à Chaîne Courte
AICARFT :	Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase
ALK :	Anaplastic Lymphoma Kinase
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNr :	Acide Ribonucléique du ribosome
ARNr 16S :	ARN ribosomique 16S
CagA :	Cytotoxine Associée au gène A
CBNPC :	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CBPC :	Cancer Bronchique à Petites Cellules
CCR :	Cancer Colorectal
CD8 :	Cluster de différenciation 8
CIFRE :	Convention Industrielle de la Formation par la Recherche
CIRC :	Centre International de Recherche sur le Cancer
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CTX :	Cyclophosphamide
DGGE :	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHF :	Dihydrofolate
DHFR :	Dihydrofolate Reductase
DSS :	Dextran Sodium Sulfate
dTMP:	Deoxythymidine Monophosphate
dTTP :	Deoxythymidine Triosphate
dUMP :	Deoxyuridine Monophosphate
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EML4 :	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
ER :	Récepteur à l'Œstrogène (Estrogen Receptor)
FDA :	Agence Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux
FISH :	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybrization
FMT :	Transplantation Fécale
FPGS :	Folypolyglutamate Synthase
FR- α :	Folate Receptor- α
GARFT :	Glycinamide Ribonucleotide Formyltransferase
GI :	Gastro-Intestinal
HAS :	Haute Autorité de Santé
IBD :	Maladie Inflammatoire de l'intestin
IBS :	Syndrome de l'intestin Irritable
IMODI :	Innovative MODEls Initiative against cancer
INCa :	Institut National du Cancer
JAX :	Jackson Laboratory
KRAS :	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LBP :	Live Biotherapeutic Products
LLN :	Ganglions Lymphatiques Pulmonaires
LPS :	Lipopolysaccharide
MLN :	Ganglions Lymphatiques Mésentériques
MPOC :	Maladies Pulmonaires Obstructives Chroniques
NF- κ B :	Nuclear Factor-kappa B
NGS :	Séquençage à haut débit / Next Generation Sequencing
NSG :	NOD SCID gamma
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OTU :	Unité Opérationnelle Taxonomique
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PD-1 :	Programmed Death-1
PD-L1 :	Ligand du PD-1
PDX :	Patient-Derived Tumor Xenograft
pH :	Potentiel Hydrogène
PRR :	Pattern Recognition Receptors
qPCR:	PCR Quantitative
RFC :	Reduced Folate Carrier
ROS :	Réactifs de l'oxygène
SBR :	Scarff-Bloom et Richardson
SCID :	Severe Combined ImmunoDeficiency
TAC :	Taconic Farms
TGGE :	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
Th :	Lymphocyte T helper
THF :	Tetrahydrofolate
TIM :	TNO Gastro-Intestinal Model
TK :	Tyrosine Kinase
TNM :	Tumeur, Nodule et Métastase
Treg :	Lymphocyte T régulateur
TS :	Thymidylate Synthase
VacA :	Cytotoxine A Vacuolisante
VEGFR2 :	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
WGS :	Séquençage du génome entier/ Whole Genome Sequencing

Avant-propos

Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes présents dans le tractus gastro-intestinal. Grâce à la relation symbiotique entre l'homme et son microbiote, il est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. Le microbiote intestinal est indispensable pour son hôte car il possède de nombreuses fonctions physiologiques importantes comme le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, la production d'énergie et de vitamines, la digestion des aliments, la protection contre les pathogènes et son rôle dans l'immunité. Cependant, lorsque l'équilibre du microbiote est perturbé, il peut être impliqué dans de nombreuses pathologies humaines comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, ou des maladies métaboliques. Dans le domaine de la cancérologie, il a été montré que le microbiote peut jouer un rôle dans la cancérogenèse mais qu'il peut aussi moduler l'efficacité et la toxicité des traitements anti-cancers. Ces dernières années de nombreux progrès ont été réalisés en immunothérapie. Cependant les chimiothérapies restent le traitement de référence dans de nombreux cancers comme dans le cancer du poumon, en dépit des nombreux effets secondaires. C'est pour cela, qu'il est important aujourd'hui d'augmenter nos connaissances au sujet de la relation microbiote-chimiothérapie afin de progresser vers une médecine personnalisée, qui prendra en compte les caractéristiques de la tumeur et du patient, comme le microbiote. Cette thèse a pour but d'étudier l'impact d'une chimiothérapie sur le microbiote intestinal dans un modèle de souris xénogreffées (Patient Derived Tumor Xenograft Models ou PDX) de cancer du poumon.

Lors de ma recherche d'un projet de thèse, l'aspect innovant et prometteur du sujet proposé par Biofortis Mérieux NutriSciences a tout de suite retenu mon attention. D'une part, il répondait à mon souhait de travailler en cancérologie, un domaine qui me tient à cœur, et d'autre part, en 2015, la recherche sur la relation microbiote et cancer était en pleine effervescence. Mener ma thèse durant trois ans sur un sujet en plein essor et sur une thématique grandissante était un challenge que je voulais relever.

Cette thèse était aussi en adéquation avec mon projet professionnel car elle faisait suite à mon Master de « Génétique Moléculaire et Cellulaire », et me permettait donc

de compléter ma formation en apprenant la technique de métaséquançage et me permettait d'aborder l'analyse bioinformatique et biostatistique des données.

La thèse CIFRE (Convention Industrielle de la Formation par la Recherche), était pour moi la forme de thèse idéale car elle me permettait à la fois de découvrir le fonctionnement de deux mondes professionnels différents : la recherche académique et la recherche en entreprise. Je voyais cette collaboration entre ces deux différents laboratoires comme une source d'apprentissage, et une expérience enrichissante.

Un autre atout de cette thèse est son incorporation dans un projet national collaboratif appelé IMODI (Innovative MODels Initiative against cancer). Ce projet regroupe de nombreux partenaires, privés et publics, répartis sur le territoire national. IMODI m'a ainsi donné l'opportunité de rencontrer et de travailler avec de nombreux collaborateurs, d'apprendre la chefferie de projets en entreprise et surtout de pouvoir travailler sur un sujet translationnel, à la fois préclinique et clinique. Le projet IMODI a pour but de développer de nouveaux modèles précliniques afin de pouvoir trouver des traitements innovants et d'avancer dans la médecine personnalisée. Basés sur le transfert d'une tumeur primaire d'un patient sur des souris immuno-déprimées, les modèles de souris PDX sont de puissants modèles animaux, utilisés pour la recherche en oncologie.

Innovant, Translationnel et Interactionnel sont les maîtres mots qui ont motivé ma décision de prendre part à cette thèse CIFRE.

Ce mémoire comporte en premier lieu une synthèse bibliographique, divisée en trois parties, permettant de situer le contexte de cette thèse. La première partie fait un état de l'art du cancer du poumon, des thérapies employées pour le traiter, et notamment le pemetrexed qui est le traitement chimiothérapeutique étudié au cours de ce travail. La deuxième partie porte sur la description du microbiote intestinal humain. Nous décrivons les différentes méthodes d'études, puis nous présenterons son établissement, sa composition, ses principaux rôles et fonctions. La troisième partie s'intéresse à la relation microbiote et cancer, à savoir le potentiel rôle du microbiote dans la carcinogenèse et les connaissances actuelles sur la relation microbiote et traitements chimiothérapeutiques. Puis, nous terminerons cette partie sur la

description de la relation entre le microbiote et le cancer du poumon. Ensuite, nous décrirons les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse, à travers deux articles et des résultats complémentaires associés. Enfin, ce mémoire se terminera par une discussion générale, ouverte sur des perspectives à court et plus long terme.

Introduction

Bibliographique

I. Cancer du poumon

1. Généralités

1.1. Epidémiologie

A l'échelle mondiale, en 2016, 17,2 millions de cas de cancer ont été recensés et la mortalité par cancer s'élevait à 8,9 millions de cas (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al., 2018). Entre 2006 et 2016, les cas de cancer ont augmenté en moyenne de 28% et cette augmentation est expliquée pour 19% par le vieillissement de la population et pour 11% par la croissance de la population (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al., 2018). En France métropolitaine, d'après l'Institut National du Cancer (INCa), en 2017, l'incidence est de 399 500 nouveaux cas de cancer (tous cancers confondus) dont 214 000 chez les hommes et 185 500 chez les femmes (INCa, 2017). Concernant la mortalité par cancer, elle est estimée à 150 000 cas en 2017, dont 84 000 cas chez les hommes et 66 000 cas chez les femmes. Même si les taux d'incidence et de mortalité tendent à diminuer grâce aux avancées scientifiques, aux diagnostics plus précoces et aux traitements plus efficaces, le cancer reste une des maladies les plus répandue dans le monde (INCa, 2017).

Le cancer du poumon, aussi appelé cancer bronchique, est un véritable problème de santé publique mondiale, car c'est le cancer le plus fréquent en terme d'incidence (2 millions de cas) et de mortalité (1,7 millions de cas) dans le monde (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al., 2018). D'après le rapport de l'INCa, l'incidence du cancer du poumon se situe au 4^e rang des cancers en France, tous sexes confondus, après les cancers du sein, de la prostate et colorectal. Avec une incidence estimée à 49 109 nouveaux cas dont 32 260 chez les hommes et 16 849 chez les femmes, il se place donc au 2^e rang des cancers chez l'homme (après le cancer de la prostate) et au 3^e rang chez la femme (après le cancer du sein et du colon-rectum). En 2017, le taux de mortalité par cancer du poumon est estimé à 30 991 décès dont 20 815 cas chez l'homme et 10 176 cas chez la femme, ce qui place ce cancer au 1^{er} rang des mortalités par cancer chez l'homme et au 2^{ème} rang chez la femme, après le cancer du sein (INCa, 2017).

De façon étonnante, les taux d'incidence et de mortalité chez la femme sont en forte progression (+5,4% d'incidence/an avec un taux moyen de mortalité de +4,6%/an entre 2005 et 2012) tandis que chez les hommes l'incidence se stabilise (-0,3%) et la mortalité tend à diminuer (-2,2%) (Figure 1) (INCa, 2017).

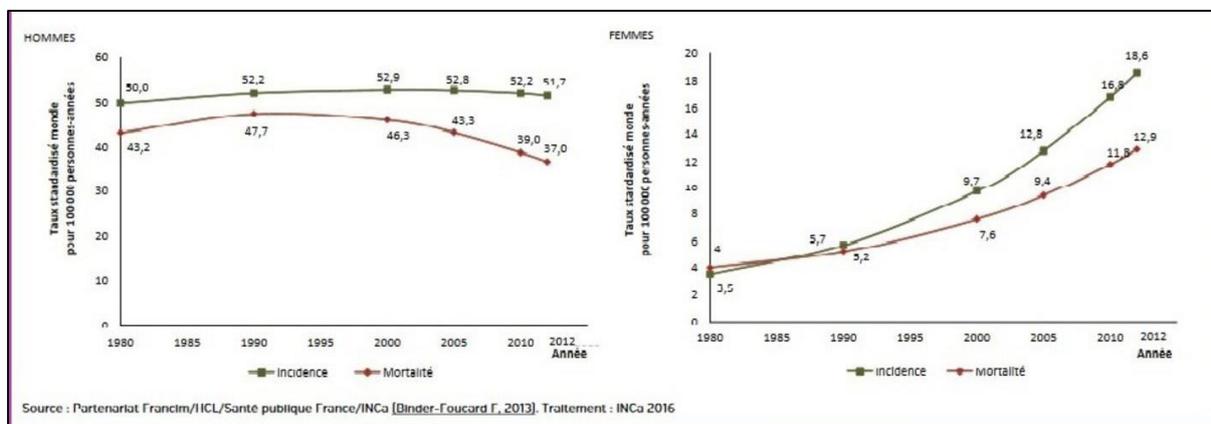


Figure 1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du poumon selon le sexe de 1980 à 2012 en France Métropolitaine (INCa, 2017).

L'évolution plus tardive de l'incidence et de la mortalité du cancer pulmonaire chez la femme est le reflet de 2 phénomènes, d'abord un début de consommation de tabac plus tardif par rapport à l'homme, puis par une hausse de la consommation par la population féminine. De plus, il semblerait que les femmes sont plus prédisposées car elles présentent 3 fois plus de risque de développer un cancer du poumon que les hommes, indépendamment du nombre de cigarettes par jour (Gasperino, 2011).

1.2. Facteurs de risques

Le cancer du poumon est une maladie multifactorielle, car même si le facteur de risque prédominant est sans aucun doute le tabac, d'autres facteurs environnementaux peuvent être pathologiques pour le poumon.

a) Tabac

Le tabac est de loin le facteur de risque le plus important dans le développement du cancer du poumon. Depuis les années 30, la cigarette a été identifiée comme facteur responsable des cancers du poumon (Ridge et al., 2013). Aux Etats-Unis, on estime qu'environ 90% des morts par cancer du poumon chez les hommes et 75-80% chez

les femmes sont causées par la cigarette. Parmi la soixantaine de composants cancérigènes dans la fumée de cigarette identifiés par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), les plus dangereux sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques, comme le benzo[a]pyrène, et les N-nitrosamines (Sun et al., 2007; Thomas et al., 2011). Dans le but d'excréter les molécules carcinogènes de l'organisme, l'enzyme Cytochrome P450 va les rendre plus solubles en ajoutant un atome d'oxygène. Mais lors de cette réaction, des métabolites intermédiaires peuvent se fixer à l'ADN et entraîner la mort cellulaire ou perturber la réparation de l'ADN. A long terme, cela peut induire des mutations sur certains gènes dont P53 et KRAS. Ces mutations sont un évènement clé de l'instabilité génomique et de la carcinogénèse pulmonaire (Sun et al., 2007).

Le risque de développer un cancer du poumon pour une personne ayant fumé pendant longtemps est estimé à 10-30 fois plus élevé comparé à un non-fumeur (Locher et al., 2013; Pallis and Syrigos, 2013; Sun et al., 2007). Cependant ce cancer peut aussi toucher des personnes non-fumeuses. Chez les non-fumeurs, le cancer du poumon apparait dans approximativement 25% des cas d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Pallis and Syrigos, 2013).

b) Tabagisme passif

Le tabagisme passif est aussi un facteur de risque important, en particulier pour les personnes vivant avec un fumeur. Le CIRC estime que le risque de développer un cancer bronchique augmente de 35% pour les hommes et 25% pour les femmes qui sont exposés au tabagisme passif (Pallis and Syrigos, 2013; Yang, 2011). Ainsi, une étude rapporte que les métabolites du tabac sont retrouvés dans 90% des urines d'enfants ayant des parents fumeurs (Thomas et al., 2011).

c) Facteurs environnementaux

Le radon est considéré comme le deuxième facteur de risque pour le cancer du poumon d'après l'Agence de Protection Environnementale. L'effet cancérigène du radon a été découvert chez des mineurs exposés à de fortes concentrations de radon dans les mines d'uranium (Samet and Hornung, 1990). Ce gaz radioactif, indolore et incolore, émet des radiations α qui agissent directement sur l'ADN. Ce gaz naturel est

présent spécifiquement dans les sous-sols granitiques et volcaniques. Il provient de la transformation de l'uranium, constituant de la croûte terrestre (Lantz et al., 2013). La principale exposition au radon est donc une exposition domestique, en particulier dans les zones riches en granit, comme en Bretagne.

Une autre cause potentielle est l'exposition à la pollution de l'air des villes, riche en nombreux composants d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. En Europe, la proportion des cancers du poumon due à la pollution de l'air urbain est estimée à 11% (Molina, 2008).

Les expositions professionnelles représentent une grande part des facteurs de risque du cancer du poumon. Le plus couramment rencontré est l'exposition à l'amiante (Ridge et al., 2013). Même si son utilisation est interdite en France depuis 1997 et en Europe depuis 2005, les risques d'exposition persistent lors de travaux de désamiantage, de démolition ou d'entretien de bâtiments anciens non conformes. Il existe d'autres agents environnementaux associés au cancer du poumon comme : la silice, le chrome, le nickel, l'arsenic, ou encore le béryllium (Ridge et al., 2013).

Comme mentionné précédemment, le genre peut également contribuer à favoriser le cancer du poumon. Chez les non-fumeurs, la forte incidence chez les femmes permet de mettre en avant le potentiel rôle des œstrogènes (ER α et β) dans la carcinogenèse du poumon (Pallis and Syrigos, 2013). Ainsi l'association œstrogène et tabac sont d'importants co-facteurs de carcinogenèse du poumon (Gasperino, 2011).

L'alimentation peut également avoir un rôle, en particulier les vapeurs d'huile cuisinées à haute température. Lors des cuissons, les substances volatiles générées peuvent être mutagènes ou peuvent contenir des mutagènes comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cette cuisine, principalement utilisée en Chine, augmente le risque de cancer du poumon chez les femmes n'ayant jamais fumé, entraînant donc un biais concernant les chiffres d'incidences chez la femme (North and Christiani, 2013).

L'altération de la composition du microbiote pulmonaire peut également favoriser l'apparition du cancer du poumon. Ce lien sera décrit par la suite dans le chapitre 3.

1.3. Anatomie du poumon

Les poumons, situés dans la cage thoracique, sont divisés en plusieurs lobes. Le poumon droit comprend 3 lobes alors que le poumon gauche n'en compte que 2. La trachée se divise en 2 bronches qui pénètrent dans les poumons en se ramifiant et se divisant de plus en plus jusqu'à donner des bronchioles (Figure 2). Les bronchioles se terminent par des alvéoles pulmonaires, de petites cavités où ont lieu les échanges gazeux entre l'air et le sang. Les bronchioles diffèrent des bronches par le fait qu'elles ont une paroi musculaire incomplète, et ne contiennent ni cartilage ni glande. La différence s'observe également au niveau de la composition cellulaire de l'épithélium. Les bronches possèdent des cellules ciliées, des cellules caliciformes et des cellules neuro-endocrines, toutes différenciées à partir des cellules souches (cellules basales). Dans l'épithélium des bronchioles, la composition est similaire mais au fur et à mesure que le diamètre des bronchioles diminue, l'épithélium devient plus fin et les cellules à mucus se raréfient alors que les cellules de Clara apparaissent. Au niveau des alvéoles, l'épithélium a la particularité de posséder des cellules de Clara, des pneumocytes de type I et II (Figure 2) (Sun et al., 2007).

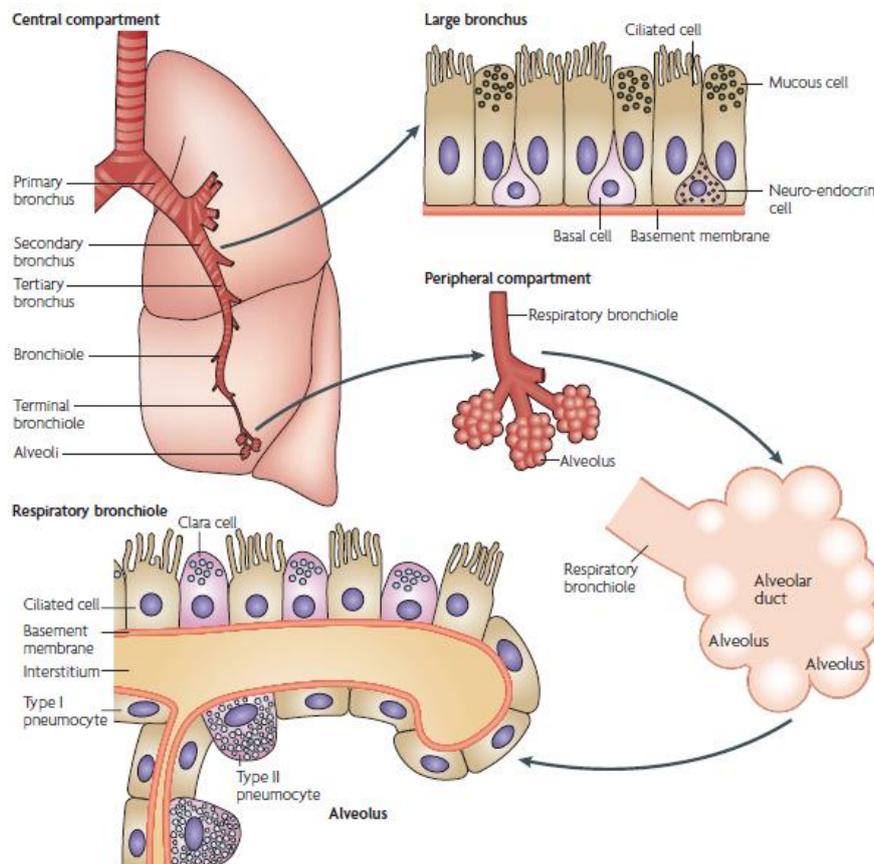


Figure 2 : Schéma de l'anatomie du poumon (Sun et al., 2007).

1.4. Classifications des différents cancers du poumon

D'un point de vue histologique, le cancer du poumon est généralement divisé en deux groupes :

- le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)
- le cancer bronchique à petites cellules (CBPC)

Les cancers à petites cellules touchent principalement les cellules qui tapissent les bronches. Ce type de cancer est dit agressif car le risque de développer des métastases est très important. Les cancers non à petites cellules sont les plus fréquents car ils représentent environ 85% des cancers du poumon (Molina, 2008; Sun et al., 2007). Dans les CBNPC, on distingue trois types de tumeurs :

- Le carcinome épidermoïde qui prend naissance dans les cellules malpighiennes tapissant la trachée jusqu'aux poumons (40%).
- L'adénocarcinome bronchique qui se forme habituellement dans les épithéliums glandulaires situés dans la partie externe du poumon (40%).
- Le carcinome à grandes cellules (20%).

En 2015, l'OMS a publié la nouvelle classification des tumeurs bronchiques (Figure 3) en prenant en compte les nouvelles avancées génétiques, thérapeutiques et diagnostiques (Travis et al., 2015). Le but de cette classification très précise est de mieux stratifier les patients pour apporter des soins plus adaptés et se rapprocher de plus en plus d'une médecine personnalisée.

La nouvelle classification inclut principalement ces changements :

- Classification applicable aux biopsies et aux échantillons cytologiques
- Tests génétiques pour sélectionner le traitement
- Inclusion de marqueurs d'immunohistochimie plus précis pour la classification des CBNPC
- Changement dans la classification des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes
- Nouvelles informations génétiques sur les sous-types tumoraux

TABLE 1. 2015 WHO Classification of Lung Tumors^{a,b,c}

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Epithelial tumors	
Adenocarcinoma	8140/3
Lepidic adenocarcinoma ^a	8250/3 ^d
Acinar adenocarcinoma	8551/3 ^d
Papillary adenocarcinoma	8260/3
Micropapillary adenocarcinoma ^a	8265/3
Solid adenocarcinoma	8230/3
Invasive mucinous adenocarcinoma ^a	8253/3 ^d
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 ^d
Colloid adenocarcinoma	8480/3
Fetal adenocarcinoma	8333/3
Enteric adenocarcinoma ^a	8144/3
Minimally invasive adenocarcinoma ^a	
Nonmucinous	8256/3 ^d
Mucinous	8257/3 ^d
Preinvasive lesions	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 ^d
Adenocarcinoma in situ ^a	
Nonmucinous	8250/2 ^d
Mucinous	8253/2 ^d
Squamous cell carcinoma	8070/3
Keratinizing squamous cell carcinoma ^a	8071/3
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma ^a	8072/3
Basaloid squamous cell carcinoma ^a	8083/3
Preinvasive lesion	
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2
Neuroendocrine tumors	
Small cell carcinoma	8041/3
Combined small cell carcinoma	8045/3
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Carcinoid tumors	
Typical carcinoid tumor	8240/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3
Preinvasive lesion	
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 ^d
Large cell carcinoma	8012/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Sarcomatoid carcinomas	
Pleomorphic carcinoma	8022/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Giant cell carcinoma	8031/3
Carcinosarcoma	8980/3
Pulmonary blastoma	8972/3
Other and Unclassified carcinomas	
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3
NUT carcinoma ^a	8023/3 ^d
Salivary gland-type tumors	
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
Adenoid cystic carcinoma	8200/3
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3
Pleomorphic adenoma	8940/0

(Continued)

TABLE 1. (Continued)

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Papillomas	
Squamous cell papilloma	8052/0
Exophytic	8052/0
Inverted	8053/0
Glandular papilloma	8260/0
Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Adenomas	
Sclerosing pneumocytoma ^a	8832/0
Alveolar adenoma	8251/0
Papillary adenoma	8260/0
Mucinous cystadenoma	8470/0
Mucous gland adenoma	8480/0
Mesenchymal tumors	
Pulmonary hamartoma	8992/0 ^d
Chondroma	9220/0
PEComatous tumors^a	
Lymphangiomyomatosis	9174/1
PEComa, benign ^a	8714/0
Clear cell tumor	8005/0
PEComa, malignant ^a	8714/3
Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Epithelioid hemangioendothelioma	9133/3
Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Synovial sarcoma	9040/3
Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation ^a	8842/3 ^d
Myoepithelial tumors^a	
Myoepithelioma	8982/0
Myoepithelial carcinoma	8982/3
Lymphohistiocytic tumors	
Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Diffuse large cell lymphoma	9680/3
Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Intravascular large B cell lymphoma ^a	9712/3
Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Erdheim-Chester disease	9750/1
Tumors of ectopic origin	
Germ cell tumors	
Teratoma, mature	9080/0
Teratoma, immature	9080/1
Intrapulmonary thymoma	8580/3
Melanoma	8270/3
Meningioma, NOS	9530/0
Metastatic tumors	

^aThe morphology codes are from the ICDO.² Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.

^bThe classification is modified from the previous WHO classification¹ taking into account changes in our understanding of these lesions.

^cThis table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.¹

^dThese new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.

^eNew terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.¹

LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma. WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

Figure 3 : Classification des cancers du poumon (Travis et al., 2015)

2. Thérapies pour le cancer du poumon

La prise de décision pour traiter le cancer du poumon, et en particulier pour le type CBNPC, se fait en fonction de la classification Tumeur, Nodule et Métastase (TNM). Cette classification, dont la dernière édition est apparue en 2015, permet de prendre en compte la taille de la tumeur primitive (composante T), l'envahissement des ganglions lymphatiques voisins (composante N) et la présence de métastase (composante M) (Tableau 1) (Goldstraw et al., 2016). Le Tableau 1 présente la nouvelle classification ainsi que la correspondance du stade de la tumeur (I, II ou III) en fonction du grade des 3 composants T, N et M. Le Tableau 2 présente les caractéristiques tumorales de chaque composant T, N et M et le grade qu'il lui est attribué (0, 1, 2, 3 ou 4).

Tableau 1 : Classification TNM et correspondance avec le stade des CBNPC (8ème édition) (Goldstraw et al., 2016)

Table 5. Descriptors and T and M categories in the seventh edition and as proposed for the eighth edition^a					
Descriptor in 7th edition	Proposed T/M	N categories			
		Overall stage			
		N0	N1	N2	N3
T1 ≤ 1 cm	T1a	IA1 (IA)	IIB (IIA)	IIIA	IIIB
T1 > 1-2 cm	T1b	IA2 (IA)	IIB (IIA)	IIIA	IIIB
T1 > 2-3 cm	T1c	IA3 (IA)	IIB (IIA)	IIIA	IIIB
T2 > 3-4 cm	T2a	IB	IIB (IIA)	IIIA	IIIB
T2 > 4-5 cm	T2b	IIA (IB)	IIB (IIA)	IIIA	IIIB
T2 > 5-7 cm	T3	IIB (IIA)	IIIA (IIB)	IIIB (IIIA)	IIIC (IIIB)
T3 structures	T3	IIB	IIIA	IIIB (IIIA)	IIIC (IIIB)
T3 > 7 cm	T4	IIIA (IIB)	IIIA	IIIB (IIIA)	IIIC (IIIB)
T3 diaphragm	T4	IIIA (IIB)	IIIA	IIIB (IIIA)	IIIC (IIIB)
T3 endobronchial: location/atelectasis 3-4 cm	T2a	IB (IIB)	IIB (IIIA)	IIIA	IIIB
T3 endobronchial: location/atelectasis 4-5 cm	T2b	IIA (IIB)	IIB (IIIA)	IIIA	IIIB
T4	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC (IIIB)
M1a	M1a	IVA (IV)	IVA (IV)	IVA (IV)	IVA (IV)
M1b single lesion	M1b	IVA (IV)	IVA (IV)	IVA (IV)	IVA (IV)
M1c multiple lesions	M1c	IVB (IV)	IVB (IV)	IVB (IV)	IVB (IV)

^aWhere there is a change, the resultant stage groupings proposed for the eighth edition are in bold, and the stage in the seventh edition is given in parenthesis.
T, tumor; M, metastasis.

Tableau 2: Description de chaque composantes T, N et M (Goldstraw et al., 2016)

Table 1. Proposed T, N, and M descriptors for the eighth edition of TNM classification for lung cancer	
T: Primary tumor	
Tx	Primary tumor cannot be assessed or tumor proven by presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤3 cm in greatest dimension surrounded by lung or visceral pleura without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (i.e., not in the main bronchus) ^a
T1a(mi)	Minimally invasive adenocarcinoma ^b
T1a	Tumor ≤1 cm in greatest dimension ^a
T1b	Tumor >1 cm but ≤2 cm in greatest dimension ^a
T1c	Tumor >2 cm but ≤3 cm in greatest dimension ^a
T2	Tumor >3 cm but ≤5 cm or tumor with any of the following features: - Involves main bronchus regardless of distance from the carina but without involvement of the carina - Invades visceral pleura - Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region, involving part or all of the lung
T2a	Tumor >3 cm but ≤4 cm in greatest dimension
T2b	Tumor >4 cm but ≤5 cm in greatest dimension
T3	Tumor >5 cm but ≤7 cm in greatest dimension or associated with separate tumor nodule(s) in the same lobe as the primary tumor or directly invades any of the following structures: chest wall (including the parietal pleura and superior sulcus tumors), phrenic nerve, parietal pericardium
T4	Tumor >7 cm in greatest dimension or associated with separate tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe than that of the primary tumor or invades any of the following structures: diaphragm, mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, and carina
N: Regional lymph node involvement	
Nx	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)
M: Distant metastasis	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis present
M1a	Separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe; tumor with pleural or pericardial nodule(s) or malignant pleural or pericardial effusion ^c
M1b	Single extrathoracic metastasis ^d
M1c	Multiple extrathoracic metastases in one or more organs
<p>Note: Changes to the seventh edition are in bold.</p> <p>^aThe uncommon superficial spreading tumor of any size with its invasive component limited to the bronchial wall, which may extend proximal to the main bronchus, is also classified as T1a.</p> <p>^bSolitary adenocarcinoma, ≤ 3cm with a predominately lepidic pattern and ≤ 5mm invasion in any one focus.</p> <p>^cT2 tumors with these features are classified as T2a if ≤4 cm in greatest dimension or if size cannot be determined, and T2b if >4 cm but ≤5 cm in greatest dimension.</p> <p>^dMost pleural (pericardial) effusions with lung cancer are due to tumor. In a few patients, however, multiple microscopic examinations of pleural (pericardial) fluid are negative for tumor and the fluid is nonbloody and not an exudate. When these elements and clinical judgment dictate that the effusion is not related to the tumor, the effusion should be excluded as a staging descriptor.</p> <p>^eThis includes involvement of a single distant (nonregional) lymph node.</p>	

2.1. Chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence pour les CBNPC lorsque le stade n'est pas trop avancé, en stade I et II. Le taux de survie à 5 ans est entre 40 et 67% suite à une chirurgie chez les patients en stade IA (Hoffman et al., 2000). Dans certains cas, elle peut être pratiquée chez des patients en stade clinique IIIa et de façon beaucoup plus rare en stade IIIb et IV (Lang-Lazdunski, 2013).

Plusieurs types de chirurgie peuvent être appliqués :

- La pneumonectomie, qui consiste à retirer le poumon entier où siège la tumeur
- La lobectomie, qui consiste à retirer 1 lobe
- La segmentectomie permet d'enlever une partie du poumon

2.2. Radiothérapie

Il existe deux types de radiothérapie : la radiothérapie stéréotaxique et la radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (3D). Leur utilisation diffère en fonction du stade de la tumeur.

La radiothérapie stéréotaxique est utilisée pour traiter de petites tumeurs, les métastases dans le cerveau ou les tumeurs profondes pour lesquelles l'intervention chirurgicale est dangereuse. C'est une technique de haute précision basée sur des microfaisceaux convergents, qui irradient à haute dose de très petits volumes en encerclant la tumeur ou la métastase. Cette radiothérapie est utilisée pour des tumeurs localisées de stade I ou II, lorsque la chirurgie n'est pas possible.

La technique en 3D est la radiothérapie la plus utilisée. C'est une radiothérapie externe, qui retranscrit le plus précisément la zone à traiter en image 3D. Ainsi la forme des faisceaux et la dose appliquée sont calculées en fonction du volume de la tumeur et de la zone à traiter. Cette radiothérapie est prescrite pour compléter la chirurgie et la chimiothérapie lorsque la tumeur n'a pas été enlevée dans sa totalité. Pour les tumeurs non opérables, la radiothérapie est souvent associée à une chimiothérapie, on parle de radiochimiothérapie. Si elles sont réalisées en même temps, on parle de radiochimiothérapie concomitante ou si elles sont réalisées l'une après l'autre, on parle de radiochimiothérapie séquentielle.

2.3. Chimiothérapie

Malgré de remarquables avancées dans le domaine des thérapies ciblées et des immunothérapies, les chimiothérapies restent encore très utilisées. Près de 70% des patients avec un cancer du poumon présentent un cancer localisé avancé ou métastatique lors du diagnostic. Dans ce cas, la chirurgie est impossible et les patients bénéficient d'une chimiothérapie palliative (Molina, 2008). Aussi, environ 60% des tumeurs ne présentent pas de mutations dirigées (« driver mutation ») donc elles ne peuvent être traitées par des thérapies ciblées (Olaussen and Postel-Vinay, 2016).

Il existe 4 classes d'agents chimiothérapeutiques couramment utilisés. Les chimiothérapies les plus généralement utilisées dans chaque groupe sont (Figure 4) :

- Les agents alkylants, qui ciblent directement l'ADN pour arrêter la réplication et la transcription (cisplatine, carboplatine)
- Les antimétaboliques, qui bloquent la synthèse des acides nucléiques (pemetrexed, gemcitabine)
- Les inhibiteurs de topoisomérases, qui agissent directement sur cette enzyme qui détend l'ADN et empêche la réplication et la transcription (topotecan, etoposide)
- Les poisons du fuseau mitotique (vinorelbine, paclitaxel, docetaxel)

Souvent ces chimiothérapies sont administrées en association avec les sels de platine.

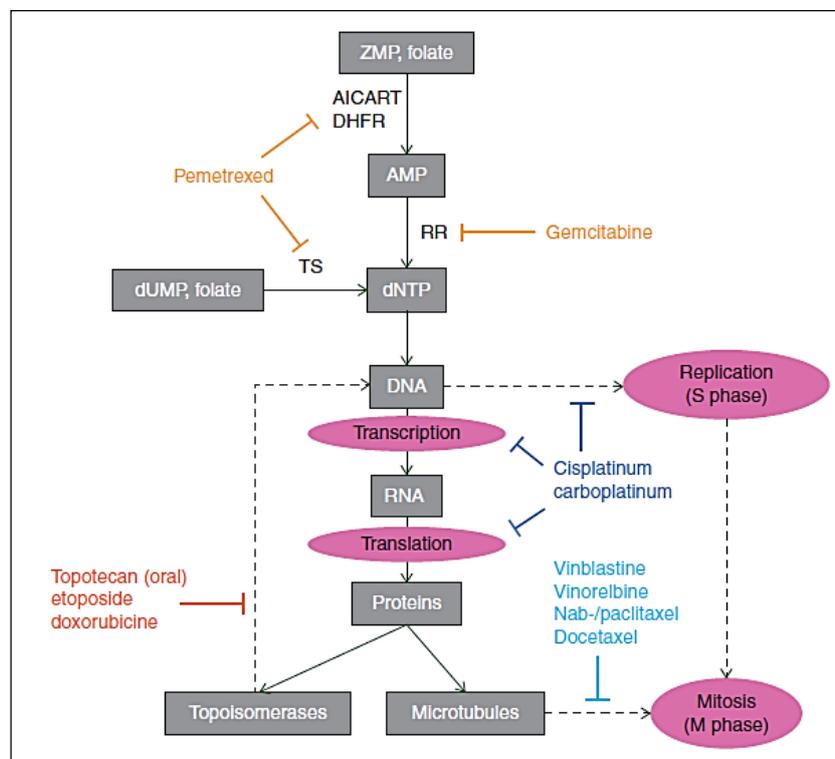


Figure 4 : Différentes classes d'agents chimiothérapeutiques et leurs cibles cellulaires (Olaussen and Postel-Vinay, 2016)

Les chimiothérapies peuvent être utilisées à différentes étapes du traitement du cancer. Tout d'abord en amont de la chirurgie, on appelle cela une chimiothérapie néoadjuvante. Une méta-analyse a montré le bénéfice de la chimiothérapie néoadjuvante (NSCLC Meta-analysis Collaborative Group, 2014). Lors de son utilisation, elle peut augmenter de 5% la survie à 5 ans et diminuer de 13% la mortalité. Egalement, son avantage est son potentiel à réduire la taille de la tumeur, à éradiquer

les métastases et à augmenter la possibilité d'opération (NSCLC Meta-analysis Collaborative Group, 2014)). Si elle est administrée après la chirurgie avec pour but d'éliminer les cellules tumorales qui auraient échappé à la chirurgie, on appelle cela une chimiothérapie adjuvante. Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité d'une chimiothérapie adjuvante post-opératoire pour, à la fois, éviter les rechutes et pour augmenter la survie à 5 ans (Molina, 2008). La méta-analyse de Burdett *et al.* montre que la chimiothérapie adjuvante après chirurgie augmente la survie à 5 ans de 4% (Burdett et al., 2015). Enfin la chimiothérapie palliative permet de contrôler la tumeur et de prolonger la vie du patient. Ce type de chimiothérapie est administré au patient avec un cancer localement avancé voire métastatique (stade IV), ou en rechute (Molina, 2008).

2.4. Thérapies ciblées

Le terme « théranostic » qui combine à la fois le diagnostic et la thérapeutique, a pris un sens important ces dernières années en oncologie car il mène vers une médecine personnalisée. Au-delà de la classification histologique, un criblage de la tumeur est réalisé pour identifier des biomarqueurs prédictifs et pronostics, permettant d'orienter le choix du traitement et d'estimer sa sensibilité.

Comme nous le montre la Figure 5, plus de 60% des adénocarcinomes et plus de 80% des carcinomes épidermoïdes possèdent une mutation dans un oncogène connu (Figure 5) (Chan and Hughes, 2015). Ces mutations, activatrices ou inhibitrices, vont principalement impacter les voies de signalisation comme RAS-RAF-MEK-ERK ou PI3K-AKT-mTOR.

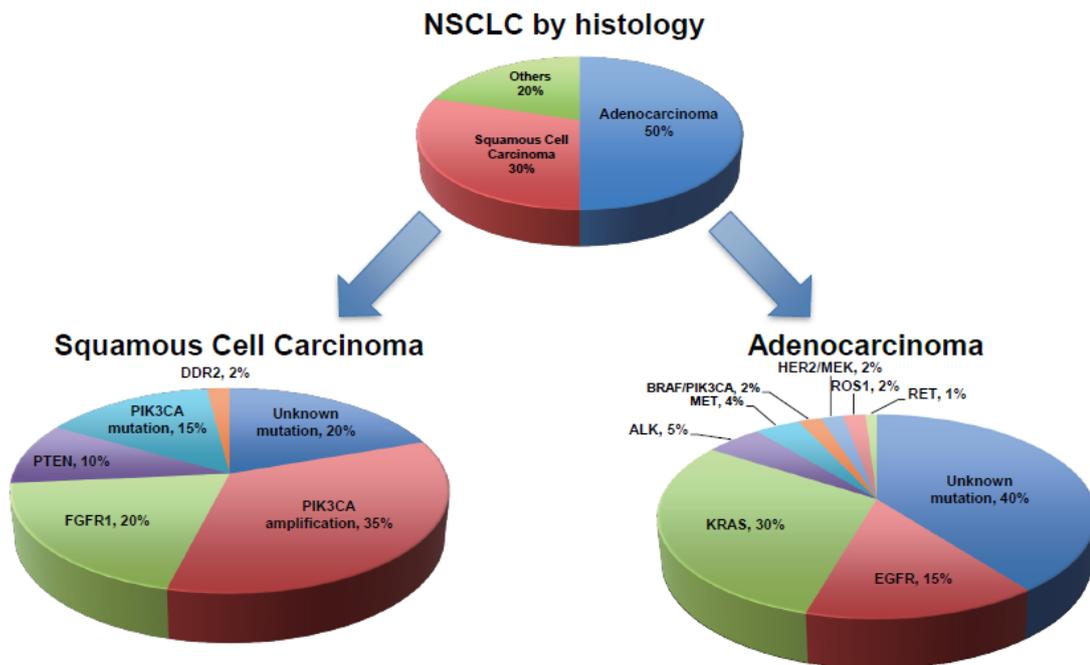


Figure 5 : Répartition des mutations dans le CBNPC (Chan and Hughes, 2015).

Ainsi, nos connaissances actuelles des principales mutations activatrices permettent d'identifier la thérapie ciblée la plus pertinente. A ce jour, 4 thérapies ciblées ont montré leurs efficacités contre les cancers portant des mutations dans les gènes :

- Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)
- Le réarrangement des gènes Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) et Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)
- ROS1, un gène codant pour un récepteur de tyrosine kinase
- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2)

Concernant les autres mutations prédictives et pronostics, bien qu'elles soient fréquentes et bien renseignées, soit des essais cliniques sont en cours, soit une thérapie ciblée efficace n'a pas encore été trouvée.

Les deux mutations les plus documentées et celles possédant les thérapies ciblées les plus efficaces à ce jour, sont décrites ci-dessous :

- L'EGFR

La mutation activatrice du gène EGFR se retrouve essentiellement dans les adénocarcinomes dans environ 15% des cas (Alamgeer et al., 2013; Chan and Hughes, 2015). Les mutations activatrices d'EGFR, générant une sur-expression de EGFR, sont majoritairement retrouvées dans le domaine Tyrosine Kinase (TK), c'est-à-dire dans les exons 18 à 21. La mutation L858R dans l'exon 21 et des délétions dans l'exon 19 sont les plus fréquentes (90%) (Figure 6) (Luo and Lam, 2013). Concernant les traitements, le gefitinib (Iressa®, AstraZeneca) et l'erlotinib (Tarceva®, Roche) sont deux traitements approuvés dans les CBNPC locaux avancés ou métastatiques avec une mutation EGFR (Alamgeer et al., 2013). Ce sont deux chimiothérapies anti EGFR-Tyrosine Kinase (EGFR-TK).

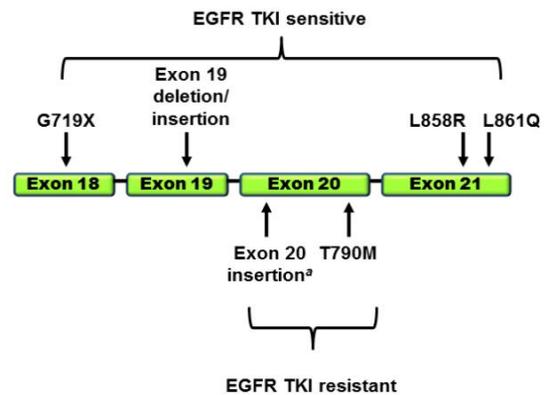


Figure 6 : Schéma de la mutation EGFR dans le cancer du poumon, d'après mycancergenome.org

- Le réarrangement des gènes ALK-EML4

Ce réarrangement, présent dans environ 4 à 7% des adénocarcinomes (Alamgeer et al., 2013; Chan and Hughes, 2015), est une fusion des gènes ALK et EML4 sur le chromosome 2p (Figure 7) (Luo and Lam, 2013). Ce réarrangement survient souvent chez les jeunes sujets ou les non-fumeurs (Alamgeer et al., 2013). Le Crizotinib (Xalkori®, Pfizer) est le traitement préconisé pour les cancers avancés ou présentant un remaniement ALK-EML4. Aussi, la présence de ALK-ELM4 est associée à une résistance aux traitements EGFR-TKI.

