

Université de Montréal

**Dynamique saisonnière du microbiome intestinal en réponse à
la diète traditionnelle inuite**

Par

Geneviève Dubois

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M. Sc.)
en sciences biologiques

Décembre, 2016

© Geneviève Dubois, 2016

RÉSUMÉ

Le microbiome intestinal humain est une importante communauté de microorganismes, spécifique aux individus et aux populations, dont la composition est influencée par de nombreux facteurs, tels que la génétique et les habitudes de vie de son hôte. La diète est cependant un élément majeur façonnant sa structure. Les influences de plusieurs diètes humaines sur le microbiome ont été largement investiguées. Toutefois, l'impact des variations saisonnières inhérentes à certaines diètes est peu connu. La diète traditionnelle inuite est un exemple de régime alimentaire riche en graisses et protéines animales qui varie temporellement en fonction de la disponibilité saisonnière des ressources. Afin d'étudier les dynamiques temporelles du microbiome intestinal inuit en réponse à la diète traditionnelle, des échantillons de papier hygiénique contenant des selles ont été récoltés auprès d'un groupe de volontaire Inuits du Nunavut (Canada) durant huit mois. Un groupe contrôle de Montréalais (Québec, Canada) de descendance européenne, consommant une diète typiquement occidentale, a également été sollicité. La diversité et la composition du microbiome ont été caractérisées par le séquençage de la région V4 de l'ARNr 16s. Les microbiomes obtenus par un échantillonnage de papier hygiénique et de selles ont été comparés. Ces deux méthodes offrent des représentations similaires mais non-identiques du microbiome intestinal. À partir du séquençage d'échantillons de papier hygiénique, nous avons trouvé que les variations inter-individuelles du microbiome sont plus importantes que les variations intra-individuelles au sein de Montréal et du Nunavut. Des différences significatives de la composition du microbiome s'expliqueraient par la consommation différentielle de certains groupes alimentaires. Bien qu'aucune différence saisonnière marquée n'ait été observée, en termes de composition, le microbiome fluctue davantage à travers le temps chez les individus inuits. Ces résultats suggèrent que le microbiome inuit pourrait être façonné par une diète plus variable. Ensemble, nos résultats suggèrent que la diète traditionnelle a encore un impact important sur la composition, la diversité et la stabilité de microbiome inuit, malgré les transitions alimentaires vécues au Nunavut.

Mots Clés: Microbiome intestinal, diète traditionnelle inuite, variation temporelle, diète occidentale, transition alimentaire, ARNr 16s

ABSTRACT

The human gut microbiome represents a diverse microbial community specific to individuals and populations, which is heavily influenced by factors such as genetics and lifestyle. Diet is a major force shaping the gut microbiome, and the effects of dietary choices on microbiome composition have been thoroughly investigated. It has been shown that a change in diet also changes the gut microbiome, but the effects of seasonal diets are poorly known. The traditional Inuit diet is primarily based on animal products, which vary seasonally based on prey availability. To investigate the dynamics of the Inuit diet over time, we collected gut microbiome samples from Inuit volunteers living in Resolute Bay (Nunavut, Canada), and compared them to samples collected from individuals of European descent living in Montréal (Québec, Canada) and consuming a typical Western diet. We sequenced the V4 region of the 16S rRNA gene to characterize the diversity and composition of the Inuit microbiome, and surveyed differences among samples collected with toilet paper or from stool. Our results show that these sampling methods provide similar, but non-identical portraits of the microbiome. Based on sequencing from toilet paper samples alone, we found that inter-individual variations of the microbiome community composition were greater than within-individual variations, both in Nunavut and Montreal, with significant differences in microbiome explained by dietary preferences. No defined seasonal shift of microbiome composition was detected in samples collected over time. However, within-individual microbial diversity fluctuated more with time in Nunavut than in Montreal. Together, these results underline that the traditional Inuit diet still has an important impact on the composition, diversity and stability of the Inuit gut microbiome, even if the traditional seasonality of the diet is less pronounced than expected, due to an increasingly westernized diet in Nunavut.