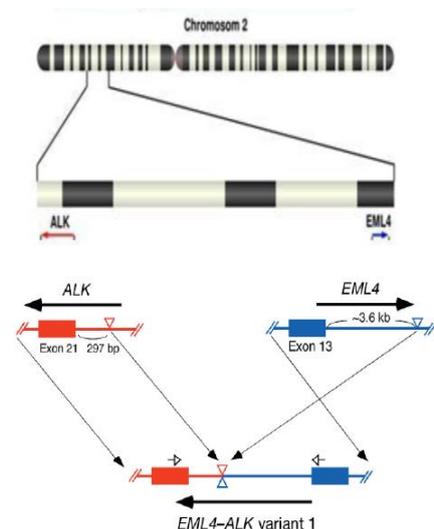


Figure 7 : Schéma du réarrangement des gènes ALK-EML4 dans le cancer du poumon, adapté de Soda et al., 2007

2.5. Immunothérapie

Parmi les patients atteints d'un cancer du poumon, seul 15-25% des patients peuvent bénéficier d'immunothérapie (Olaussen and Postel-Vinay, 2016).

Dans le microenvironnement tumoral, les cellules cancéreuses détournent le mécanisme du système immunitaire de l'hôte afin de rendre l'immunité anti-tumorale inefficace. Ainsi les cellules cancéreuses peuvent continuer à proliférer, et surexpriment à leurs surfaces des inhibiteurs de ligands et de récepteurs permettant d'empêcher la réponse immunitaire des lymphocytes T. Ce sont ces ligands que les immunothérapies vont cibler (Figure 8) (Xia and Herbst, 2016).

Les principaux mécanismes d'évasion sont les voies CTLA-4 et PD-1. Les molécules d'immunothérapie sont des anticorps qui vont cibler soit CTLA-4, PD-1 ou PD-L1 et bloquer l'interaction entre la cellule cancéreuse et le lymphocyte T, pour permettre de réactiver la réponse immunitaire anti-tumorale (Minguet et al., 2016; Xia and Herbst, 2016).

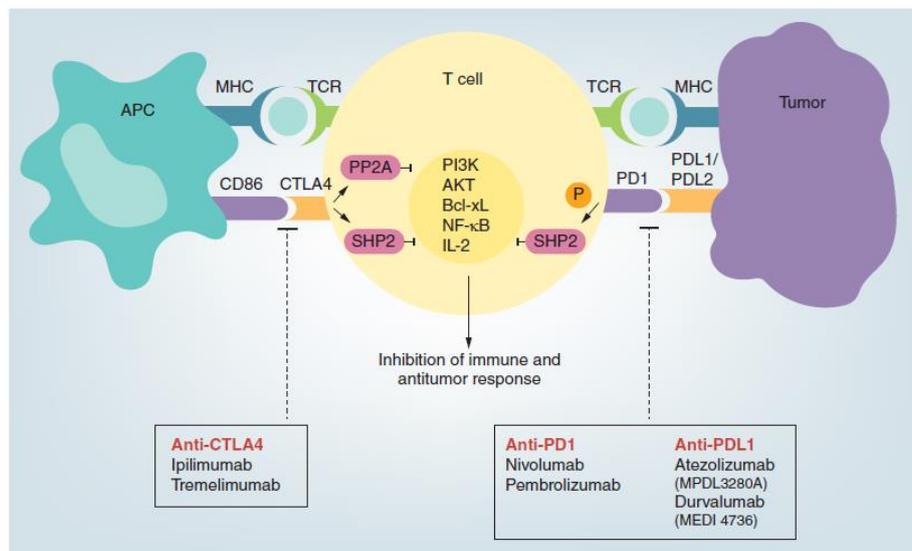


Figure 8 : Mécanismes de dérégulation des lymphocytes T par les cellules cancéreuses par les voies CTLA-4 et PD-1 et inhibition de ces voies par les 3 types d'immunothérapies (Xia and Herbst, 2016).

Parmi les immunothérapies utilisées, il en existe 6 sur le marché :

- Anti-CTLA-4: Ipilimumab (Bristol Myers Squibb) et Tremelimumab (AstraZeneca)
- Anti-PD-1: Pembrolizumab (Merck) et Nivolumab (Bristol Myers Squibb)
- Anti-PD-L1: Atezolizumab (Genentech/Roche) et Durvalumab (Medimmune)

3. Pemetrexed

Le pemetrexed (ALIMTA, LY231514), de formule moléculaire $C_{20}H_{21}N_5O_6$ (Figure 9), est un agent chimiothérapeutique qui fait partie de la classe des agents anti-métaboliques et plus précisément des anti-folates (Adjei, 2004).

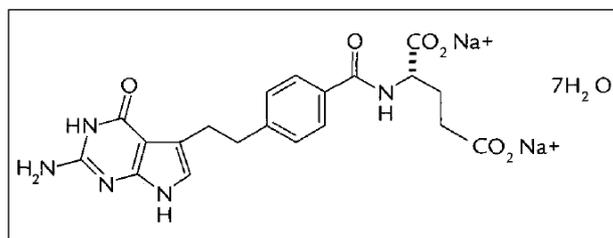


Figure 9 : Structure chimique du pemetrexed (Rollins and Lindley, 2005)

3.1. Mode d'action

a) Mode de transport et activation du pemetrexed

Contrairement aux autres molécules anti-folates (methotrexate, raltitrexed, pralatrexate,...), le pemetrexed peut entrer dans la cellule par deux mécanismes principaux (Figure 10). Le premier met en jeu un transporteur de folate réduit (RFC, Reduced Folate Carrier), un transporteur bidirectionnel le plus utilisé pour le transport des folates (Rollins and Lindley, 2005). Le deuxième mécanisme, qui a une très forte affinité avec le pemetrexed mais une capacité de diffusion plus faible, se fait *via* le récepteur- α du folate (FR- α , Folate Receptor- α), un récepteur membranaire qui permet l'entrée du folate dans la cellule en formant des vésicules d'endocytose (Adjei, 2004; Rollins and Lindley, 2005) (Figure 10).

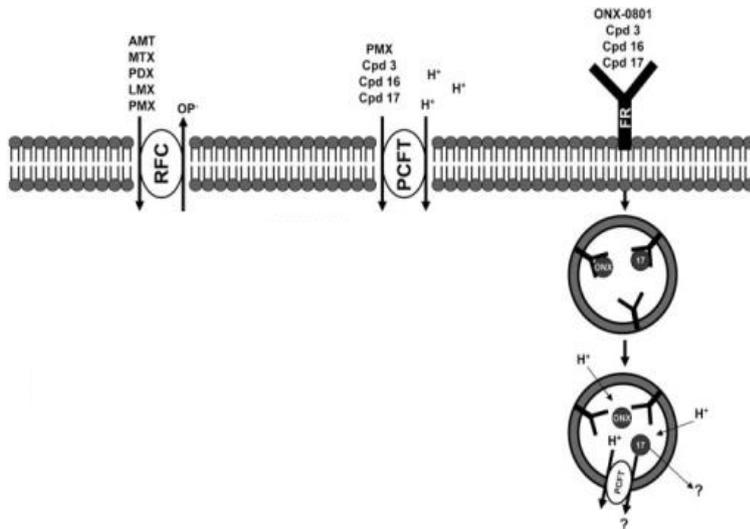


Figure 10 : Schéma des transporteurs de folate permettant au pemetrexed de rentrer dans la cellule. Adapté de (Desmoulin et al., 2012)

Une fois dans la cellule, le pemetrexed est polyglutaminé en un pentaglutamate actif, par une enzyme appelée la folypolyglutamate synthase (FPGS) (Adjei, 2004; Rollins and Lindley, 2005). Comparé à d'autres molécules anti-folates comme le methotrexate ou le lometrexol, le pemetrexed est l'un des meilleurs substrats pour la FPGS. De ce fait, l'activation du pemetrexed dans la cellule est beaucoup plus efficace que ces homologues. Donc la rétention et l'accumulation du pemetrexed dans la cellule est beaucoup plus importante.

b) Mécanisme d'action

Le pemetrexed, un analogue du folate, inhibe plusieurs enzymes impliquées dans la voie des folates (Figure 4, Figure 11) :

- Thymidylate synthase (TS)
- Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide formyltransferase (AICARFT)
- Glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT)
- Dihydrofolate reductase (DHFR)

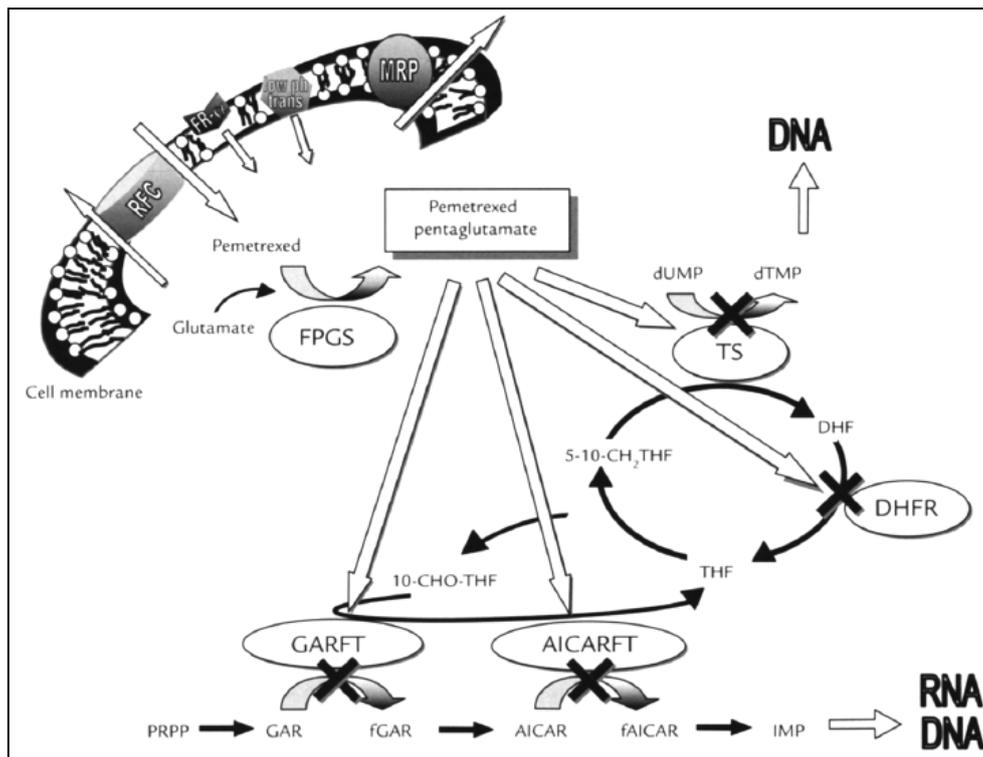


Figure 11 : Mécanisme d'action du pemetrexed (Rollins and Lindley, 2005)

De toute évidence, la TS est la cible prédominante du pemetrexed. C'est une enzyme folate dépendante, qui catalyse la transformation du deoxyuridine monophosphate (dUMP) en deoxythymidine monophosphate (dTMP) (Figure 11) (Molina and Adjei, 2003). L'inhibition de la TS entraîne donc une diminution de dTMP, une molécule nécessaire à la formation du nucléotide deoxythymidine triphosphate (dTTP) et nécessaire à la synthèse de l'ADN (Molina and Adjei, 2003; Rollins and Lindley, 2005). Le pemetrexed inhibe aussi AICARFT et GARFT, des enzymes essentielles à la synthèse des purines *de novo*. Le pemetrexed inhibe également, mais de façon moins importante, la DHFR qui a pour rôle de réduire le dihydrofolate (DHF) en tetrahydrofolate (THF) généré par la TS (Zhao and Goldman, 2004). La TS est donc une enzyme hautement importante pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. D'autant plus que dans de nombreux cancers, la TS est surexprimée. Cette enzyme est donc une très bonne cible pour les chimiothérapies (Wilson et al., 2014).

3.2. Utilisation clinique

D'après le dernier rapport de la commission de la Transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS), le pemetrexed est tout d'abord indiqué dans le traitement de 1^{ère} ligne, en association avec le cisplatine, des patients atteints de CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique.

Il peut également être administré dans le traitement de maintenance, si la maladie n'a pas progressé et après une 1^{ère} ligne de traitement à base de sel de platine.

Enfin, il est recommandé de l'utiliser en monothérapie dans le traitement de 2^{ème} ligne chez des patients ayant un cancer CBNPC non épidermoïde, localement avancé ou métastatique, sans mutation activatrice EGFR ou un réarrangement ALK.

La posologie recommandée est de 500 mg/m² de surface corporelle, en perfusion intraveineuse de 10 min, le premier jour de chaque cycle de 21 jours.

3.3. Effets secondaires du pemetrexed

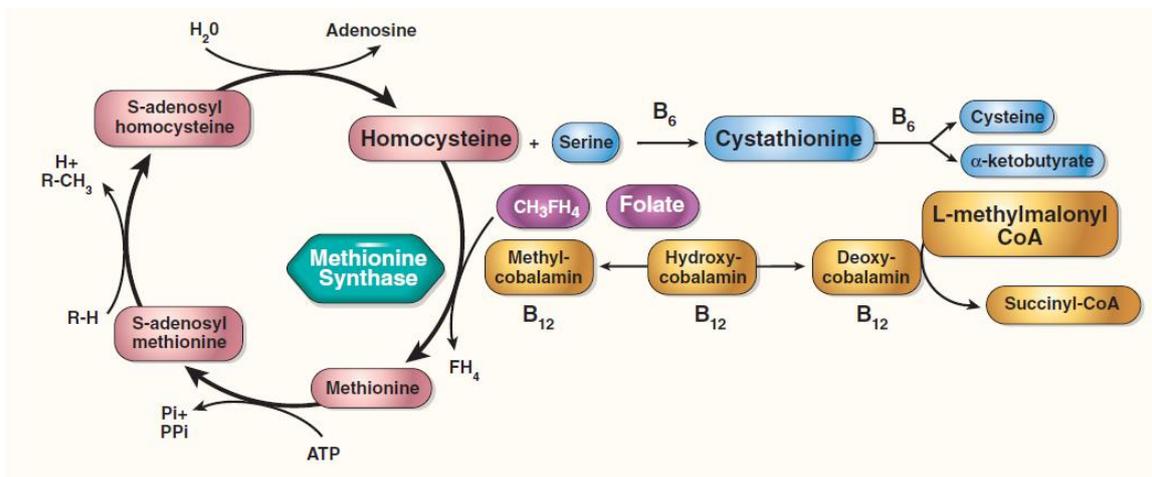
Le pemetrexed a une activité anti-tumorale à large spectre car c'est une chimiothérapie anti-folate multicible. Elle est donc associée à de nombreux effets secondaires.

L'étude de Niyikiza et al. a collecté l'ensemble des informations cliniques des patients traités en phase I et II entre 1995 et 1998, et a pu établir le tableau ci-dessous qui regroupe les effets secondaires les plus couramment observés chez 246 patients (Niyikiza et al., 2002). Durant les phases I et II du développement clinique du pemetrexed, la myélosuppression est la toxicité la plus fréquente chez les patients. Elle se manifeste dans environ 32% des cas par une neutropénie de grade III/IV, et dans 37% des cas par une toxicité hématologique de grade IV associée à une toxicité non-hématologique de grade III/IV. Dans 3% des cas, une neutropénie de grade IV a été associée à des inflammations des muqueuses (mucites) de grade III/IV ou des diarrhées de grade III/IV (Tableau 3) (Niyikiza et al., 2002).

Tableau 3 : Synthèse des toxicités observées chez des patients traités au pemetrexed d'après l'étude de (Niyikiza et al., 2002).

Toxicity	No. of patients	%
Grade 4 neutropenia	79	32
Grade 4 thrombocytopenia	20	8
Grade 3/4 mucositis	12	5
Grade 3/4 diarrhea	15	6
Any grade 4 hematological toxicity or grade 3/4 nonhematological toxicity	92	37
Grade 4 neutropenia + grade 3/4 mucositis	8	3
Grade 4 neutropenia + grade 3/4 diarrhea	8	3
Grade 4 neutropenia + grade 3/4 infection	6	2

Le but de cette étude était aussi d'identifier des biomarqueurs prédictives de toxicités sévères, comme par exemple : l'homocystéine, la cystathionine, l'acide méthylmalonique, l'albumine et d'autres enzymes hépatiques. Les connaissances actuelles du métabolisme des folates ont permis de faire le lien avec les toxicités du pemetrexed (Figure 12).



Abbreviations: ATP = adenosine triphosphate; CoA = coenzyme A; Pi = orthophosphate; PPi = pyrophosphate
 Reproduced with permission from Molina J, Adjei A. The Role of Pemetrexed (Alتما®, LY231514) in Lung Cancer Therapy. Clin Lung Cancer 2003; 5:21-27.

Figure 12 : Schéma des voies de biosynthèse du Folate, de l'Homocystéine, des Vitamine B12 et B6 (Molina and Adjei, 2003).

Le cycle des folates est lié au métabolisme de l'homocystéine car il permet de méthyler l'homocystéine en méthionine (Figure 12) (Adjei, 2004). Cette réaction est catalysée par la méthionine synthase qui va utiliser le groupe méthyl de CH₃FH₄ pour la

méthylation de l'homocystéine, tout en recrutant la cobalamine (vitamine B₁₂) comme co-facteur. Ainsi, sous l'action des anti-folates, la concentration d'homocystéine dans le plasma augmente car sa méthylation en méthionine est limitée, et la concentration en vitamine B₁₂ diminue. C'est pourquoi une concentration élevée en homocystéine dans le plasma indique une déficience en folate et une sévère toxicité.

La concentration seuil après le 1^{er} cycle est donc de 10 mmol/L. Ainsi, pour diminuer les effets toxiques du pemetrexed, les patients reçoivent en parallèle une supplémentation d'acide folique et de vitamine B₁₂. La posologie indiquée est : 350-1000 µg d'acide folique en cachet au moins 5 jours avant le début de la thérapie et pendant le traitement. La vitamine B₁₂ est administrée en intramusculaire à 1 mg et est répétée toutes les 9 semaines.

Outre les marqueurs prédictifs de la toxicité liée au pemetrexed, plusieurs biomarqueurs moléculaires ont été étudiés pour prédire la réponse au pemetrexed. Par exemple, l'expression de la TS a beaucoup été investiguée. Plusieurs études ont montré que le faible niveau d'expression de la TS entraînait une meilleure sensibilité au traitement et donc une meilleure survie du patient. Cependant plusieurs études contradictoires viennent remettre en cause ce biomarqueur. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires pour valider ou non le rôle prédictif et pronostique de l'expression de la TS (Tomasini et al., 2016). A ce jour, aucun biomarqueur n'a été approuvé.

II. Microbiote intestinal humain

1. Définition

Le terme microbiote définit un ensemble de micro-organismes vivants dans un écosystème particulier. Dans le cas du microbiote intestinal, également appelé flore intestinale, c'est un écosystème complexe composé d'un ensemble de micro-organismes, principalement des bactéries mais aussi des virus, champignons, levures et archées, présents dans le tractus gastro-intestinal (GI) (Thursby and Juge, 2017). La co-évolution du microbiote intestinal avec son hôte crée des relations bénéfiques mutuelles. Cette symbiose est indispensable pour l'homme car le microbiote exerce d'importantes fonctions physiologiques qui sont essentielles pour la santé humaine.

2. Les différents microbiotes

Le microbiote humain ou plutôt les microbiotes correspondent à des niches écologiques différentes. Chaque écosystème microbien est distinct suivant le site anatomique concerné : peau, bouche, poumon, vagin, tractus GI... (Figure 13) (Cho and Blaser, 2012; Grice and Segre, 2012).

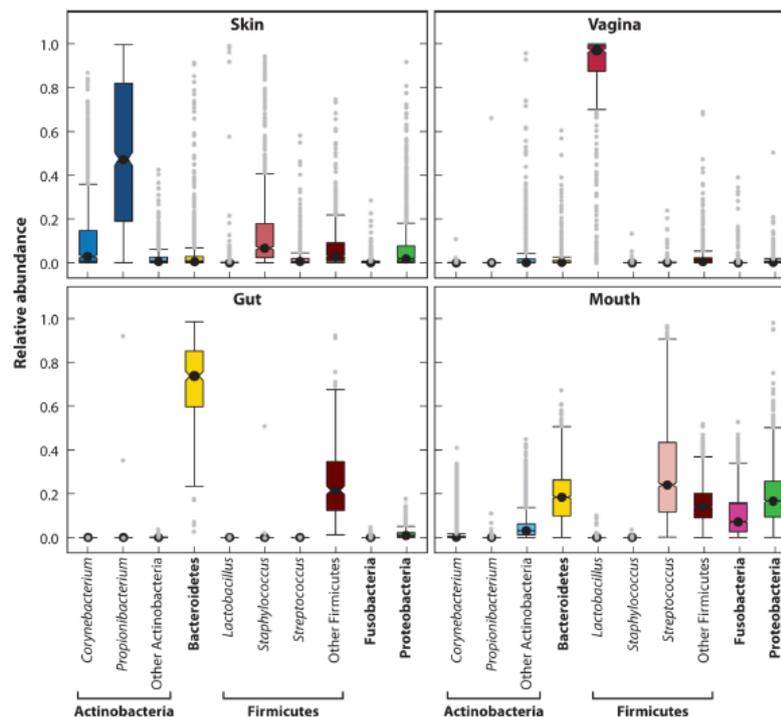


Figure 13 : Composition du microbiote en fonction du site anatomique (Grice and Segre, 2012).

Pour chaque site, la variabilité interindividuelle est significativement importante (Figure 13) (Cho and Blaser, 2012; Grice and Segre, 2012). Brièvement, le microbiote de la peau est le microbiote le plus divers principalement au niveau du Phylum et de la Famille. Il est différent en fonction des zones du corps car le microenvironnement peut varier en fonction de l'humidité, de la sécheresse ou encore du niveau gras de la peau. De manière générale, dans un environnement plus gras comme sur le visage, la diversité bactérienne est pauvre alors que dans un environnement sec comme au niveau des bras et des jambes, la diversité bactérienne est plus élevée. On peut quand même noter que le genre *Propionibacterium* est le genre dominant du microbiote de la peau (Chen et al., 2018). Le microbiote oral est un microbiote riche qui peut varier d'un site à l'autre de la bouche (langue, gencive, dents...). De manière générale, ce microbiote est principalement composé d'espèces du genre *Streptococcus* mais également de *Veillonella*, *Gamella*, *Rothia*, *Fusobacterium* et *Neisseria*. Le microbiote vaginal est l'un des microbiotes les plus importants après celui du tractus GI. Une étude a montré qu'il y avait 5 types de profils bactériens vaginaux dont 4 étaient dominés par les espèces *Lactobacillus*. Le 5^{ème} groupe présentait une forte proportion d'espèces anaérobies et une grande diversité bactérienne est fortement associée à des vaginoses bactériennes (Ravel et al., 2011). Comme précédemment dit, le microbiote du tractus GI est le microbiote le plus abondant. C'est aussi le microbiote dont les fonctions et le rôle pour la santé humaine sont les mieux documentés. Ainsi la suite de ce chapitre portera sur la description du microbiote intestinal.

3. Méthodes d'étude

Jusque dans les années 90, nos connaissances sur le microbiote étaient limitées car elles étaient basées sur des approches de cultures bactériennes. La méthode de culture permet d'identifier les espèces bactériennes grâce à des milieux de culture spécifiques, sélectifs et nutritifs (Moore and Holdeman, 1974). L'inconvénient de cette technique est qu'elle se limite aux bactéries cultivables. Ainsi, à cette époque notre vision de la diversité du microbiote était réduite et ne concernait qu'environ 30% des bactéries présentes (Eckburg et al., 2005). Ces dernières années, les techniques de séquençage à haut débit se sont fortement développées et ont permis d'avoir une vision plus large du microbiote et d'aller au-delà des bactéries cultivables. Dans un premier temps, ces techniques se sont principalement basées sur l'amplification du

gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), une séquence très conservée permettant d'identifier et de quantifier les bactéries présentes dans le microbiote (Ludwig and Schleifer, 1994; Woese, 1987).

3.1. L'ARN ribosomal 16S

L'ARNr 16S provient du ribosome procaryote 70S se trouvant dans le cytoplasme de toutes les bactéries. Il est composé de 2 sous-unités, la 50S et la 30S. Chaque sous-unité est composée d'un ou de plusieurs ARN, dit ARN ribosomal (ARNr) et de nombreuses protéines. Ainsi la sous-unité 50S contient un ARNr 5S et un ARNr 23S, tandis que la sous-unité 30S contient 1 seul ARNr, le 16S.

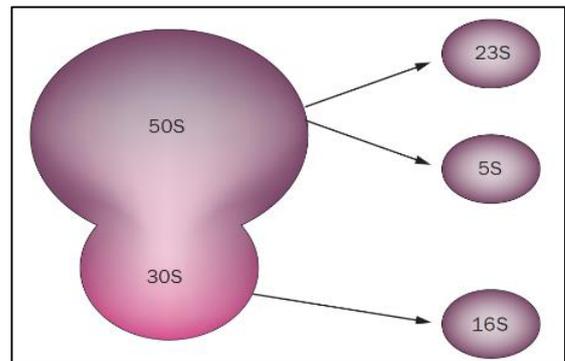


Figure 14 : Composition du ribosome procaryote (Yarza et al., 2014).

(Rajendhran and Gunasekaran, 2011; Watson et al., 2012).

Les gènes codants pour l'ARNr 16S sont des gènes fortement conservés dans le règne bactérien. Ils ont la particularité de contenir des régions hautement conservées (« universelles ») et des régions hypervariables (qui ont évolué dans le temps). Ainsi, les régions très conservées permettent de développer des amorces de PCR universelles ou des sondes marquées, et les régions hypervariables permettent d'identifier des espèces bactériennes. La Figure 15 présente les différentes régions de l'ARNr 16S.

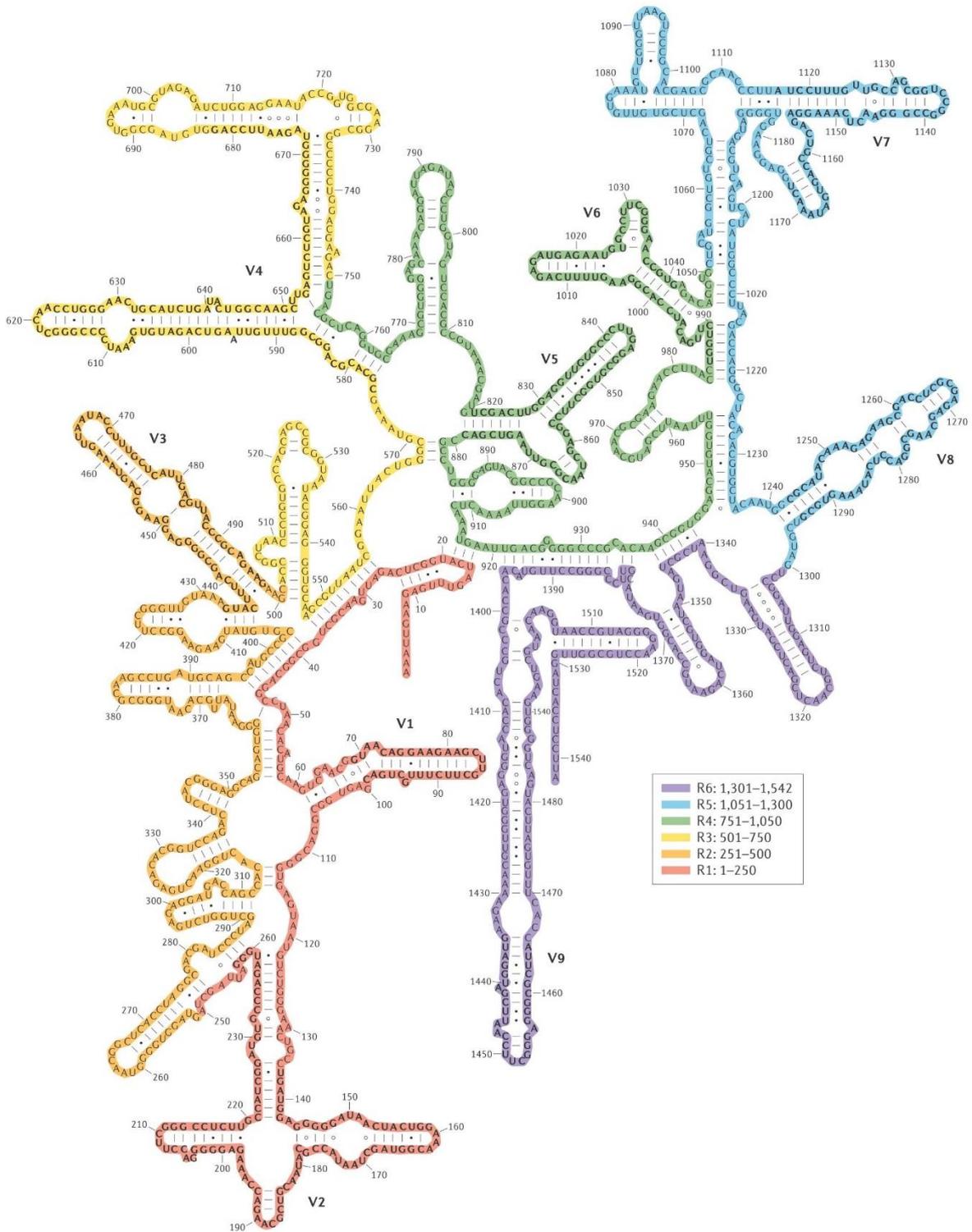


Figure 15 : Structure de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli* avec la présence des 6 régions composées de régions conservées et variables (Yarza et al., 2014).

Les méthodes indépendantes de la culture se sont donc développées et sont basées sur l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S. Il existe deux types de techniques : *a priori* et sans *a priori*.

3.2. Méthode d'analyse *a priori*

Les techniques *a priori* détectent des bactéries dont le génome est déjà connu. Parmi ces méthodes, il y a l'hybridation *in situ* en fluorescence (Fluorescent *In Situ* hybridation ou FISH) qui utilise des sondes ADN marquées par un fluorochrome spécifique de l'espèce bactérienne recherchée. L'avantage de cette technique est qu'elle peut se réaliser directement sur les selles, sans passer par une technique d'extraction d'ADN (Figure 16) (Moter and Göbel, 2000; Rigottier-Gois et al., 2003).

Les méthodes de micro-puces ou puces à ADN permettent également de détecter des espèces connues, par hybridation à une sonde marquée. Contrairement à la technique FISH, la puce à ADN est une technique à haut débit car elle se réalise sur une puce où se trouve un ensemble de sondes ADN marquées spécifiques de plusieurs bactéries ou phyla donnés simultanément (Fraher et al., 2012).

Enfin, la PCR quantitative (qPCR) peut aussi rentrer dans cette catégorie d'analyse car elle peut être spécifique d'une espèce bactérienne. Suite à une amplification d'ADN spécifique, la PCR va quantifier à l'aide de sondes marquées ou d'agents intercalants les produits d'amplification. La PCR peut également cibler l'ADN codant pour l'ARNr 16S et donc amplifier l'ensemble des bactéries de l'échantillon. Cette technique est souvent réalisée en amont des méthodes « sans *a priori* » ou de séquençages à haut débit (Figure 16).

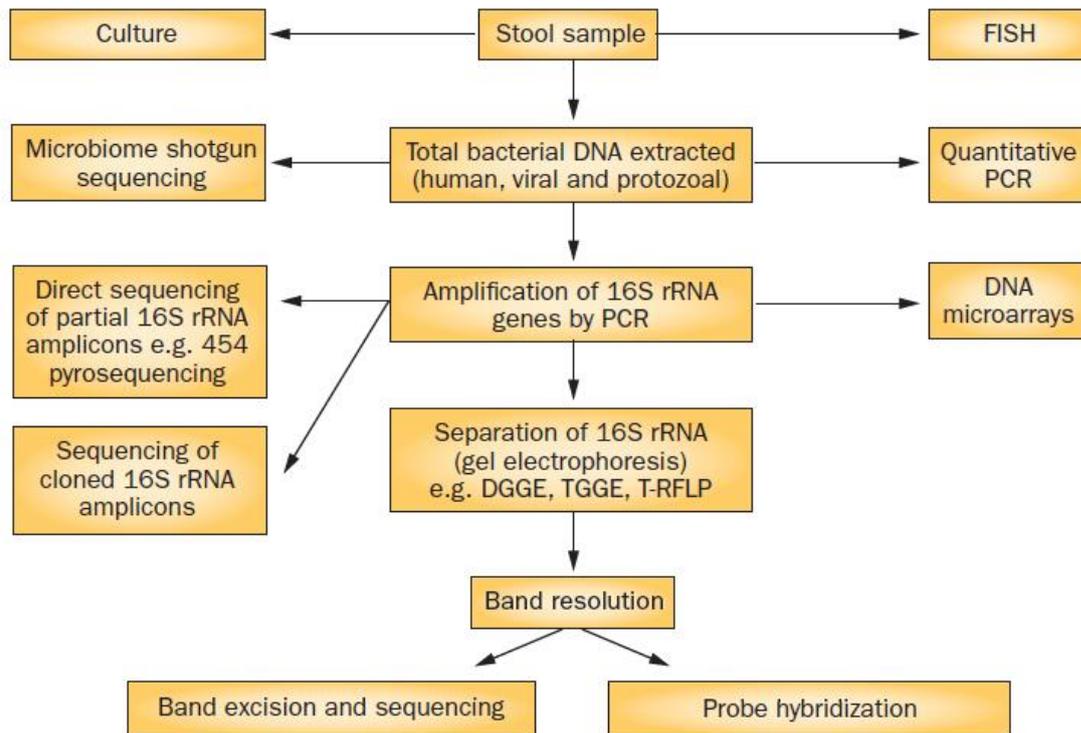


Figure 16 : Aperçu des approches utilisées pour caractériser le microbiote (Fraher et al., 2012).

3.3. Méthodes d'analyse sans *a priori*

Concernant les méthodes sans *a priori*, elles permettent d'identifier de nouvelles espèces bactériennes. Parmi ces techniques, on retrouve les techniques d'empreintes génétiques qui permettent de comparer des fragments d'ADN du gène ARNr 16S dans un échantillon. Les deux principales techniques sont la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) qui reposent, respectivement, sur une séparation des amplicons de l'ADNr 16S en fonction du gradient dénaturant ou du gradient de température. Les amplicons se séparent en fonction de leurs poids moléculaires et forment des bandes distinctes. Ainsi il est possible dans un premier temps de comparer les communautés bactériennes d'échantillons de deux conditions en fonction de la présence ou de l'absence d'un phylotype. Ensuite chaque bande peut être séquencée pour identifier l'espèce bactérienne. L'inconvénient de ces techniques c'est que l'identification des bactéries est limitée aux seules bactéries dominantes, et la quantification est peu précise. Depuis le développement des nouvelles générations de méthodes de séquençage à

haut débit (Next Generation Sequencing ou NGS), ces techniques sont de moins en moins utilisées.

Le NGS a révolutionné l'étude du microbiote car elle nous a donné accès à l'ensemble des gènes du microbiote (Figure 17). Parmi ces techniques, la technique la plus utilisée est le métabarcoding c'est-à-dire un séquençage ciblé sur les gènes codant l'ARNr 16S. Suite à une amplification de ce gène par PCR, tous les amplicons vont être séquencés, puis des séquences ou « reads » d'un même échantillon vont être générés. Ces reads vont être regroupés en une unité opérationnelle taxonomique (OTU) en fonction de leur similarité. Le seuil de similarité est généralement de 97%. Les OTUs vont ensuite être comparées à une base de données de référence (par exemple RDP, SILVA, GenBank, ...) afin de les assigner à un groupe taxonomique. Ainsi cette technique nous permet de connaître la composition de la population bactérienne dans un échantillon mais aussi son abondance relative et sa diversité globale (Knight et al., 2018). C'est cette approche que nous avons utilisée au cours de cette thèse.

La technique la plus récente est le séquençage du génome entier (« Whole Genome Sequencing » ou WGS) ou plus précisément pour le microbiote le Shotgun Metagenomic Sequencing. Le WGS permet de séquencer tout le génome de chaque bactérie dominante présente dans l'échantillon sans se restreindre au gène de l'ARNr 16S (Figure 17). Pour se faire, l'ADN est fragmenté puis séquencé et les séquences sont reconstruites par recouvrement pour avoir une séquence continue. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'obtenir la diversité génétique et fonctionnelle au sein de l'échantillon, et permet d'aller jusqu'à l'espèce voire même la souche bactérienne.

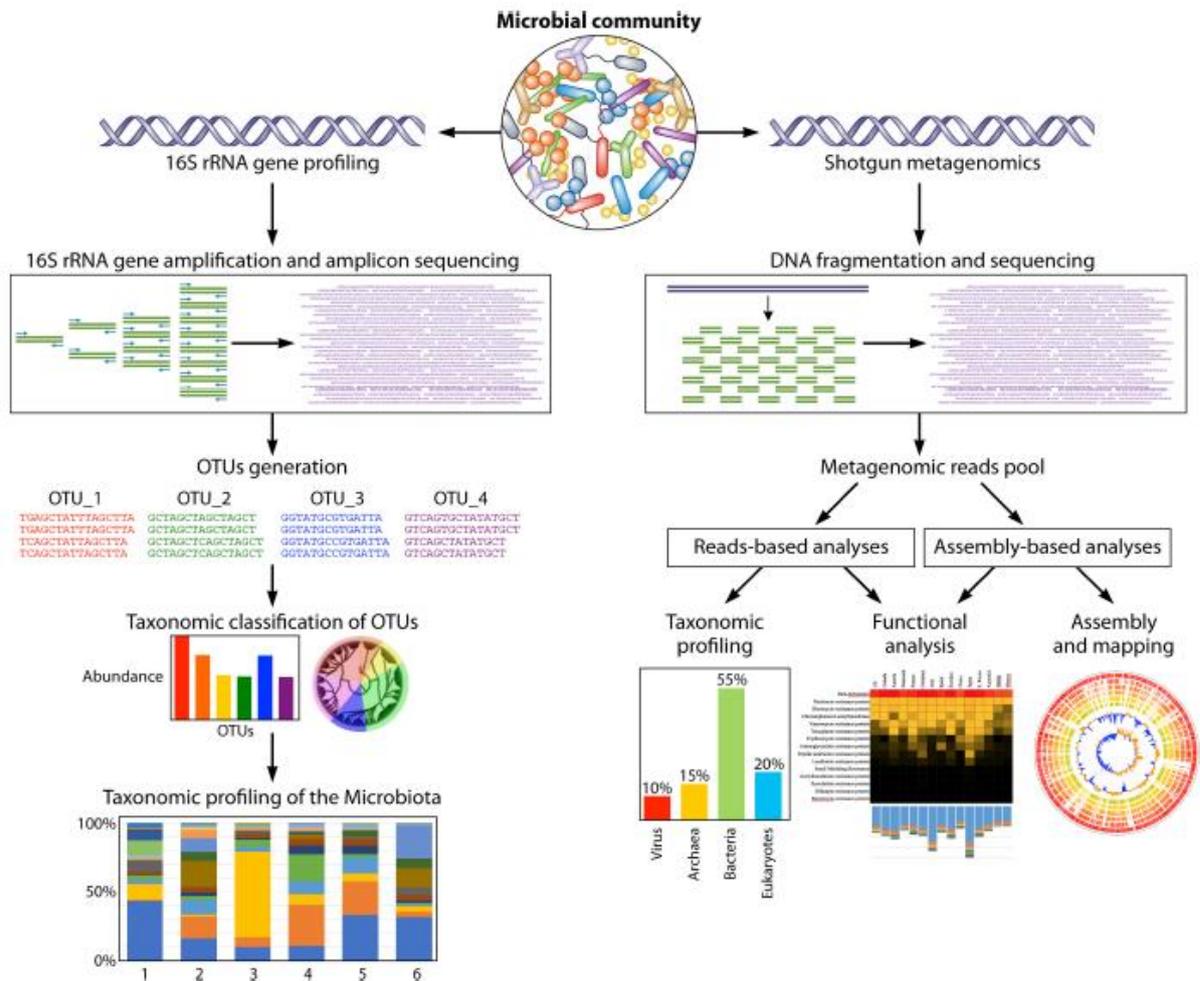


Figure 17 : Aperçu des différentes étapes clés des deux méthodes de séquençage à haut débit, le séquençage ciblé sur les gènes codant l'ARNr 16S et le séquençage du génome entier, à partir de l'extraction d'ADN jusqu'à l'obtention des résultats (Milani et al., 2017).

4. Microbiote Intestinal

4.1. Distribution du microbiote le long du tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal (GI) est un système compartimenté qui contient plusieurs régions anatomiquement distinctes allant de l'estomac au rectum. Celui-ci est divisé en trois parties : l'estomac, l'intestin grêle comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléum et le gros intestin aussi appelé colon comprenant les colons ascendant, transverse et descendant, et le rectum. Chacune de ces sections possède des caractéristiques physico-chimiques et physiologiques qui lui sont propres (Donaldson

et al., 2016; Kovatcheva-Datchary et al., 2013; Walter and Ley, 2011). Les variations physiologiques influençant la composition de la communauté bactérienne le long du tractus GI sont :

- Le pH
- Le potentiel redox
- Les enzymes digestives
- Les sécrétions et absorptions
- La motricité intestinale
- L'activité immunitaire de l'hôte
- La disponibilité en composant alimentaire

Ainsi, en fonction de tous ces paramètres, l'abondance et la diversité du microbiote intestinal est différente dans chaque partie du tractus GI, et le nombre de cellules bactériennes augmente progressivement le long de celui-ci (Figure 18).

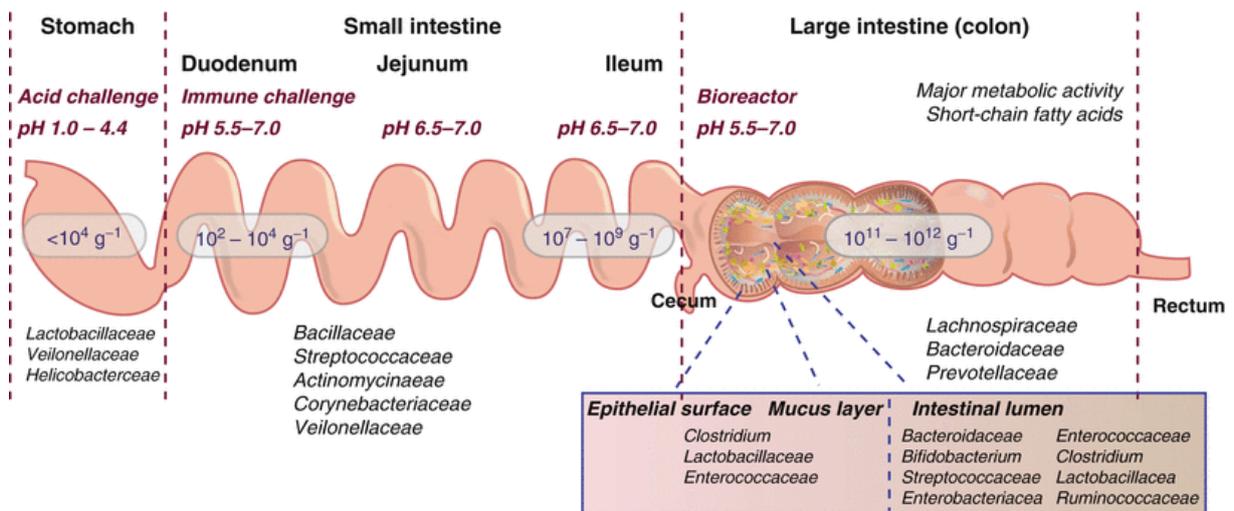


Figure 18 : Abondance et composition du microbiote le long du tractus gastro-intestinal (Kovatcheva-Datchary et al., 2013).