Key words: Gut microbiome, Inuit traditional diet, Temporal variation, Western diet, Dietary transition, 16S rRNA

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
REMERCIEMENTS.....	viii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Le microbiome intestinal : Une riche communauté microbienne.....	2
1.2. La méthodologie nécessaire à l'étude du microbiome intestinal.....	2
1.3. Le rôle du microbiome intestinal sur la santé humaine.....	3
1.4. Composition du microbiome intestinal : Influences et particularités.....	4
1.4.1. Le microbiome est façonné par une multitude d'influences.....	4
1.4.2. Variations temporelles du microbiome.....	5
1.4.3. Le microbiome est le reflet de la diète.....	7
1.5. Mise en contexte de l'étude.....	11
1.5.1. La diète traditionnelle inuite.....	11
1.5.2. Transition et insécurité alimentaires au Nunavut.....	11
1.5.3. Problématique.....	12
1.6. Objectifs et hypothèses du projet.....	13
CHAPITRE 2. The inuit gut microbiome is dynamic over time but lacks seasonality.....	14
2.1. Abstract.....	15
2.2. Introduction.....	16
2.3. Materials and methods.....	18
2.3.1. Participant recruitment and sample collection.....	18
2.3.2. DNA extraction, libraries preparation and sequencing.....	20
2.3.3. OTU picking.....	21
2.3.4. Statistical analysis.....	22

2.4. Results	24
2.4.1. Stool and toilet paper provide similar but non-identical pictures of the microbiome	24
2.4.2. Individuality, geography and gender shape microbiome composition	25
2.4.3. Diet contribution to microbiomes in Montreal and Resolute.....	25
2.4.4. Temporal variations of the Inuit microbiome	26
2.5. Discussion	27
2.5.1. Stool and toilet paper provide similar but non-identical pictures of the microbiome	27
2.5.2. Individuality, geography and gender shape microbiome composition	28
2.5.3. Diet contribution to microbiomes in Montreal and Resolute.....	29
2.5.4. Temporal variations of the Inuit microbiome	30
2.6. Conclusion	31
2.7. Author contributions.....	31
2.8. Acknowledgements	31
2.9. Tables and figures.....	32
2.10. Supplementary Tables and figures.....	36
2.11. Appendix	47
2.11.1. Appendix 1 – Dietary habits questionnaire	47
2.11.2. Appendix 2 – Primer sequences	51
2.11.3. Appendix 3 – Pooled food categories	52
CHAPITRE 3. CONCLUSION.....	53
3.1. Conclusion Générale.....	54
Références.....	57

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

JSD	Jenson-Shannon divergence
LDA	Linear discriminant analysis
LEfSe	Linear discriminant analysis effect size
OTU	Operational taxonomic unit
p	P -value (probability value)
PCoA	Principal coordinates analysis
PCR	Polymerase chain reaction
Permanova	Permutational multivariate analysis of variance
R^2	Coefficient of determination
RDA	redundancy analysis

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Paired toilet paper and stool samples from the same individual do not differ in microbial richness, but differ slightly in community composition.....	32
Figure 2. Microbiomes vary mainly by participant, and slightly by geography.....	33
Figure 3. Variation in diet explains differences in microbial community structure between Montreal and Nunavut.....	34
Figure 4. Greater temporal alpha diversity variation among individuals in Nunavut.....	35
Figure S1. Sampling locations in Nunavut and Montreal and examples of Inuit hunting practices.....	36
Figure S2. Comparison of alpha diversity estimates between paired stool and toilet paper samples.....	37
Figure S3. Comparison of beta diversity between paired stool and toilet paper samples.....	38
Figure S4. Unweighted UniFrac distance metric offers a more comparable portrait of microbiome beta diversity with toilet paper and stool.....	39
Figure S5. Similar levels of richness and diversity are observed in Nunavut and Montreal samples.....	40
Figure S6. Geography, participants and gender viewed with additional distance metrics.....	41
Figure S7. No clear temporal or seasonal clustering of samples in either Nunavut or Montreal.....	42
Figure S8. No significant difference in diversity between optimal and sub-optimally conserved samples.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Table S1. Differentially abundant taxa between stool and toilet paper samples.....44