L'estomac permet d'assurer la digestion par ses fonctions mécaniques de brassage, et ses fonctions chimiques comme les sucs gastriques fonctionnant à pH acide et les sécrétions d'acide chlorhydrique. C'est l'organe du tractus GI contenant le moins de bactéries, car son environnement très acide (pH entre 1 et 4,4) et la présence d'enzymes digestives limitent la croissance des bactéries (Nardone and Compare, 2015).

L'intestin grêle, qui fait suite à l'estomac, est divisé en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Dans le duodénum, des enzymes sécrétées par le foie et le pancréas (protéases, lipases et amylases) sont libérées par le canal biliaire pour poursuivre la digestion. Les sécrétions de bicarbonate permettent l'élévation du pH en neutralisant l'acidité, mais la présence des enzymes biliaires et du péristaltisme crée un environnement défavorable et très bactéricide. Dans le jéjunum, la concentration bactérienne est aussi clairsemée principalement à cause du péristaltisme très actif. Dans l'intestin grêle, la principale raison de la faible densité en bactéries est le flux rapide des aliments causant un rapide lavement des bactéries. La concentration bactérienne augmente tout au long du tractus GI et vers la fin de l'intestin grêle, la densité atteint les 10^7 - 10^8 cellules bactériennes par gramme. En effet, l'iléon est le segment comprenant le plus de bactéries car les conditions (pH, température, péristaltisme réduit) sont plus favorables à la croissance bactérienne (Donaldson et al., 2016).

Dans le gros intestin, plusieurs propriétés permettent la prolifération des bactéries :

- Le pH moins acide
- Le volume plus large
- La concentration en sels biliaires moins élevée
- Le temps de rétention plus long dû à un péristaltisme plus lent (diminution du temps de transit)
- Augmentation de la disponibilité en nutriments

La plus grande concentration bactérienne est localisée dans le colon où la concentration peut atteindre 10^{12} bactéries par gramme de selles. (Kovatcheva-Datchary et al., 2013; Walter and Ley, 2011). Ce milieu anaérobie avec un potentiel redox très bas favorise la prolifération des bactéries.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 18, la composition du microbiote diffère entre le microbiote de la lumière intestinale et celui associé au mucus. Le microbiote associé au mucus, en contact avec les cellules épithéliales, montre une grande stabilité et facilite les fonctions bénéfiques comme les échanges de nutriments ou l'induction du système immunitaire inné. Le microbiote de la lumière intestinale est un microbiote transitoire soumis à d'importantes variations (Eckburg et al., 2005).

Dans la suite de ce mémoire, nous parlerons exclusivement du microbiote du colon car c'est la partie du tractus GI qui abrite la densité bactérienne la plus importante et également la population bactérienne étudiée au cours de ma thèse.

4.2. Etablissement du microbiote intestinal

La colonisation du microbiote chez l'enfant est un processus influencé par plusieurs facteurs provenant de l'environnement et de l'hôte. Comme on peut le voir sur la Figure 19, le microbiote s'établit au cours des 3 premières années de vie et comporte 4 étapes clés, allant de la grossesse à la petite enfance. Cette colonisation du microbiote est connue pour jouer un rôle important dans l'établissement de l'immunité et des voies métaboliques pour la santé humaine. Ces 4 étapes vont maintenant être détaillées.

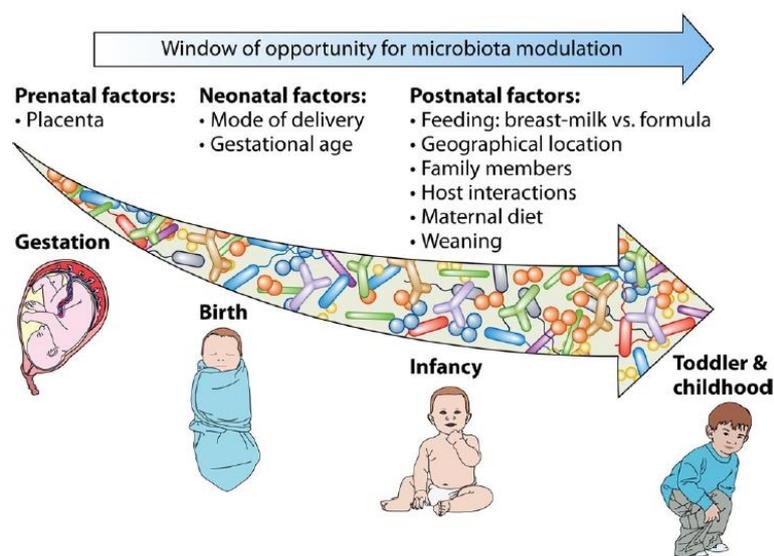


Figure 19: Schéma représentant les étapes clés de l'établissement du microbiote chez l'enfant (Milani et al., 2017).

Depuis des décennies, le dogme que le fœtus vit dans un environnement stérile et qu'il soit ensuite colonisé pendant et après l'accouchement a été accepté. Cependant, de récentes études ont proposé que le développement du microbiote commence *in utero* (Aagaard et al., 2014; Lauder et al., 2016; Perez-Muñoz et al., 2017). Cette notion est aujourd'hui controversée. En effet cette acquisition du microbiote *in utero* doit être prise avec précaution car à cause de la pauvre abondance des bactéries dans le placenta, le liquide amniotique ou le méconium, la détection par des techniques moléculaires, peut atteindre ses limites. En effet, la détection de bactéries dans des environnements

très peu riche peut soit être générée par de faux positifs ou par la présence de contaminations de kits d'extraction ou de réactifs de PCR (Milani et al., 2017). En revanche, il est accepté que l'environnement fœtal soit exposé à des métabolites et composants du microbiote de la mère. On parle alors de la transmission verticale du microbiote entre la mère et son fœtus lors de la grossesse (Milani et al., 2017).

Au moment de l'accouchement, le nouveau-né se retrouve brutalement plongé dans un univers bactérien riche et varié, et va être colonisé rapidement par des bactéries. Les premières bactéries à s'implanter chez le nourrisson dépendent fortement du mode de naissance. Les bébés nés par voie basse sont colonisés principalement par des bactéries vaginales et fécales de la mère, comme principalement *Lactobacillus*, *Prevotella* et *Bifidobacterium spp.* (Biasucci et al., 2010; Dominguez-Bello et al., 2010). Au contraire, les bébés nés par césarienne ne sont pas directement exposés au microbiote de la mère et sont davantage colonisés par les microorganismes de l'environnement provenant de la peau de la mère, de l'équipe hospitalière et de l'environnement hospitalier (Milani et al., 2017). Les enfants nés par césarienne montrent aussi un microbiote moins complexe et colonisé surtout par les *Staphylococcus*, *Propionibacteriaceae* et *Corynebacterineae*. (Dominguez-Bello et al., 2010; Milani et al., 2017). Les premières bactéries à s'implanter sont généralement les bactéries anaérobies facultatives. Ces bactéries créent un environnement permettant la colonisation des anaérobies strictes comme *Bacteroides*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*. Le microbiote d'un nouveau-né est caractérisé par une pauvre diversité et une dominance relative des phyla Proteobacteria et Actinobacteria, puis le microbiote devient plus divers avec l'émergence et la dominance des Firmicutes et Bacteroidetes.

Ces différences observées diminuent dans le temps, mais le microbiote des enfants nés par césarienne reste plus hétérogène que celui des bébés nés par voie basse. Au-delà de la façon d'accoucher qui est le premier facteur important de la colonisation du microbiote, d'autres facteurs vont influencer cette implantation, comme (Matamoros et al., 2013; Rodríguez et al., 2015) :

- L'âge gestationnel
- L'alimentation : nourriture au sein ou par lait infantile
- L'hygiène
- Les traitements antibiotiques

- L'environnement familial comme la présence d'un aîné ou d'un animal de compagnie
- Le moment et le mode de sevrage

A la fin de la première année de vie, le microbiote de l'enfant tend vers les caractéristiques du microbiote de l'adulte et possède déjà sa propre signature bactérienne. Entre l'âge de 2 à 5 ans, le microbiote ressemble fortement à celui de l'adulte en terme de composition et de diversité (Arrieta et al., 2014; Rodríguez et al., 2015).

Plusieurs études soulignent que le développement du microbiote de l'enfant joue un rôle important dans la maturation de son système immunitaire, de la protection contre les pathogènes, et la disponibilité des nutriments. Cette période du développement du microbiote est donc cruciale pour la future santé de l'adulte. Ainsi, les enfants nés par césarienne ont un risque augmenté pour les maladies immunitaires comme l'asthme, les allergies, le diabète de type 1 ou encore l'obésité.

A l'âge adulte, le microbiote intestinal est très divers et relativement stable dans le temps, même s'il est soumis à de nombreuses pressions intrinsèques et environnementales (Faith et al., 2013).

4.3. Composition du microbiote adulte

Récemment une équipe Israélienne a refait une estimation de la quantité de bactéries et de cellules humaines présente dans notre corps. Se basant sur les caractéristiques d'un homme standard (1m70 et 70 kg), cette équipe a estimé que le microbiote intestinal est composé de $3,8 \cdot 10^{13}$ bactéries et a une biomasse de 0,2kg, soit 10^{12} bactéries/g (Sender et al., 2016). Le ratio bactéries/cellules humaines est donc de 1:1 donc nous sommes en nombre de « cellules » à 50% microbiens (Sender et al., 2016).

Le microbiote intestinal de l'adulte est un écosystème très complexe composé d'au moins 160 espèces bactériennes par personne (Qin, 2010). Concernant sa composition phylogénétique, plus de 90% des bactéries appartiennent à deux phyla majoritaires les Firmicutes et les Bacteroidetes (Arumugam et al., 2011; Turnbaugh et al., 2007). Les autres phyla majoritaires, présents de façon moins important sont : Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia (Figure 20) (Tap et al., 2009). La Figure 20 présente aussi les 30 genres les plus abondants. On peut remarquer que le

genre le plus abondant est *Bacteroides* qui figure aussi comme le plus variable entre les individus de leur cohorte (Arumugam et al., 2011).

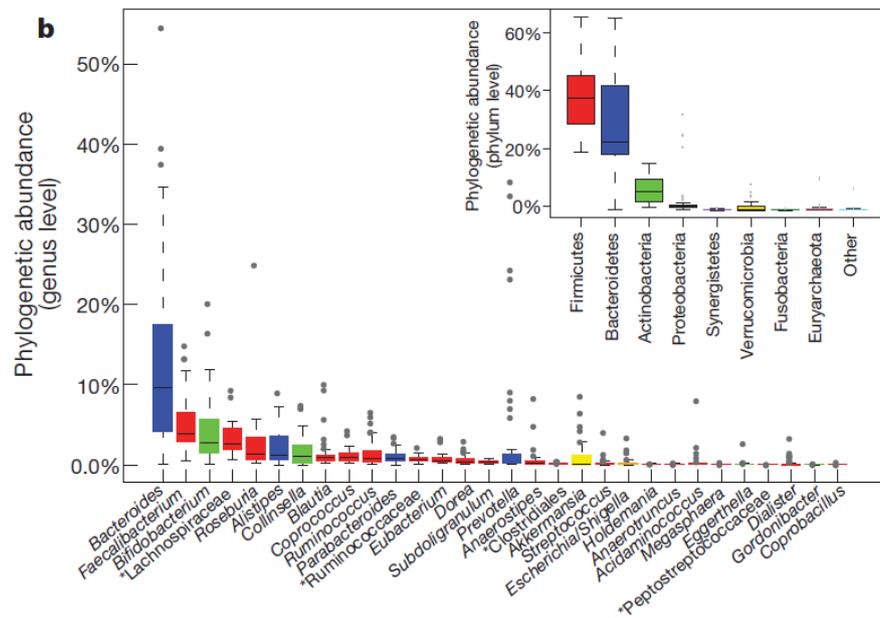


Figure 20 : Abondance des phyla et des 30 plus abondants genres bactériens (Arumugam et al., 2011).

a) Le « core microbiome »

Le microbiote intestinal humain possède une très grande diversité inter-individus, cependant beaucoup d'espèces bactériennes sont partagées entre individus. Dans l'étude du consortium MetaHIT portant sur 124 individus Espagnols et Danois, environ 40% des gènes bactériens de chaque individu sont partagés avec au moins la moitié des personnes de la cohorte. Les 57 espèces les plus communes sont retrouvées chez plus de 90% des individus (Qin, 2010). On parle alors d'un « core microbiome », c'est-à-dire d'un noyau phylogénétique où les génomes bactériens sont présents et partagés entre tous les individus de la cohorte (Qin, 2010).

b) Les entérotypes

L'étude du microbiote intestinal est complexe car elle doit prendre en compte à la fois la grande diversité inter-individuelle, la complexité de cet écosystème et la variation dans le temps.

En 2011, les équipes de Bork et Ehrlich (Consortium MetaHIT) proposent de stratifier la population en fonction des taxa présents majoritairement dans le microbiote intestinal adulte, indépendamment du sexe, de l'âge et de l'origine géographique. Cette classification basée sur la prévalence d'un genre bactérien a permis d'établir 3 groupes distincts, appelés entérotypes (Figure 21) (Arumugam et al., 2011).

Les 3 entérotypes sont :

- Enterotype 1 : dominance du genre *Bacteroides*
- Enterotype 2 : dominance du genre *Prevotella*
- Enterotype 3 : dominance du genre *Ruminococcus*

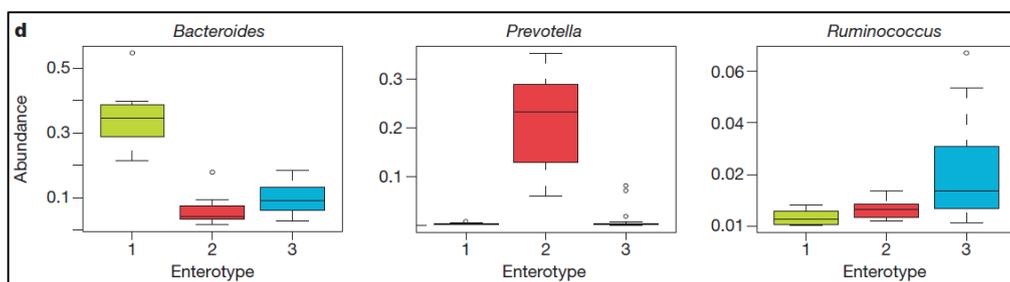


Figure 21 : Abondance des principaux contributeurs de chaque entérotype (Arumugam et al., 2011)

Il faut souligner que ces entérotypes correspondent à des écosystèmes différents, les genres dominants étant présents en association ou en exclusion à d'autres genres bactériens et que l'écologie sous-jacente reste encore à être mieux comprise. Cette notion d'entérotype a été controversée pendant plusieurs années, mais un article de perspective publié en 2018, par les différents acteurs de cette controverse, a mis fin au débat et accepté cette notion (Costea et al., 2018).

4.1. Principaux rôles et fonctions

En condition homéostatique, le microbiote intestinal assure de nombreuses fonctions physiologiques afin d'entretenir la relation symbiotique existante entre lui et son hôte. Voici les principales fonctions du microbiote.

a) Développement et maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale

Suite à la colonisation du tractus GI par le microbiote à la naissance, les échanges entre l'hôte et le microbiote vont tout de suite s'établir. Les premières interactions vont

permettent le développement de l'épithélium intestinal et du système immunitaire. En effet, des études ont montré que les souris axéniques (dépourvues de microbiote) présentaient un système digestif immature et montraient de nombreuses anomalies comme un colon plus long, une atrophie des villosités et des cryptes (Kandori et al., 1996; Thompson and Trexler, 1971). Les fonctions métaboliques et le développement du système immunitaire sont également immatures. Ces observations soulignent l'importance du microbiote intestinal dans le développement structural et fonctionnel de l'intestin.

Au-delà de la barrière « physique » faite par les cellules épithéliales et la couche de mucus, le microbiote va aussi participer à l'effet barrière, par exemple, en s'opposant à la colonisation de pathogènes par compétition pour les nutriments ou les sites d'adhésion ou par production de bactériocines (Zheng et al., 2015). Certaines bactéries influencent le renouvellement et la différenciation cellulaire de l'épithélium intestinal (Becker et al., 2013). Récemment, la composition du microbiote intestinal a été impliquée dans la modification de la qualité et de la pénétrabilité de la couche de mucus au niveau du colon (Jakobsson et al., 2015). De plus, l'effet de barrière est conduit par le maintien des jonctions adhérentes (β -catenin, E-cadhérine, ...) ou des jonctions serrées (claudines, occludines et *zonula occludines*), qui ont un rôle déterminant dans la perméabilité intestinale.

Le microbiote joue aussi un rôle indirect dans le maintien de la barrière épithéliale en stimulant le système immunitaire de l'épithélium intestinal. Cela se traduit par une stimulation de la production de mucus, des peptides antimicrobiens, des immunoglobulines A et par un renforcement des jonctions serrées (Duncan and Edberg; Hoffmann et al., 2016; Hooper et al., 2012; Johansson, 2014).

b) Fonction métabolique

Lors de la digestion des aliments, l'homme a une inaptitude à digérer certains composés alimentaires tels que de nombreux glucides (polysaccharides, oligosaccharides ou divers sucres). Le microbiote a la capacité de digérer ces macromolécules en molécules plus petites et assimilables par l'homme et par certaines bactéries. Pour ce faire, la dégradation anaérobie (fermentation) de ces polysaccharides est complexe et nécessite d'avoir des micro-organismes possédant un équipement enzymatique approprié dont des glycosyl transférases, glucosides

hydrolases et polysaccharides lyases (Bernalier-Donadille, 2010; Jandhyala, 2015). Les principales bactéries du microbiote impliquées dans le métabolisme des glucides sont les *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* et *Enterobacteria*. Elles permettent de transformer les oligosaccharides indigestibles en acide gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, le propionate ou l'acétate et des gaz. Ces AGCC sont une source d'énergie pour l'hôte (Scott et al., 2013).

Concernant les protéines alimentaires résiduelles, elles représentent une source d'azote et de carbone pour le microbiote. Pour cela, les bactéries doivent faire intervenir des protéases, des désaminases ou encore des transaminases. Les principales espèces possédant ces fonctions sont : les *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (Marteau and Doré, 2017). Ainsi les métabolites générés à partir de la fermentation des protéines sont surtout des acides gras à chaîne ramifiée, de l'ammoniaque, des phénols, des amines et des sulfures. L'inconvénient de ces métabolites est qu'ils peuvent être potentiellement toxiques pour l'homme en forte concentration dans le colon (Mafra et al., 2013).

Le troisième rôle métabolique important du microbiote est la synthèse de vitamine K2 (ménaquinone), B12 et B8 (biotine).

Ainsi la fonction métabolique du microbiote génère une diversité de métabolites qui ont un rôle essentiel sur la santé. Principalement absorbés au niveau de l'épithélium intestinal, ils peuvent exercer un effet bénéfique physiologique. Les AGCC sont une source importante d'énergie pour les cellules coliques, en particulier le butyrate qui apporte 80% de l'énergie aux colonocytes (Blottière et al., 2003).

c) Développement et maturation du système immunitaire

Les bactéries commensales assurent également un rôle de protection de l'hôte par modulation du système immunitaire. L'implication du microbiote dans la maturation du système immunitaire a d'abord été observée chez des souris axéniques. Ces souris présentaient un déficit immunitaire important avec une diminution de la taille des plaques de Peyer et du nombre de follicules lymphoïdes. L'influence du microbiote intestinal sur la réponse immunitaire va au-delà de la muqueuse intestinale car il peut moduler le système immunitaire systémique. Le microbiote peut activer les récepteurs de l'immunité innée appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) présents sur les

cellules épithéliales. L'activation des récepteurs entraîne une activation et/ou modulation de la réponse immunitaire innée et induit une production de mucines, de peptides antimicrobiens, de cytokines pro-inflammatoires et permet le recrutement de macrophages (Shapiro et al., 2014).

L'activation de la réponse immunitaire adaptative se fait principalement par les plaques de Peyer, et les nodules lymphoïdes. L'épithélium de ces régions possède des cellules différenciées, appelées cellule M. Leur rôle est de permettre la captation des antigènes de la lumière intestinale pour activer les lymphocytes B et T. Les cellules dendritiques peuvent aussi contribuer à cette réponse immunitaire (Marteau and Doré, 2017; Rescigno, 2014). Ainsi le microbiote a un rôle crucial pour le développement, la maturation et la modulation du système immunitaire inné et adaptatif.

4.2. Dysbiose du microbiote

L'équilibre entre l'homme et son microbiote est indispensable pour maintenir cette relation symbiotique. Cependant, le microbiote est soumis à de nombreuses pressions de la part de son hôte mais aussi de la part de facteurs environnementaux, comme nous pouvons le voir sur la Figure 22 (Eloe-Fadrosh and Rasko, 2013). Tous ces facteurs peuvent affecter la composition du microbiote intestinal et rompre cet équilibre, on parle alors de dysbiose. A ce jour, il existe plusieurs définitions de la dysbiose avec une vision plus ou moins large de cet événement.

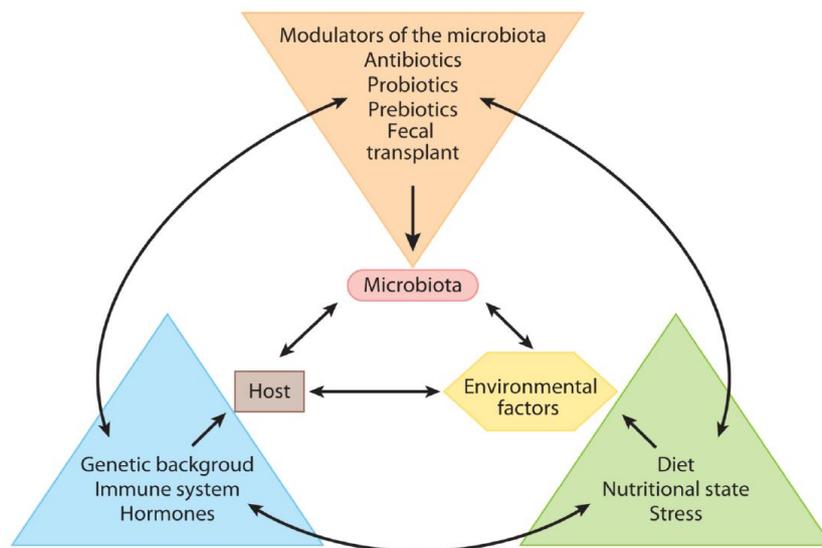


Figure 22 : Schématisation des interactions et facteurs pouvant entraîner une dysbiose (Eloe-Fadrosh and Rasko, 2013)

La définition la plus commune parle d'un changement général de la composition du microbiote, c'est-à-dire une altération ou une perturbation de la composition du microbiote avec la notion d'une perte de la diversité. La seconde définition, plus précise, décrit un déséquilibre du microbiote. Cela implique un dysfonctionnement du microbiote avec souvent la notion négative pour l'hôte. Aussi, cette définition fait référence à la rupture de la symbiose entre le microbiote et l'hôte donc la perte de l'homéostasie. La troisième définition relatée est plus précise et concerne des changements spécifiques d'un taxon et/ou la présence d'un pathogène dans le sang (Eloe-Fadrosh and Rasko, 2013).

Ainsi, lorsque l'homéostasie entre le microbiote et son hôte est rompue, et que le microbiote entre en dysbiose, il peut être associé à de nombreuses pathologies.

Le tableau ci-dessous fait état des pathologies humaines pour lesquelles une "dysbiose" du microbiote intestinal a été rapportées dans des études cliniques que ce soit par métagénomique ciblée ou par séquençage métagénomique.

Tableau 4 : Liste non exhaustive des maladies pour lesquelles une dysbiose a été mise en évidence adaptée de (Blottière and Doré, 2016).

Pathologies	Selected references
Crohn's disease	(Gevers et al., 2014; Qin, 2010)
Ucerative colitis	(Lepage et al., 2011; Qin, 2010)
Celiac disease	(D'Argenio et al., 2016)
Irritable bowel syndrome	(Saulnier et al., 2011)
Colorectal cancer	(Sobhani et al., 2011; Zeller et al., 2014)
Obesity	(Le Chatelier et al., 2013; Ley et al., 2006)
Type 1 diabetes	(Kostic et al., 2015)
Type 2 diabetes	(Forslund et al., 2015)
Seniors frailty	(Claesson et al., 2012)
GVHD	(Taur et al., 2014)
Allergy	(Abrahamsson et al., 2012)
Liver pathologies	(Qin et al., 2014)
Cardiovascular diseases	(Karlsson et al., 2012)
Autism	(De Angelis et al., 2015; Finegold et al., 2010)
Depression	(Naseribafrouei et al., 2014)
Multiple sclerosis	(Berer et al., 2017; Cekanaviciute et al., 2017)
Alzheimer disease	(Cattaneo et al., 2017)
Parkinson disease	(Bedarf et al., 2017)
Hypertension	(Li et al., 2017a)
Bone diseases	(Brebant et al., 2017; Wen et al., 2017)
Kidney diseases	(Vaziri et al., 2013)

III. Microbiote et cancer

Comme décrit précédemment, le microbiote intestinal est un écosystème très complexe avec de nombreuses interactions à la fois avec l'hôte, entre les bactéries et avec l'environnement. Tous ces échanges permettent de maintenir de nombreuses fonctions nécessaires à la santé de l'hôte. Lorsque le microbiote est altéré, il peut être impliqué dans de nombreuses pathologies, comme le cancer (Wang et al., 2017).

1. Microbiote et étiologie des cancers

La relation entre cancer et microbiote intestinal est complexe mais aujourd'hui reconnue (Garrett, 2015). Cette relation peut se définir sous 3 formes : soit le cancer est une conséquence directe de micro-organismes oncogènes, soit le microbiote contribue à la carcinogénèse *via* un effet direct ou, soit par un effet indirect. Ces trois types de relations microbiote-cancer vont maintenant être détaillés.

1.1. Les micro-organismes carcinogènes

En 2012, environ 15% des cas de cancers dans le monde sont attribuables aux micro-organismes, et deux tiers de ces cancers se trouvent dans les pays les moins développés. D'après le CIRC, 10 micro-organismes sont répertoriés comme cancérogène pour l'homme Tableau 5 (Plummer et al., 2016).

Tableau 5: Nombre d'incidence de cancer par infection en 2012 (Plummer et al., 2015)

	Number of new cases	Proportion of new cases attributable to each infectious agent (%)	Number of new cases attributable to infection by sex		Number of new cases attributable to infection by age group		
			Males	Females	<50 years	50-69 years	≥70 years
<i>Helicobacter pylori</i>	770 000	35.4%	500 000	270 000	91 000	340 000	330 000
Human papillomavirus	640 000	29.5%	66 000	570 000	270 000	280 000	90 000
Hepatitis B virus	420 000	19.2%	300 000	120 000	84 000	190 000	140 000
Hepatitis C virus	170 000	7.8%	110 000	55 000	26 000	76 000	66 000
Epstein-Barr virus	120 000	5.5%	80 000	40 000	61 000	44 000	14 000
Human herpesvirus type 8	44 000	2.0%	29 000	15 000	32 000	7600	4500
<i>Schistosoma haematobium</i>	7000	0.3%	4900	2200	1300	3700	2100
Human T-cell lymphotropic virus, type 1	3000	0.1%	1700	1200	630	1200	1200
<i>Opisthorchis viverrini</i> or <i>Clonorchis sinensis</i>	1300	0.1%	820	470	130	670	490
All infectious agents	2 200 000	100.0%	1 100 000	1 100 000	570 000	950 000	650 000

Numbers of cases rounded to two significant figures.

Comme on peut le voir sur ce Tableau 5, la plupart des micro-organismes impliqués sont des virus. L'agent infectieux bactérien ayant l'incidence la plus élevée est *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Cette espèce bactérienne est directement associée au cancer de l'estomac, car elle colonise spécifiquement l'épithélium gastrique (Polk and Peek, 2010). Bien que portée par la moitié de la population mondiale, seulement 1 à 3% des individus vont développer un cancer gastrique (Rajagopala et al., 2017). Le mécanisme par lequel *H. pylori* contribue à développer un cancer gastrique est principalement attribué à la sécrétion de cytotoxines associées au gène A (CagA) et de cytotoxines A vacuolisantes (VacA), qui induisent une inflammation chronique, un stress oxydatif et un dommage à l'ADN, pouvant contribuer à la carcinogénèse (Rajagopala et al., 2017; Wroblewski and Peek, 2013).

1.2. Microbiote intestinal et carcinogénèse : effet direct

Au-delà des micro-organismes carcinogènes, le microbiote intestinal peut contribuer à l'initiation et la progression d'autres cancers. Le cancer le plus étudié est le cancer colorectal (CCR), car c'est à la fois la région où le microbiote est en plus forte concentration et où la relation entre le microbiote intestinal et la barrière épithéliale colorectale est directe (Gagnière et al., 2016).

Le CCR est un cancer multifactoriel qui peut être causé par une combinaison de facteurs : l'âge, l'hérédité, des mutations génétiques, l'épigénétique, le comportement alimentaire, le mode de vie (en particulier occidental) ou divers facteurs environnementaux (Nistal et al., 2015). En effet, le CCR est un cancer fréquent dans les pays développés, mais aujourd'hui ce problème de santé devient un problème pour les pays émergents, conséquence de leur croissance économique. Le mode de vie occidental est caractérisé principalement par une consommation excessive de viande rouge, d'aliments très caloriques et pauvres en fibres, et une sédentarité (Nistal et al., 2015). Tous ces facteurs vont également impacter le microbiote.

Une des premières constatations cliniques est que la composition du microbiote de patients ayant une coloscopie saine et ceux avec un CCR est significativement différente. Comme, le montre la Figure 23, le profil microbien des 2 groupes est distinct. Le groupe atteint d'un CCR présente une augmentation des Bacteroidetes, des Fusobacteria et des Proteobacteria au détriment des Firmicutes. Une augmentation des lymphocytes immunoréactifs Th-17 a aussi été observée chez ces patients (Sobhani et al., 2011).

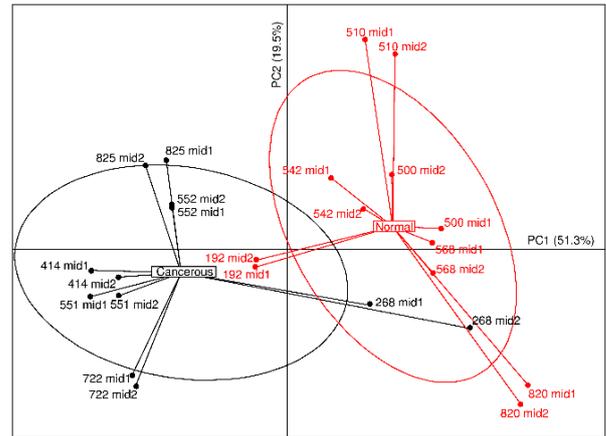


Figure 23: Comparaison de la composition du microbiote fécal de patients témoins (noir) à des patients atteints d'un CCR (rouge) par une analyse en composantes principales (PCA) (Sobhani et al., 2011).

Même si aujourd'hui, nous ne savons pas encore si le microbiote exerce un effet direct sur l'initiation ou la progression du CCR, de plus en plus d'études soutiennent l'idée que certaines bactéries jouent un rôle dans l'initiation et d'autres dans la progression tumorale. On parle alors de bactéries initiatrices et de bactéries passagères (Tjalsma et al., 2012). Le tableau ci-dessous présente les principales bactéries initiatrices et passagères du CCR.

Tableau 6: Principales bactéries impliquées dans l'initiation et la progression de la carcinogénèse du CCR (Marteau and Doré, 2017).

Bactéries candidates	Mécanisme d'action expliquant le pouvoir carcinogène	Surreprésentation chez les patients atteints de CCR en comparaison à une population contrôle
Bactéries initiatrices		
<i>Enterococcus faecalis</i>	Génotoxicité et instabilité chromosomique par production de radicaux libres	0
<i>Escherichia coli</i>		+ (hybridation <i>in situ</i>)
Souches génotoxiques d' <i>E. coli</i>	Production de colibactine ou d'autres enzymes aux propriétés génotoxiques	+ (tissu tumoral)
Souches adhérentes d' <i>E. coli</i>	Réduction des capacités de réparation de l'ADN	+ (tissu tumoral)
<i>Bacteroides fragilis</i> entérotoxigène	Inactivation de la E-cadhérine Activation de la voie Wnt/ β -caténine Activité pro-inflammatoire (NF- κ B) et de la voie Th17 Génotoxicité (fragilysine)	+ (selles)
Bactéries passagères		
<i>Fusobacterium</i> spp.	Inhibition de la E-cadhérine Activation de la voie Wnt/ β -caténine Activité pro-inflammatoire (NF- κ B) Hyperméthylation des îlots CpG	+ (tissu tumoral)
<i>Streptococcus gallolyticus</i> (<i>bovis</i> , biotype 1)	Activité pro-inflammatoire favorisant la croissance tumorale	+ (tissu tumoral)

CCR : cancer colorectal.

Le rôle du microbiote intestinal dans le développement du CCR a été montré dans différents modèles murins pouvant développer un CCR spontanément. Le développement de CCR chez les animaux est possible par plusieurs moyens, soit par une modification génétique comme les souris *Apc*^{Min/-} (Agüera-González et al., 2017), soit en utilisant des carcinogènes chimiques comme l'azoxyméthane (AOM) ou la diméthylhydrazine (Reddy et al., 1975). Ainsi, une des premières études étudiant l'effet du microbiote sur la tumorigénèse colique a été l'étude de Schloss en 2013. Dans cette étude, ils induisent le CCR par injection d'un carcinogène chimique, l'AOM, suivi d'un traitement au Dextran Sodium Sulfate. Ce travail montre que les souris ayant un microbiote conventionnel sont plus susceptibles de développer des tumeurs colorectales que les souris axéniques. De plus, le transfert d'un microbiote dysbiotique caractéristique de souris portant un CCR à des souris axéniques, va favoriser l'émergence des tumeurs chez les souris axéniques. Ces résultats nous montrent bien que le microbiote selon sa composition peut être un acteur du développement du CCR (Zackular et al., 2013). Une étude récente a mis en évidence l'effet pro-tumorigène potentiel du microbiote dans le développement du CCR chez des souris axéniques ou conventionnelles traitées à l'azoxyméthane et gavées avec des selles de patients

atteints ou non d'un CCR. Les souris gavées avec les selles de patients avec un CCR présentent une augmentation du nombre de polypes, une dysplasie intestinale élevée, une prolifération cellulaire augmentée et une infiltration de cellules immunitaires et une expression des gènes pro-inflammatoires plus élevées que les souris gavées avec les selles de patients témoins (Wong et al., 2017).

Le microbiote peut contribuer à des effets pro-carcinogéniques *via* 4 mécanismes principaux (Figure 24) (Gagnière et al., 2016; Garrett, 2015; Nistal et al., 2015; Tilg et al., 2018) :

- 1- L'activation du système immunitaire induisant un phénotype inflammatoire par translocation bactérienne
- 2- La production de génotoxines et de facteurs de virulence par les bactéries qui impactent directement l'ADN de l'hôte
- 3- L'induction d'un stress oxydatif par la production de Réactifs de l'oxygène (ROS)
- 4- La production de métabolites secondaires alimentaires par les bactéries (acide biliaire secondaire, ...)

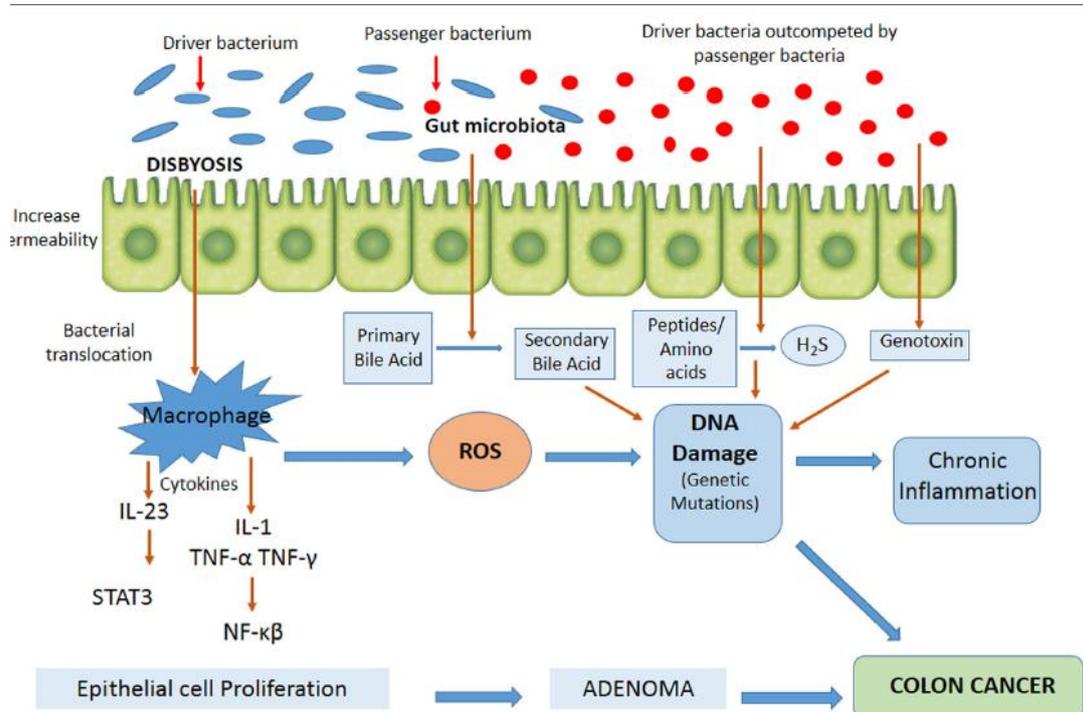


Figure 24: Schéma représentant les mécanismes impliqués dans la carcinogenèse du CCR (Nistal et al., 2015).

Des travaux récents ont montré que la présence de biofilms dans la muqueuse normale de patients atteint d'un CCR sporadique était associée à un état pro-carcinogène (Dejea et al., 2014; Johnson et al., 2015). Cela suggère que la formation des biofilms pourrait être un évènement précoce dans le développement du CCR héréditaire. De plus, il a été montré que le biofilm bactérien était principalement composé d'*E. coli* (produisant la colibactine), et *B. fragilis* (produisant la toxine bft). L'expression de ces bacteriocines était augmentée chez les patients atteints de polypose adénomateuse familiale (une forme héréditaire de CCR), et cette augmentation d'expression était associée à l'inflammation et aux dommages à l'ADN dans le colon. Il semble donc qu'il existe un lien entre la néoplasie du colon et la présence et l'activité de certaines bactéries au potentiel tumorigène. Des expériences complémentaires chez la souris semblent corroborer cette hypothèse (Dejea et al., 2018).

1.3. Microbiote intestinal et effet systémique

Au-delà de l'interaction locale entre le microbiote et la barrière épithéliale intestinale, le microbiote peut aussi exercer une action systémique sur des organes distants. La figure ci-dessous synthétise les mécanismes par lesquels le microbiote peut agir systémiquement et les pathologies associées (Figure 25) (Belkaid and Naik, 2013). De manière générale, l'effet systémique du microbiote intestinal est médié par la translocation de bactéries, de produits bactériens (métabolites, endotoxines, ...), ou par la migration de cellules immunitaires ou inflammatoires (Roy and Trinchieri, 2017).

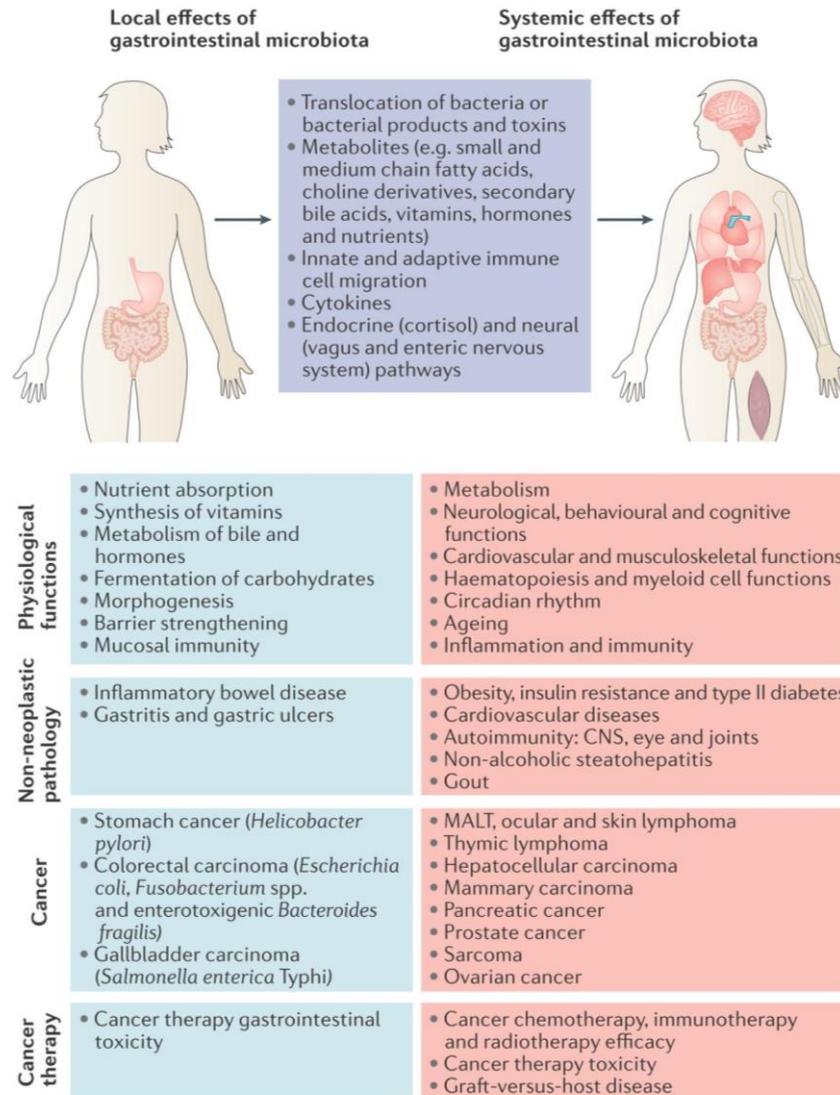


Figure 25: Effets locaux et systémiques du microbiote intestinal (Roy and Trinchieri, 2017)

Concernant le lien entre le microbiote intestinal et les cancers systémiques, de nombreux cancers ont été étudiés comme : cancer du foie, du pancréas, de la peau, du sein, du poumon et du tractus urogénital (rein, ovaire, vessie, ...) (Pevsner-Fischer et al., 2016; Tsilimigras et al., 2017). Bien que les recherches, portant sur la relation entre ces cancers systémiques et le microbiote intestinal, soient à leurs débuts, de nombreuses hypothèses ont pu être soulevées. Par exemple pour le cancer du sein, l'hypothèse la plus probable est la suivante : il a été montré que le microbiote était capable de produire des enzymes métabolisant les œstrogènes, les β -glucuronidases. Ces enzymes produites par certaines bactéries peuvent déconjuguer les œstrogènes et ainsi produire des œstrogènes circulants. Les femmes ménopausées possédant un taux d'œstrogènes élevé dans le sérum ont un risque augmenté d'avoir un cancer du

sein et dans ce cas le microbiote pourrait contribuer à cette augmentation du risque (Fernández et al., 2018; Shapira et al., 2013).