Table S2. Differentially abundant taxa between genders.....45

Table S3. Differentially abundant taxa between Nunavut and Montreal samples.....46

Table A1. Primers names and DNA sequences used in the two-step PCR method for library preparation.....51

Table A2. Dietary categories from merged food types, based on dietary habit questionnaires.....52

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur François-Joseph Lapointe. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'accordes. Merci d'avoir été mon psychologue dans les moments les moins reluisants, et un supporteur hors-pair dans les petites et grandes victoires du cheminement en recherche. Merci de m'avoir permis de faire ce stage d'été en 2013 qui a mené à bien plus finalement. Merci aussi à mon co-directeur Jesse Shapiro, tout d'abord pour m'avoir offert ce projet de maîtrise rempli de terrain et de défis excitants. Cette expérience a une valeur inestimable pour moi. Merci pour tout le support moral et scientifique offert lors de ces deux années, ainsi que pour ton investissement dans mon travail. Merci à Nathalie Tessier, qui fut jadis ma co-directrice, et dont l'expérience et l'énergie sont des ressources précieuses pour les étudiants qui naviguent les eaux parfois brumeuses des études supérieures.

Un grand merci à tous les membres et amis des deux laboratoires dont je fais partie qui m'ont épaulée de près ou de loin, et qui ont su créer une ambiance de travail motivante et positive. Un merci spécial à Catherine Girard sans qui le projet n'aurait pas été possible. Ce fut vraiment agréable de vivre ces moments à l'autre bout du monde en ta compagnie. Tu es d'une aide précieuse dans de nombreux volets de ma maîtrise, merci d'avoir donné de ton temps si généreusement. Un immense merci à Cindy Bouchard qui a investi de longues heures dans ma formation en laboratoire et qui m'a fait rire souvent. Merci également à Virginie qui m'aide régulièrement, et ce, sans compter les heures.

Merci à la communauté de Resolute Bay de nous avoir accueillies et aidées, Catherine et moi. Merci pour votre patience, votre intérêt et votre gentillesse légendaire. Merci à Debbie Iqaluk, pour toute son aide, sa générosité et ses enseignements. Merci pour les aventures dans le Nord que je n'oublierai jamais. Merci Pilipoosie Iqaluk et James Iqaluk pour les expéditions et le plaisir. Je souhaite vous revoir un jour !

Un grand merci à tous les participants de l'étude qui ont donné des échantillons très intimes !

Merci au personnel de PCSP de Resolute Bay pour leur gentillesse et leur aide. Merci également à tous les organismes subventionnaires ayant permis la tenue de ce projet (CRSNG, FRQNT, CRSH, PFSN).

Merci à Francine Lavoie d'être un pilier dans ma vie, d'être fière de moi et de m'aimer inconditionnellement. Merci de cuisiner pour moi, de te proposer sans relâche pour m'aider dans mon travail. J'ai hâte de te construire une petite maison près de la mienne. Merci à Pierre Beauchamp pour ton support à travers le temps, ton intérêt scientifique qui n'a pas manqué de déteindre sur moi et pour tes conseils et corrections. Merci à Michel, Véronique et à ma famille, qui me suivent dans mes aventures et qui me supportent depuis toujours. Merci Sammy d'être un être humain tout neuf, plein de promesse, que j'ai hâte d'apprendre à connaître.

Comment remercier tous ces colocs et amis avec lesquels j'aurai vécu et qui m'ont soutenue par leur écoute, leur cuisine (!) et leur patience. Les Sophie(s), Éloïse, Sébastien, Joël, Mélissa et tous les autres. Merci également à tous les ami(es), dont peut-être certains négligés. Je suis heureuse de partager avec vous.

Un merci du fond de cœur à Joël et sa famille. Merci pour ces années d'amour et de confiance qui ont forgé la personne que je suis. Merci pour votre optimisme, vos conseils et votre support.

Merci à Félix St-Hilaire pour la livraison impromptue de sapin, pour tous les plaisirs portneuvois et autres folies. Terroriste de l'amour !



CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Le microbiome intestinal : Une riche communauté microbienne

Notre système digestif est peuplé de centaines de milliards (10^{11}) de microorganismes (Sender *et al.* 2016). Cette quantité de cellules microbiennes est similaire au nombre de cellules humaines, avec un ensemble de gènes associés jusqu'à des centaines de fois plus important que celui de l'humain (Ley *et al.* 2006). Cette imposante communauté microscopique est formée d'une forte proportion de bactéries, mais comporte également une importante abondance de virus, d'archéobactéries et d'eucaryotes (Hamad *et al.* 2012, Reyes *et al.* 2012, Hoffmann *et al.* 2013). Leur abondance le long du système digestif est variable. La partie supérieure du tractus gastro-intestinal, qui inclut l'estomac et le petit intestin, renferme une infime proportion de microorganismes, principalement éliminés par les sécrétions digestives, l'acidité du pH environnant et le débit accéléré du transit intestinal (Kanno *et al.* 2009). Les microorganismes peuplent toutefois densément le grand intestin (Guarner et Malagelada 2003). Des communautés microbiennes distinctes occupent la lumière et les cellules épithéliales de l'intestin (Li *et al.* 2015). L'ensemble des microorganismes et de leur matériel génétique, résidant principalement dans le grand intestin, forment le microbiome intestinal.

1.2. La méthodologie nécessaire à l'étude du microbiome intestinal

Les études sur le microbiome intestinal humain se basent sur la collecte d'échantillons de selles dont la masse est composée à 60% de bactéries (Stephen et Cummings 1980). Yasuda *et al.* (2015) ont montré que les selles renferment une communauté bactérienne fortement corrélée avec les communautés échantillonnées à même la lumière intestinale et dans une moindre mesure, avec celle des cellules épithéliales du grand intestin. Les selles seraient toutefois un échantillon beaucoup moins représentatif des communautés microbiennes de l'intestin grêle. Ainsi, cette méthode d'échantillonnage est fréquemment utilisée puisqu'elle est non-invasive et offre un portrait non-identique mais représentatif des communautés du grand intestin. Malgré la diversité des microorganismes formant le microbiome intestinal, la littérature scientifique actuelle s'intéresse principalement à sa composition en taxons et en gènes bactériens. Ce mémoire

ne fera pas exception: le terme microbiome sera donc employé pour désigner l'ensemble des taxons bactériens, excluant les eucaryotes, virus et levures. L'étude approfondie de la structure du microbiome est rendue possible suite à l'avènement de nouvelles technologies de séquençage (séquençage de seconde génération). Un haut débit de séquençage et de l'équipement de moins en moins dispendieux, permet à ce domaine d'étude de se développer rapidement. Notamment, le séquençage du gène 16s de l'ARN ribosomique bactérien a connu une grande popularité au cours de la dernière décennie car il permet d'identifier les taxons bactériens contenus dans un échantillon, et d'étudier ainsi la composition du microbiome. Un survol des découvertes relatives à cette composition et à ses dynamiques temporelles est proposé dans cette introduction.