Bien que cette hypothèse ne soit pas encore démontrée, nous savons quand même que les glandes mammaires sont colonisées par un microbiote distinct (Xuan et al., 2014). De plus, une étude clinique a montré que la tumeur mammaire possédait un microbiote différent d'un tissu mammaire sain (Xuan et al., 2014). Deux études précliniques ont montré que le microbiote intestinal pourrait promouvoir l'apparition et la progression du cancer du sein par une réaction inflammatoire (Lakritz et al., 2015; Rutkowski et al., 2015).

2. Microbiote et chimiothérapies

La chimiothérapie est aujourd'hui le traitement de référence pour traiter les cancers. Malheureusement, les nombreux effets secondaires associés obligent parfois les médecins à réduire les traitements ou à y mettre fin. Le deuxième inconvénient des chimiothérapies concerne la non spécificité. En effet, les chimiothérapies ciblent les cellules avec un fort potentiel de réplication comme les cellules cancéreuses. Cependant, les cellules épithéliales intestinales font partie des cellules qui se divisent rapidement. C'est une des raisons pour lesquelles les effets secondaires les plus courants sont les troubles gastro-intestinaux comme les diarrhées et les mucites (Rigby et al., 2016).

Récemment, l'importance du microbiote dans la modulation des chimiothérapies a été mise en évidence et le rôle du microbiote dans l'efficacité et la toxicité des chimiothérapies est aujourd'hui reconnu (Roy and Trinchieri, 2017). On parle alors de « pharmacomicrobiomique » car le but est de décrire ces interactions microbiote-hôte-traitement afin d'aller vers une médecine personnalisée (Alexander et al., 2017).

De nombreuses chimiothérapies ont été étudiées à ce jour. Alexander *et al.*, ont ainsi synthétisé l'ensemble des mécanismes clés expliquant comment les bactéries influencent les effets des chimiothérapies sur l'hôte (Figure 26). Ils proposent le schéma ci-dessous appelé TIMER (pour Translocation, Immunomodulation, Métabolisme, dégradation Enzymatique et Réduction de la diversité et de la variation écologique) (Figure 26) (Alexander et al., 2017).

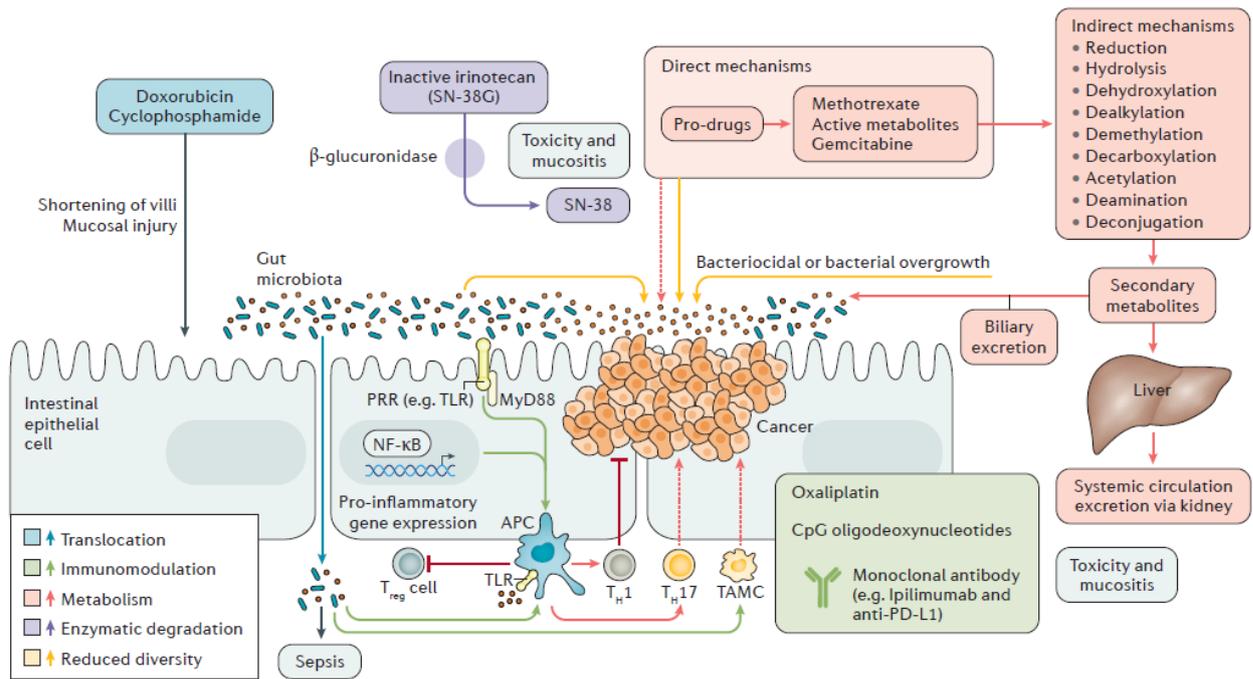


Figure 26: Schéma TIMER présentant une vue d'ensemble des interactions entre le microbiote-hôte modulant l'efficacité et la toxicité des chimiothérapies (Alexander et al., 2017).

Nous allons maintenant détailler quelques exemples d'interactions microbiote et agents chimiothérapeutiques et décrire comment le microbiote peut influencer, d'abord l'efficacité, puis la toxicité des chimiothérapies.

2.1. Microbiote et efficacité des chimiothérapies

Comme vu sur le schéma du TIMER (Figure 26), les bactéries peuvent moduler l'efficacité des chimiothérapies en agissant sur la réponse immunitaire de l'hôte. Les cas du cyclophosphamide (CTX) et de l'oxaliplatine sont aujourd'hui très bien étudiés.

a) Cyclophosphamide

La CTX est une pro-drogue, qui une fois activée va agir comme un agent alkylant cytotoxique. L'administration de CTX entraîne à la fois une dysbiose et une altération de la barrière épithéliale intestinale, permettant une translocation des bactéries, en particulier de bactéries Gram-positives, dans les ganglions lymphatiques chez les souris portant une tumeur de sarcome (Viaud et al., 2013). Dans leur étude, Viaud et al., ont montré que la translocation des bactéries commensales, *Lactobacillus*

johnsonii et *Enterococcus hirae*, dans les organes lymphoïdes secondaires était favorisatrice de l'activation du système immunitaire. Ainsi, chez les souris dépourvues de microbiote (traitement à la Vancomycine), la CTX n'était plus efficace et l'accumulation des Th17 et Th1 dans la rate n'était plus présente. En revanche, l'administration de *L. johnsonii* et *E. hirae* chez ces souris restaurait la réponse des Th17. Ainsi, le CTX peut causer des dommages intestinaux qui seraient nécessaires à l'activation des cellules immunitaires périphériques et à l'efficacité antitumorale (Viaud et al., 2013). Faisant suite à ces travaux, Daillère *et al.*, ont montré que *E. hirae* transloquait dans les ganglions lymphatiques secondaires et augmentait le ratio CD8/Treg. Dans le même temps, *Barnesiella intestinihominis* s'accumulait dans le colon pour promouvoir l'infiltration de cellules immunitaires dans les lésions cancéreuses. Ainsi, ces deux espèces bactériennes permettaient de changer le microenvironnement tumoral en réduisant les lymphocytes T pour rendre la tumeur plus sensible au CTX (Daillère et al., 2016).

b) Oxaliplatine

Comme pour le CTX, les bactéries commensales doivent interagir avec le système immunitaire de l'hôte pour augmenter l'efficacité anti-tumorale de l'oxaliplatine. En effet, Lida *et al.* ont montré que l'oxaliplatine pouvait entraîner la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par les cellules myéloïdes, qui induisait un stress oxydatif intra-tumoral et augmentait la mort des cellules cancéreuses par dommage à l'ADN (Lida et al., 2013). Lorsque les souris, porteuses d'un carcinome du colon en sous-cutané, sont dépourvues de microbiote ou ont subi un traitement antibiotique, la production de ROS et l'effet anti-tumoral de la chimiothérapie étaient diminués. Cela suggère donc que le microbiote est nécessaire à l'efficacité de l'oxaliplatine (Lida et al., 2013).

c) Gemcitabine

Les bactéries ont la capacité de biotransformer une molécule chimique comme une toxine, un polluant, un médicament, etc... *via* des enzymes endogènes. Afin de mieux comprendre l'interaction entre bactéries et chimiothérapie, et de savoir si les molécules anti-cancéreuses sont sujettes à la biotransformation par les bactéries, l'équipe de Tangney a examiné, *in vitro* sur des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire

(Lewis Lung Carcinoma) ou de colon (CT26), l'efficacité de 30 chimiothérapies en présence des bactéries *E. coli* Nissle 1917 ou *Listeria welshimeri* (Lehouritis et al., 2015). Ainsi, en présence de *E. coli*, la toxicité *in vitro* de la Gemcitabine vis-à-vis de cellules tumorales était réduite. De même, *in vivo*, son activité anti-tumorale était diminuée en présence de *E. coli* (augmentation du volume tumoral et diminution de la survie des souris). Cette équipe montrait également une acétylation de la Gemcitabine par les bactéries qui pouvait influencer la réponse tumorale et la toxicité de la gemcitabine (Lehouritis et al., 2015).

Une autre étude a montré que la gemcitabine entraînait des modifications de la composition du microbiote intestinal chez des souris portant un carcinome canalaire pancréatique. Cette dysbiose se traduisait par une augmentation de bactéries pro-inflammatoires, les Proteobacteria (*Escherichia coli* et *Aeromonas hydrophila*) et de bactéries dégradant le mucus, les Verrucomicrobia (*Akkermansia muciniphila*). De plus, l'activation de la voie NF-κB dans la tumeur est toujours observée suite au traitement à la Gemcitabine (Panebianco et al., 2018).

2.2. Microbiote et toxicité des chimiothérapies

L'Irinotecan (CPT-11) est une chimiothérapie principalement utilisée pour les cancers solides comme le cancer du côlon, du poumon, du cerveau, et certaines formes réfractaires de leucémie et lymphome. Le CPT-11 est une pro-drogue, qui va d'abord être biotransformée en une forme active (SN-38) qui va catalyser l'activité de la topoisomérase I, impliquée dans la réplication de l'ADN (Figure 27) (Wallace et al., 2010).

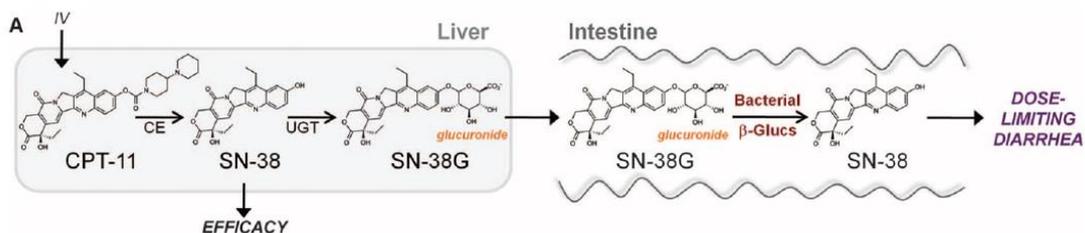


Figure 27 : Métabolisme de l'Irinotecan (CPT-11) à travers ses différentes phases de biotransformation : activation, inactivation et son interaction avec les β-glucuronidases du microbiote (Wallace et al., 2010).

Après avoir exercé ses effets anti-tumoraux, le SN-38 est glucuronidé dans le foie par une enzyme UDP-glucuronosyl-transférase pour créer une forme inactive SN-38G. La forme inactive est ensuite excrétée dans l'intestin par la voie biliaire afin d'être éliminée. Cependant, une fois dans l'intestin, les β -glucuronidases du microbiote commensal vont réactiver ce métabolite en enlevant le groupe glucuronide pour s'en servir comme source de carbone. Ainsi, la réactivation de l'irinotecan va entraîner des dommages intestinaux et de sévères diarrhées. Selon la FDA, plus de 88% des patients présentent des diarrhées et 31% ont des diarrhées de grade 3-4 (Wallace et al., 2015). Cela entraîne donc une réduction des doses ou l'arrêt du traitement (Wallace et al., 2015)

Pour contrer ces effets indésirables et prévenir de la réactivation de l'irinotecan, l'équipe de Redinbo a dans un premier temps établi la structure des β -glucuronidases bactériennes afin d'identifier le potentiel inhibiteur de ces enzymes bactériennes. L'équipe a ensuite testé ces inhibiteurs avec succès chez des souris et montré qu'en associant l'irinotecan à ces inhibiteurs de β -glucuronidases bactériennes, la toxicité intestinale était diminuée et l'efficacité de la chimiothérapie était donc augmentée (Roberts et al., 2013; Wallace et al., 2010, 2015).

3. Microbiote et immunothérapies

L'immunothérapie est la nouvelle approche de traitement anti-cancéreux. Ce type de traitement a montré son efficacité pour traiter les cancers solides et hématopoïétiques. L'immunothérapie a permis d'obtenir des réponses complètes et durables pour des mélanomes métastatiques et des cancers du poumon, pour lesquels les thérapies conventionnelles ne fonctionnaient pas (Roy and Trinchieri, 2017).

En 2015, deux études ont mis en avant l'importance de la composition du microbiote pour l'efficacité de l'immunothérapie.

La première étude a montré que la présence de *Bifidobacterium* spp. augmentait l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-L1 en activant la réponse anti-tumorale des lymphocytes T (Sivan et al., 2015).

En effet, en comparant la croissance tumorale d'un mélanome dans une lignée de souris similaire mais provenant de deux fournisseurs différents (Jackson Laboratory

(JAX) et Taconic Farms (TAC)), ils ont observé que la croissance tumorale du mélanome était moins agressive chez les souris JAX et que la réponse immunitaire contre la tumeur (infiltration des lymphocyte T CD8+) était aussi plus élevée chez les souris JAX. De plus, la thérapie anti-PD-L1 était également plus efficace chez les souris JAX que chez les TAC. Cette efficacité de l'immunothérapie était corrélée à la présence de ces trois espèces *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium adolescentis*. Puis, en traitant des souris JAX, préalablement gavées avec un cocktail de *Bifidobacterium* spp., l'efficacité de l'immunothérapie était retrouvée ainsi que l'activation de la réponse immunitaire (Sivan et al., 2015).

La deuxième étude a montré que l'ipilimumab, un anticorps dirigé contre le CTLA-4, avait une efficacité augmentée en présence de *Bacteroidetes fragilis* et *Burkholderia cepacia* car ils permettaient l'activation de la réponse immunitaire (Vétizou et al., 2015). Plus tard, Dubin et al., ont complété cette étude sur l'ipilimumab en montrant que la sur-représentation des Bacteroidetes était corrélée à une résistance au traitement et à l'apparition de colites (effets secondaires observés chez 1/3 des patients recevant l'ipilimumab) (Dubin et al., 2016). Récemment, l'étude de Routy et al., a montré que les souris et les patients traités par antibiotique avant l'immunothérapie étaient plus résistants au traitement. De plus, ils trouvaient qu'*Akkermensia muciniphila* était plus présente chez les personnes sensibles au traitement. En colonisant des souris avec le microbiote fécal d'un patient répondeur, l'efficacité de l'immunothérapie était rétablie. Ainsi, il semble dans cette étude qu' *A. muciniphila* soit un agent microbien capable d'augmenter l'efficacité de PD-1 et serait un marqueur de réponse au traitement (Routy et al., 2018). Ces résultats doivent bien entendu être confirmés mais ils soulignent l'importance du microbiote intestinal du patient dans la réponse aux immunothérapies.

4. Microbiote et cancer du poumon

Récemment, le dogme concernant la stérilité des poumons chez un individu sain a été brisé. Les poumons possèdent également un microbiote spécifique et varié, qui pourrait être impliqué dans certaines pathologies (Dickson et al., 2014a).

4.1. Le microbiote pulmonaire

Par leur forte exposition à l'environnement extérieur, les poumons sont la porte d'entrée à de nombreux micro-organismes. Bien qu'ils soient équipés d'une défense immunitaire antimicrobienne robuste et efficace, les poumons d'un individu sain ne sont pas stériles, et possèdent un microbiote bien distinct. Grâce à l'avancée des techniques indépendantes de la culture, le profil microbien des poumons a pu être déterminé. Malgré qu'on soit qu'au début de cette exploration, la revue de Bingula *et al.*, présente un tableau de synthèse regroupant les bactéries les plus détectées dans le système respiratoire de personnes saines (Tableau 7). En 2014, Dickson et al., proposent un nouveau modèle conceptuel de la répartition du microbiote dans les poumons (Dickson et al., 2014b). Ils suggèrent que plus la communauté bactérienne pulmonaire est distale, plus elle est disséminée et pauvre. La composition du microbiote pulmonaire est aussi déterminée par l'équilibre entre les bactéries transitoires (apportées par la respiration) et les bactéries éliminées (Budden et al., 2017). De plus, tout comme le microbiote intestinal, le microenvironnement (température, pH, oxygène, système immunitaire de l'hôte...) influe beaucoup sur la composition et la biogéographie du microbiote dans les poumons (Dickson et al., 2014b).

Les études de la composition du microbiote pulmonaire étant encore récentes, elles sont à prendre avec précaution (Bingula et al., 2017). En effet, aujourd'hui les protocoles ne sont pas standardisés et la méthode de prélèvement choisie (lavage broncho-alvéolaire ou biopsies) influe beaucoup sur les résultats finaux.

Tableau 7: Composition bactérienne des différentes parties du système respiratoire de sujets sains (Bingula et al., 2017).

TABLE 1: Most frequently detected bacteria in GI tract and respiratory system of healthy volunteers or from healthy tissue samples. Results from different studies are presented by the taxa level in which they were originally detected, in order of decreasing abundance where possible. If the sampling, analysis method, or result was specific for a certain study, the reference was added adjacent to the corresponding information.

	Sample source Analysis method	Phylum	Order or family	Genus or species	Reference
GI tract	Faeces qPCR ^a , 16S sequencing ^b	Firmicutes(79.4% of sequences), Bacteroidetes (16.9%), Actinobacteria (2.5%), Proteobacteria (1%), and Verrucomicrobia (0.1%) ^b		<i>Faecalibacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Dorea</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Alistipes</i> , and <i>Bifidobacterium</i> ^a <i>Bacteroides (vulgatus)</i> , <i>Roseburia (intestinalis)</i> , <i>Ruminococcus (bromii)</i> , <i>Eubacterium (rectale)</i> , <i>Coprobacillus (sp.)</i> , <i>Bifidobacterium (longum)</i> , and <i>Clostridium (leptum, coccoides)</i> ^b	Tap et al. [11]
Oral cavity	Saliva 16S sequencing	Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, TM7, and Spirochaetes	Pasteurellaceae (5.8%), Enterococcaceae (2.6%), Veillonellaceae (2.0%), Burkholderiales (1.2%), and Lactobacillales (1.1%)	<i>Neisseria</i> and <i>Streptococcus</i> (70% of sequences), <i>Haemophilus</i> (9.2%), <i>Leptotrichia</i> (2.1%), <i>Actinomyces</i> (1.9%), <i>Abiotrophia</i> (1.8%), <i>Atopobium</i> (1.6%), <i>Gemella</i> (1.6%), and <i>Arthrobacter</i> (1.0%)	Lazarevic et al. [12]
Nose	Swab 16S sequencing	Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, and Fusobacteria	Staphylococcaceae, Lachnospiraceae [13] Propionibacteriaceae, Corynebacteriaceae [14]		Charlson et al. [14] Lemon et al. [13]
Oropharynx	Swab 16S sequencing	Dominated by Firmicutes, Proteobacteria, and Bacteroidetes, and Fusobacteria, Actinobacteria, TM7, and SRI follow (oropharynx was richer and less variable than the nostril microbiota)	Streptococcaceae, Lachnospiraceae, unclassified group of Clostridia [13] Streptococcaceae, Veillonellaceae, Fusobacteriaceae, and Neisseriaceae [14]		Charlson et al. [14] Lemon et al. [13]
Esophagus	Biopsy 16S sequencing	Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, and TM7		<i>Streptococcus (mitis, thermophiles, parasanguis)</i> , <i>Prevotella (pallens)</i> , <i>Veillonella (atypica, dispar)</i> , <i>Rothia (mucilaginosus)</i> , <i>Megasphaera</i> (micronuciformis), <i>Granulicatella (adiacens)</i> , <i>Gemella</i> , TM7, <i>Actinomyces (odontolyticus)</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Haemophilus</i> , and <i>Bulleidia (moorei)</i>	Pei et al. [15]
Lung	BAL ^a , brushing ^b 16S sequencing	Actinobacteria, Firmicutes, and Proteobacteria ^a [16] Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, and Fusobacteria ^b [7]	Streptococcaceae, Veillonellaceae, Prevotellaceae, Micrococcaceae, Neisseriaceae, Porphyromonadaceae, Lachnospiraceae, Actinomycetaceae, and Fusobacteriaceae ^a [14]	<i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Veillonella</i> , and <i>Porphyromonas</i> ^a [17] <i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , other <i>Firmicutes</i> , other <i>Bacteroidetes</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Fusobacterium</i> , other <i>Actinobacteria</i> , <i>Staphylococcus</i> , other <i>Proteobacteria</i> , and <i>Corynebacterium</i> ^b [7]	Charlson et al. [14] Erb-Downward et al. [17] Hilty et al. [7] Pragman et al. [16]

BAL: bronchoalveolar lavage.

A ce jour, de nombreuses publications ont mis en évidence une relation existante entre la composition du microbiote pulmonaire et certaines maladies pulmonaires comme : les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC), les fibroses kystiques, l'asthme ou encore les fibroses pulmonaires idiopathiques. Le Tableau 8 regroupe les principales modifications du microbiote pulmonaire observées dans ces pathologies (Mao et al., 2018).

Tableau 8: Tableau synthétique présentant les différents taxa du microbiote pulmonaire caractéristiques des différentes pathologies (Mao et al., 2018).

Medical condition	References	Differential taxa features*	Sample size	Sample type
Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Kim et al ²³	phyla: <i>Firmicutes</i> ↑ genera: <i>Ochrobactrum</i> ↑ <i>Stenotrophomonas</i> ↓ <i>Propionibacterium</i> ↓	26	lung tissue
	Sze et al ²⁴	phyla: <i>Firmicutes</i> ↑ genera: <i>Lactobacillus</i> ↑	24	lung tissue
	Pragman et al ²⁵	phyla: <i>Fusobacteria</i> ↑ genera: <i>Leptotrichia</i> ↑ <i>Fusobacterium</i> ↑	32	broncho alveolar lavage
	Millares et al ²⁶	genera: <i>Pseudomonas</i> ↑ <i>Corynebacterium</i> ↑ <i>Moraxella</i> ↑	16	sputum
	Garcia-Nuñez et al ²⁷	phyla: <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↓ <i>Bacteroidetes</i> ↓	17	sputum
	Lee et al ²⁸	phyla: <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Fusobacteria</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↓ genera: <i>Prevotella</i> ↑ <i>Porphyromonas</i> ↑ <i>Veillonella</i> ↑ <i>Fusobacterium</i> ↑ <i>Streptococcus</i> ↑	8	sputum
	Garcha et al ²⁹	stable: <i>H influenzae</i> ↑ exacerbation: <i>S pneumoniae</i> ↑ <i>M catarrhalis</i> ↑	134	sputum
Cystic Fibrosis	Carmody et al ³³	genera: <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Burkholderia</i> ↑ <i>Streptococcus</i> ↑	4	sputum
	Fodor et al ³⁴	genera: <i>Pseudomonas</i> ↑ <i>Burkholderia</i> ↑	23	sputum mouthwash
	Frayman et al ³⁵	genera: <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Streptococcus</i> ↑ <i>Pseudomonas</i> ↑	95	broncho alveolar lavage
	Laguna et al ³⁶	genera: <i>Streptococcus</i> ↑ <i>Burkholderia</i> ↑ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Haemophilus</i> ↑ <i>Porphyromonas</i> , and <i>Veillonella</i> ↑	12	broncho alveolar lavage
	Feigelman et al ³⁷	genera: <i>Pseudomonas</i> ↑ <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Stenotrophomonas</i> ↑ <i>Achromobacter</i> ↑	17	sputum
Asthma	Hilty et al ²²	phyla: <i>Proteobacteria</i> ↑ genera: <i>Haemophilus spp.</i> ↑		bronchoscopy
	Marri et al ⁴⁴	phyla: <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Firmicutes</i> ↓ <i>Actinobacteria</i> ↓	20	sputum
	Teo et al ⁴⁰	phyla: <i>Proteobacteria</i> ↑ genera: <i>Streptococcus</i> ↑	234	nasopharyngeal
	Bisgaard et al ³⁹	genera: <i>S. pneumoniae</i> ↑ <i>M. catarrhalis</i> ↑ <i>H. influenzae</i> ↑	321	hypopharyngeal
	Durack et al ⁴¹	genera: <i>Haemophilus</i> ↑ <i>Neisseria</i> ↑ <i>Fusobacterium</i> ↑ <i>Porphyromonas</i> ↑	42	bronchoscopy
Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Molyneaux et al ⁴³	genera: <i>Haemophilus</i> ↑ <i>Streptococcus</i> ↑ <i>Neisseria</i> ↑ <i>Veillonella</i> ↑	65	broncho alveolar lavage
	Han et al ⁴⁹	genera: <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Streptococcus</i> ↑	55	broncho alveolar lavage
	Molyneaux et al ⁴⁷	genera: <i>Streptococcus</i> ↑ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Veillonella</i> ↑ <i>Haemophilus</i> ↑ <i>Pseudomonas</i> ↑	35	bronchoscopy

1 ↑: Microbiota increases in cases compared to controls; ↓: Microbiota decrease in cases compared to controls;

2

4.2. Axe Intestin-poumon

Le dialogue entre le microbiote intestinal et le microbiote pulmonaire a récemment été découvert et a permis de mettre en évidence un échange bidirectionnel entre ces deux organes.

L'interaction entre le microbiote intestinal et pulmonaire peut être médié par deux voies principales :

- Par translocation de bactéries ou de produits bactériens
- Par l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte

La Figure 28 ci-dessous résume l'ensemble des voies possibles qui permettent le dialogue entre les microbiotes intestinal et pulmonaire.

La 1^{ère} voie qui fait intervenir la translocation de bactéries ou de produits bactériens se fait majoritairement lorsque l'intégrité de la barrière intestinale ou pulmonaire est altérée. Après translocation, les bactéries ou produits bactériens peuvent soit passer dans la circulation sanguine, soit être transférés dans les ganglions lymphatiques mésentériques puis pulmonaires, ou inversement. Concernant le lien microbiote intestinal vers le microbiote pulmonaire, une étude a montré que lorsque les souris étaient gavées avec des AGCC, les allergies respiratoires diminuaient (Trompette et al., 2014). Concernant le lien du microbiote pulmonaire vers le microbiote intestinal, la translocation bactérienne reste encore floue et semble se produire de façon annexe à une réaction inflammatoire (Bingula et al., 2017; Budden et al., 2017).

La 2^{ème} voie d'interaction entre les deux microbiotes fait intervenir l'immunité de l'hôte. En effet, lors de translocation bactérienne, de lésions ou autres événements causant l'activation d'une réaction inflammatoire, le système immunitaire d'abord inné puis adaptatif vont s'activer. Ainsi la migration des cellules immunitaires peut faire le lien entre les deux organes (Bingula et al., 2017; Budden et al., 2017).

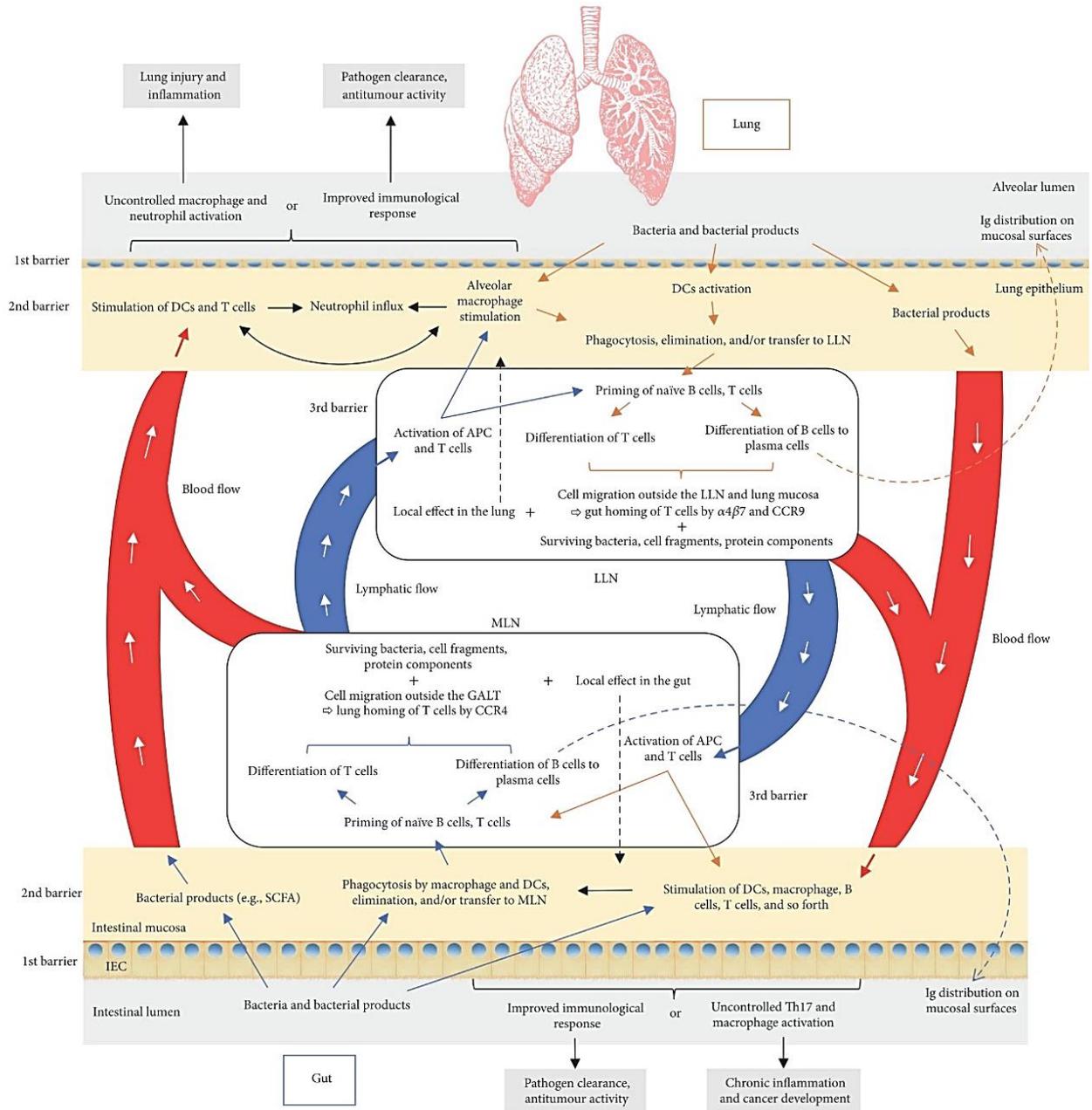


Figure 28: Potentielles voies d'interaction entre le microbiote intestinal et pulmonaire (Bingula et al., 2017). MLN = Ganglions Lymphatiques Mésentériques ; LLN = Ganglions Lymphatiques Pulmonaires

4.3. Relation microbiote intestinal et cancer du poumon

Comme nous venons de le voir, des études ont montré le lien potentiel existant entre le microbiote intestinal et de nombreux cancers, cependant la relation entre le microbiote et le cancer du poumon reste encore inconnue. Bien que la relation entre le microbiote pulmonaire et intestinal soit encore à leurs prémices, des observations ont montré que les patients avec des maladies chroniques pulmonaires (COPD, asthme, ...) ont souvent en parallèle des maladies chroniques du GI comme des IBD, IBS. De même, 50% des patients avec un IBD et 33% avec un IBS ont des troubles pulmonaires (Budden et al., 2017). De plus, il paraît évident que des maladies aiguës ou chroniques pulmonaires comme la MPOC ou des fibroses sont une étape pré-cancer. Car souvent l'un des points communs de ces pathologies est la présence d'une forte inflammation pulmonaire et/ou intestinale, causée par des lésions de la barrière épithéliale, une colonisation pathogénique, ou encore par des facteurs intrinsèques (Bingula et al., 2017). En revanche, la relation entre microbiote pulmonaire et cancer du poumon est de mieux en mieux caractérisée et des profils ou des bactéries biomarqueurs « prédictives » du cancer du poumon commencent à apparaître (Mao et al., 2018).

A ma connaissance, les seules publications étudiant cette relation se concentrent sur l'étude de l'efficacité d'un traitement en fonction du microbiote comme vu dans le paragraphe précédent. Un exemple permettant d'illustrer les recherches actuelles sur ce sujet, est apporté par l'étude de Gui et al., qui montre que l'efficacité du cisplatine était diminuée par un traitement antibiotique et augmentée lorsqu'il était associé à certains Lactobacilles (Gui et al., 2015).

Objectifs de thèse

IMODI (Innovative MODels Initiative against cancer) est un consortium national, constitué de 18 partenaires, incluant plusieurs compagnies pharmaceutiques dont Sanofi, Servier, Ipsen, et Pierre Fabre, ainsi qu'une société de recherche sous contrat, Biofortis Mérieux NutriSciences.

L'objectif du projet IMODI est de développer de nouveaux modèles expérimentaux de cancers reproduisant le plus fidèlement possible la tumeur primaire humaine, appelés PDX (Patient-Derived Tumor Xenograft) pour 8 cancers (poumon, sein, ovaire, foie, prostate, pancréas, lymphome et myélome). A travers la caractérisation exhaustive de chaque PDX, incluant l'historique clinique du patient et les caractéristiques histologiques, moléculaires et pharmacologiques, ces nouveaux modèles cartographient mieux l'hétérogénéité des tumeurs. Les PDX permettent ainsi le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses plus personnalisées.

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, l'intérêt d'étudier le microbiote est grandissant en oncologie car, il est reconnu que le microbiote peut contribuer à l'initiation et/ou à la progression tumorale, et qu'il peut jouer un rôle dans la modulation de l'efficacité et de la toxicité des chimiothérapies.

Ma thèse s'intègre dans ce projet IMODI, et plus particulièrement dans la partie caractérisation pharmacologique des modèles PDX. En complément de l'étude de l'efficacité et de la toxicité de quatre agents chimiothérapeutiques pour un même modèle PDX, mon objectif général est d'étudier l'impact des chimiothérapies sur le microbiote intestinal.

En conséquence, dans le projet IMODI, nous nous sommes intéressés à la question suivante : quel impact ont les agents chimiothérapeutiques sur le microbiote intestinal ?

Au début de ces travaux, nous avons étudié la composition du microbiote intestinal des modèles PDX avant et après traitements chimiothérapeutiques. L'objectif était d'explorer l'impact de chaque agent chimiothérapeutique, en monothérapie, sur le microbiote de PDX de plusieurs types et sous-types tumoraux. Nos premières observations ont montré que la perturbation du microbiote pouvait être plus ou moins importante en fonction des médicaments et des modèles. Et *a contrario*, certaines chimiothérapies n'entraînaient aucune dysbiose du microbiote. Ces résultats ne sont pas présentés dans le présent manuscrit. Même si ce travail exploratoire a été

relativement long, il aurait mérité d'être répété pour avoir des résultats robustes. De plus, ces résultats portaient sur d'autres agents chimiothérapeutiques et nous voulions concentrer ce mémoire sur le pemetrexed uniquement.

Cette première étape a permis de sélectionner la chimiothérapie la plus pertinente et intéressante à étudier pour la suite de ma thèse. Nous avons fait le choix de focaliser la thèse sur le pemetrexed chez les PDX de cancer du poumon.

Plusieurs raisons ont motivé notre choix :

- Le pemetrexed est actuellement très utilisé dans les cas d'adénocarcinomes du poumon avancés mais il entraîne de nombreux effets indésirables (mucites, diarrhées) à cause de son activité à large spectre.
- La 1^{ère} investigation effectuée chez 2 modèles PDX, nous a permis d'observer un impact important et reproductible sur le microbiote, avec une augmentation de bactéries potentiellement pathogènes.
- Aucune étude n'a encore exploré l'impact de ce médicament sur le microbiote intestinal.

La question principale de la thèse était donc : quel est l'impact du pemetrexed sur le microbiote intestinal des modèles PDX d'adénocarcinome de poumon ?

Les grandes étapes de ma thèse étaient d' :

- Etudier l'impact du pemetrexed sur le microbiote des PDX, et de souris non greffées comme contrôle
- Etudier l'impact du pemetrexed sur l'intégrité de la barrière épithéliale
- Explorer l'inflammation induite par le traitement

RÉSULTATS

I. Article N°1 : “Impact of pemetrexed chemotherapy on gut microbiota and intestinal inflammation of Patient-Lung-Derived Tumor Xenograft (PDX) Mouse Models”

Comme décrit précédemment, de nombreux progrès ont été réalisés dans le domaine des traitements anti-cancéreux pour le cancer du poumon. Cependant, la majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé, permettant seulement un traitement chimiothérapeutique. Ainsi, la chimiothérapie reste le traitement de référence pour de nombreux patients

Cependant cette solution thérapeutique est associée à de nombreux effets secondaires. En effet, les chimiothérapies ne sont pas spécifiques et n'attaquent pas seulement les cellules cancéreuses, elles ciblent les cellules avec un fort potentiel de prolifération. De ce fait, elles détruisent aussi bien les cellules tumorales que les cellules souches intestinales. Une des chimiothérapies recommandées par la commission de la Transparence de la Haute Autorité de Santé, dans le traitement des cancers du poumon de type CBNPC non épidermoïdes avancés, est le pemetrexed. Cette chimiothérapie est un antifolate multicyclic qui inhibe plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN. A cause de son activité à large spectre, le pemetrexed entraîne de nombreuses toxicités comme des neutropénies ou des troubles gastrointestinaux (mucites, diarrhées).

Le but de notre étude est, d'abord, d'étudier l'impact du pemetrexed sur la composition du microbiote, puis d'investiguer son impact sur l'intégrité et l'inflammation de la barrière épithéliale du colôn dans un modèle PDX d'adénocarcinome de poumon. Pour ce faire, nous avons défini le protocole expérimental suivant : Après l'établissement des modèles PDX et une fois que la tumeur atteint un volume entre 150 et 250 mm³, les souris sont randomisées en 4 groupes : Control (C), Tumeur (T), Pemetrexed (P) et Tumeur + Pemetrexed (T+P). Cette expérimentation comporte 3 temps clés : avant traitement, 24h après traitement et 1 semaine après traitement. A chaque temps, l'impact de la tumeur et du pemetrexed sont étudiés sur la composition du microbiote et sur l'état, l'inflammation et la perméabilité de la barrière épithéliale. Etant donné leur savoir-faire pour l'établissement des modèles PDX et la conduite d'études

pharmacologiques, l'ensemble de cette étude préclinique a été réalisé par OncoDesign, partenaire du projet IMODI.

De manière générale, cette étude révèle que 24h après le traitement :

- (i) le pemetrexed impacte la composition du microbiote intestinal 24h et une semaine après traitement en entraînant plusieurs variations dont une forte augmentation des *Enterobacteriaceae*.
- (ii) le pemetrexed entraîne une altération significative de l'intégrité de la barrière épithéliale associée à une inflammation précoce.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant, actuellement en cours de relecture dans le journal « Scientific Reports ».

A la suite de cet article, des résultats complémentaires non publiés sont joints, ainsi que des résultats effectués une semaine après traitement qui n'ont pas été inclus dans l'article.

1. Article

manuscripttrackingsystem		SCIENTIFIC REPORTS				
tracking system home	author instructions	reviewer instructions	? help	tips	✕ logout	journal home
Manuscript #	SREP-18-38811-T					
Current Revision #	0					
Submission Date	25th October 18					
Current Stage	Manuscript Assigned to Editor					
Title	Impact of pemetrexed chemotherapy on gut microbiota and intestinal inflammation of Patient-Lung-Derived Tumor Xenograft (PDX) Mouse Models					

1 **Article Title:** Impact of pemetrexed chemotherapy on gut microbiota and intestinal
2 inflammation of Patient-Lung-Derived Tumor Xenograft (PDX) Mouse Models

3

4 **Author name:** Cindy Pensec^{1,2}, Florence Gillaizeau¹, Dominique Guenot^{3,2}, Anne Bessard⁴,
5 Thomas Carton^{1,2}, Sébastien Leuillet^{1,2}, Mario Campone⁵, Michel Neunlist⁴, Hervé M.
6 Blottière^{6,7} and Françoise Le Vacon^{1,2}.

7

8 ¹ Biofortis Mériex NutriSciences, 44800 Saint Herblain, France.

9 ² IMODI Consortium: <http://www.imodi-cancer.org/>

10 ³ Université de Strasbourg (Unistra), EA 3430 U1123, Progression tumorale et
11 microenvironnement, Approches translationnelles et Epidémiologie, Fédération de Médecine
12 Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 67200 Strasbourg, France.

13 ⁴ TENS, INSERM U1235, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif du CHU de Nantes,
14 Université de Nantes.

15 ⁵ Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes, France.

16 ⁶ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas,
17 France.

18 ⁷ MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France.

19

20 * Corresponding author: Biofortis Mériex NutriSciences, 3 route de la Chatterie, 44800 Saint
21 Herblain, France. Tel: +33 2 40 20 57 99; E-mail: francoise.le.vacon@mxns.com

22

23

24

25

26

27

28

1

29 **Abstract**

30

31 **Background:** Significant progress has been realized in lung cancer treatment, such as
32 targeted therapies and immunotherapies. Nevertheless, chemotherapy remains the gold
33 standard for advanced cancer. Pemetrexed, a chemotherapeutic agent used in Non-Small
34 Cell Lung Cancer (NSCLC) can induce significant side effects in patients. Although the role
35 of the microbiota in carcinogenesis and efficacy or toxicity of chemotherapy agents has been
36 demonstrated, the impact of pemetrexed on the gut microbiota and gastrointestinal
37 inflammation remains unknown. The objective was to evaluate the impact of tumor graft and
38 pemetrexed on gut microbiota composition of patient-derived xenograft (PDX) mice. The
39 integrity of the intestinal epithelial barrier and inflammatory markers following treatment were
40 also analyzed.

41 **Methods:** Mice were treated with pemetrexed for two weeks. Fecal microbiota composition
42 was studied by 16S rRNA metabarcoding before, 24h and one week after treatment. The
43 colon epithelial barrier integrity was evaluated by histological examination, intestinal
44 permeability measurements, and selected cytokine quantification.

45 **Results:** The tumor graft by itself induced some variations on fecal microbiota composition.
46 Pemetrexed further increased the relative abundance of *Enterobacteriaceae* and 3 families
47 from the Firmicutes phylum, as well as decreased *Ruminococcaceae*. Pemetrexed also
48 significantly altered the epithelial barrier integrity, which was associated with early
49 inflammation.

50 **Conclusions:** This pilot study shows that the association of a lung tumor with the
51 chemotherapeutic agent pemetrexed causes an alteration of the microbiota composition
52 along with an early inflammatory response. Such information increases our knowledge about
53 the chemotherapy impact on microbiota in order to minimize side effects, avoid infection
54 complications, and improve therapy effectiveness in the future.

55

56

57 **Article**

58

59 **Background**

60

61 Lung cancer remains the most frequent cancer in the world, both in terms of incidence (1.8
62 million new cases/year) and mortality (1.6 million deaths/year) (1). During the last decade,
63 the theranostic of lung cancer based on personalized pharmacotherapy has achieved great
64 progress, particularly for the most common subtype Non-Small Cell Lung Carcinoma
65 (NSCLC). Beside histological classification, the tumor screening is now realized to obtain a
66 molecular profile and find some predictive and prognostic biomarkers. Thanks to major
67 breakthroughs in our knowledge, major subtypes of driver mutations are well known and can
68 be inhibited with targeted therapies, for example tyrosine kinase inhibitors, or monoclonal
69 antibody inhibiting angiogenesis or EGF pathway. More recently, the development of
70 immunotherapy allowed for new strategies in lung cancer (2,3). However, for the majority of
71 lung cancers, chemotherapy remains the treatment of reference because most patients
72 present a locally advanced or metastatic cancer (4). Pemetrexed is one of the recommended
73 drugs, combined with cisplatin or carboplatin, for a first-line treatment of advanced non-
74 squamous lung cancer patients, but also as a maintenance therapy, or second and third line
75 therapies (3).

76

77 Pemetrexed (ALIMTA, Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA) is a multi-target anti-folate
78 drug that inhibits several enzymes involved in the folate pathway: thymidylate synthase,
79 dihydrofolate reductase, and glycinamide ribonucleotide formyltransferase (5,6). These
80 enzymes are involved in the purine and pyrimidine nucleotide metabolism for DNA and RNA
81 synthesis (3). Given that pemetrexed has a broad-spectrum activity, this chemotherapy
82 results in several toxicities, including neutropenia, skin rash, diarrhea, mucositis, and
83 nausea/vomiting (4,5)

84

3

85 The role of the gut microbiota in carcinogenesis has been recently revealed as complex, but
86 it is now well known that it could contribute to cancer risk and development (7). Some
87 bacteria can promote the initiation and progression of cancer *via* different processes.
88 Microbiota alteration can favor opportunistic pathogens and can contribute to higher mucosal
89 permeability, resulting in bacteria or bacterial compound translocation, and thus activating
90 components of both the innate and adaptive immune systems, leading to chronic
91 inflammation. The translocated bacterial products, like toxins or metabolites, can affect cell
92 cycle regulation, cell proliferation, and DNA integrity, and influence cancer development and
93 progression (7,8). In addition, recent studies have demonstrated the important role of the
94 microbiota in modulating the efficacy and toxicity of chemotherapies, and more recently
95 immunotherapies (7). Indeed, the antitumor efficacy could be modulated by bacteria through
96 their influence on host immune response. For instance, the effect of cyclophosphamide is
97 reduced in germ-free mice and in mice depleted in Gram-positive bacteria by antibiotic
98 treatment (9), but the presence of *Lactobacillus johnsonii* and *Enterococcus hirae* can restore
99 its efficacy. One of the side effects of this chemotherapy is to induce an alteration of the gut
100 mucosa, with a translocation of intraluminal bacteria into secondary lymphoid organs. The
101 translocation of these two bacteria could promote the antitumor adaptive immune response
102 by increasing the intratumoral CD8+ T cell/T regulatory cell ratio and activating pathogenic T
103 helper 17 cells and memory Th1 cell immune responses (7). In the case of irinotecan
104 treatment, the gut microbiota increases its toxicity. Irinotecan (CPT-11) is transformed into
105 the active antitumor drug (SN-38). To generate the inactive form, SN-38 is then converted in
106 the liver to an inactive glucuronide molecule (SN-38G) that is excreted via the bile duct into
107 the gut. The bacterial β -glucuronidase can cleave the glucuronide to use it as carbon source,
108 reactivating the compound to cytotoxic SN-38 form, causing intestinal toxicity and diarrhea
109 (10).

110

111 The relation between pemetrexed and the gut microbiota has not been studied yet although it
112 is a routine drug used for lung cancer treatment. We therefore decided to investigate the

4

113 impact of pemetrexed, firstly, on the gut microbiota to highlight the potentially associated
114 dysbiosis (imbalance of gut microbiota), and secondly, on the colon epithelial barrier integrity
115 and inflammation. Our model was based on immunodeficient mice ectopically xenografted
116 with human lung tumors (PDX).

117

118 **Methods**

119

120 **Animals and ethical considerations**

121 Thirty nine healthy female CB17 SCID mice were obtained from Charles River (L'Arbresles,
122 France) and maintained in Specific Pathogen Free (SPF) conditions in accordance with the
123 Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) guidelines (11).

124 Animal housing and experimental procedures were conducted according to the French and
125 European Regulations and the NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The
126 protocol was approved by the Oncodesign animal care and use ethical committee (Oncomet)
127 which is certified by the French authorities (CNREEA agreement #91).

128 The tumor sample was obtained from a xenograft tumor bank previously established (12).

129

130 **Experimental study design**

131 The study design is presented in Figure 1. After a primary amplification in five healthy female
132 CB17 SCID mice, the human lung adenocarcinoma tissue was broken down into 30-50 mg
133 fragments that were subcutaneously implanted into the right flank of 18 mice while 16 mice
134 remained graft-free (day 0 of the study). Twenty-three days later (denoted as time point T01),
135 when the tumor volume reached 150 to 250 mm³, mice were randomized into one of the four
136 groups: "Control" (C group – no tumor and no treatment), "Tumor" (T group – tumor and no
137 treatment), "Pemetrexed" (P group – no tumor and treatment), and "Tumor + Pemetrexed"
138 (P+T group – tumor and treatment) groups. Mice treated with pemetrexed (ALIMTA, Eli Lilly
139 and Company, Indianapolis, USA) received two cycles of once daily intraperitoneal injection

140 (75 mg/kg in NaCl 0.9%) for 5 consecutive days, 2 weeks in a row (Figure 1). All mice were
141 weighed twice a week and the tumor volume measured with calipers.

142

143 **Fecal sample collection**

144 Feces were collected prior to treatment (T01), 24h (T02), and one week (T03) after the end
145 of the 2 pemetrexed cycles. These samples were stored at -80°C until microbiota
146 composition analysis.

147

148 **16S metabarcoding analysis**

149 DNA from PDX mouse stools were extracted using Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kits
150 (Promega, Charbonnière-les-Bains, France) after a bead-beating, following the
151 manufacturer's instructions. DNA extraction was performed on 100 mg of fecal sample.
152 Double-stranded DNA concentration was measured by fluorimetry, using Qubit® 3.0
153 Fluorometer, Qubit® dsDNA broad range, and a high sensitivity assay (Invitrogen Thermo
154 Fisher Scientific, Illikirch-Graffenstaden, France). DNA samples were stored at -20°C until
155 further processing.

156 The V3-V4 region of the bacterial 16S ribosomal RNA genes was amplified from microbiota
157 genomic DNA using universal primers: 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 785R
158 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), as previously described (13). PCR was performed
159 by using 5 ng/μL of DNA, 0.2 μM of primers, 1X of KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche,
160 Boulogne-Billancourt, France) for a final volume of 25 μL. PCR cycling was performed with
161 an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 25 cycles at 98°C for 30 s, hybridization
162 at 55°C for 30 s, elongation at 72°C for 30 s, and a final extension of 72°C for 5 min. The
163 amplicons were purified using AMPure XP beads (Agencourt, Beckman Coulter, Villepinte,
164 France) according to the manufacturer's instructions, and visualized by Bioanalyzer on DNA
165 chips Diversilab (Agilent technologies, Les Ulis, France). After DNA quantification, a library
166 was generated using a Nextera XT Index kit (Illumina, Paris, France). Each library was
167 purified with a Agencourt AMPure kit (Beckman Coulter), controlled for quality on the 2100

6

168 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies, Les Ulis, France), and quantified on a Qubit®
169 2.0 fluorometer (Life technologies, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France),
170 using a Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life technologies, Thermo Fisher Scientific). Then, all
171 libraries quantified and normalized at 4 nM were pooled and denatured with 0.2 N NaOH,
172 diluted to 6pM and mixed with 20% of 6 pM denatured phiX, according to the Illumina
173 protocol. The amplicons were sequenced using the Illumina MiSeq platform using a 2 x 250
174 paired-end Miseq kit V2 (Illumina).

175 The generated sequences from fecal samples were analyzed using an in-house bioinformatic
176 pipeline adapted from the mothur software (14). Briefly, sequences were trimmed and
177 aligned to the V3-V4 region of the 16S gene of the Greengenes database formatted by
178 mothur (gg_13_5_99 release). Chimera sequences were removed using the UCHIME
179 algorithm. Reads were classified using a naive Bayesian classifier against Silva Release 123
180 formatted for mothur with a bootstrap cutoff of 70%. Sequences were then clustered into
181 operational taxonomic units (OTUs) using furthest neighbour clustering at a similarity
182 threshold of 97%. For each sample, OTU-based microbial diversity was estimated by
183 calculating the Shannon and rarefied Chao (to 12650 reads) indices with the R package
184 phyloseq (R version 3.4.3) (15).

185 (13)

186 **qPCR on total bacteria**

187 The total bacteria quantity was established by PCR using primer of 16S region: Uni331modF
188 5'- TCCTACGGGAGGCAGCAGTG-3' and E533modR 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCACG-3'.

189 The DNA from samples at 5 ng/μL was amplified with primers at 0.7 μM and 1X of SYBR
190 qPCR Premix Ex Taq (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) in a final volume of 25 μL.
191 PCR reactions were submitted to the following conditions: 95°C for 3min; followed by 40
192 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s, and finally held at 4°C, using 7500 Real
193 Time PCR System, Applied Biosystems.

194

195 **Intestinal permeability *in vivo***

7

196 Intestinal permeability was measured as described previously (16). FITC (fluorescein
197 isothiocyanate)-Dextran (4 kDa, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was
198 administered by gavage at a concentration of 600 mg/kg body weight (10 mL/kg of a 60
199 mg/mL solution). Four hours after, animals were anesthetized with isoflurane gas (1.0-1.5%
200 Florane®, Abnott, France). Blood collected by cardiac puncture was centrifuged for 10 min
201 at 2,000 g and +4°C, and the plasma was stored at -80°C. Plasma was diluted in PBS (1/9
202 volume). Plasma FITC levels were determined by fluorescence spectrophotometer
203 (Varioskan, Thermo Fisher Scientific) with an excitation of 485 nm and an emission
204 wavelength of 528 nm. The readings were analyzed with the Skan It software (Thermo Fisher
205 Scientific).

206 (16)

207 **RNA extraction**

208 Total RNA of colon tissues was extracted by using NucleoSpin RNA/protein (Macherey
209 Nagel, Düre, Germany) following the manufacturer's instructions. Briefly, 30 mg of tissue,
210 RA1 lysis buffer, and β -mercaptoethanol were homogenized in lysing Matrix D tubes with
211 Precellys-24 (6800 tr/min, 2 cycles of 25s) (Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux,
212 France). The cellular lysate was filtrated on Nucleospin Filter and ethanol was added to
213 separate RNA and proteins. The RNA was eluted from the column with ethanol and collected
214 in RNAase-free water. A treatment with TURBO™ DNAase (ThermoFisher Scientific) was
215 carried out.

216

217 **Cytokine mRNA expression with RT-qPCR**

218 cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using RT superscript III (Invitrogen,
219 ThermoFisher scientific). Real-Time-PCR was performed by the SpetOnePlus System with
220 SYBR Green Master Mix for the gene expression of TNF α (UP
221 GAACTTCGGGGTGATCGGTC NM_001278601,1 and LP
222 GCCACTCCAGCTGCTCCTCC NM_013693,3), IL-10 (UP
223 GACTTTAAGGGTACTTGGGTTGC NM_010548.2 and LP

8

224 AGAAATCGATGACAGCGCCTC), and IL-1 β (UP GCCTCGTGCTGTCGGACCCATA
225 NM_008361.4 and LP TTGAGGCCCAAGGCCACAGGT), or with a TaqMan probe
226 (Thermo Fisher Scientific) for IL-6 (Mm00446190_m1) and MCP1 (Mm00441242_m1). All
227 genes were normalized to the S6 housekeeping gene. This gene code for the ribosomal
228 protein S6, a component of the 40S ribosomal subunit involved in regulating translation.

229 **Histology**

230 Colons were collected for histology when mice were sacrificed at T02. Before cutting, the
231 colon was washed by passing a 0.9% NaCl solution. Colons were cut longitudinally and
232 rolled up to obtain a swiss-roll, which was fixed in 4% formalin, and embedded in paraffin
233 (Histosec®, Merck, Darmstadt, Germany). Histological tissue sections and eosin-hematoxylin
234 (H&E) staining were realized at the MicroPiCell platform (University of Nantes, France). After
235 H&E staining, each microscopic slide was scanned with the Nanozoomer (Hamamatsu
236 Photonics, Japan) and analyzed with the NDP View software (Hamamatsu Photonics,
237 Japan).

238

239 **Statistical analyses**

240

241 The relative variations from T01 of body weight and tumor volume, the relative abundance of
242 each taxon at the Phylum, Family and Genus levels, Shannon index, and rarefied Chao 1
243 index were studied using an analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements. The
244 two-way ANOVA considered the group, the time, and their interaction. For the body weight
245 and the tumor volume, the p-values were adjusted by the Tukey's method for pairwise
246 comparisons between groups at each time. For the analysis of the relative abundances of
247 taxa, only taxa present in average in all samples at a threshold $\geq 0.05\%$ or present in at least
248 10% of samples at a threshold $\geq 0.05\%$ were analyzed (statistically compared). A Benjamini
249 Hochberg procedure was applied to control the False Discovery Rate (FDR) due to multiple
250 hypothesis tests (adjusted p-values are presented). The procedure was applied at each

251 taxonomic classification level for the main effects of the model (multiple hypothesis tests on
252 all taxa), and at each taxon level for the between-group comparisons (pairwise comparisons
253 between groups at each time) and within-group comparisons (pairwise comparisons between
254 times for each group). Intestinal permeability, inflammatory cytokine mRNA expression,
255 crypt length, crypt width, number of goblet cells, and scores of inflammatory cell infiltration
256 and total bacteria number were compared between the 4 groups using the Kruskal-Wallis
257 test. Post-hoc pairwise comparisons were done with a Dunn's test. Results are presented as
258 observed means \pm standard errors of the mean (SEM) or estimated means with 95%
259 Confidence Interval (95%CI). A p-value < 0.05 was considered as statistically significant.
260 Inferential statistics were performed using the SAS[®] software version 9.3 (SAS Institute Inc.,
261 Cary, NC, USA) or GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA). Graphical
262 representations were generated using R software version 3.3.2 for microbiota data and
263 GraphPad Prism 7 otherwise.

264

265 **Results**

266

267 **Pemetrexed impacted the overall mouse weight transiently and the tumor volume** 268 **mildly**

269 After the first pemetrexed cycle (D28), only two groups significantly lost weight. The mean
270 relative loss of weight (from D23 *i.e.* before starting the treatment) was estimated to -4.30%
271 [95%CI: -7.87% ; -0.74%] in the P group ($p=0.0191$), -4.69% [-8.07% ; -1.31%] in the T+P
272 group ($p=0.0076$), while 1.43% [95%CI: -2.62% ; 5.47%] in the C group ($p=0.4817$ (non-
273 significant difference compared to the P and T+P groups, $p=0.1488$ and $p=0.0975$
274 respectively). During the two-day interval between the two cycles (D31), mice from the P
275 group regained a similar weight than before treatment (-0.13% [95%CI: -3.69%; 3.44%])
276 while mice from the P+T group returned close to the initial weight (-2.75% [95%CI: -6.13% ;
277 0.63%]). After the second treatment cycle (D34), the difference between the two groups was
278 more important than during the first cycle and close to statistical significance (adjusted

10

279 $p=0.0740$): mice of the P group had a mean weight comparable to the start of the treatment (-
280 0.10% [95%CI: -9.48% ; -2.71%]) whereas the relative loss of weight in the P+T group was
281 estimated to - 6.09% [95%CI: -9.48% ; -2.71%]. Throughout the experiment, mice from the C
282 and T groups progressively gained weight, except 2 mice in the T group that rapidly lost
283 weight with an important tumor growth at D34. These mice were sacrificed at T02 and
284 therefore did not further impact their group body weight.

285 The efficacy of pemetrexed was evaluated by following the evolution of tumor volume over
286 time compared to mice without treatment. As shown in Figure 2c, a significant reduction in
287 tumor volume was observed following pemetrexed administration. At the end of the
288 experiment (D41), the mean tumor volume was 527.4 mm³ [450.87 ; 603.87] in the T group
289 against 371.1 mm³ [307.87 ; 434.25] in the T+P group, corresponding to a moderate, yet
290 significant, effect of pemetrexed on tumor growth (-156.30 [-255.52 ; 57.08], $p=0.0028$).
291 Interestingly, just after each treatment cycle (D28 and D34), there was a moderate negative
292 linear correlation between body weight change and tumor volume regardless the group
293 (Figure 2b, Pearson correlation coefficient $\rho = -0.68$, $p < 0.001$).

294

295 **Tumor engraftment modified the microbiota composition**

296 The presence of the tumor led to several modifications in microbiota composition. Phylum
297 most impacted by the graft was the Firmicutes. Among the most abundant families, the
298 *Lachnospiraceae* and *Streptococcaceae* significantly increased with tumor graft whereas
299 *Ruminococcaceae* and *Clostridiaceae_1* significantly decreased. Microbiota composition
300 perturbations were associated with significant decrease of the total quantity of bacteria in
301 DNA extract of feces of grafted mice (8.3 log of copies number ± 0.15 for control mice and 7.7
302 log ± 0.15 for grafted mice, p value = 0.0076) (Figure 2b). Moreover, the microbiota diversity
303 was increased following the tumor engraftment (Shannon index) (4.054 ± 0.138 versus 3.581
304 ± 0.142 ; $p = 0.0232$).

305

306 **Pemetrexed induced some dysbiosis in fecal microbiota**

11

307 Gut microbiota composition in the different groups of mice was analyzed by 16S
308 metabarcoding approach at T02 to study the impact of pemetrexed 24h after the end of
309 treatment (Figure 4). The pemetrexed treatment associated to tumor caused several
310 microbiota perturbations compared to control mice (Figure 4a). Indeed, for Proteobacteria
311 phylum, the *Enterobacteriaceae* family was significantly more abundant in the T+P group
312 compared to the three other groups (Figure 3a and b, Supplemental Table 1, $p=0.0013$,
313 $p=0.0013$, and $p=0.0004$ with the T, C and P groups respectively). In addition, three families
314 from the Firmicutes phylum (*Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* and *Streptococcaceae*)
315 were significantly more abundant with tumor and/or treatment while of the *Ruminococcaceae*
316 family was significantly less abundant (Figure 4a and 4b). The *Enterococcaceae* family (from
317 Firmicutes phylum) was significantly more abundant in the T+P group compared to the three
318 other groups ($p=0.0020$ with the three groups). In absence of treatment, the observed mean
319 relative abundance of *Lactobacillaceae* family was greater in mice with tumor than without,
320 but the difference did not reach statistical significance ($29.06\% \pm 6.75\%$ in the T group
321 compared to $11.33\% \pm 6.75\%$ in the C group, $p=0.1346$). On the other hand, the addition of
322 pemetrexed and tumor resulted in a significant increase of *Lactobacillaceae* ($38.17\% \pm$
323 5.64% in the T+P group, $p=0.0193$ for comparison with the T group). Similar significant
324 increases were observed for *Streptococcaceae* with addition of tumor (group T) and
325 pemetrexed (group T+P) while opposite significant changes (decreases) were observed for
326 *Ruminococcaceae*. Interestingly, the differences between groups with and without tumor
327 were already statistically significant for these two families before starting the treatment (T01)
328 (Supplemental Figure 1 and Supplemental Table 2). These results were supported by a
329 Shannon index (a marker of both richness and evenness in microbiota composition) lower in
330 the T+P group compared to other groups (Figure 3c). An increase in microbiota richness
331 measured with the rarefied Chao1 index was also observed. There was no significant
332 difference in total bacteria number in feces between groups (data not shown).
333

334 One week after pemetrexed treatment, the gut microbiota composition was studied to
335 document whether the observed dysbiosis was still observed. Generally, gut microbiota
336 came back to a normal composition at T03. The increase of *Enterobacteriaceae* was not
337 present anymore in the T+P group. However, the decrease of *Ruminococcaceae* was still
338 present and more severely than at T02. The mean relative abundance in T+P was 3.2% ±
339 3.2 as compared to control 16.3% ± 3.9 ($p=0.0344$). The significant increase of
340 *Lactobacillaceae*, already present at T02, was also still observed at T03 (64.1% ± 7.3 in T+P
341 group compared to 27.1% ± 9.0 in control group; $p=0.0060$).

342

343

344 **Pemetrexed weakly impacted gut inflammatory status**

345 The intestinal permeability was measured by the presence of FITC-Dextran in the plasma
346 (Figure 5a). The observed mean values of intestinal permeability were greater in the T+P
347 (1.101 UA) and P (1.052 UA) groups but no significant difference was highlighted between
348 the different groups (respectively $p=0.3851$ and $p=0.0747$ compared to C group, Figure 5a).
349 Among the 5 selected cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , and MCP1), the mRNA expression
350 of IL-10 was significantly higher in the T+P group compared to the P group ($p = 0.0280$,
351 Figure 5b); a smaller non-significant effect was observed in the C group ($p=0.3193$).
352 Moreover, IL-1 β and MCP1 mRNA expressions were higher in the T+P and P groups
353 compared to others groups. At T03, expression of all cytokines came back to normal (data
354 not shown).

355

356 **Pemetrexed modified the colon epithelial barrier integrity**

357

358 In the proximal colon, the crypt length was significantly greater in the T, P, and T+P groups
359 than in the C group ($p < 0.0001$, $p=0.0003$, and $p=0.0007$ respectively, Figure 6a and 6b),
360 whereas the crypt width was not significantly different between groups. The number of goblet

361 cells was significantly lower in the T and T+P groups than in the group C ($p < 0.0001$ and $p <$
362 0.0001 respectively).

363 In the distal colon, opposite significant changes were observed for crypt length (decrease in
364 groups T, P and T+P, to group C ($p=0.0003$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively, Figure
365 6c). The mean crypt width was the lowest in the group T and the highest in the group P,
366 these two groups being statistically significantly different compared to group C ($p < 0.001$ and
367 $p=0.0005$ respectively). The number of goblet cells in the distal colon was significantly
368 increased in the P and T+P groups compared to the C group ($p < 0.0001$ and, $p < 0.0001$,
369 respectively) and T group ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$, respectively).

370 In both the proximal and distal colon, the infiltration of inflammatory cells was significantly
371 higher in the T+P group (score 3) compared to groups C and T, respectively ($p = 0.0367$, p
372 $=0.0161$, Figure 5d).

373

374 **Discussion**

375

376 In the present work, we analyzed the impact of pemetrexed on the gut microbiota
377 composition, the colon mucosa integrity and inflammation in a mouse model xenografted with
378 a human lung adenocarcinoma.

379

380 This observation of the impact of the tumor on microbiota composition before treatment
381 allows documenting that the perturbation in microbiota composition may be due in part to the
382 tumor itself and not only to the chemotherapy treatment. In our study, the presence of grafted
383 tumors increased significantly the microbiota diversity but decreased the total number of
384 bacteria per gram of feces and changed slightly the microbiota composition, which tended to
385 be more anaerobic.

386 Bacterial families more impacted by the presence of tumors were *Lachnospiraceae*,
387 *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* and *Streptococcaceae*. The important increase of
388 *Lachnospiraceae* was frequently observed in metabolic disorder and after stress; and also

14

389 associated with human diseases such as type 2 diabetes, ulcerative colitis, Crohn's and
390 celiac diseases (17–19).

391 The grafted tumor induced also a decrease of the *Ruminococcaceae*. This family is producer
392 of SCFAs especially acetate and butyrate, the later can be the major energy source for
393 colonic epithelial cells. The low abundance of *Ruminococcaceae* may lead to a decrease of
394 SCFAs production and several studies show that butyrate may affect the host immune
395 response. The lack of luminal butyrate induced a nutritional deficiency for the colonic
396 epithelium

397 The increase of *Streptococcaceae* was also important following the tumor graft. The
398 presence of this family has been associated with metabolic syndrome and colon cancer (20).

399 The second step was to study the impact of pemetrexed treatment, with or without tumor, on
400 the gut microbiota composition. Firstly, our study demonstrated that pemetrexed induced
401 significant weight loss in treated mice, indicating potential side effects. This effect appeared
402 to be strengthened by the presence of the tumor, as evidenced during the second
403 pemetrexed cycle. Indeed, only the mice from the P+T group significantly lost weight,
404 contrary to the P group. Moreover, a significant correlation between weight loss and tumor
405 volume was established (Figure 2b). The more the weight decreased, the more the tumor
406 grew, suggesting a diminished effect of pemetrexed potentially because of side effects.
407 Pemetrexed has a broad spectrum antitumor activity and drives considerable toxicity in
408 patients(5). Myelosuppression is the major toxic effect encountered (21) and grade 3-4
409 neutropenia with gastrointestinal toxicity occurs in about 50% patients (22). Interestingly, we
410 observed that weight lost was abolished after the two cycles of pemetrexed, supporting the
411 involvement of pemetrexed in this effect.

412

413 Secondly, concerning the impact of pemetrexed on the gut microbiota composition, a
414 significant increase in 2 families, *Enterobacteriaceae* and *Enterococcaceae*, was only
415 observed in the T+P group. This suggests that the association of the tumor and treatment
416 might be led to expansion of these families. These bacteria are frequently regarded as

15

417 opportunistic pathogens. For example, the increase of *Enterococcaceae*, a pro-inflammatory
418 opportunistic pathogen, has been seen in fecal samples from colorectal cancer patients, and
419 is commonly associated with metabolic disorders (23). The significant increase in
420 *Enterobacteriaceae* was the most striking significant observation in the microbiota
421 perturbation of our mice and has also been reported in human patients suffering from
422 metabolic disorders, obesity, inflammatory bowel disease, diabetes and cancer (24–26). In
423 mice, Hughes *et al.*, proposed that intestinal inflammation could reduce the ability of the
424 colonocytes to perform β -oxidation, causing an increase in oxygen in the gut lumen and
425 promoting the proliferation of facultative anaerobic bacteria, like *Enterobacteriaceae* (27).

426 Consistent with the earlier findings of Tjalsma *et al.* (29), our analysis identified members
427 of *Enterobacteriaceae* as potential bacterial drivers, and *Streptococcaceae* as possible pro-
428 inflammatory passenger bacteria. This finding was not unexpected, since earlier reports
429 considered both *Escherichia coli* (*Enterobacteriaceae*) and *Streptococcus*
430 *gallolyticus* (*Streptococcaceae*) as protagonists of tumor development due to the correlation
431 of their presence and increased risks of CRC.

432 Interestingly, we observed also a decrease in *Ruminococcaceae* in the T group and which is
433 amplified in T+P group. As this decrease was also observed after tumor grafting, but not in
434 tumor-free animals, we can suppose that the loss of *Ruminococcaceae* was due principally to
435 the tumor itself.

436

437

438

439 To evaluate the resilience of gut microbiota after pemetrexed treatment, we have analyzed
440 the gut microbiota composition one week after the end of the treatment. Interestingly, the
441 increase of *Enterobacteriaceae* was completely abolished. However, some variations
442 persisted such as the decrease of *Ruminococcaceae* and the increase of *Lactobacillaceae*.
443 For us, these microbiota variations seems to be mainly due to the growth of the tumors. In
444 fact, *Ruminococcaceae* was already observed at T01, before pemetrexed treatment.

16

445 Concerning *Lactobacillaceae*, no significant increase was observed at T01 after the tumor
446 graft, but a trend could be observed.

447 Taken together, it appears that the association of both tumor and pemetrexed
448 amplifies the dysbiosis. In the future, it would be interesting to perform whole metagenome
449 shotgun sequencing to study the microbial metabolic functions associated with this
450 pemetrexed-associated dysbiosis profile in PDX mice.

451

452 The importance of the symbiotic relationship between intestinal bacteria and epithelial cells
453 has been well established, especially in homeostatic functions of the intestine (30). Faced
454 with the effects of pemetrexed, we can hypothesize to explain our results that, (i) pemetrexed
455 causes a dysbiosis that impacts the integrity of epithelial barrier by altering the mucus layer,
456 (ii) pemetrexed acts directly on the epithelial barrier resulting in alteration of the cellular
457 structure, and then of the mucus layer, which promotes the disturbance of the microbiota.(i)
458 By impacting the microbiota composition, the T+P combination might indirectly impact
459 epithelial barriers because of degradation of the mucus layer by certain gut bacteria. In fact,
460 the mucus can be an attachment site for bacteria and mucins can be an important carbon
461 sources for some bacterial species (31). Another way by which the gut mucosa might have a
462 direct impact on chemotherapy is exemplified by irinotecan (CPT-11). This drug is eliminated
463 in the bile and reaches the intestine as an inactivated compound that is reactivated by
464 bacterial β -glucuronidases in the gut, leading to epithelial cell damage in the intestine (10).
465 (ii) The T+P combination could also impact the epithelial barrier directly. Indeed, pemetrexed
466 inhibits cell replication through the inhibition of three enzymes involved in DNA synthesis.
467 The intestinal epithelium is one of the most rapidly dividing tissues (30), so it is highly
468 probable that pemetrexed causes direct damages to intestinal epithelial cells. In our
469 histological study, the association of T+P had a more deleterious impact on the epithelial
470 integrity than seen in other group. In the proximal colon, the alteration of crypt integrity, the
471 decrease of goblet cell number, and the increased intestinal permeability may have altered
472 the mucus barrier. Simultaneously, the IL-10 expression and the inflammatory cell infiltration

17

473 seem more marked in the proximal colon of in the T+P group. A more permeable epithelium
474 may facilitate bacteria or bacterial-product translocation, causing intestinal inflammation, as
475 evidenced with increased production of cytokines. In fact, the mucus barrier helps maintain
476 the mutualistic relationship between host immunity and bacteria and reduce leukocyte
477 activation (32). Disruption of the barrier may explain the early inflammation features
478 observed in the proximal colon (leukocyte infiltration and inflammatory cytokines, Figure 4). It
479 is notable that SCID mice are immunodeficient, thus, the inflammation response might have
480 been less important than in regular mice. These mice are severely deficient in functional B
481 and T lymphocytes, although this deficiency is not absolute (33).

482 Interestingly in our experiments, all histologic and inflammation perturbations
483 observed 24h after pemetrexed treatment disappeared one week after the end of treatment.
484 A similar resilience has been described after a short course of antibiotic treatment (34).
485 Indeed, the microbiota has the capacity to resist alterations and to return to its original
486 symbiosis between host and microbiota composition (35).

487

488 **Conclusions**

489 This pilot study supports the hypothesis that associating a tumor engraftment with a
490 chemotherapeutic drug can disrupt the microbiota balance and impact the colon barrier
491 integrity, more than with either the tumor or the drug alone. Our results will need to be
492 confirmed in other PDX models to deepen our understanding of the relationship between
493 microbiota, cancer and inflammation following pemetrexed treatment. Eventually, it will be
494 essential to increase our knowledge about the impact of chemotherapy on the gut microbiota
495 in order to establish some strategies to minimize the drug's intestinal side effects. One of the
496 major questions will be to determine which of the bacterial dysbiosis and the barrier
497 disruption comes first.

498

499 **List of abbreviations**

500 PDX: Patient-derived Tumor Xenograft

501 NSCLC: Non-Small Cell Lung Carcinoma

502 SPF: Specific Pathogen Free

503 16S rRNA: 16S ribosomal RNA

504 H&E: Hematoxylin-Eosin

505 SCFA: Short Chain Fatty Acids

506 SCID: severe combined immunodeficiency

507

508 **Declarations**

509 **Acknowledgements**

510 We thank: Lorely Calvet for providing the PDX models and her support in this project;
511 Oncodesign for conducting the mice experiments; the MicroPICell platform for their technical
512 assistance with the histological experiments; Yao Amouzou for the bioinformatics analysis;
513 Pauline Vaissié and Benoit Douillard for their help with some of the biostatistical analyses.
514 We would also like to thank the members of the IMODI Consortium for their advices; and Dr.
515 Sidonie N. Lavergne for reviewing the manuscript. Finally, we are very grateful to the patient
516 for giving a tumor biopsy to research.

517 **Funding**

518 This work was supported by a ANRT subvention (Cifre fellowship) and the IMODI Consortium.

519 **Availability of data and material**

520 All data generated and analyzed during this study are included in this manuscript and in
521 supplementary information files. Further details are available from the corresponding author
522 on request.

523 **Authors' contributions**

524 CP, HMB, SL, and FLV designed experiments. CP performed all experiments and analyzed
525 the data. FG and SL performed all statistical analysis. AB provided technical support. CP and
526 HMB wrote the paper. DG, MC, and MN contributed to scientific report. FLV, FG, DG, AB,
527 TC, SL, MC and, MN reviewed the manuscript. All authors read and approved the final
528 manuscript.

529 **Ethics approval**

530 All animal experiments were in accordance with the French and European Regulations and
531 the NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocol was approved by
532 the Oncodesign animal care and use ethical committee (Oncomet) which is certified by the
533 French authorities (CNREEA agreement #91).

534 **Consent for publication**

535 Not applicable.

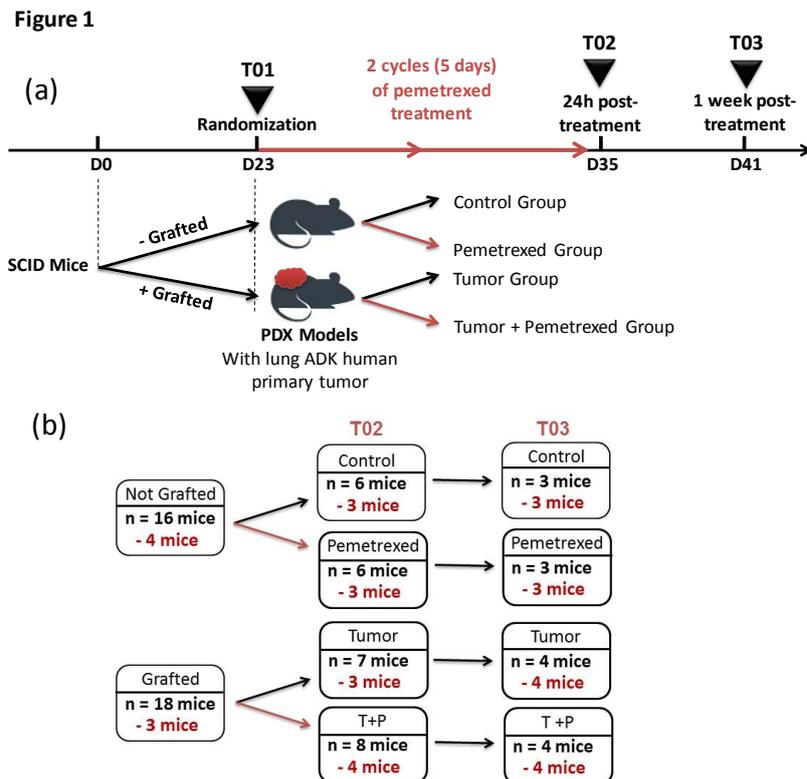
536 **Competing interests**

537 The authors declare that they have no competing interests.

538

539

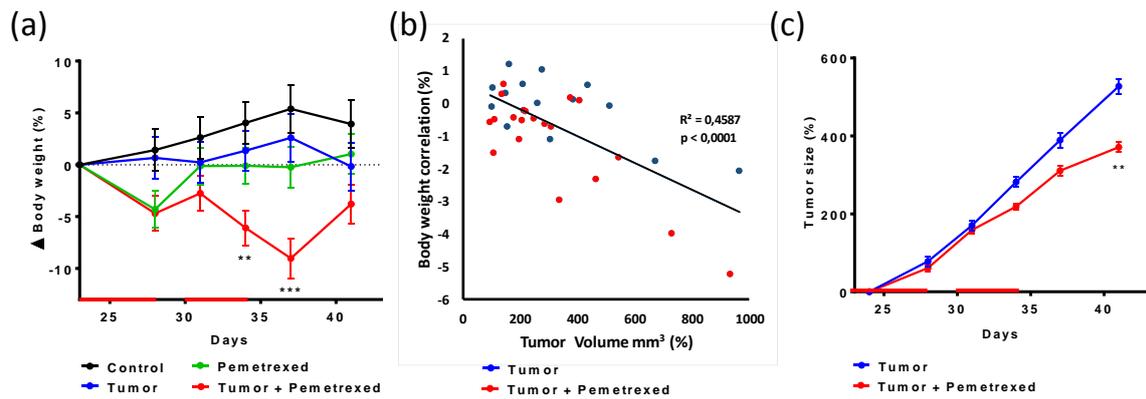
540 **Figures Legends**



542 **Figure 1: Experimental study design.** (a) Experimental study design and collection time
543 points. (b) Mice number during the experiment. Mice written in black correspond to mice for
544 microbiota analysis and mice in red correspond to those for RT-qPCR and histology.