1.3. Le rôle du microbiome intestinal sur la santé humaine

Le microbiome est activement impliqué dans les activités métaboliques intestinales et il est souvent décrit, par analogie, comme un véritable organe du corps humain (Hooper *et al.* 2002, Eckburg *et al.* 2005, O'Hara et Shanahan 2006). L'humain et son microbiome auraient coévolué pour parfaire des relations en grande majorité mutuellement bénéfiques (Bäckhed *et al.* 2005). La composition du microbiome intestinal a, conséquemment, des impacts majeurs sur la santé humaine. D'une part, la communauté bactérienne intestinale forge le système immunitaire, dès la naissance, et participe à la formation de la barrière intestinale de mucus qui protège les cellules épithéliales contre des pathogènes exogènes chez l'hôte (Nicholson *et al.* 2012, Olszak *et al.* 2012, Kamada *et al.* 2013). D'autre part, les activités du microbiome agissent sur le transit intestinal ainsi que sur la digestion, l'absorption et la synthèse des nutriments (Savage 1986, Kau *et al.* 2011, El Kaoutari *et al.* 2013). De plus, le système digestif et la riche communauté microbienne qui le peuple sont décrits comme un écosystème complexe (Costello *et al.* 2012, Lozupone *et al.* 2012) dont la perturbation de la composition en espèces et en gènes est associée à de nombreux problèmes de santé, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin, l'obésité et le diabète (Ley 2010, Neu *et al.* 2010, Morgan *et al.* 2012). Par ailleurs, les implications du microbiome intestinal sur la santé s'étendraient bien au-delà du tractus digestif et auraient été liées, entre autres, à l'autisme et à la dépression (Foster et Neufeld 2013, Mulle *et al.*

2013). Ainsi, les découvertes reliées au microbiome touchent de vastes domaines et la compréhension de sa composition et de ses fonctions permet de mieux définir son importance.

1.4. Composition du microbiome intestinal : Influences et particularités

Le microbiome intestinal est unique à chaque individu, diversement influencé par la génétique, l'environnement et les habitudes de vie et d'alimentation de l'hôte. En plus d'être unique à l'individu, la composition du microbiome n'est pas stable dans le temps, mais serait plutôt assujettie à une dynamique complexe de facteurs.

1.4.1. Le microbiome est façonné par une multitude d'influences

Une étude menée par Falony *et al.* (2016) auprès d'une importante cohorte de participants ($n=3948$) a tenté d'ordonner en importance une multitude de facteurs influençant la composition du microbiome. Leurs résultats soulignent l'interaction importante du statut de santé d'un individu avec son microbiome. On retrouve, en première position d'importance, le score de Bristol, qui classifie les selles selon leur contenu en eau. Vandeputte *et al.* (2015), corroborent ce résultat en démontrant, entre autres, que la texture des selles est corrélée avec la richesse bactérienne qu'elles contiennent. La richesse serait minimale dans les selles liquides. L'indice de masse corporelle, le taux de cholestérol dans le sang, l'âge et le genre se retrouvent également au sommet de la liste dressée par Falony *et al.* Dans d'autres études, le genre et la génétique de l'hôte sont identifiés comme des éléments exerçant une influence notable sur la prévalence de certains groupes bactériens au sein du microbiome. Par exemple, les genres *Bacteroides* et *Prevotella* seraient plus abondants chez les hommes (Mueller *et al.* 2006). L'impact de la génétique de l'hôte a été investigué chez la souris, chez qui la présence de locus spécifiques dans le génome aurait une influence mesurable sur l'abondance de taxons bactériens activement impliqués dans son métabolisme (Benson *et al.* 2010). Chez l'humain, les individus d'une même famille possèdent des microbiomes plus similaires entre eux que des individus non-apparentés (Goodrich *et al.* 2014). La comparaison des microbiomes de jumeaux monozygotiques et dizygotiques semble indiquer que l'environnement favoriserait

toutefois majoritairement les ressemblances entre les familles (Turnbaugh *et al.* 2009). Yatsunenko *et al.* (2012) ont observé des divergences entre les compositions bactérienne et génétique du microbiome intestinal chez différentes populations humaines géographiquement distinctes, dévoilant également une influence de la localisation géographique, notamment via des conditions sanitaires différentes. Ces quelques exemples, sélectionnés parmi une littérature grandissante sur le sujet, démontrent qu'une multitude de facteurs semblent influencer la composition du microbiome. Or, celle-ci est également soumise à des variations à travers le temps, principalement influencée par la diète de l'hôte, ajoutant une dimension à la complexité de cet écosystème.