545

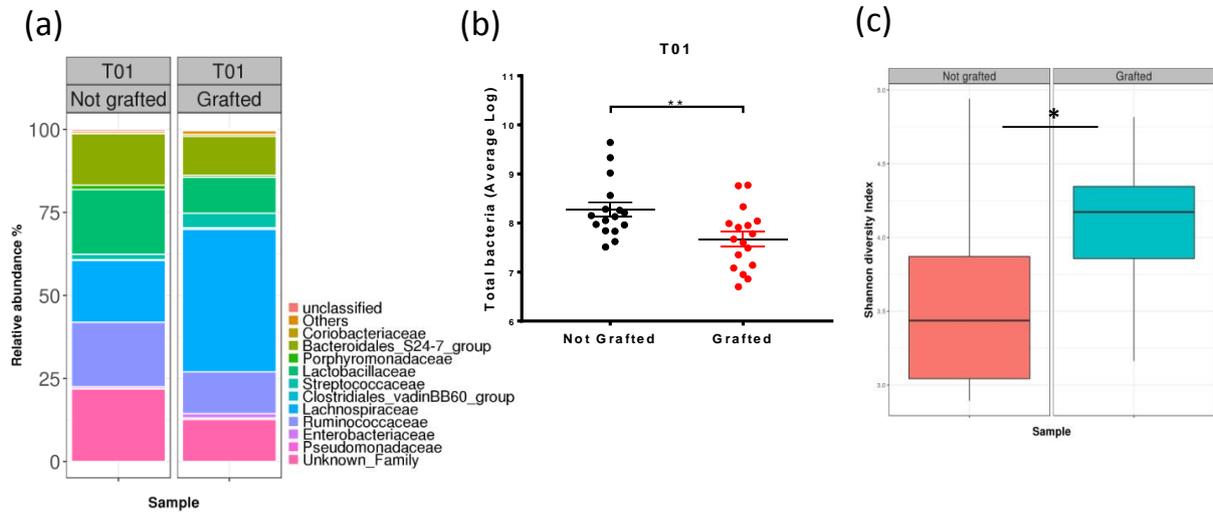
Figure 2



546 **Figure 2: Body weight and tumor volume following pemetrexed.** (a) Percentage body
 547 weight changes (mean \pm SEM) of mice, normalized to D23, across the 41 days study period.
 548 Groups were compared with an ANOVA for repeated measurements, followed by Tukey test
 549 at each time point. Only significant results from the comparison "Tumor + Pemetrexed" VS
 550 Control groups are shown. (two mice of T group at D34 were eliminated to the figure for
 551 graphical reason) (b) Correlation between body weight changes and tumor volume
 552 normalized at each end of treatment (D28 et D34). (c) Tumor volume normalized at D23
 553 (beginning of the treatment) (mean \pm SEM) of mice across the 41 days study period. Groups
 554 were compared with an ANOVA for repeated measurement. Statistical significance: **
 555 $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

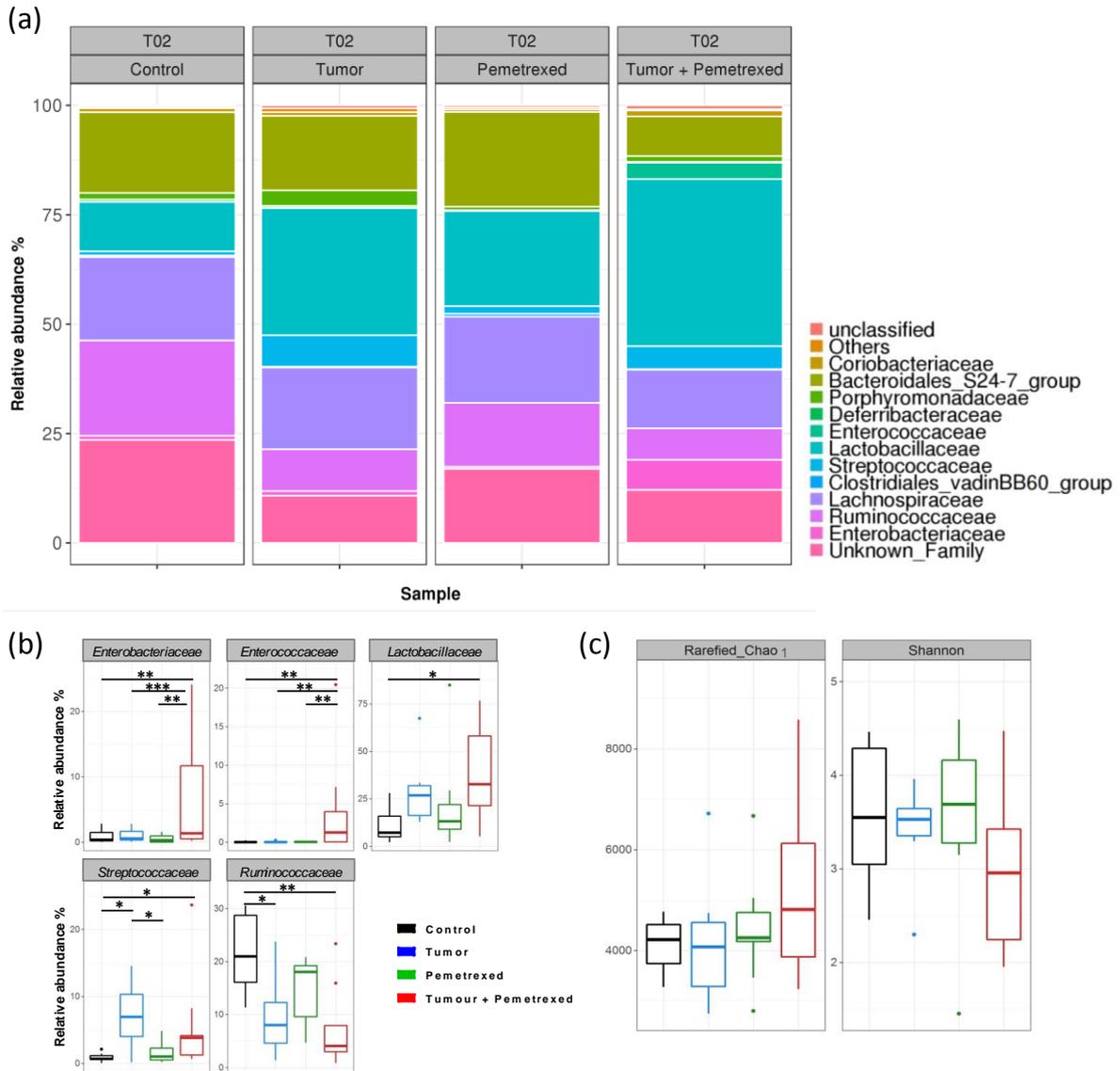
556

Figure 3



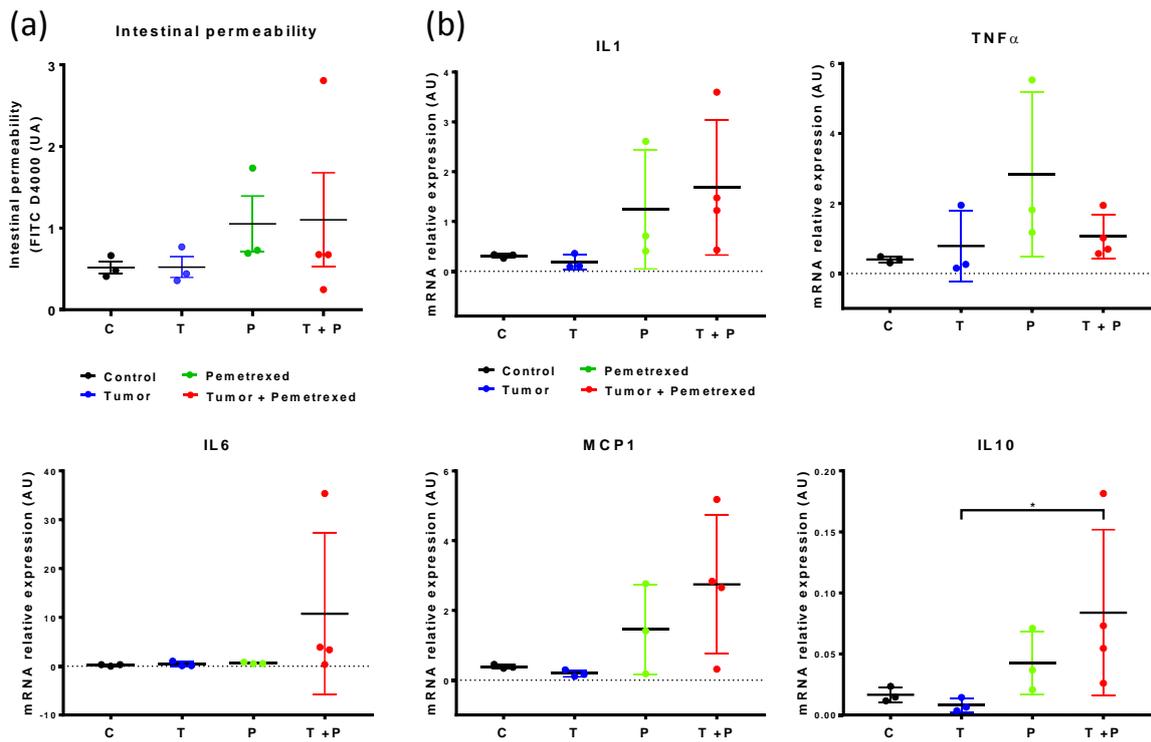
557 **Figure 3:** Impact of the tumor on microbiota composition (a) Microbiota composition at the
 558 family level at T01 in control (n=16) and Grafted (n=17) mice groups as assessed by 16S
 559 rDNA metabarcoding. Families present at a threshold $\geq 0.5\%$ in average in all samples, or
 560 present in at least 10% of samples at a threshold $\geq 0.5\%$ are represented. (b) Quantity of
 561 total bacteria \pm SEM per group at T01, measured by RT-PCR of the 16S rDNA gene. (c)
 562 Microbiota diversity established with the Shannon index at T01. Statistical significance: **,
 563 $p < 0.01$

Figure 4



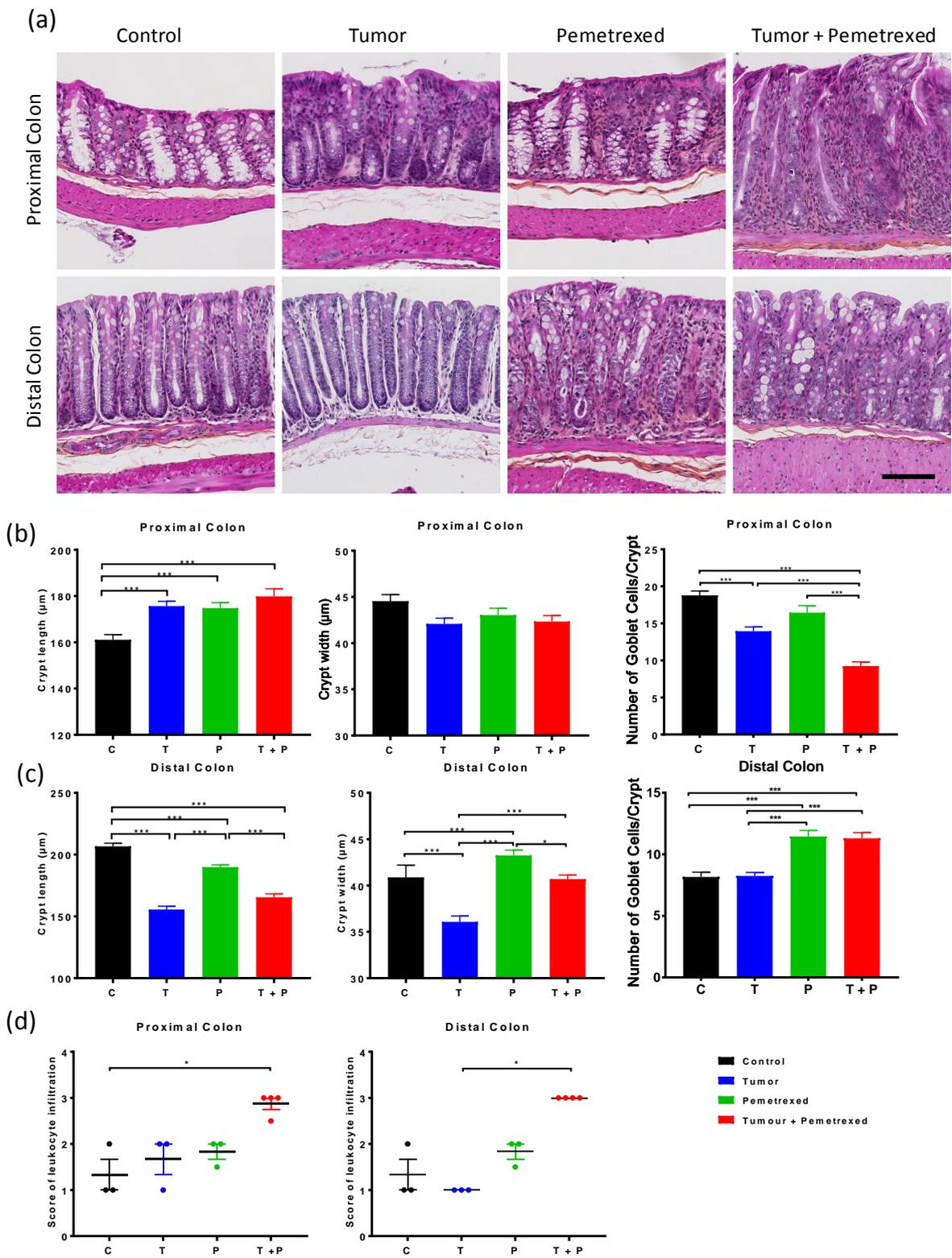
565 **Figure 4: Impact of pemetrexed on microbiota composition.** (a) Microbiota composition
 566 at the family level at T02 in the 4 groups as assessed by 16S rRNA metabarcoding. Families
 567 present at a threshold $\geq 0.5\%$ in average in all samples, or present in at least 10% of
 568 samples at a threshold $\geq 0.5\%$ are represented. (b) Relative abundance of the five most
 569 impacted families per groups. Groups were compared at T02 with an ANOVA for repeated
 570 measurements with a FDR adjustment for multiple comparisons. (c) Microbiota diversity and
 571 richness established with the Shannon and rarefied Chao at T02. Statistical significance: *
 572 $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 5



574 **Figure 5: Intestinal permeability and expression of inflammatory cytokines.** (a)
 575 Intestinal permeability with the FITC-Dextran measured in plasma in the 4 groups at T02. (b)
 576 RNA expression of inflammatory cytokines in the proximal colon measured by RT-qPCR at
 577 T02. Four groups are Control (C), Tumor (T), Pemetrexed (P), and Tumor + Pemetrexed (T +
 578 P). Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test, corrected with a Dunn's test. * p<0.05.

Figure 6



580 **Figure 6: Colon epithelial barrier integrity following pemetrexed.** (a). Hematoxylin-eosin
581 staining of the proximal and distal colon, 24h post-treatment (T02) of the 4 groups (scale =
582 100 μm). (b and c) Crypt length, width and number of goblet cells of proximal (b) and distal
583 (c) colon. (d) Score of inflammatory cell infiltration at T02 in proximal and distal colon.
584 Graphs showing the mean \pm SEM of each group. Data were analyzed with the Kruskal-
585 Wallis test, corrected with a Dunn's test. Control (C), Tumor (T), Pemetrexed (P), and Tumor
586 + Pemetrexed (T + P). Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

588 **Supplemental Table 1: Relative abundance of families present in the four groups at T02**
589 (LSmeans (SEM)). Groups were compared at T02 with ANOVA for repeated measurements
590 with a FDR adjustment for multiple comparisons. Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;
591 *** $p < 0.001$.

Phylum	Family	Time-point	Group T - LSmeans (SEM)	Group T+P - LSmeans (SEM)	Group C - LSmeans (SEM)	Group P - LSmeans (SEM)	Comparison	FDR adj. p value
Actinobacteria	Cellulomonadaceae	T02	0.067 (0.039)	0.026 (0.033)	0.015 (0.039)	0.037 (0.035)	G01 vs G02	0.8349
		T02	G01 vs G03	0.8349
		T02	G01 vs G04	0.8349
		T02	G02 vs G03	0.8349
		T02	G02 vs G04	0.8349
		T02	G03 vs G04	0.8349
	Coriobacteriaceae	T02	0.838 (0.348)	1.341 (0.291)	0.909 (0.348)	0.558 (0.307)	G01 vs G02	0.6576
		T02	G01 vs G03	0.8865
		T02	G01 vs G04	0.6576
		T02	G02 vs G03	0.6576
		T02	G02 vs G04	0.4113
Bacteroidetes	Bacteroidales_S24-7_group	T02	17.018 (4.678)	9.072 (3.914)	18.449 (4.678)	21.646 (4.126)	G01 vs G02	0.3934
		T02	G01 vs G03	0.8293
		T02	G01 vs G04	0.6907
		T02	G02 vs G03	0.3854
		T02	G02 vs G04	0.1808
		T02	G03 vs G04	0.7318
	Porphyromonadaceae	T02	3.561 (1.106)	1.309 (0.925)	1.481 (1.106)	0.768 (0.975)	G01 vs G02	0.3676
		T02	G01 vs G03	0.3751
		T02	G01 vs G04	0.3676

		T02	G02 vs G03	0.9054
		T02	G02 vs G04	0.8262
		T02	G03 vs G04	0.8262
Deferribacteres	Deferribacteraceae	T02	0.456 (0.179)	0.202 (0.149)	0.537 (0.179)	0.203 (0.158)	G01 vs G02	0.4383
		T02	G01 vs G03	0.9000
		T02	G01 vs G04	0.4383
		T02	G02 vs G03	0.4383
		T02	G02 vs G04	0.9967
		T02	G03 vs G04	0.4383
Firmicutes	Bacillaceae	T02	0.054 (0.038)	0.029 (0.032)	0.021 (0.038)	0.031 (0.034)	G01 vs G02	0.9691
		T02	G01 vs G03	0.9691
		T02	G01 vs G04	0.9691
		T02	G02 vs G03	0.9691
		T02	G02 vs G04	0.9691
		T02	G03 vs G04	0.9691
	Clostridiaceae_1	T02	0.010 (0.034)	0.016 (0.029)	0.017 (0.034)	0.083 (0.030)	G01 vs G02	0.9949
		T02	G01 vs G03	0.9949
		T02	G01 vs G04	0.2968
		T02	G02 vs G03	0.9949
		T02	G02 vs G04	0.2968
		T02	G03 vs G04	0.2968
	Clostridiales_vadinBB60_group	T02	0.196 (0.151)	0.136 (0.126)	0.391 (0.151)	0.649 (0.133)	G01 vs G02	0.7632
		T02	G01 vs G03	0.4338
		T02	G01 vs G04	0.0806
		T02	G02 vs G03	0.3042
		T02	G02 vs G04	0.0389 (*)
		T02	G03 vs G04	0.3042
	Enterococcaceae	T02	0.043 (0.833)	3.767 (0.697)	0.014 (0.833)	0.023 (0.735)	G01 vs G02	0.0020 (**)
		T02	G01 vs G03	0.9936
		T02	G01 vs G04	0.9936
		T02	G02 vs G03	0.0020 (**)
		T02	G02 vs G04	0.0020 (**)
		T02	G03 vs G04	0.9936
	Erysipelotrichaceae	T02	0.265 (0.063)	0.028 (0.053)	0.098 (0.063)	0.030 (0.055)	G01 vs G02	0.0197 (*)
		T02	G01 vs G03	0.1274
		T02	G01 vs G04	0.0197 (*)
		T02	G02 vs G03	0.5081
		T02	G02 vs G04	0.9800
		T02	G03 vs G04	0.5081
Lachnospiraceae	T02	18.678 (4.596)	13.389 (3.845)	19.031 (4.596)	19.714 (4.053)	G01 vs G02	0.7606	
	T02	G01 vs G03	0.9569	
	T02	G01 vs G04	0.9569	
	T02	G02 vs G03	0.7606	
	T02	G02 vs G04	0.7606	
	T02	G03 vs G04	0.9569	

	Lactobacillaceae	T02	29.061 (6.747)	38.170 (5.645)	11.331 (6.747)	21.712 (5.951)	G01 vs G02	0.3648
		T02	G01 vs G03	0.1346
		T02	G01 vs G04	0.4167
		T02	G02 vs G03	0.0193 (*)
		T02	G02 vs G04	0.1346
		T02	G03 vs G04	0.3648
	Paenibacillaceae	T02	0.037 (0.019)	0.020 (0.016)	0.009 (0.019)	0.026 (0.017)	G01 vs G02	0.7964
		T02	G01 vs G03	0.7964
		T02	G01 vs G04	0.7964
		T02	G02 vs G03	0.7964
		T02	G02 vs G04	0.7964
		T02	G03 vs G04	0.7964
	Ruminococcaceae	T02	9.557 (2.923)	7.177 (2.446)	21.797 (2.923)	14.593 (2.578)	G01 vs G02	0.5343
		T02	G01 vs G03	0.0124 (*)
		T02	G01 vs G04	0.2405
		T02	G02 vs G03	0.0016 (**)
		T02	G02 vs G04	0.0808
		T02	G03 vs G04	0.1029
	Staphylococcaceae	T02	0.006 (0.297)	0.003 (0.249)	0.004 (0.297)	0.003 (0.262)	G01 vs G02	0.9993
		T02	G01 vs G03	0.9993
		T02	G01 vs G04	0.9993
		T02	G02 vs G03	0.9993
		T02	G02 vs G04	0.9993
		T02	G03 vs G04	0.9993
Streptococcaceae	T02	7.185 (1.438)	5.243 (1.203)	0.914 (1.438)	1.747 (1.268)	G01 vs G02	0.3646	
	T02	G01 vs G03	0.0174 (*)	
	T02	G01 vs G04	0.0177 (*)	
	T02	G02 vs G03	0.0476 (*)	
	T02	G02 vs G04	0.0739	
	T02	G03 vs G04	0.6652	
Proteobacteria	Caulobacteraceae	T02	0.045 (0.038)	0.028 (0.032)	0.012 (0.038)	0.028 (0.034)	G01 vs G02	0.9046
		T02	G01 vs G03	0.9046
		T02	G01 vs G04	0.9046
		T02	G02 vs G03	0.9046
		T02	G02 vs G04	0.9991
		T02	G03 vs G04	0.9046
	Enterobacteriaceae	T02	1.054 (1.253)	6.886 (1.049)	0.945 (1.253)	0.485 (1.105)	G01 vs G02	0.0013 (**)
		T02	G01 vs G03	0.9512
		T02	G01 vs G04	0.9411
		T02	G02 vs G03	0.0013 (**)
		T02	G02 vs G04	0.0004 (***)
		T02	G03 vs G04	0.9411
	Oxalobacteraceae	T02	0.038 (0.020)	0.013 (0.017)	0.007 (0.020)	0.021 (0.018)	G01 vs G02	0.8400
		T02	G01 vs G03	0.8400
		T02	G01 vs G04	0.8400

		T02	G02 vs G03	0.8400
		T02	G02 vs G04	0.8400
		T02	G03 vs G04	0.8400
	Pseudomonadaceae	T02	0.259 (0.112)	0.087 (0.094)	0.050 (0.112)	0.118 (0.099)	G01 vs G02	0.7003
		T02	G01 vs G03	0.7003
		T02	G01 vs G04	0.7003
		T02	G02 vs G03	0.8192
		T02	G02 vs G04	0.8192
		T02	G03 vs G04	0.8192
			T02	
Saccharibacteria	Unknown_Family	T02	10.806 (4.177)	12.139 (3.495)	23.556 (4.177)	16.947 (3.684)	G01 vs G02	0.8073
		T02	G01 vs G03	0.1203
		T02	G01 vs G04	0.4115
		T02	G02 vs G03	0.1203
		T02	G02 vs G04	0.4168
		T02	G03 vs G04	0.4115
-	unclassified	T02	0.688 (0.136)	0.855 (0.114)	0.389 (0.136)	0.525 (0.120)	G01 vs G02	0.4475
		T02	G01 vs G03	0.2530
		T02	G01 vs G04	0.4475
		T02	G02 vs G03	0.0642
		T02	G02 vs G04	0.1494
		T02	G03 vs G04	0.4600

593 **Supplemental Table 2:** Relative abundance of families present in the two groups at T01
594 (LSmeans (SEM)). Groups were compared at T01 for study the impact of tumor graft in
595 control group and grafted group with ANOVA for repeated measurements with a FDR
596 adjustment for multiple comparisons. Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***
597 $p < 0.001$.

Phylum	Family	Time Point	Group	Lsmeans (SEM)	FDR p-value
Actinobacteria	Cellulomonadaceae	T01	Not Grafted	0.029 (0.035)	0.0325
		T01	Grafted	0.158 (0.034)	
	Coriobacteriaceae	T01	Not Grafted	0.105 (0.116)	0.0325
		T01	Grafted	0.584 (0.113)	
Bacteroidetes	Bacteroidales_S24-7_group	T01	Not Grafted	15.482 (2.617)	0.3337
		T01	Grafted	11.78 (2.538)	
	Porphyromonadaceae	T01	Not Grafted	1.354 (0.492)	0.2946
		T01	Grafted	0.578 (0.477)	
Deferribacteres	Deferribacteraceae	T01	Not Grafted	0.13 (0.082)	0.8479
		T01	Grafted	0.152 (0.08)	
Firmicutes	Bacillaceae	T01	Not Grafted	0.032 (0.04)	0.0451
		T01	Grafted	0.16 (0.039)	

	Clostridiaceae_1	T01	Not Grafted	0.098 (0.026)	0.0451	
		T01	Grafted	0.015 (0.025)		
	Clostridiales_vadinBB60_group	T01	Not Grafted	0.222 (0.115)	0.1626	
		T01	Grafted	0.475 (0.111)		
	Erysipelotrichaceae	T01	Not Grafted	0.191 (0.043)	0.2451	
		T01	Grafted	0.115 (0.041)		
	Lachnospiraceae	T01	Not Grafted	18.625 (3.457)	0.0004	
		T01	Grafted	42.918 (3.353)		
	Lactobacillaceae	T01	Not Grafted	19.476 (3.194)	0.0860	
		T01	Grafted	10.841 (3.099)		
	Paenibacillaceae	T01	Not Grafted	0.013 (0.016)	0.0325	
		T01	Grafted	0.069 (0.016)		
	Ruminococcaceae	T01	Not Grafted	19.405 (1.91)	0.0325	
		T01	Grafted	12.577 (1.853)		
	Streptococcaceae	T01	Not Grafted	1.622 (0.673)	0.0325	
		T01	Grafted	4.376 (0.653)		
	Proteobacteria	Caulobacteraceae	T01	Not Grafted	0.037 (0.038)	0.0325
			T01	Grafted	0.185 (0.037)	
Comamonadaceae		T01	Not Grafted	0.006 (0.009)	0.0325	
		T01	Grafted	0.038 (0.009)		
Enterobacteriaceae		T01	Not Grafted	0.571 (0.344)	0.1772	
		T01	Grafted	1.29 (0.334)		
Oxalobacteraceae		T01	Not Grafted	0.01 (0.014)	0.0325	
		T01	Grafted	0.061 (0.013)		
Pseudomonadaceae		T01	Not Grafted	0.091 (0.087)	0.0325	
		T01	Grafted	0.441 (0.084)		
Saccharibacteria	Unknown_Family	T01	Not Grafted	21.859 (2.638)	0.0325	
		T01	Grafted	12.67 (2.559)		
-	unclassified	T01	Not Grafted	0.576 (0.057)	0.0325	
		T01	Grafted	0.365 (0.055)		

599 **References**

- 600 1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and
601 mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan
602 2012. *International Journal of Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
- 603 2. Olaussen KA, Postel-Vinay S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer:
604 a challenging landscape. *Annals of Oncology*. 2016 Nov;27(11):2004–16.
- 605 3. Tomasini P, Barlesi F, Mascaux C, Greillier L. Pemetrexed for advanced stage nonsquamous non-
606 small cell lung cancer: latest evidence about its extended use and outcomes. *Therapeutic
607 Advances in Medical Oncology*. 2016 May;8(3):198–208.
- 608 4. Socinski MA, Stinchcombe TE, Hayes DN. The evolving role of pemetrexed (Alimta) in lung
609 cancer. *Seminars in Oncology*. 2005 Apr;32:S16–22.
- 610 5. Adjei AA. Pharmacology and Mechanism of Action of Pemetrexed. *Clinical Lung Cancer*. 2004
611 Apr;5:S51–5.
- 612 6. Molina JR, Adjei AA. The Role of Pemetrexed (Alimta®, LY231514) in Lung Cancer Therapy.
613 *Clinical Lung Cancer*. 2003 Jul;5(1):21–7.
- 614 7. Roy S, Trinchieri G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*.
615 2017 Mar 17;17(5):271–85.
- 616 8. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):80–6.

22

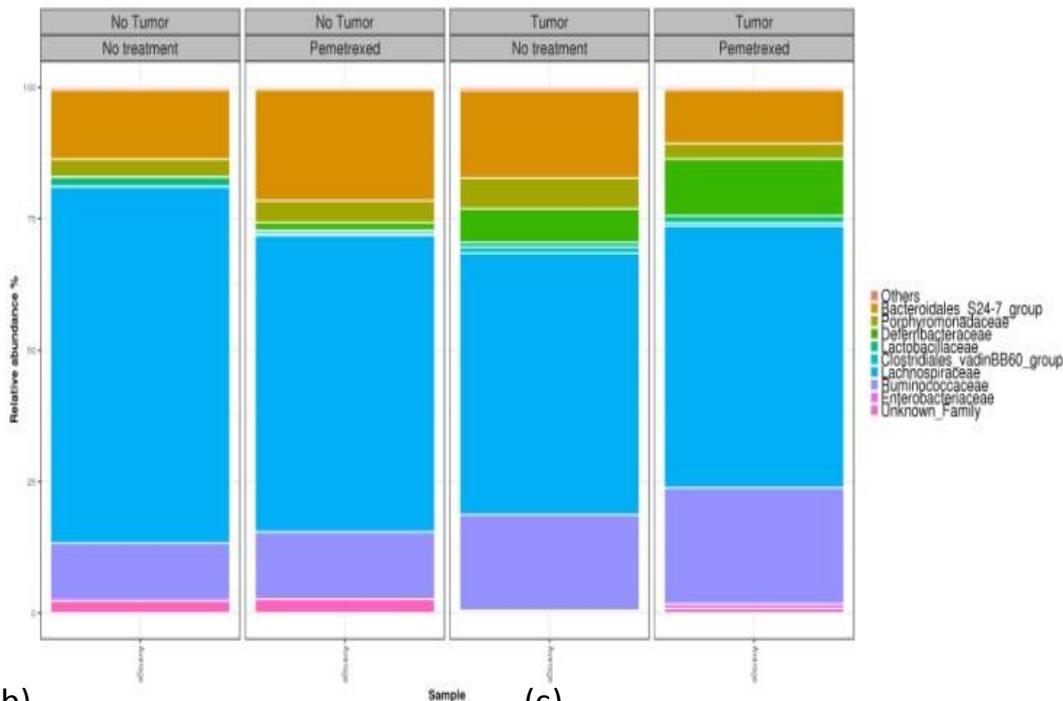
- 617 9. Viaud S, Daillère R, Boneca IG, Lepage P, Langella P, Chamailard M, et al. Gut microbiome and
618 anticancer immune response: really hot Sh*t! *Cell Death and Differentiation*. 2015
619 Feb;22(2):199–214.
- 620 10. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, et al. Alleviating Cancer Drug Toxicity by
621 Inhibiting a Bacterial Enzyme. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):831–5.
- 622 11. Guillen J. FELASA Guidelines and Recommendations. *Journal of the American Association for
623 Laboratory Animal Science*. 2012;51(3):311–21.
- 624 12. Ilie M, Nunes M, Blot L, Hofman V, Long-Mira E, Butori C, et al. Setting up a wide panel of
625 patient-derived tumor xenografts of non-small cell lung cancer by improving the preanalytical
626 steps. *Cancer Medicine*. 2015 Feb;4(2):201–11.
- 627 13. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S
628 ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity
629 studies. *Nucleic acids research*. 2013 Jan 7;41:e1.
- 630 14. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur:
631 open-source, platform-independent, community-supported software for describing and
632 comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 2009
633 Dec;75:7537–41.
- 634 15. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for
635 Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015;
- 636 16. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut
637 Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced
638 Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*. 2008 Jun 1;57(6):1470–81.
- 639 17. Kameyama K, Itoh K. Intestinal Colonization by a Lachnospiraceae Bacterium Contributes to the
640 Development of Diabetes in Obese Mice. *Microbes Environ*. 2014 Dec;29(4):427–30.
- 641 18. Li S, Wang Z, Yang Y, Yang S, Yao C, Liu K, et al. Lachnospiraceae shift in the microbial
642 community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress. *AMB Express*
643 [Internet]. 2017 Apr 17 [cited 2018 Oct 18];7. Available from:
644 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5393979/>
- 645 19. San-Juan-Vergara H, Zurek E, Ajami NJ, Mogollon C, Peña M, Portnoy I, et al. A Lachnospiraceae-
646 dominated bacterial signature in the fecal microbiota of HIV-infected individuals from
647 Colombia, South America. *Scientific Reports*. 2018 Mar 14;8(1):4479.
- 648 20. Zeng H, Ishaq SL, Zhao F-Q, Wright A-DG. Colonic inflammation accompanies an increase of β -
649 catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat
650 diet-fed mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016 Sep 1;35:30–6.
- 651 21. Niyikiza C, Baker SD, Seitz DE, Walling JM, Nelson K, Rusthoven JJ, et al. Homocysteine and
652 methylmalonic acid: markers to predict and avoid toxicity from pemetrexed therapy. *Mol
653 Cancer Ther*. 2002 May;1(7):545–52.
- 654 22. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz H-J, Ladner RD. Standing the test of time:
655 targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014
656 May;11(5):282–98.

- 657 23. Nistal E, Fernández-Fernández N, Vivas S, Olcoz JL. Factors Determining Colorectal Cancer: The
658 Role of the Intestinal Microbiota. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2015 Oct 12 [cited 2018 Aug
659 7];5(220). Available from:
660 <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00220/abstract>
- 661 24. Montassier E, Batard E, Massart S, Gastinne T, Carton T, Caillon J, et al. 16S rRNA gene
662 pyrosequencing reveals shift in patient faecal microbiota during high-dose chemotherapy as
663 conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Microb Ecol*. 2014 Apr;67(3):690–9.
- 664 25. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD—what role do Proteobacteria play?
665 *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012 Apr;9(4):219–30.
- 666 26. Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut
667 microbiota. *Trends in Biotechnology*. 2015 Sep;33(9):496–503.
- 668 27. Hughes ER, Winter MG, Duerkop BA, Spiga L, Furtado de Carvalho T, Zhu W, et al. Microbial
669 Respiration and Formate Oxidation as Metabolic Signatures of Inflammation-Associated
670 Dysbiosis. *Cell Host & Microbe*. 2017 Feb;21(2):208–19.
- 671 28. Underwood S, Avison. *Citrobacter koseri* and *Citrobacter amalonaticus* isolates carry highly
672 divergent -lactamase genes despite having high levels of biochemical similarity and 16S rRNA
673 sequence homology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 Apr 29;53(6):1076–80.
- 674 29. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal
675 cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol*. 2012 25;10(8):575–82.
- 676 30. Rigby RJ, Carr J, Orgel K, King SL, Lund PK, Dekaney CM. Intestinal bacteria are necessary for
677 doxorubicin-induced intestinal damage but not for doxorubicin-induced apoptosis. *Gut
678 Microbes*. 2016 Jul 26;7(5):414–23.
- 679 31. Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, Schipper R, de Vos W, Dekker J. Mucin-
680 bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2010
681 Jul;1(4):254–68.
- 682 32. Sun J, Shen X, Li Y, Guo Z, Zhu W, Zuo L, et al. Therapeutic Potential to Modify the Mucus
683 Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*. 2016 Jan 14;8(1):44.
- 684 33. Bosma MJ. The Scid Mouse Mutant: Definition, Characterization, and Potential Uses. 1991;28.
- 685 34. De La Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Dore J. Resilience of the
686 Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge. *Journal of Clinical
687 Microbiology*. 2005 Nov 1;43(11):5588–92.
- 688 35. van de Guchte M, Blottière HM, Doré J. Humans as holobionts: implications for prevention and
689 therapy. *Microbiome* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2018 Jul 4];6. Available from:
690 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928587/>
- 691

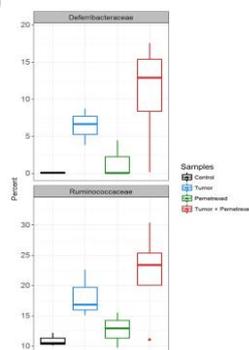
2. Résultats Complémentaires

2.1. Impact of pemetrexed on the cecal microbiota

(a)



(b)



(c)

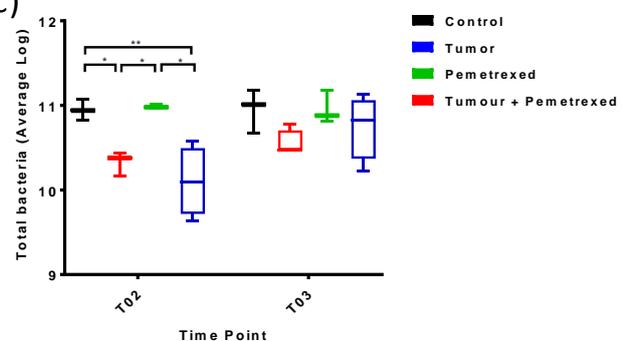


Figure 29 : Impact of pemetrexed on cecal microbiota. (a) The cecal microbiota composition at the family level at T02 in 4 groups: Control (C), Tumor (T), Pemetrexed (P) and Tumor + Pemetrexed (T+P). Families present at a threshold $\geq 0.5\%$ in average in all samples, or present in at least 10% of samples at a threshold $\geq 0.5\%$ are represented. (b) Relative abundance of 2 families per groups. (c) Quantity of total bacteria per group at T02 and T03. Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test corrected with Dunn's test. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

Results:

The composition of cecum microbiota has been also studied by 16S metagenomic sequencing (Figure 30). Compared to microbiota composition of the feces, the cecum microbiota composition was different. In Control group, 4 phyla were identified:

Bacteroidetes, Firmicutes, Defferibacteria and Saccharibacteria. The relative abundance of Saccharibacteria was very low in the cecum ($2,624 \% \pm 0,445$) compared to feces ($23,557 \% \pm 4,177$). After pemetrexed treatment, we have observed in T and T+P groups a significant increase of Defferibacteria ($6.4\% \pm 1.9$ in T group and $10.9\% \pm 1.6$ in T+P group, $p= 0.04$ and $p= 0.001$ respectively) and decrease of Saccharibacteria ($0.4\% \pm 0.5$ in T group and $0.8\% \pm 0.4$ in T+P group, $p= 0.0134$ and $p= 0.0181$ respectively) compared to C group ($0.1\% \pm 1.6$ and $2.6\% \pm 0.4$ respectively). Looking at lower taxonomic levels, pemetrexed has brought a significant increase of *Defferibacteraceae* ($6.4\% \pm 1.9$ in T group and $10.9\% \pm 1.6$ in T+P group compared to $0.1\% \pm 1.6$ in C group; $p=0.04$ and $p=0.001$ respectively) and diminution of *Ruminococcaceae* ($18.2\% \pm 2.3$ in T+P group compared to $11.7\% \pm 2$ in C group; $p=0.009$). Interestingly, compared to impact on feces, a slight significant increase of Proteobacteria and consequently *Enterobacteriaceae* was observed ($0.9\% \pm 0.2$ in T+P group and $0.001\% \pm 0.2$ in C group; $p=0;02$).

Concerning all bacteria quantity, pemetrexed treatment alone had no impact on the total bacteria ($10,990 \log \pm 0,015$) but we have observed a significant diminution in T group ($10,327 \log \pm 0,085$) and a more significant decrease in T+P group ($10,103 \log \pm 0,201$), compared to control group ($10,947 \log \pm 0,069$).

Discussion:

We have been studying the cecal microbiota composition since our expectation was that pemetrexed impacted the microbiota of cecum more than feces. As previously described in others publications, the microbiota composition was different from fecal microbiota, but we have found a different profile than others (Bråten et al., 2017; Ericsson et al., 2018; Hugenholtz and de Vos, 2018).

We supposed that we found this different profile as we have immunodeficient SCID mice. Firstly, we observed a decrease of total bacteria in T group, which was amplified in T+P group. Similarly, an increase of *Defferibacteriaceae* and *Ruminococcaceae* was found in T group and more importantly in T+P group. We could suppose that tumors induced a diminution of total bacteria in cecal microbiota with an increase of these 2 families. And these modulations were exacerbated by pemetrexed. Secondly, a slight increase of *Enterobacteriaceae* was observed in T+P group as compared to control, as previously observed in fecal microbiota. We supposed that pemetrexed began to impact gut microbiota in the cecum and its strong impact was observed preferentially

in fecal microbiota. Thus, we have concluded that cecal microbiota was mainly impacted by the tumor itself.

2.2. Impact of pemetrexed on fecal microbiota composition at T03

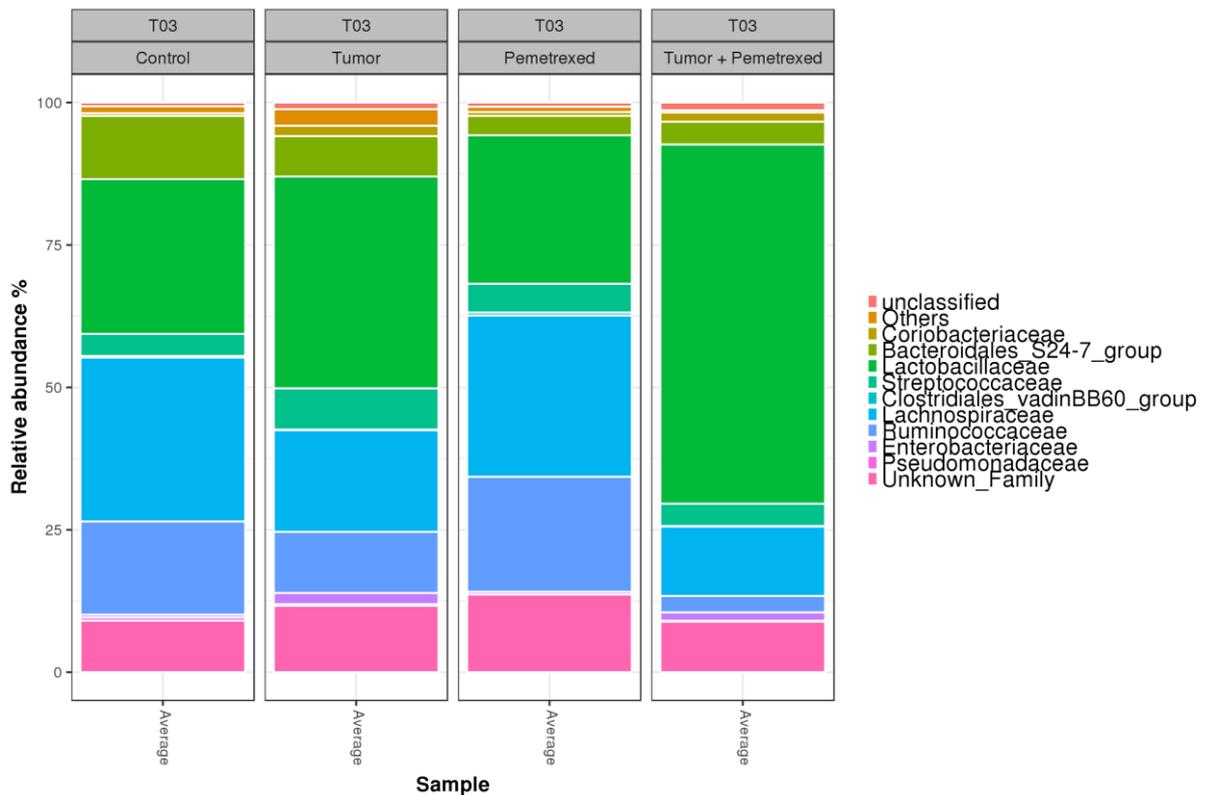


Figure 30: Microbiota composition at the family level at T03 in the 4 groups as assessed by 16S rRNA metabarcoding. Families present at a threshold $\geq 0.5\%$ in average in all samples, or present in at least 10% of samples at a threshold $\geq 0.5\%$ are represented.

Results:

One week after pemetrexed treatment, the gut microbiota composition was studied to document whether the dysbiosis was still observed. Generally, gut microbiota came back to a normal composition. The increase of *Enterobacteriaceae* was not present anymore. However, the decrease of *Ruminococcaceae* was still present and more severely than at T02. The relative abundance in T+P was only $3.2\% \pm 3.2$ as compared to control $16.3\% \pm 3.9$; $p=0.0344$). The significant increase of *Lactobacillaceae*, already present at T02, was also still observed at T03 ($64.1\% \pm 7.3$ in T+P group compared to $27.1\% \pm 8.9$ in control group; $p=0.0060$).

Discussion:

To evaluate the resilience of gut microbiota after pemetrexed treatment, we have analyzed the gut microbiota composition one week after the end of the treatment. Interestingly, the increase of *Enterobacteriaceae* was completely abolished. However, some variations persisted such as the decrease of *Ruminococcaceae* and the increase of *Lactobacillaceae*. For us, these microbiota variations were mainly due to the growth of the tumors. In fact, *Ruminococcaceae* was already observed at T01, before pemetrexed treatment. Concerning *Lactobacillaceae*, no significant increase was observed at T01 after the tumor graft, but a trend could be observed. *Lactobacillus*, the genus represented in *Lactobacillaceae*, is known to have anti-inflammatory properties. Indeed It was shown to ameliorate the inflammatory reaction by downregulating the proinflammatory cytokines secretion pathway (Amdekar et al., 2012; Silva et al., 1987).

2.3. Impact of pemetrexed on gut inflammatory status at T03

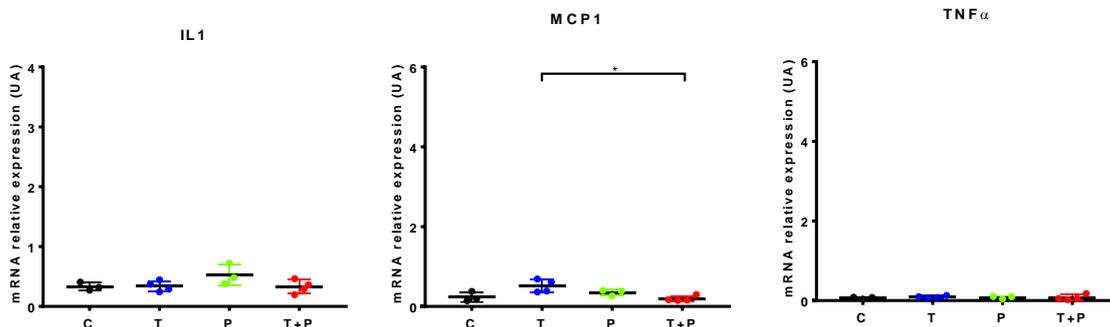


Figure 31 : RNA expression of inflammatory cytokines in the proximal colon as measured by RT-qPCR at T03. The four groups are Control (C), Tumor (T), Pemetrexed (P), and Tumor + Pemetrexed (T + P). Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test, corrected with a Dunn's test. *, $p < 0.05$.

Results:

At T03, the expression of five cytokines was measured to compare the gut inflammatory status at 24h and one week after pemetrexed treatment. In opposition to what was observed at T02, the expression of IL-6 and IL-10 was not detectable. Figure 31 represents the profile of the 3 cytokines that were detectable at T03 by using the same scale than at T02. Globally, we have observed that cytokines expression decreased considerably as compared to T02 for the 3 cytokines, and it was close to zero. A significant increase of MCP1 mRNA expression in T group was still observed

as compared to T+P, but taking into consideration the very low difference observed between the T group and controls, this difference although statistically significant did not seem to have pathophysiological relevance.

Discussion:

The early inflammation observed at T02 has almost completely disappeared after one week of pemetrexed treatment. Indeed, the expression of two cytokines, IL-6 and IL-10 was undetectable and the expression of IL-1, TNF α and MCP1 was close to baseline.

II. Article N°2 : “Pemetrexed Impact on the Gut Microbiota of Patient-Derived Tumor Xenografts”

Les modèles murins PDX sont de puissants outils en cancérologie car ils portent les caractéristiques clés des tumeurs primaires humaines. Pour établir ce modèle, la tumeur primaire du patient est implantée, soit en sous-cutané soit en orthotopique (dans l'organe d'origine de la tumeur), dans des souris immuno-déprimées. Les PDX ont pour avantage de maintenir fidèlement les caractéristiques histologiques et génétiques de la tumeur, ou encore l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. C'est ce qui fait de lui un modèle idéal pour les recherches de nouveaux traitements anti-cancéreux et pour identifier des facteurs prédictifs de réponses positives aux traitements. Ainsi, à ce jour, les PDX sont considérés comme les modèles les plus pertinents et les plus prédictifs de la réponse aux traitements anti-cancéreux.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a encore utilisé les modèles PDX pour étudier à la fois l'effet d'une chimiothérapie et son impact sur le microbiote intestinal. A partir de ce constat et de notre précédente étude, nous nous sommes demandés si les résultats observés étaient reproductibles sur d'autres PDX de même sous-type tumoral, ou si l'impact du pemetrexed était modèle dépendant.

Dans cette étude exploratoire, nous avons sélectionné 4 différents modèles PDX d'adénocarcinome de poumon, dont le modèle LUN-NIC-0014 déjà analysé précédemment. Ces modèles sont issus des modèles générés et étudiés par le consortium IMODI. Basé sur les mêmes temps de collecte, avant traitement, 24h et 1 semaine après traitement, nous avons analysé l'impact du pemetrexed sur la composition du microbiote, et sur le poids et le volume tumoral des souris.

Les résultats sont présentés dans ce deuxième article, actuellement en cours de préparation et fera l'objet d'une future « short communication ».

Pemetrexed Impact on the Gut Microbiota of Patient-Derived Tumor Xenografts

C. PENSEC¹, A. GROH², L. CALVET³, S. LEUILLET¹, D. GUENOT², T. CARTON¹, H.M. BLOTTIERE^{4,5}, F. LE VACON¹

¹ Biofortis Mérieux NutriSciences, Saint-Herblain, France,

² Université de Strasbourg (Unistra), EA 3430 U1123, Progression tumorale et microenvironnement, Approches translationnelles et Epidémiologie, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 67200 Strasbourg, France.

³ Sanofi, Gentilly, France

⁴ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France.

⁵ MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France.

Abstract

Background: Patient-derived tumor xenograft (PDX) models are powerful research platforms because these models retain key characteristics of patients' tumors. However, to the best of our knowledge no one used these models to study gut microbiota modulation after a chemotherapy treatment. Our aims was to study the impact of pemetrexed, a classical chemotherapy used in lung cancer, on the gut microbiota and to observe the repeatability between several PDX models.

Methods: After the establishment of four PDX models with four different human primary lung tumors, mice were treated with pemetrexed for two weeks. Fecal sample were analyzed by 16S rRNA metabarcoding before and after treatment.

Results: Pemetrexed induced a similar response in all four PDX models with an increase of the relative abundance of *Enterobacteriaceae*, associated with weight loss. The efficacy of the chemotherapy on the tumors appeared to be correlated with the importance of gut microbiota dysbiosis and weight loss.

Conclusion: This work confirmed our first observations and the impact of pemetrexed on gut microbiota seems to be conserved in several different PDX models of lung cancer.

Article

Introduction

Cancer is a global public health problem in the world. In Europe, estimation recognized 3.91 million of new cases and 1.93 million deaths from cancer in 2018 (Ferlay et al., 2018).

Thanks to recent advances in high-throughput sequencing, the discovery of new genetic mutations and anomalies allowed to increase our comprehension about molecular profile of the tumors (Yao et al., 2014). This discovery has induced a better classification of tumors taking into account their histology and genetic mutations. This new classification has allowed to go towards personalized medicine. In this concept, the most significant improvement was the development of targeted therapies. This treatment approach, based on the mutation profile of the tumor, allows to target a specific genomic alteration, called predictive biomarker. For example, in lung cancer, gefitinib or erlatinib target the EGFR mutation; or crizotinib targets the ALK rearrangement (Alamgeer et al., 2013).

However, despite predictive biomarkers for targeted therapies, the heterogeneity and genomic instability of tumors results in a clinical success rate lower than 15% (Cho, 2016). Actually, the drug response cannot be fully anticipated because the human cancer is complex and the cancer phenotype depends mainly on the tumor microenvironment, cancer-associated signaling pathways and all cancer cell types and oncogenes.

To remedy this situation, the scientific community needs to access to preclinical models of cancer mimicking as close as possible the primary human tumor. Based on the transfer of primary tumors directly from patient into immunodeficient mice, Patient-Derived Tumor Xenograft Models (PDX) are a powerful tool widely used in cancer research to study tumor biology and evaluate anticancer drugs response. Currently, the PDX model represents the most predictive preclinical model for drug investigation and side effect evaluation. Indeed, xenograft helps maintaining many of the key characteristics of patients' tumor including histology, genomic profiles, tumor heterogeneity and drug responsiveness (Cho, 2016; Gao et al., 2015).

In order to go further in the use of PDX models, we have studied the impact of a chemotherapy treatment on the gut microbiota composition of PDX of lung cancer. We

decided to study it because it remains the gold standard for advanced cancer and unfortunately they induce several side effect for patients. Pemetrexed (ALIMTA, Eli Lilly and Company), the chemotherapy studied, is an agent used in non-small cell lung cancer treatment. This drug is an antifolate which inhibits several enzymes involved in the folate pathway, such as the thymidylate synthase (Molina and Adjei, 2003). Among the side effects of chemotherapeutic drugs, adverse effects on microbiota were previously reported by several teams (Montassier et al., 2015; Tsilimigras et al., 2017). The gut microbiota is involved in numerous physiological functions such as natural defensive barrier, immunological and metabolic functions (Garrett, 2015; Jandhyala, 2015). Disruption of a “healthy” microbiota i.e. dysbiosis can be involved in large arrays of human diseases, including cancer. The link between gut microbiota and cancer is established and yet complex (Gagnière et al., 2016; Garrett, 2015). Dysbiosis can increase host susceptibility to carcinogenic pathogens and expose the host to cancer risks (Tsilimigras et al., 2017).

The objective of this work was to study the impact of pemetrexed on the microbiota composition in several PDX models of lung cancer and explore if the drug response will be similar and repeatable following PDX models.

Methods

Mouse Experiments

Mice were obtained from Charles River (L'Arbresles, France) and maintained in Specific Pathogen Free (SPF) conditions according to the FELASA guidelines (Guillen, 2012). Animal housing and experimental procedures were conducted according to the French and European Regulations and the NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocol was approved by the Oncodesign animal care and use ethical committee (Oncomet) which is certified by the French authorities.

The four tumors samples were obtained from a xenograft tumor bank previously established (Ilie et al., 2015), and were named LUN-NIC-0014 (acinar adenocarcinoma; grade II; pas de mutation), LUN-NIC-0032 (papillar adenocarcinoma; grade I; mutation KRAS G12C et PIK3CA E726K), LUN-NIC-0058 (papillar adenocarcinoma; grade II, mutation KRAS G12V) and LUN-NIC-0084 (acinar adenocarcinoma; grade II; mutation not available).

Briefly, after anesthetized mice were shaved, a small 3- to 4-mm incision was made through the skin over right flank. The tumor piece was placed subcutaneously as deep as possible. Once tumor reached approximately 100-200 mm³, it was harvested and retransplanted in 7 mice for expansion in serial generations, which were used for *in vivo* drug response studies. When the tumor volume reached 150 to 250 mm³, mice were randomized into two groups: “Control” (C), and “Tumor + Pemetrexed” (P+T) groups. Mice treated with pemetrexed (Alimta, Lilly) received two cycles of once-daily intraperitoneal injection (75 mg/kg in NaCl 0.9%) for 5 consecutive days, 2 weeks in a row (Figure 1). All mice were weighed twice a week and the tumor volume measured with calipers. Tumor volumes and body weights were normalized with their value at the beginning of treatment (D23).

Fecal sample collection

Feces were collected for each mouse at different time points: prior to treatment (T01), 24h (T02), and one week (T03) after the end of the 2 pemetrexed cycles. These samples were stored at -80°C until microbiota composition analysis.

16S rRNA gene sequencing

DNA from PDX mice stool samples were extracted with Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kits (Promega). DNA extraction was performed from 100 mg of a fecal sample. Double-stranded DNA concentration was measured by fluorimetry using Qubit® 2.0 Fluorometer and Qubit® dsDNA broad range assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). DNA samples were stored at -20°C until metagenomic analysis. The V3-V4 hypervariable regions of 16S rRNA gene were amplified from microbiota genomic DNA using universal primers: 341F and 735R. PCR was performed by using 5ng/μL of sample, 0.2μM of primers, 1X of KAPA HiFi HotStart Ready Mix per sample for 25μL volume. PCR cycling was performed with an initial denaturation at 95°C for 5min, following by 25 cycles at denaturing at 98°C for 30s, hybridization at 55°C for 30s and allongement at 72°C for 30s, and final extension of 72°C for 5min. The amplicons were purified using AMPure XP beads (Agencort) according to the manufacturer's instructions, and visualized by Bioanalyzer on DNA chip Diversilab (Agilent technologies, Santa Clara, California, US). After DNA quantification, a library was generated using Nextera XT Index kit (Illumina, San Diego, California, US), and each library was purified with magnetic beads. Then, all libraries

quantified and normalized at 4nM, were pooled and denatured. The amplicons were sequenced using the Illumina MiSeq platform using 2 x 250 paired-end Miseq kit V2 (Illumina, San Diego, California, USA)

Sequence Analyses and Taxa Identification

The generated sequences from fecal samples were analyzed using an in-house bioinformatic pipeline adapted from mothur software (Schloss et al., 2009). Briefly, sequences were trimmed and aligned to the V3-V4 region of the 16S gene of the Greengenes database formatted by mothur (gg_13_5_99 release). Chimera sequences were removed using the UCHIME algorithm. Reads were classified using a naive Bayesian classifier against Silva Release 123 formatted for mothur with a bootstrap cutoff of 70%. Sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTUs) using furthest neighbour clustering at a similarity threshold of 97%. For each sample, OTU-based microbial diversity was estimated by calculating the Shannon and rarefied Chao (to 12650 reads) indices with the R package phyloseq (R version 3.4.3) (R Core Team, 2015)).

Statistical Analysis

The relative abundance of each taxon at the Phylum, Family and Genus levels, was studied using the analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements. The two-way ANOVA considered the group, the time, and their interaction. For the body weight and the tumor volume, the p-values were adjusted by the Tukey's method for pairwise comparisons between groups at each time. For the analysis of the relative abundances of taxa, only taxa present in average in all samples at a threshold $\geq 0.05\%$ or present in at least 10% of samples at a threshold $\geq 0.05\%$ were analyzed (statistically compared). A Benjamini Hochberg procedure was applied to control the False Discovery Rate (FDR) due to multiple hypothesis tests. The procedure was applied at each taxonomic classification level for the main effects of the model (multiple hypothesis tests on all taxa), and at each taxon level for the between-group comparisons (pairwise comparisons between groups at each time) and within-group comparisons (pairwise comparisons between times for each group). Results were presented as means \pm standard errors of the mean (SEM). A p value < 0.05 was considered as statistically significant. Inferential statistics were performed using the SAS[®] software version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) or GraphPad Prism 7

(GraphPad Software, San Diego, CA). Graphical representations of microbiota data were generated using R software version 3.3.2 or GraphPad Prism 7.

Results

Pemetrexed induced dysbiosis following treatment

To study gut microbiota following pemetrexed treatment, stools were sampled and analyzed at 4 different time points after grafting: before treatment (T01), at the end of treatment (T02), one-week post-treatment (T03) and at the end of experiment when mice were sacrificed (T04). This pilot study has been performed on four adenocarcinoma lung PDX models: LUN-NIC-0014 (acinar adenocarcinoma), LUN-NIC-0032 (papillar adenocarcinoma), LUN-NIC-0058 (papillar adenocarcinoma) and, LUN-NIC-0084 (acinar adenocarcinoma). Gut microbiota composition was analyzed by 16S metagenomic sequencing (Fig. 1). Before treatment (T01), all mice were considered as a homogeneous population for the four PDX, because the microbiota composition was similar (Fig1). No significant difference was observed at phylum and family levels between groups. Seven phyla were identified: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Deferribacteres, Proteobacteria, Tenericutes and Saccharibacteria (Fig. 1). Similarly, at the family level at T01, the relative abundance of each taxon was similar with no significant differences between the four lung PDX models.

As control group received no treatment, the gut microbiota composition could be studied during the tumor growth at T02, T03 and T04 (Fig 1a). No major difference was observed in gut microbiota during the tumor growth. The relative abundance of each taxon seemed similar to T01 at phylum and family taxonomic levels, indicating that the tumor growth by itself had no significant impact on gut microbiota composition.

Microbiota composition in mice treated with pemetrexed is presented in Fig. 1b. The four lung PDX models featured very similar dysbiosis following treatment. As described in our previous paper, a significant increase of *Enterobacteriaceae* family (Proteobacteria phylum) was observed in the four PDX models after pemetrexed treatment at T02 ($17\% \pm 2.4$) and T03 ($4.3\% \pm 2.3$) as compared to T01 ($0.02\% \pm 2.4$). However, the increase of this family was different according to models in terms of amplitude and period. Models LUN-NIC-0014 and LUN-NIC-0058 had a higher increase at T02 of the relative abundance of *Enterobacteriaceae* than LUN-NIC-0032

and LUN-NIC-0084. The dysbiosis was longer for models LUN-NIC-0014 and LUN-NIC-0032 because the increase of *Enterobacteriaceae* was still present at T03. The increase of *Enterobacteriaceae* was mainly due to the increase of the genus *Escherichia/Shigella*. Moreover, an increase in the relative abundance of *Bacteroidaceae* was observed at T03 following pemetrexed treatment ($29.7\% \pm 3.3$) compared to $8.5\% \pm 3.3$ for T01 ($p < 0.0001$) and $14.6\% \pm 3.3$ for T02 ($p < 0.01$). On the contrary, a significant decrease of *Bacteroidales* S24-7 group was observed at T03 compared to T01 ($17.6\% \pm 4.2$ at T03 compared to $33.01\% \pm 4.2$ at T01; $p < 0.5$) but compared to control group the relative abundance was significantly different at T02 ($32.6\% \pm 4.2$ for control compared to $19.4\% \pm 4.2$ for pemetrexed; $p < 0.5$) and T03 ($37.5\% \pm 4.2$ for control compared to $17.6\% \pm 4.2$ for pemetrexed; $p < 0.01$). At the end of the experiment (T04), the relative abundances of these three families were similar to baseline and to control group.

Body weight and tumor volume following pemetrexed treatment

In parallel, body weight and tumor volume were measured during and after the pemetrexed treatment (Fig. 2).

Results of LUN-NIC0014 and LUN-NIC-0058 seemed similar. After the first pemetrexed cycle, mice of these two PDX models significantly lost weight and during the two days interval between the two treatment cycles, mice regained or stabilized their weight. After the second treatment, mice did not lose weight anymore. For control mice of LUN-NIC-0014, body weight was constant during the experiment. However, control mice from LUN-NIC-0058 regularly lost weight all along the experiment. Concerning their tumor volume, for these two models, the tumor volume increased constantly during experiment in both control and treated groups indicating a poor efficacy of pemetrexed treatment.

The LUN-NIC-0084 had a different profile because mice lost less weight than for the two precedent models during pemetrexed treatment. Interestingly, pemetrexed had a significant efficacy on tumor volume, indeed the tumors almost disappeared.

The fourth model LUN-NIC-0032 had another profile. Mice lost weight significantly after the two pemetrexed treatment cycle while mice without treatment did not lose weight. Interestingly, the tumor was completely abolished after chemotherapy treatment whereas the tumor volume of mice without treatment increased gradually.

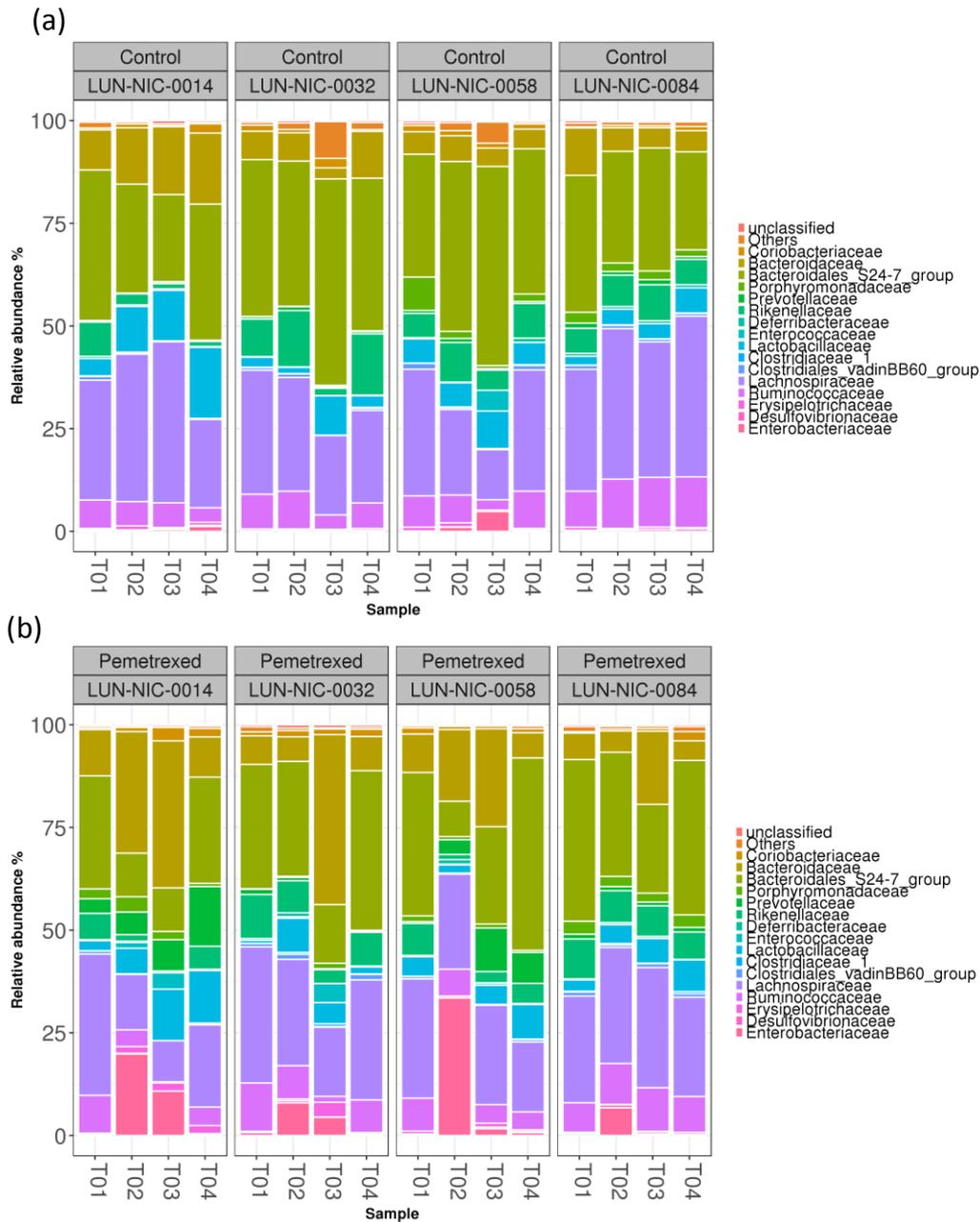


Figure 1: Bacterial taxonomical composition (relative abundance) at the family (a, b) levels of 4 adenocarcinoma lung PDX models LUN-NIC-0014, LUN-NIC-0032, LUN-NIC-0058 and LUN-NIC-0084, without treatment (a) or treated with pemetrexed (b; 75mg/kg, QD5x2, IP in NaCl 0.9%). Analyses were performed at baseline (T01), at the end of treatment (T02), one week post-treatment (T03) and when mice were sacrificed (T04). Families present at a threshold $\geq 0.5\%$ in all samples, or present in at least 10% of samples at a threshold $\geq 0.5\%$ are represented. In other cases, families are grouped and labeled "other" in the boxplots.

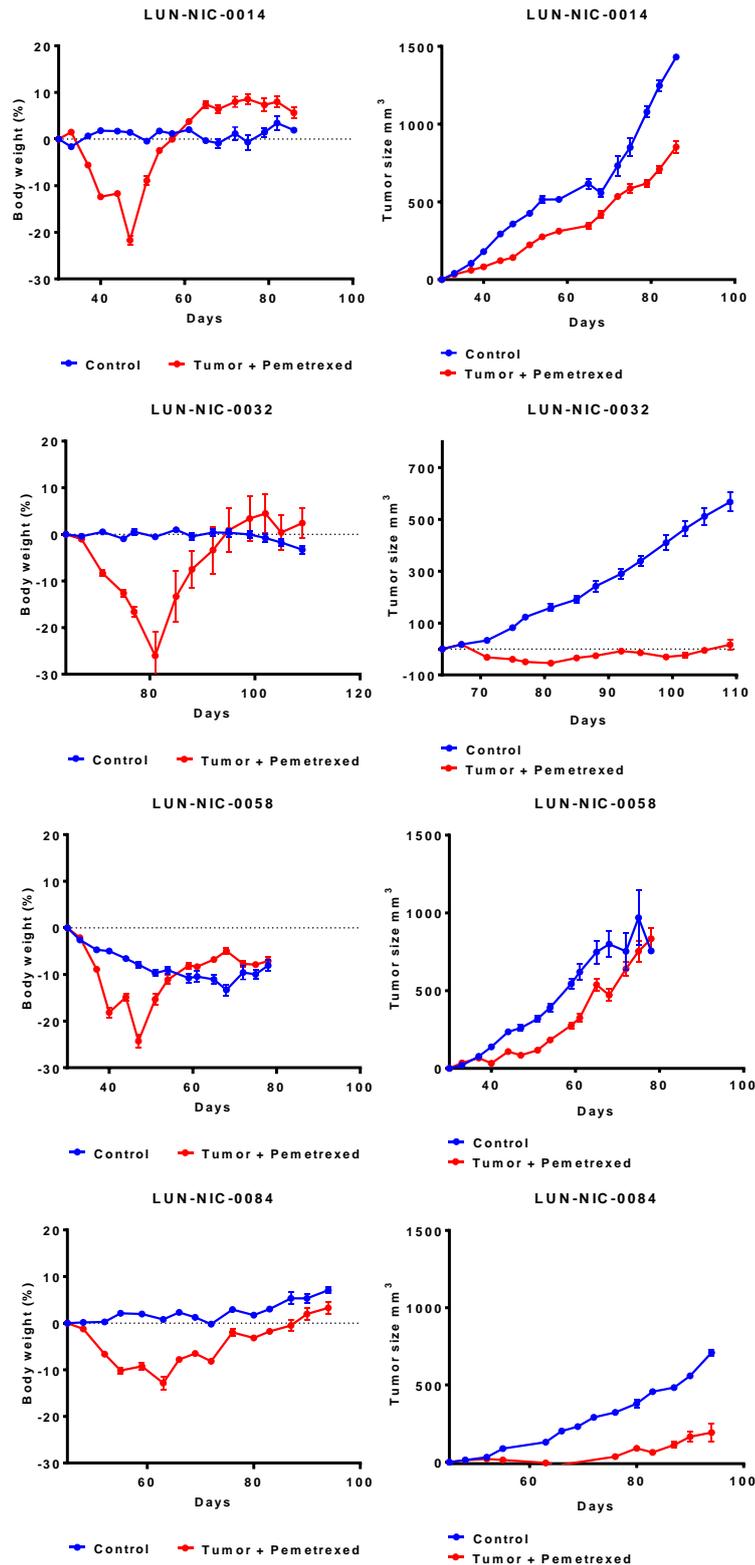


Figure 2: (a) Impact of pemetrexed on mice body weight (b) and tumour volume of 4 adenocarcinoma lung PDX models LUN-NIC-0014, LUN-NIC-0032, LUN-NIC-0058 and LUN-NIC-0084, without treatment (blue line) or treated with pemetrexed (red line; 75mg/kg, QD5x2, IP in NaCl 0.9%). Data were analyzed with the Kruskal-Wallis test corrected with Dunn's test. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

Discussion

In this study, four PDX models established from 4 different adenocarcinoma of lung cancer were used to study the impact of pemetrexed treatment on the mouse gut microbiota. The objective was to confirm that the results observed in our previous paper were repeatable in PDX models.

The most striking observation was the significant and reproducible increase of the relative abundance of the *Enterobacteriaceae* family (phylum Proteobacteria) after pemetrexed treatment. Interestingly, this significant increase was observed in all four PDX models at T02, but the importance and the duration depended on the models. The model LUN-NIC-0014 presented a moderate increase of *Enterobacteriaceae* but one week after the end of treatment, the dysbiosis was still present. The models LUN-NIC-0058 showed the largest increase 24h after treatment, but one week after microbiota composition returned to baseline. For models LUN-NIC-0032 and LUN-NIC-0084, the increased of *Enterobacteriaceae* was the least important.

Concomitantly, the body weight and tumor volume were measured to evaluate the toxicity and efficacy of pemetrexed. All models lost weight but the importance was different depending on the model. Interestingly, it seems that weight loss was correlated to the efficacy of pemetrexed but also to the dysbiosis. The more mice lost weight, the less pemetrexed was efficient and the more the dysbiosis was important, and inversely. As an example, LUN-NIC-0014 and LUN-NIC-0058 models had important weight loss during pemetrexed treatment and pemetrexed was not very efficient since tumor growth was almost similar to control mice, and these observations were associated with an important increase of *Enterobacteriaceae*. On the contrary, LUN-NIC-0084 model presented a less important weight loss, pemetrexed showed important efficacy, tumors almost disappeared in those mice, and the dysbiosis was the lowest.

Thus, in our study, we observed a significant increase of *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria* phyla) in PDX-bearing mice treated with pemetrexed, but not in control mice. In the context of mouse immunodeficiency status, several publications established a relation between the immune system deficiency, the onset and progression of colonic inflammation, and the increased level of *Proteobacteria* (Carvalho et al., 2012; Shin et al., 2015). This microbiota disturbance has already been described in human and mice, in association with metabolic disorders, obesity,

inflammatory bowel disease, diabetes, and cancer (Mukhopadhyaya et al., 2012; Shin et al., 2015). The transposition from mice to human microbiota should be considered with caution because only 15% of bacterial genera are found both in mice and human microbiota. However, *Proteobacteria* is a minor phylum in both healthy mice and healthy human microbiota, so the transposition may be possible.

In our previous results on PDX models of adenocarcinoma of lung cancer, we have observed a significant increase of the relative abundance of *Enterobacteriaceae* after pemetrexed treatment associated to a significant alteration of the epithelial barrier integrity, and an early inflammation. To our knowledge, it is the first time that PDX models was used to study the gut microbiota composition. So it was important to confirm our observations on the effect of pemetrexed on microbiota composition on various PDX models of adenocarcinoma of lung cancer. In the present work, we have observed that pemetrexed induced similar alterations on gut microbiota composition in all four PDX models than our previous publication. A significant increase of *Enterobacteriaceae* was observed after treatment in each model. We already know that PDX model represents the most predictive preclinical model for drug investigation, and through this article we have shown that the microbiota exploration could be possible.

Discussion

Perspectives

Conclusion

Conclusion et perspectives du projet de thèse

Au cours de ce projet de thèse, nous avons étudié l'impact du pemetrexed sur le microbiote intestinal, et sur l'intégrité, l'inflammation et la perméabilité de la barrière épithéliale de l'intestin, dans des modèles PDX de cancer du poumon. Le pemetrexed est un antifolate multicibles inhibant plusieurs enzymes impliquées dans la voie des folates (Molina, 2008). Cet agent chimiothérapeutique est principalement utilisé pour traiter les adénocarcinomes pulmonaires avancés. Du fait de son activité à large spectre, il entraîne de nombreux effets secondaires comme des neutropénies, des mucites ou des diarrhées de grade 3 ou 4 (Niyikiza et al., 2002). Bien qu'impactant fortement l'intestin des patients, à notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise pour investiguer son impact sur le microbiote intestinal afin de mieux comprendre les effets indésirables.

Ce travail de thèse fait donc l'objet de deux publications et de résultats complémentaires présentés dans ce manuscrit.

Le premier article aborde l'objectif principal de cette thèse à savoir, l'étude de l'impact du pemetrexed sur le microbiote. Dans ce travail, nous avons montré que 24h après le traitement chimiothérapeutique, la composition du microbiote était altérée. Cette perturbation du microbiote se traduisait principalement par une forte augmentation des *Enterobacteriaceae* et *Enterococcaceae* et une diminution des *Ruminococcaceae* chez les souris ayant la tumeur et soumises au traitement pemetrexed. De plus, ce traitement entraînait une perte de poids importante traduisant une toxicité du traitement. Pour aller plus loin dans cette étude, nous avons étudié l'état de la barrière intestinale après traitement du pemetrexed. Dans cette approche exploratoire, nous avons vu que le pemetrexed et la tumeur entraînaient une altération significative de l'intégrité de la barrière épithéliale associée à une inflammation précoce et une potentielle perméabilité.

Face aux effets du pemetrexed, nous pouvons émettre deux hypothèses pouvant expliquer nos résultats, (i) soit le pemetrexed entraîne une dysbiose qui impacte la barrière épithéliale en altérant la couche de mucus, (ii) soit le pemetrexed agit directement sur la barrière épithéliale entraînant une altération de la structure cellulaire, puis de la couche de mucus, ce qui favorise la perturbation du microbiote.

Pour investiguer sur ces deux hypothèses et valider l'une d'entre elles, les futures études sont les suivantes :

(i) Concernant la première hypothèse, nous pourrions étudier dans des fermenteurs l'impact du pemetrexed sur le microbiote intestinal pour s'affranchir de l'hôte. Par exemple, le TIM (TNO Gastro-Intestinal (GI) Model) serait un bon modèle pour cette étude car ce système recrée les conditions GI *in vitro* avec une maîtrise de l'ensemble des paramètres (temps de transit, pH, métabolites, quantité d'eau, ...). De plus ce système a déjà été utilisé pour l'étude de molécules pharmacologiques (Minekus, 2015). Cependant, le pemetrexed étant injecté en intrapéritonéal, il serait important de préalablement se documenter et investiguer pour savoir à quelle quantité et à quelle concentration le microbiote peut être exposé.

(ii) Concernant la deuxième hypothèse, il serait intéressant de réaliser une étude plus approfondie de l'intégrité de la barrière épithéliale et du statut inflammatoire, avec un nombre d'animaux plus important. De plus, ce travail pourrait être complété par une étude du temps de transit et de la perméabilité intestinale à plusieurs temps. Par la suite, il serait intéressant de récupérer la tumeur afin d'explorer les marqueurs tumoraux.

Il faut également noter que nous sommes dans un contexte de souris SCID, donc ayant un système immunitaire très déficient. Afin de mieux comprendre le lien existant entre la barrière mucosale et le microbiote, il serait intéressant de tester l'impact du pemetrexed sur des souris non-immuno-déprimées. Si la deuxième hypothèse était vérifiée, nous aurions une dysbiose plus importante liée au maintien de l'inflammation par le système immunitaire.

Dans le deuxième article, nous avons voulu savoir si les résultats observés sur le microbiote dans le premier article étaient similaires pour d'autres modèles PDX de même sous-type tumoral, ou si l'impact du pemetrexed était modèle dépendant. Nous avons pu voir que les 4 modèles PDX d'adénocarcinome de poumon présentaient tous une augmentation des *Enterobacteriaceae* après traitement. De façon intéressante, cette augmentation varie en fonction des modèles. Ainsi, dans deux modèles PDX, une forte augmentation des *Enterobacteriaceae* était observée, associée à une importante perte de poids et une efficacité anti-tumorale faible. *A contrario*, un autre modèle montrait une augmentation des *Enterobacteriaceae* et une perte de poids, toutes deux modérées mais présentait une efficacité tumorale importante. A travers

cette deuxième étude, nous avons pu montrer que le pemetrexed altérerait la composition du microbiote des quatre modèles PDX d'adénocarcinome de poumon de façon similaire. Ainsi, les PDX pourraient être de bons modèles d'études pour investiguer l'impact des traitements anti-cancéreux sur le microbiote. Cependant, des études complémentaires seraient à réaliser avec d'autres agents chimiothérapeutiques et des modèles PDX portant d'autres types de cancers.

A travers ces deux articles, le résultat le plus caractéristique et le plus significatif sur le microbiote intestinal était l'augmentation de la famille des *Enterobacteriaceae* (du Phylum des Proteobacteria). Cette famille est composée de bactéries à Gram-négatifs comprenant à la fois des micro-organismes commensaux et pathogènes. Dans beaucoup d'articles, cette famille est considérée comme un marqueur d'inflammation intestinale ou de dysbiose. En effet, l'augmentation des *Enterobacteriaceae* a beaucoup été décrite dans les cas de maladies associées à des troubles métaboliques comme le diabète de type 2 ou l'obésité (Shin et al., 2015), ainsi que dans les cas d'inflammation intestinale et de colites. Par exemple, les souris TLR5^{-/-} développant des colites spontanées ont une désorganisation de la couche de mucus et une augmentation des Proteobacteria (Carvalho et al., 2012). De la même manière, les souris déficientes en IL-10, une cytokine immunorégulatrice, développent des mucites spontanées et présentent une augmentation des Proteobacteria et des *Enterobacteriaceae* (Maharshak et al., 2013). Ainsi, il semble qu'une dérégulation ou une déficience de la réponse immunitaire puissent induire une augmentation des *Enterobacteriaceae*. Des observations similaires ont été faites en clinique. Des patients ayant une maladie inflammatoire de l'intestin (recto-colite hémorragique ou maladie de Crohn) (Shin et al., 2015), présentaient généralement une perte de diversité bactérienne et une augmentation significative des *Enterobacteriaceae*.

Dans le domaine de la cancérologie, plusieurs études, cliniques et précliniques, investiguant les effets des traitements chimiothérapeutiques sur le microbiote, ont montré que les traitements chimiothérapeutiques pouvaient moduler le microbiote et induire une augmentation des Proteobacteria ou des *Enterobacteriaceae*. L'augmentation de cette famille bactérienne a été observée chez des patients ayant un lymphome non-hodgkinien et recevant une quadri-chimiothérapie myéloablative pour préparer une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Montassier et al., 2015). En préclinique, il a été montré que le 5-FU, l'oxaliplatine et l'irinotecan

induisaient une toxicité intestinale associée à une augmentation de la perméabilité et de l'abondance relative des *Enterobacteriaceae* (Forsgård et al., 2016; Lin et al., 2012). Dans l'étude de Österlund *et al.*, une corrélation entre la perméabilité intestinale et l'augmentation des Proteobacteria suite à un traitement à l'Irinotecan a été décrite (Forsgård et al., 2017). Les auteurs discutent également du lien possible entre l'augmentation des Proteobacteria et l'inflammation. La réponse inflammatoire serait activée soit par la production de LPS par ces bactéries, soit par l'action des chimiothérapies directement sur la barrière épithéliale. En revanche, il est étonnant de remarquer que certaines chimiothérapies, comme la cyclophosphamide, n'entraînent pas d'augmentation des *Enterobacteriaceae* alors qu'elles impactent l'intégrité de la barrière épithéliale (Viaud et al., 2013).

Modèle animaux pour l'étude du microbiote

La compréhension des fonctions du microbiote et de son implication dans des pathologies humaines en est encore à ses débuts. Les progrès technologiques, en particulier en matière de séquençage, ont fortement contribué à accroître nos connaissances, et les modèles animaux ont aussi permis de nombreuses découvertes notamment fonctionnelles.

De manière générale, le modèle murin est depuis longtemps, le modèle de référence en recherche grâce à ses nombreux avantages, comme la similarité génétique, anatomique et physiologique avec l'homme, la reproduction rapide, le cycle de vie court et le faible coût, ou encore nos connaissances en génétique qui permettent de nombreuses modifications au niveau génomique (Knock in, Knock out, mutagenèse). Mais est-il un bon modèle pour l'étude du microbiote ? L'utilisation du modèle murin dans la recherche du microbiote est grandissante. Ce modèle permet d'étudier le rôle et les fonctions du microbiote et son implication dans les pathologies. Ainsi, de nombreuses corrélations entre le microbiote et les pathologies ont pu être faites. Par exemple, nous savons qu'une altération de la composition du microbiote peut être impliquée dans des maladies associées à des perturbations métaboliques (obésité, diabète de type II, ...), des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), des maladies auto-immunes ou encore des allergies (Nguyen et al., 2015). Dans la recherche du microbiote, voici les trois avantages les plus notables que présentent les souris :

Le premier avantage est la possibilité de manipuler génétiquement les souris, pour supprimer un gène (souris Knock out). Cette action permet ainsi d'explorer l'interaction hôte-microbiote et la causalité d'un gène fonctionnel sur le microbiote. Par exemple, les souris dépourvues du gène muc2 codant pour une mucine, composant structural de la couche de mucus, développent des colites spontanées et une importante inflammation du colon.

Le deuxième avantage, très intéressant, est la possibilité de moduler et de contrôler la composition du microbiote des souris. En effet, l'inoculation contrôlée d'une souche isolée ou d'un cocktail bactérien dans une souris axénique est relativement facile à réaliser afin d'investiguer le rôle ou l'impact d'une ou de plusieurs bactéries sur l'hôte. Une deuxième technique très récemment utilisée est la transplantation fécale, qui permet l'étude d'une composition fécale d'intérêt sur l'hôte. Dans ces modèles, il est possible de transplanter des microbiotes humains à des souris axéniques ou à des souris ayant subi un traitement antibiotique afin de réduire fortement le microbiote des souris de laboratoire.

Le troisième avantage qu'ont les souris pour l'étude du microbiote, est la possibilité de contrôler les conditions expérimentales : l'environnement de l'animalerie, l'alimentation, les traitements et tous autres facteurs pouvant moduler le microbiote. Grâce à tous ces avantages, des recherches fonctionnelles et mécanistiques sur l'interaction hôte-microbiote ont pu être menées et ont permis de montrer la contribution voire la causalité du microbiote dans des maladies associées à des altérations de la composition du microbiote (Nguyen et al., 2015).

De plus, il a été montré que le microbiote intestinal des souris est relativement proche de celui de l'homme. Au rang du phylum, la composition est relativement similaire car plus de 70% du microbiote est composé des 3 mêmes phyla majoritaires : Firmicutes, Bacteroidetes et Proteobacteria. Au niveau du genre la similarité est moindre, même si en comparant le « core » microbien de la souris à celui de l'homme, on retrouve 13 genres similaires. En revanche, seulement 4% des gènes microbiens de la souris sont partagés avec ceux du microbiome humain, bien que l'analyse fonctionnelle montre 95,2% de similarité (Xiao et al., 2015).

Ainsi, comme pour toute étude, il est important de connaître les limites de chaque modèle utilisé. Globalement, le modèle murin reste un très bon modèle pour l'étude du microbiote.

Modèle PDX : avantages et inconvénients

Dans notre projet, nous avons utilisé les modèles murins PDX. A notre connaissance, c'est la première fois que ce modèle est utilisé pour l'étude du microbiote. Les PDX sont des modèles précliniques très utilisés dans la recherche en cancérologie. Le modèle PDX, considéré comme un des meilleurs modèles prédictifs reproduisant le plus fidèlement la tumeur, est aujourd'hui beaucoup utilisé pour identifier et valider de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements anti-cancéreux (Cho, 2016). Pour établir un modèle PDX, la tumeur primaire du patient est implantée, soit en sous-cutané, soit en orthotopique (dans l'organe d'origine de la tumeur), dans des souris immuno-déprimées (Hidalgo et al., 2014; Jung et al., 2018). Comme la tumeur fraîche du patient est directement implantée dans la souris et qu'il n'y a pas d'étape *in vitro*, la tumeur garde les caractéristiques tumorales initiales (Cho, 2016). Les modèles PDX maintiennent ainsi de nombreuses caractéristiques de la tumeur du patient comme le type histologique, la signature génétique, l'hétérogénéité cellulaire et la réponse aux traitements anticancéreux (Cho, 2016; Gao et al., 2015). Lors de l'établissement des quatre PDX sélectionnés dans notre étude, une caractérisation exhaustive, par des approches d'histopathologies, d'immunohistologies et de séquençage, a été réalisée afin de s'assurer que le PDX conserve les caractéristiques de la tumeur primaire (Ilie et al., 2015). De ce fait, les modèles PDX sont de très bons modèles prédictifs pour l'étude d'agents anticancéreux et leurs mécanismes de résistance, et pour identifier et valider des cibles thérapeutiques.

Concernant les limites majeures de ce modèle, le taux de prise lors de l'établissement des modèles PDX varie considérablement en fonction du type tumoral, et même du sous-type tumoral. Par exemple, pour les CBNPC, la prise tumorale des adénocarcinome est de 13% alors que celle des carcinomes épidermoïdes est de 80% (Ilie et al., 2015). De plus l'agressivité de la tumeur d'origine va influencer le taux de prise. Ceci est d'autant plus vrai que le taux de prise tumoral « facile » est souvent corrélé à un mauvais pronostic. Il faut aussi souligner cependant que ces modèles sont inadaptés pour les approches d'immunothérapie, les souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) utilisées ayant un système immunitaire peu fonctionnel (Willyard, 2018).

Dans le contexte de médecine personnalisée, le concept « d'avatars » est né. Cette stratégie consiste à greffer la tumeur du patient sur des souris immunodéprimées pour créer un « PDX avatar », puis tester plusieurs traitements et identifier le traitement le plus efficace pour ce patient. Les patients ont ainsi leur modèle murin personnalisé, portant leur tumeur « active » et permettant d'orienter la stratégie thérapeutique (Malaney et al., 2014). L'inconvénient soulevé à cette pratique est le taux de la prise des greffes variable et faible, qui parfois permet d'obtenir le PDX après la prise de décision thérapeutique (Willyard, 2018).

Pour réaliser les PDX, plusieurs souches de souris immunodéficiences peuvent être utilisées. Les plus courantes sont les souris SCID qui ne possèdent pas de lymphocyte T et B mature, les souris Nude qui ne possèdent pas de lymphocyte T fonctionnel et les NSG (NOD SCID gamma) qui n'ont ni de lymphocyte T et B fonctionnel, ni de cellule NK (Hidalgo et al., 2014; Jung et al., 2018). L'immunodéficiences de ces souris va favoriser la prise tumorale. En revanche, comme indiqué ci-dessus, l'inconvénient majeur de ce modèle est que les études d'immunothérapies sont impossibles (Willyard, 2018). Dans le présent travail, cette déficiences du système immunitaire (puisque nous avons utilisé des souris SCID) a été un obstacle pour nous car, comme présenté dans l'article N°1 nous avons souhaité explorer la réponse inflammatoire du colon après traitement. Or, à notre connaissance, aucune étude récente n'a décrit le niveau basal de cytokines et chemokines des souris SCID, alors que c'est un modèle très utilisé aujourd'hui et pour lequel l'immunodéficiences n'est pas totale. Les seules études rapportant ces taux datent des années 90 (années d'expansion du modèle) et portent principalement sur l'étude de l'inflammation chez des souris SCID avec un système immunitaire partiellement reconstitué par un transfert de lymphocyte T (Picarella et al., 1997; Powrie et al., 1993, 1994). Pour pallier à ce problème, nous avons envisagé une étude parallèle afin de connaître le niveau basal de certaines cytokines et chemokines du modèle souris SCID. Le but de cette étude aurait été de comparer ces paramètres chez des souris SCID et des souris normales (C57Bl/6) soumises à un agent pro-inflammatoire (un traitement DSS) *versus*, une condition contrôle sans traitement. Il était prévu d'étudier, avant et après inflammation, plusieurs marqueurs d'inflammations sur des échantillons de sang et de tissus, et de compléter par une analyse du microbiote intestinal et d'histologie de l'appareil digestif. Malheureusement cette étude n'a pas pu être réalisée dans le cadre de cette thèse.

Cette expérimentation nous aurait permis de relativiser la réponse de la muqueuse intestinale observée sous pemetrexed.