1.4.2. Variations temporelles du microbiome

1.4.2.1. Développement de l'humain et vieillissement

Au cours de la vie d'un individu, la composition de son microbiome subit de profonds changements, principalement lors des trois premières années de vie. La colonisation microbienne du système digestif à la naissance sera influencée notamment par l'accouchement (par voie naturelle ou par césarienne) (Biasucci *et al.* 2010, Jakobsson *et al.* 2014), par l'alimentation lors des premiers mois (lait maternel ou formule) et par la composition de la diète solide consommée par la suite (Grönlund *et al.* 1999, Harmsen *et al.* 2000). Des variations extrêmes de la composition du microbiome pourront être observées durant la première année de vie, suivies d'une stabilisation jusqu'à l'atteinte d'un microbiome plus similaire au microbiome à l'âge adulte observé lors de l'introduction des aliments solides (Palmer *et al.* 2007, Koenig *et al.* 2011). Les variations interpersonnelles, en termes de diversité du microbiome intestinal, seraient plus fortes chez les enfants que chez les adultes, ce qui souligne l'importance des changements subis par le microbiome en bas âge (Kurokawa *et al.* 2007). Ainsi, au cours de la vie d'un individu, le microbiome subira de nombreuses successions jusqu'à l'atteinte d'un climax à l'âge adulte. Les microbiomes à l'âge adulte seraient significativement différents de ceux des aînés, de façon variable selon la géographie (Mueller *et al.* 2006).

1.4.2.2. Variations quotidiennes : les habitudes de vie

Caporaso *et al.* (2011) ont suivi la variation de la microflore chez deux individus adultes chaque jour, durant 15 mois, pour conclure que la microflore variait au cours des mois, des semaines et même des journées au sein de l'individu. Cette étude souligne également qu'une infime part de sa composition serait stable dans le temps, composée de taxons résidents permanents. Plus importante serait la portion de la microflore formée de résidents persistants, mais non-permanents. David *et al.* (2014) ont aussi étudié la composition quotidienne de la microflore chez deux participants au cours d'une même année. Ces auteurs conclurent, quant à eux, que les communautés bactériennes de l'intestin seraient stables dans le temps. Ils ont cependant mis en évidence que de rares événements auraient largement et rapidement bouleversé la composition de la microflore des participants durant l'année. Notamment, la prise d'antibiotiques aurait résulté en un remplacement dans le microbiome de certains taxons par d'autres taxons génétiquement similaires. Flores *et al.* (2014) ont échantillonné hebdomadairement les microflores intestinales, cutanées et linguales de 85 adultes durant plus de trois mois. Ils ont observé que les microflores intestinales et buccales étaient plus stables en termes de taxons présents, mais plus variables en termes d'abondances relatives de ses taxons. Ils ont aussi observé que la composition de la microflore intestinale changeait à différentes intensités selon les participants. Les individus arborant la composition la plus variable au cours du temps étaient caractérisés par des communautés davantage dominées par les familles des Clostridiaceae et Lactobacillaceae, tandis que les Bacteroidaceae étaient plus abondant chez les individus plus stables. Ils ont toutefois observé une variabilité plus importante entre les participants que chez un participant au cours du temps. Cette dernière observation a également été relevée dans d'autres exemples d'étude temporelle du microbiome, soulignant le caractère personnalisé de la composition du microbiome (Costello *et al.* 2009, Turnbaugh *et al.* 2009). Faith *et al.* (2013) ont étudié la composition de la microflore intestinale chez 37 adultes durant cinq ans. Ils suggèrent que la majorité des souches bactériennes seraient résidentes durant des décennies chez un même individu. Selon Schloissnig *et al.* (2013), les souches spécifiques aux individus seraient difficiles à remplacer dans le système digestif. Ainsi, les conclusions de ces recherches démontrent

qu'au sein d'un individu, il y aurait une combinaison de stabilité et de changement de la composition de la microflore, propre à chaque personne.

1.4.3. Le microbiome est le reflet de la diète

La diète est une composante déterminante de la santé humaine via l'apport nutritif qu'elle apporte à son hôte. La microflore intestinale, quant à elle, joue un rôle primordial dans la digestion en permettant d'extraire le maximum de nutriments et d'énergie des aliments. La composition en différents groupes alimentaires, tels que les glucides, les gras et les protéines, varie grandement selon les diètes humaines. De nombreuses études ont mis en lumière l'impact des différents groupes alimentaires ou des diètes sur la composition du microbiome intestinal, notamment sur les taxons bactériens impliqués dans l'activité métabolique digestive.