Pour pallier à ce problème d'absence de système immunitaire et pour rendre possible l'utilisation des PDX en immunothérapie, les chercheurs créent aujourd'hui des PDX humanisés, possédant à la fois la tumeur et les cellules immunitaires du patient. Le principe consiste à prélever des cellules hématopoïétiques des patients, de les injecter à la souris pour créer des souris humanisées puis de greffer la tumeur de ce même patient (Hidalgo et al., 2014; Malaney et al., 2014). Pour aller encore plus loin dans l'humanisation des modèles PDX et pour qu'ils soient plus adaptés à l'étude du microbiote, on pourrait envisager d'humaniser la souris à la fois avec le système immunitaire, la tumeur, et le microbiote d'un même patient. Bien entendu, cette triple humanisation n'a jamais été réalisée à ce jour.

Etude clinique

Dans le projet IMODI, en parallèle de l'établissement des modèles PDX, une étude clinique est menée afin d'étudier le microbiote des patients, avant, pendant et après la chimiothérapie. Quatre cancers sont étudiés : le cancer du sein, de l'ovaire, du foie et de la prostate. Au début de ma thèse, j'avais entrepris d'étudier la composition du microbiote des femmes atteintes d'un cancer du sein. Le premier objectif était de caractériser la population incluse dans l'étude IMODI avant traitement, en me basant sur les critères cliniques principaux comme l'âge, l'Indice de Masse Corporelle, le statut hormonal (pré ou post ménopause), l'origine ethnique et le grade histopronostique (dit Scarff-Bloom et Richardson, SBR). Le premier objectif de cette étude était de savoir si notre population de femmes recrutées dans IMODI était bien représentative de la population générale de femmes atteintes d'un cancer du sein en France. Puis, le second objectif était d'analyser le microbiote de ces femmes atteintes d'un cancer du sein et de réaliser une analyse multi-variable afin de corrélérer les données cliniques au microbiote avant traitement. Cette étude allait permettre de diviser notre population en sous-groupes, en fonctions des critères cliniques, afin de voir si le microbiote avait une signature particulière. Au cours de ma thèse, j'ai été confrontée à de multiples problèmes comme l'absence de donnée clinique renseignée dans les dossiers des patients, qui m'ont contrainte à écarter ce projet de ma thèse.

En revanche, cette étude suit son cours et fera l'objet d'un futur article auquel je serai associée.

Concernant le cancer du poumon, malheureusement, l'étude clinique n'a pas été réalisée dans IMODI, mais il serait intéressant de mener un tel projet. L'étude clinique pourrait permettre, à la fois, de confirmer nos observations sur PDX et de les corrélérer avec les effets cliniques indésirables déjà décrits. De plus, en étudiant la composition du microbiote avant et après traitement chez les patients, des profils répondeurs/non-répondeurs ou des profils ne développant pas de dysbiose pourront être recherchés comme décrit dans les travaux de l'équipe de Zitvogel *et al.*, sur des patients atteints d'un CBNPC, d'un cancer rénal ou urothélial, traités par immunothérapie PD-1/PD-L1 (Routy et al., 2018).

Conclusion générale

Pour conclure sur ce travail de thèse, nous avons montré que le traitement au pemetrexed entraînait des modifications significatives de la composition du microbiote intestinal avec principalement une augmentation des *Enterobacteriaceae*. Cette perturbation est associée à une altération de l'intégrité et de la perméabilité de la barrière épithéliale couplée à une inflammation intestinale précoce. De ce fait, pour confirmer et compléter ces résultats exploratoires, mes perspectives à court terme seraient de déterminer le niveau basal de certaines cytokines et chemokines chez les souris SCID, afin de mieux comprendre la pertinence de nos observations dans le contexte de souris immuno-déprimées. Puis, il serait intéressant de reproduire notre étude sur les PDX (article N°1) avec un nombre de souris plus important et/ou avec des PDX humanisés afin d'explorer plus en détail la réponse immunitaire et la relation microbiote-tumeur. Enfin, une étude clinique observationnelle pour étudier le microbiote de patients atteints d'un cancer du poumon et traités au pemetrexed serait intéressante à effectuer afin de conforter nos résultats précliniques. Cette étude permettrait de définir des profils microbiens « bénéfiques » pour les patients pour lesquels le traitement chimiothérapeutique est efficace et n'induit pas de symptômes GI, et *a contrario*, déterminer les profils microbiens « à risques » pour les patients développant systématiquement des effets secondaires GI. Ainsi, dans une démarche de médecine personnalisée, l'analyse de la composition du microbiote de chaque

patient serait à effectuer afin de déterminer s'ils ont un profil de microbiote « bénéfique » ou « à risque » et ce profil servirait d'outil pronostique et/ou théranostique.

Perspectives à long terme

L'ensemble de ces démarches a pour but d'augmenter nos connaissances sur la relation et les interactions entre le microbiote, la tumeur et le traitement chimiothérapeutique. Ces recherches permettront de déterminer les profils microbiens « bénéfiques » et nécessaires pour des résultats thérapeutiques positifs. A terme la composition du microbiote pourrait être utilisée comme biomarqueur. En effet, *in fine*, ces recherches permettront d'utiliser le microbiote comme outil de pronostique et comme un paramètre à prendre en compte lors de la décision thérapeutique.

Au sujet des solutions thérapeutiques envisageables dans le futur, trois stratégies thérapeutiques me semblent pertinentes :

Une stratégie **avant** le traitement consisterait à étudier la composition du microbiote en amont du traitement chimiothérapeutique dans un cadre de prévention thérapeutique. Le but de cette démarche est de déterminer si le profil microbien est favorable ou non à la chimiothérapie, puis de potentiellement intervenir afin de le préparer à subir le traitement et générer un microbiote robuste.

Une stratégie **pendant** le traitement consisterait à suivre la composition du microbiote tout au long du traitement chimiothérapeutique afin de maintenir un « bon » microbiote et prévenir les toxicités GI en évitant la prolifération de bactéries néfastes.

Pour ces 2 stratégies, plusieurs solutions sont aujourd'hui envisageables pour modifier la composition du microbiote. La première possibilité consisterait à apporter les bactéries bénéfiques pour l'efficacité et la diminution des effets secondaires du traitement anti-cancéreux à l'aide de probiotiques voire probiotiques de 2ème génération (appelés également Live Biotherapeutic Products - LBP), contenant une ou plusieurs espèces bactériennes. La deuxième possibilité serait de favoriser la prolifération et le fonctionnement d'espèces bactériennes bénéfiques par l'administration de prébiotiques ou par un régime alimentaire spécifique. Puis, l'antibiothérapie ou la phagothérapie auraient pour but de réduire des bactéries

potentiellement pathogènes ou considérées comme mauvais pronostic pour l'efficacité du traitement ou associées au développement d'effets indésirables GI.

Une stratégie **après** le traitement permettrait de rétablir le microbiote par transplantation fécale (FMT). A ce jour, cette méthode est utilisée en aval du traitement chimiothérapeutique pour remplacer les microbiotes intestinaux très altérés par le traitement anti-tumoral. Dans le futur, il pourrait être envisageable de réaliser des FMT, avant les traitements chimiothérapeutiques, en prévention pour rétablir les profils microbiens de mauvais pronostic, et implanter un microbiote dont le profil est connu pour être « bénéfique ».

Pour conclure, le microbiote représente un important indicateur pour évaluer la toxicité et/ou l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques. De ce fait, il sera important de le prendre en compte lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques et lors de la prise en charge des patients atteints d'un cancer.

*« Prendre soin de son microbiote
peut contribuer au soin par son microbiote »*

Valorisation des travaux de recherche

I. Publication

Impact of pemetrexed chemotherapy on gut microbiota and intestinal inflammation of Patient-Lung-Derived Tumor Xenograft (PDX) Mouse Models, *Scientific Reports*, Nature group, *Soumis*.

Cindy Pensec, Florence Gillaizeau, Dominique Guenot, Anne Bessard, Thomas Carton, Sébastien Leuillet, Mario Campone, Michel Neunlist, Hervé M. Blottière and Françoise Le Vacon.

II. Présentation des travaux

1. Communications orales

Juin 2016 : Cancéropole Grand Ouest aux Sables d'Olonnes

- Cindy PENSEC, Alessandra DE MARTINO, IMODI Consortium, Sophie LE FRESNE, Audrey GROH, Yao AMOUZOU, Sébastien LEUILLET, Dominique GUENOT, Mario CAMPONE, Thomas CARTON, Françoise LE VACON (2016). **Effets de traitements chimiothérapeutiques sur le microbiote intestinal de modèles murins PDX**. Journée du Cancéropole Grand Ouest (Sables d'Olonne)

Octobre 2016 : AFSTAL à Nantes

- Cindy Pensec, Thomas Carton, Sébastien Leuillet, Alessandra De Martino, IMODI Consortium, Françoise Le Vacon. **Biofortis Mérieux NutriSciences : plateforme d'analyse du microbiote**. AFSTAL (Nantes)

Octobre 2016: 4th Sino-French School of Oncology of Wuhan (Chine)

- Cindy PENSEC, Alessandra DE MARTINO, IMODI Consortium, Sophie LE FRESNE, Audrey GROH, Yao AMOUZOU, Sébastien LEUILLET, Dominique GUENOT, Mario CAMPONE, Thomas CARTON, Françoise LE VACON (2016). **Chemotherapy Impact on the Gut Microbiome of Patient-Derived Tumor Xenograft Models**. 2016 Sino-Frensh School of Oncology (Wuhan).

Mai 2016, 2017 et 2018 : PhD day de Mérieux

- 2 présentations en 180s
- 1 présentation de 15 min

Décembre 2016 et 2017 : Journée IMODI

- Microbiote, un nouvel organe ; résultats et perspectives
- PDX et Microbiote – Cibles et traitement du futur ?

2. Poster

Février 2016 : OncoWeek à Toulouse

- Cindy PENSEC, Alessandra DE MARTINO, IMODI Consortium, Sophie LE FRESNE, Audrey GROH, Yao AMOUZOU, Sébastien LEUILLET, Mario CAMPONE, Thomas CARTON, Françoise LE VACON (2016). **Pharmacological Testing of Chemotherapy in PDX Models: Impact on Gut Microbiota.** Onco week (Toulouse)

Décembre 2016 : Journée de l'école doctorale à Nantes

- Cindy PENSEC, Alessandra DE MARTINO, IMODI Consortium, Sophie LE FRESNE, Audrey GROH, Yao AMOUZOU, Sébastien LEUILLET, Dominique GUENOT, Mario CAMPONE, Thomas CARTON, Françoise LE VACON (2016). **CLINICAL METAGENOMICS FOR EVALUATION OF CHEMOTHERAPY IMPACT ON GUT MICROBIOTA** (Nantes).

Juin 2018 : IHMC à Killarney (Irlande) et Cancéropole Grand ouest à Vannes

- C. PENSEC, T. CARTON, S. LEUILLET, D. GUENOT, IMODI Consortium, M. CAMPONE, H. BLOTTIERE, F. LE VACON (2018). **Effects of pemetrexed chemotherapy on gut microbiota and digestive inflammation of Patient-Derived Tumor Xenograft Models.** IHMC (Killarney, Irlande).

3. Prix

- Microbiome Hero Award dans le cadre du congrès IHMS et de la Journée Internationale du Microbiote

III. Communications autres

- Juillet 2016 : Article dans la newsletter N°1 d'IMODI <http://www.imodi-cancer.org/fr/newsletter-imodi-1-july-2016/est>
- Article de vulgarisation scientifique « Microbiote et Cancer » dans le cadre d'une formation à la vulgarisation scientifique
- « Projet Curieux » est un projet de vulgarisation scientifique dans le cadre de la Nuit Blanche des Chercheurs de Nantes
- Flyer destiné aux patients recrutés dans IMODI. Le but de ce flyer est de présenter aux patients, le rôle du microbiote, et l'intérêt de l'étudier afin de les sensibiliser à l'étude IMODI.
- Article dans la Newsletter N° 5 de Biofortis

Références

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine* 6, 237ra65.
- Abrahamsson, T.R., Jakobsson, H.E., Andersson, A.F., Björkstén, B., Engstrand, L., and Jenmalm, M.C. (2012). Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 434–440, 440.e1-2.
- Adjei, A.A. (2004). Pharmacology and Mechanism of Action of Pemetrexed. *Clinical Lung Cancer* 5, S51–S55.
- Agüera-González, S., Burton, O.T., Vázquez-Chávez, E., Cucho, C., Herit, F., Bouchet, J., Lasserre, R., Río-Iñiguez, I. del, Bartolo, V.D., and Alcover, A. (2017). Adenomatous Polyposis Coli Defines Treg Differentiation and Anti-inflammatory Function through Microtubule-Mediated NFAT Localization. *Cell Reports* 21, 181–194.
- Alamgeer, M., Ganju, V., and Watkins, D.N. (2013). Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 13, 394–401.
- Alexander, J.L., Wilson, I.D., Teare, J., Marchesi, J.R., Nicholson, J.K., and Kinross, J.M. (2017). Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14, 356–365.
- Amdekar, S., Roy, P., Singh, V., Kumar, A., Singh, R., and Sharma, P. (2012). Anti-Inflammatory Activity of Lactobacillus on Carrageenan-Induced Paw Edema in Male Wistar Rats.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L.T., Amenyogbe, N., Brown, E.M., and Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* 5.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.
- Becker, S., Oelschlaeger, T.A., Wullaert, A., Vlantis, K., Pasparakis, M., Wehkamp, J., Stange, E.F., and Gersemann, M. (2013). Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 8, e55620.
- Bedarf, J.R., Hildebrand, F., Coelho, L.P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., Bork, P., and Wüllner, U. (2017). Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Med* 9, 39.
- Belkaid, Y., and Naik, S. (2013). Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nat. Immunol.* 14, 646–653.
- Berer, K., Gerdes, L.A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., Liu, C., Klotz, L., Stauffer, U., Baranzini, S.E., et al. (2017). Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 10719.

- Bernalier-Donadille, A. (2010). [Fermentative metabolism by the human gut microbiota]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *34 Suppl 1*, S16-22.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., and Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* *86*, 13–15.
- Bingula, R., Filaire, M., Radosevic-Robin, N., Bey, M., Berthon, J.-Y., Bernalier-Donadille, A., Vasson, M.-P., and Filaire, E. (2017). Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *Journal of Oncology* *2017*, 1–15.
- Blottière, H.M., and Doré, J. (2016). [Impact of newly developed metagenomic tools on our knowledge of the gut microbiota and its role in human health: diagnostic and therapeutic issues]. *Med Sci (Paris)* *32*, 944–951.
- Blottière, H.M., Buecher, B., Galmiche, J.-P., and Cherbut, C. (2003). Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* *62*, 101–106.
- Bråten, L.S., Sødving, M., Paulsen, J.E., Snipen, L.G., and Rudi, K. (2017). Cecal microbiota association with tumor load in a colorectal cancer mouse model. *Microbial Ecology in Health and Disease* *28*, 1352433.
- Breban, M., Tap, J., Leboime, A., Said-Nahal, R., Langella, P., Chiocchia, G., Furet, J.-P., and Sokol, H. (2017). Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1614–1622.
- Budden, K.F., Gellatly, S.L., Wood, D.L.A., Cooper, M.A., Morrison, M., Hugenholtz, P., and Hansbro, P.M. (2017). Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nature Reviews Microbiology* *15*, 55–63.
- Burdett, S., Pignon, J.P., Tierney, J., Tribodet, H., Stewart, L., Le Pechoux, C., Aupérin, A., Le Chevalier, T., Stephens, R.J., Arriagada, R., et al. (2015). Adjuvant chemotherapy for resected early-stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* CD011430.
- Carvalho, F.A., Koren, O., Goodrich, J.K., Johansson, M.E.V., Nalbantoglu, I., Aitken, J.D., Su, Y., Chassaing, B., Walters, W.A., González, A., et al. (2012). Transient Inability to Manage Proteobacteria Promotes Chronic Gut Inflammation in TLR5-Deficient Mice. *Cell Host & Microbe* *12*, 139–152.
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U.P., Paghera, B., Muscio, C., et al. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging* *49*, 60–68.
- Cekanaviciute, E., Yoo, B.B., Runia, T.F., Debelius, J.W., Singh, S., Nelson, C.A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y.K., Hauser, S.L., et al. (2017). Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 10713–10718.

Chan, B.A., and Hughes, B.G.M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational Lung Cancer Research* 4, 19.

Chen, Y.E., Fischbach, M.A., and Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota-host interactions. *Nature* 553, 427–436.

Cho (2016). An Integrative Approach to Precision Cancer Medicine Using Patient-Derived Xenografts. *Molecules and Cells* 39, 77–86.

Cho, I., and Blaser, M.J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 13, 260–270.

Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M.B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178–184.

Costea, P.I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M.J., Bushman, F.D., de Vos, W.M., Ehrlich, S.D., Fraser, C.M., Hattori, M., et al. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology* 3, 8–16.

Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., Duong, C.P.M., Flament, C., Lepage, P., Roberti, M.P., et al. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity* 45, 931–943.

D'Argenio, V., Casaburi, G., Precone, V., Pagliuca, C., Colicchio, R., Sarnataro, D., Discepolo, V., Kim, S.M., Russo, I., Del Vecchio Blanco, G., et al. (2016). Metagenomics Reveals Dysbiosis and a Potentially Pathogenic *N. flavescens* Strain in Duodenum of Adult Celiac Patients. *Am J Gastroenterol* 111, 879–890.

De Angelis, M., Francavilla, R., Piccolo, M., De Giacomo, A., and Gobbetti, M. (2015). Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* 6, 207–213.

Dejea, C.M., Wick, E.C., Hechenbleikner, E.M., White, J.R., Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., Peterson, S.N., Snesrud, E.C., Borisy, G.G., Lazarev, M., et al. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 18321–18326.

Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., Shields, C.E.D., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., et al. (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 359, 592–597.

Desmoulin, S.K., Hou, Z., Gangjee, A., and Matherly, L.H. (2012). The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biology & Therapy* 13, 1355–1373.

Dickson, R.P., Martinez, F.J., and Huffnagle, G.B. (2014a). The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 384, 691–702.

Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., and Huffnagle, G.B. (2014b). Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med* 2, 238–246.

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11971–11975.

Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 14, 20–32.

Dubin, K., Callahan, M.K., Ren, B., Khanin, R., Viale, A., Ling, L., No, D., Gobourne, A., Littmann, E., Huttenhower, C., et al. (2016). Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nature Communications* 7, 10391.

Duncan, H., and Edberg, S. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. - PubMed - NCBI.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.

Eloe-Fadrosh, E.A., and Rasko, D.A. (2013). The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* 64, 145–163.

Ericsson, A.C., Gagliardi, J., Bouhan, D., Spollen, W.G., Givan, S.A., and Franklin, C.L. (2018). The influence of caging, bedding, and diet on the composition of the microbiota in different regions of the mouse gut. *Scientific Reports* 8, 4065.

Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A.L., Clemente, J.C., Knight, R., Heath, A.C., Leibel, R.L., et al. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 341, 1237439.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., and Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*.

Fernández, M.F., Reina-Pérez, I., Astorga, J.M., Rodríguez-Carrillo, A., Plaza-Díaz, J., and Fontana, L. (2018). Breast Cancer and Its Relationship with the Microbiota. *Int J Environ Res Public Health* 15.

Finegold, S.M., Dowd, S.E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K.E., Wolcott, R.D., Youn, E., Summanen, P.H., Granpeesheh, D., Dixon, D., et al. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16, 444–453.

Forsgård, R.A., Korpela, R., Holma, R., Lindén, J., Frias, R., Spillmann, T., and Österlund, P. (2016). Intestinal permeability to iohexol as an in vivo marker of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in Sprague–Dawley rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 78, 863–874.

Forsgård, R.A., Marrachelli, V.G., Korpela, K., Frias, R., Collado, M.C., Korpela, R., Monleon, D., Spillmann, T., and Österlund, P. (2017). Chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity is associated with changes in serum and urine metabolome and fecal microbiota in male Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *80*, 317–332.

Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Pedersen, H.K., et al. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* *528*, 262–266.

Fraher, M.H., O'Toole, P.W., and Quigley, E.M.M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *9*, 312–322.

Gagnière, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.-A., Pezet, D., and Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* *22*, 501–518.

Gao, H., Korn, J.M., Ferretti, S., Monahan, J.E., Wang, Y., Singh, M., Zhang, C., Schnell, C., Yang, G., Zhang, Y., et al. (2015). High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nature Medicine* *21*, 1318–1325.

Garrett, W.S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science* *348*, 80–86.

Gasperino, J. (2011). Gender is a risk factor for lung cancer. *Medical Hypotheses* *76*, 328–331.

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L.A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S.J., Yassour, M., et al. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* *15*, 382–392.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T.F., Al Lami, F.H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C., Alsharif, U., Alvis-Guzman, N., Amini, E., et al. (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.*

Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W.E.E., Nicholson, A.G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., et al. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* *11*, 39–51.

Grice, E.A., and Segre, J.A. (2012). The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *13*, 151–170.

Gui, Q.-F., Lu, H.-F., Zhang, C.-X., Xu, Z.-R., and Yang, Y.-H. (2015). Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model. *Genetics and Molecular Research* *14*, 5642–5651.

Guillen, J. (2012). FELASA Guidelines and Recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 51, 311–321.

Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., and Brummer, R.-J. (2007). Review article: the role of butyrate on colonic function: REVIEW: ROLE OF BUTYRATE ON COLONIC FUNCTION. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27, 104–119.

Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A.V., Budinská, E., Byrne, A.T., Caldas, C., Clarke, R.B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G.M., et al. (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 4, 998–1013.

Hoffman, P.C., Mauer, A.M., and Vokes, E.E. (2000). Lung cancer. *Lancet* 355, 479–485.

Hoffmann, T.W., Pham, H.-P., Bridonneau, C., Aubry, C., Lamas, B., Martin-Gallausiaux, C., Moroldo, M., Rainteau, D., Lapaque, N., Six, A., et al. (2016). Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *ISME J* 10, 460–477.

Hooper, L.V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268–1273.

Hugenholtz, F., and de Vos, W.M. (2018). Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci* 75, 149–160.

Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C.A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R.A., Molina, D.A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., et al. (2013). Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *Science* 342, 967–970.

Ilie, M., Nunes, M., Blot, L., Hofman, V., Long-Mira, E., Butori, C., Selva, E., Merino-Trigo, A., Vénissac, N., Mouroux, J., et al. (2015). Setting up a wide panel of patient-derived tumor xenografts of non-small cell lung cancer by improving the preanalytical steps. *Cancer Medicine* 4, 201–211.

INCa (2017). Les Cancers en France en 2016, l'essentiel des faits en chiffres.

Jakobsson, H.E., Rodríguez-Piñero, A.M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G.C., and Johansson, M.E. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* 16, 164–177.

Jandhyala, S.M. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* 21, 8787.

Johansson, M.E.V. (2014). Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2124–2131.

Johnson, C.H., Dejea, C.M., Edler, D., Hoang, L.T., Santidrian, A.F., Felding, B.H., Cho, K., Wick, E.C., Hechenbleikner, E.M., Uritboonthai, W., et al. (2015). Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab* 21, 891–897.

Jung, J., Seol, H.S., and Chang, S. (2018). The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat* 50, 1–10.

Kameyama, K., and Itoh, K. (2014). Intestinal Colonization by a Lachnospiraceae Bacterium Contributes to the Development of Diabetes in Obese Mice. *Microbes Environ* 29, 427–430.

Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., and Doi, K. (1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp. Anim.* 45, 155–160.

Karlsson, F.H., Fåk, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., Petranovic, D., Bäckhed, F., and Nielsen, J. (2012). Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 3, 1245.

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B.C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L.-I., McDonald, D., et al. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology* 1.

Kostic, A.D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Hämäläinen, A.-M., Peet, A., Tillmann, V., Pöhö, P., Mattila, I., et al. (2015). The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17, 260–273.

Kovatcheva-Datchary, P., Tremaroli, V., and Bäckhed, F. (2013). The Gut Microbiota. In *The Prokaryotes: Human Microbiology*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 3–24.

Lakritz, J.R., Poutahidis, T., Mirabal, S., Varian, B.J., Levkovich, T., Ibrahim, Y.M., Ward, J.M., Teng, E.C., Fisher, B., Parry, N., et al. (2015). Gut bacteria require neutrophils to promote mammary tumorigenesis. *Oncotarget* 6, 9387–9396.

Lang-Lazdunski, L. (2013). Surgery for nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Review* 22, 382–404.

Lantz, P.M., Mendez, D., and Philbert, M.A. (2013). Radon, Smoking, and Lung Cancer: The Need to Refocus Radon Control Policy. *Am J Public Health* 103, 443–447.

Lauder, A.P., Roche, A.M., Sherrill-Mix, S., Bailey, A., Laughlin, A.L., Bittinger, K., Leite, R., Elovitz, M.A., Parry, S., and Bushman, F.D. (2016). Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome* 4, 29.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.

- Lehouritis, P., Cummins, J., Stanton, M., Murphy, C.T., McCarthy, F.O., Reid, G., Urbaniak, C., Byrne, W.L., and Tangney, M. (2015). Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Sci Rep* 5, 14554.
- Lepage, P., Häsler, R., Spehlmann, M.E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S., Kupcinskas, L., Doré, J., Raedler, A., et al. (2011). Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 141, 227–236.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Li, J., Zhao, F., Wang, Y., Chen, J., Tao, J., Tian, G., Wu, S., Liu, W., Cui, Q., Geng, B., et al. (2017a). Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome* 5, 14.
- Li, S., Wang, Z., Yang, Y., Yang, S., Yao, C., Liu, K., Cui, S., Zou, Q., Sun, H., and Guo, G. (2017b). Lachnospiraceae shift in the microbial community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress. *AMB Express* 7.
- Lin, X.B., Dieleman, L.A., Ketabi, A., Bibova, I., Sawyer, M.B., Xue, H., Field, C.J., Baracos, V.E., and Gänzle, M.G. (2012). Irinotecan (CPT-11) Chemotherapy Alters Intestinal Microbiota in Tumour Bearing Rats. *PLOS ONE* 7, e39764.
- Locher, C., Debieuvre, D., Coëtmeur, D., Goupil, F., Molinier, O., Collon, T., Dayen, C., Le Treut, J., Asselain, B., Martin, F., et al. (2013). Major changes in lung cancer over the last ten years in France: The KBP-CPHG studies. *Lung Cancer* 81, 32–38.
- Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 155–173.
- Luo, S.Y., and Lam, D.C. (2013). Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Transl Respir Med* 1, 6.
- Mafra, D., Barros, A.F., and Fouque, D. (2013). Dietary protein metabolism by gut microbiota and its consequences for chronic kidney disease patients. *Future Microbiol* 8, 1317–1323.
- Maharshak, N., Packey, C.D., Ellermann, M., Manick, S., Siddle, J.P., Huh, E.Y., Plevy, S., Sartor, R.B., and Carroll, I.M. (2013). Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut Microbes* 4, 316–324.
- Malaney, P., Nicosia, S.V., and Davé, V. (2014). One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* 344, 1–12.
- Mao, Q., Jiang, F., Yin, R., Wang, J., Xia, W., Dong, G., Ma, W., Yang, Y., Xu, L., and Hu, J. (2018). Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Letters* 415, 40–48.
- Marteau, P., and Doré, J. (2017). *Le microbiote intestinal : Un organe à part entière* (John Libbey Eurotext).

Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., and de La Cochetiere, M.F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology* 21, 167–173.

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81.

Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM) | SpringerLink (Springer, Cham).

Minguet, J., Smith, K.H., and Bramlage, P. (2016). Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer—Recent advances and future perspectives: Targeted Therapies for Treatment of NSCLC. *International Journal of Cancer* 138, 2549–2561.

Molina, J.R. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin Proc.* 11.

Molina, J.R., and Adjei, A.A. (2003). The Role of Pemetrexed (Alimta®, LY231514) in Lung Cancer Therapy. *Clinical Lung Cancer* 5, 21–27.

Montassier, E., Gastinne, T., Vangay, P., Al-Ghalith, G.A., Varannes, S.B. des, Massart, S., Moreau, P., Potel, G., Cochetière, M.F.L., Batard, E., et al. (2015). Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 42, 515–528.

Moore, W.E., and Holdeman, L.V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961–979.

Moter, A., and Göbel, U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85–112.

Mukhopadhyay, I., Hansen, R., El-Omar, E.M., and Hold, G.L. (2012). IBD—what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9, 219–230.

Nardone, G., and Compare, D. (2015). The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol J* 3, 255–260.

Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., Wilson, R., and Rudi, K. (2014). Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 1155–1162.

Nguyen, T.L., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms* 8, 1–16.

Nistal, E., Fernández-Fernández, N., Vivas, S., and Olcoz, J.L. (2015). Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota. *Frontiers in Oncology* 5.

Niyikiza, C., Baker, S.D., Seitz, D.E., Walling, J.M., Nelson, K., Rusthoven, J.J., Stabler, S.P., Paoletti, P., Calvert, A.H., and Allen, R.H. (2002). Homocysteine and Methylmalonic Acid: Markers to Predict and Avoid Toxicity from Pemetrexed Therapy. *1*, 545–552.

North, C.M., and Christiani, D.C. (2013). Women and Lung Cancer: What is New? *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 25, 87–94.

NSCLC Meta-analysis Collaborative Group (2014). Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *The Lancet* 383, 1561–1571.

Olaussen, K.A., and Postel-Vinay, S. (2016). Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. *Annals of Oncology* 27, 2004–2016.

Pallis, A.G., and Syrigos, K.N. (2013). Lung cancer in never smokers: Disease characteristics and risk factors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 88, 494–503.

Panebianco, C., Adamberg, K., Jaagura, M., Copetti, M., Fontana, A., Adamberg, S., Kolk, K., Vilu, R., Andriulli, A., and Paziienza, V. (2018). Influence of gemcitabine chemotherapy on the microbiota of pancreatic cancer xenografted mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 81, 773–782.

Perez-Muñoz, M.E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A.E., and Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 5, 48.

Pevsner-Fischer, M., Tuganbaev, T., Meijer, M., Zhang, S.-H., Zeng, Z.-R., Chen, M.-H., and Elinav, E. (2016). Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers. *World J Clin Oncol* 7, 200–213.

Picarella, D., Hurlbut, P., Rottman, J., Shi, X., Butcher, E., and Ringler, D.J. (1997). Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *The Journal of Immunology* 158, 2099–2106.

Plummer, M., Franceschi, S., Vignat, J., Forman, D., and Martel, C. de (2015). Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *International Journal of Cancer* 136, 487–490.

Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health* 4, e609-616.

Polk, D.B., and Peek, R.M. (2010). *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 403–414.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddie, L.B., and Coffman, R.L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5, 1461–1471.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Barcomb Caddle, L., and Coffman, R.L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1, 553–562.

Qin, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. - PubMed - NCBI.

Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., et al. (2014). Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513, 59–64.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rajagopala, S.V., Vashee, S., Oldfield, L.M., Suzuki, Y., Venter, J.C., Telenti, A., and Nelson, K.E. (2017). The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prevention Research* 10, 226–234.

Rajendhran, J., and Gunasekaran, P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research* 166, 99–110.

Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S.K., McCulle, S.L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C.O., et al. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4680–4687.

Reddy, B.S., Narisawa, T., Wright, P., Vukusich, D., Weisburger, J.H., and Wynder, E.L. (1975). Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res.* 35, 287–290.

Rescigno, M. (2014). Intestinal microbiota and its effects on the immune system. *Cell Microbiol* 16, 1004–1013.

Ridge, C., McErlean, A., and Ginsberg, M. (2013). Epidemiology of Lung Cancer. *Seminars in Interventional Radiology* 30, 093–098.

Rigby, R.J., Carr, J., Orgel, K., King, S.L., Lund, P.K., and Dekaney, C.M. (2016). Intestinal bacteria are necessary for doxorubicin-induced intestinal damage but not for doxorubicin-induced apoptosis. *Gut Microbes* 7, 414–423.

Rigottier-Gois, L., Bourhis, A.-G., Gramet, G., Rochet, V., and Doré, J. (2003). Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 237–245.

Roberts, A.B., Wallace, B.D., Venkatesh, M.K., Mani, S., and Redinbo, M.R. (2013). Molecular Insights into Microbial β -Glucuronidase Inhibition to Abrogate CPT-11 Toxicity. *Molecular Pharmacology* 84, 208–217.

Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., et al. (2015). The composition of the gut

microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26050.

Rollins, K.D., and Lindley, C. (2005). Pemetrexed: A multitargeted antifolate. *Clinical Therapeutics* 27, 1343–1382.

Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359, 91–97.

Roy, S., and Trinchieri, G. (2017). Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 17, 271–285.

Rutkowski, M.R., Stephen, T.L., Svoronos, N., Allegrezza, M.J., Tesone, A.J., Perales-Puchalt, A., Brencicova, E., Escovar-Fadul, X., Nguyen, J.M., Cadungog, M.G., et al. (2015). Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell* 27, 27–40.

Samet, J.M., and Hornung, R.W. (1990). Review of radon and lung cancer risk. *Risk Anal.* 10, 65–75.

San-Juan-Vergara, H., Zurek, E., Ajami, N.J., Mogollon, C., Peña, M., Portnoy, I., Vélez, J.I., Cadena-Cruz, C., Diaz-Olmos, Y., Hurtado-Gómez, L., et al. (2018). A Lachnospiraceae-dominated bacterial signature in the fecal microbiota of HIV-infected individuals from Colombia, South America. *Scientific Reports* 8, 4479.

Saulnier, D.M., Riehle, K., Mistretta, T.-A., Diaz, M.-A., Mandal, D., Raza, S., Weidler, E.M., Qin, X., Coarfa, C., Milosavljevic, A., et al. (2011). GASTROINTESTINAL MICROBIOME SIGNATURES OF PEDIATRIC PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME. *Gastroenterology* 141, 1782–1791.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537–7541.

Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Sansonetti, P.J., and Cerf-Bensussan, N. (2017). Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. *Current Opinion in Microbiology* 35, 100–109.

Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., and Duncan, S.H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* 69, 52–60.

Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, e1002533.

Shapira, I., Sultan, K., Lee, A., and Taioli, E. (2013). Evolving Concepts: How Diet and the Intestinal Microbiome Act as Modulators of Breast Malignancy. *ISRN Oncology* 2013, 1–10.

- Shapiro, H., Thaiss, C.A., Levy, M., and Elinav, E. (2014). The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage. *Curr. Opin. Immunol.* *30*, 54–62.
- Shin, N.-R., Whon, T.W., and Bae, J.-W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology* *33*, 496–503.
- Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C., and Gorbach, S.L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *31*, 1231–1233.
- Sivan, A., Corrales, L., Hubert, N., Williams, J.B., Aquino-Michaels, K., Earley, Z.M., Benyamin, F.W., Lei, Y.M., Jabri, B., Alegre, M.-L., et al. (2015). Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* *350*, 1084–1089.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Nhieu, J.T.V., and Furet, J.P. (2011). Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLOS ONE* *6*, e16393.
- Sun, S., Schiller, J.H., and Gazdar, A.F. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 778–790.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D.L.E., Nalin, R., et al. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* *11*, 2574–2584.
- Taur, Y., Jenq, R.R., Perales, M.-A., Littmann, E.R., Morjaria, S., Ling, L., No, D., Gobourne, A., Viale, A., Dahi, P.B., et al. (2014). The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *124*, 1174–1182.
- Thomas, J.L., Guo, H., Carmella, S.G., Balbo, S., Han, S., Davis, A., Yoder, A., Murphy, S.E., An, L.C., Ahluwalia, J.S., et al. (2011). Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in children exposed to secondhand or thirdhand tobacco smoke in their homes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *20*, 1213–1221.
- Thompson, G.R., and Trexler, P.C. (1971). Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* *12*, 230–235.
- Thursby, E., and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* *474*, 1823–1836.
- Tilg, H., Adolph, T.E., Gerner, R.R., and Moschen, A.R. (2018). The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* *33*, 954–964.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R., and Dutilh, B.E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 575–582.

- Tomasini, P., Barlesi, F., Mascaux, C., and Greillier, L. (2016). Pemetrexed for advanced stage nonsquamous non-small cell lung cancer: latest evidence about its extended use and outcomes. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 8, 198–208.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Nicholson, A.G., Yatabe, Y., Austin, J.H.M., Beasley, M.B., Chirieac, L.R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D.B., et al. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology* 10, 1243–1260.
- Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166.
- Tsilimigras, M.C.B., Fodor, A., and Jobin, C. (2017). Carcinogenesis and therapeutics: the microbiota perspective. *Nature Microbiology* 2.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810.
- Vaziri, N.D., Wong, J., Pahl, M., Piceno, Y.M., Yuan, J., DeSantis, T.Z., Ni, Z., Nguyen, T.-H., and Andersen, G.L. (2013). Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int.* 83, 308–315.
- Vétizou, M., Pitt, J.M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350, 1079–1084.
- Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., et al. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342, 971–976.
- Wallace, B.D., Wang, H., Lane, K.T., Scott, J.E., Orans, J., Koo, J.S., Venkatesh, M., Jobin, C., Yeh, L.-A., Mani, S., et al. (2010). Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme. *Science* 330, 831–835.
- Wallace, B.D., Roberts, A.B., Pollet, R.M., Ingle, J.D., Biernat, K.A., Pellock, S.J., Venkatesh, M.K., Guthrie, L., O'Neal, S.K., Robinson, S.J., et al. (2015). Structure and Inhibition of Microbiome β -Glucuronidases Essential to the Alleviation of Cancer Drug Toxicity. *Chemistry & Biology* 22, 1238–1249.
- Walter, J., and Ley, R. (2011). The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annual Review of Microbiology* 65, 411–429.
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., and Li, L. (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 3, 71–82.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., and Losick, R. (2012). *Biologie moléculaire du gène* (Pearson Education France).

Wen, C., Zheng, Z., Shao, T., Liu, L., Xie, Z., Le Chatelier, E., He, Z., Zhong, W., Fan, Y., Zhang, L., et al. (2017). Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. *Genome Biol.* 18, 142.

Willyard, C. (2018). THE MICE THAT GROW HUMAN TUMOURS. *Springer Nature* 560, 156–157.

Wilson, P.M., Danenberg, P.V., Johnston, P.G., Lenz, H.-J., and Ladner, R.D. (2014). Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 11, 282–298.

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

Wong, S.H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., Xiao, X., Kwong, T.N.Y., Tsoi, H., Wu, W.K.K., et al. (2017). Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* 153, 1621-1633.e6.

Wroblewski, L.E., and Peek, R.M. (2013). *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 42, 285–298.

Xia, B., and Herbst, R.S. (2016). Immune checkpoint therapy for non-small-cell lung cancer: an update. *Immunotherapy* 8, 279–298.

Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S.B., Xia, Z., Qiu, X., Li, X., Long, H., Zhang, J., Zhang, D., et al. (2015). A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotech* 33, 1103–1108.

Xuan, C., Shamonki, J.M., Chung, A., Dinome, M.L., Chung, M., Sieling, P.A., and Lee, D.J. (2014). Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS ONE* 9, e83744.

Yang, P. (2011). Lung Cancer in Never Smokers. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32, 010–021.

Yao, J., Caballero, O.L., Yung, W.K.A., Weinstein, J.N., Riggins, G.J., Strausberg, R.L., and Zhao, Q. (2014). Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers. *Cancer Immunol Res* 2, 371–379.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., and Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12, 635.

Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y., and Schloss, P.D. (2013). The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio* 4, e00692-00613.

Zeller, G., Tap, J., Voigt, A.Y., Sunagawa, S., Kultima, J.R., Costea, P.I., Amiot, A., Böhm, J., Brunetti, F., Habermann, N., et al. (2014). Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol* 10.

Zhao, R., and Goldman, I.D. (2004). Enter Alimta®: A New Generation Antifolate. *The Oncologist* 9, 242–244.

Zheng, H., Chen, M., Li, Y., Wang, Y., Wei, L., Liao, Z., Wang, M., Ma, F., Liao, Q., and Xie, Z. (2017). Modulation of Gut Microbiome Composition and Function in Experimental Colitis Treated with Sulfasalazine. *Frontiers in Microbiology* 8.

Zheng, J., Gänzle, M.G., Lin, X.B., Ruan, L., and Sun, M. (2015). Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environ. Microbiol.* 17, 2133–2143.

Titre : Impact de la chimiothérapie sur le microbiote intestinal à travers l'exemple du pemetrexed sur les modèles murins PDX

Mots clés : Microbiote, Pemetrexed, PDX, Dysbiose, Chimiothérapie, Inflammation, Cancer du poumon

Résumé : Ces dernières années, d'importants progrès ont été réalisés au niveau des traitements contre le cancer. Cependant, la chimiothérapie reste le traitement de référence car la plupart des patients présentent un cancer avancé. Pour certains cancers, il a été démontré que le microbiote intestinal pouvait moduler l'efficacité et la toxicité de certaines chimiothérapies. Le pemetrexed, un agent chimiothérapeutique utilisé dans le cancer du poumon, peut induire des effets secondaires importants chez les patients. Cependant, son impact sur le microbiote reste inconnu. Le but de notre étude est d'évaluer l'impact du pemetrexed et de la tumeur sur la composition du microbiote dans des modèles PDX de cancer du poumon par métaséquençage ciblé 16S. Nous avons mis en évidence que le pemetrexed et la tumeur entraînaient d'importantes perturbations dans la composition du microbiote, traduites par une augmentation significative des *Enterobacteriaceae* et de 3 familles du phylum Firmicutes, et une diminution de *Ruminococcaceae*. De plus, une perturbation de l'intégrité de la barrière épithéliale associée à une inflammation précoce et une infiltration de leucocytes dans les muqueuses ont été observées. Par ailleurs, nous avons montré que l'effet du pemetrexed sur le microbiote était reproductible dans plusieurs modèles de PDX de poumon, et que la dysbiose était proportionnelle à l'efficacité de la chimiothérapie. Ce travail préliminaire nous permet de confirmer la relation entre microbiote et chimiothérapie. Il est essentiel d'accroître nos connaissances sur l'impact des chimiothérapies sur le microbiote afin de minimiser les effets secondaires, et d'améliorer l'efficacité des traitements.

Title: Chemotherapy impact on the gut microbiota through the example of pemetrexed on PDX mice models

Keywords: Microbiota, Pemetrexed, PDX model, Dysbiosis, Chemotherapy, Inflammation, Lung cancer

Abstract: In the field of lung cancer treatments, significant progresses have been realized during last decade, such as targeted therapies and immunotherapies. Nevertheless, chemotherapy remains the gold standard for advanced cancer. Pemetrexed, a chemotherapeutic agent used in NSCLC, can induce significant side effects on patients. However, the impact of pemetrexed on gut microbiota and gastrointestinal inflammation in PDX mice remains unknown, although the role of the microbiota in carcinogenesis and modulation of efficacy or toxicity of chemotherapy agents has been demonstrated. The aim of our study is to evaluate the impact of pemetrexed and tumor on gut microbiota composition by 16S rRNA metabarcoding in PDX models of lung cancer. Firstly, we have found that pemetrexed and tumor induced several modifications on microbiota composition, resulting in a significant increase of the relative abundance of *Enterobacteriaceae* and 3 families from the Firmicutes phylum, and a decrease of *Ruminococcaceae*. Secondly, a significant alteration of epithelial barrier integrity associated with early inflammation and infiltration of leukocytes into mucosal tissues was observed following treatment. Moreover, we have shown that pemetrexed effect on the microbiota was reproducible on several models of lung PDX models of lung carcinoma, and that dysbiosis was propositional to the effectiveness of chemotherapy. Although, this work is a preliminary approach, that confirms the relationship between microbiota and chemotherapy. It is essential to expand our knowledge about the chemotherapy impact on microbiota in order to minimize the side effects, avoid infection complications, and improve therapy efficiency.