1.4.3.1. Les glucides complexes, un groupe alimentaire plus étudié

Le génome humain code un nombre limité d'enzymes digestives et, de ce fait, une certaine partie de la nourriture ingérée est indigeste. Ces éléments indigestes, notamment un complexe répertoire d'oligosaccharides et de polysaccharides de nature végétale, transiteront à travers le tractus digestif sans être digérés. Ils deviendront donc une source d'énergie pour les bactéries du colon, notamment pour le phylum Bacteroidetes. Ce groupe posséderait un large éventail de gènes encodant une diversité d'enzymes de dégradation des fibres et autres polysaccharides (El Kaoutari *et al.* 2013). Ces glucides complexes, dont certaines fibres alimentaires, sont soumis à une fermentation microbienne qui produit des acides butyrique, acétatique et propionique, et des acides gras à chaînes courtes qui représenteraient environ 10% des calories absorbées par jour dépendamment des diètes (McNeil 1984). Une diète riche en fibres influencerait grandement la croissance et l'activité des bactéries productrices de butyrates en particulier, dont les *Roseburia*, *Eubacterium rectale* et *Faecalibacterium prausnitzii*. La nature de ces composants insolubles influencera généralement l'identité des premiers taxons bactériens qui colonisent certains aliments. Par exemple, le son des céréales serait rapidement colonisé par des espèces des genres *Clostridium*, *Eubacterium* et *Roseburia*, tandis que l'amidon serait colonisé par les genres

Ruminococcus et *Bifidobacterium* (Hooper *et al.* 2002). L'ingestion de glucides est fortement liée à l'intensité de la fermentation bactérienne ainsi qu'au nombre de taxons bactériens retrouvés dans le colon (Flint 2012). Des changements dans la quantité de fibres ingérées seraient aussi positivement corrélés à un enrichissement en *Bifidobacterium*, *Roseburia* et *Eubacterium*, observables le jour suivant l'ingestion (David *et al.* 2014).

1.4.3.2. Autres groupes alimentaires d'intérêts

La consommation d'aliments riches en gras stimule la sécrétion d'acides biliaires et augmente dans les selles la concentration de produits secondaires issus de la bile (Rafter *et al.* 1987). La composition du microbiome intestinal pourrait être particulièrement influencée, tel qu'observé chez le rat, par ces produits qui ont une activité antimicrobienne notable (Islam *et al.* 2011). L'impact de ces aliments n'a toutefois pas été caractérisé précisément. De même, les effets de la consommation de noix, fruits, légumes et légumineuses sont également peu connus, bien que quelques études aient observées l'influence de certains aliments ciblés, telles que les baies, les pommes et les noix de cajous (Graf *et al.* 2015). Certains de ces aliments sont toutefois physiquement colonisés par des communautés bactériennes avant leur ingestion, notamment les aliments crus et fermentés. Les fruits et légumes sont colonisés par de riches communautés bactériennes qui seront notamment influencées par les types de cultures agricoles (Leff et Fierer 2013). Les aliments lacto-fermentés, tel que le kimchi, contiendront d'importantes concentrations de bactéries acido-lactiques (Di Cagno *et al.* 2013). La consommation de vin rouge alcoolisé aurait des effets significatifs, notamment sur l'abondance de *Bifidobacterium*, *Enterococcus* et du phylum Fusobacteria, en comparaison avec un vin désalcoolisé, soulignant l'impact des ferments alimentaires sur le microbiome (Queipo-Ortuño *et al.* 2012).

1.4.3.3. Influence des diètes humaines sur la composition du microbiome

De nombreux autres travaux ont étudié l'impact des diètes sur la microflore intestinale de certaines communautés humaines, notamment en contrastant la diète occidentale avec différentes diètes traditionnelles. Par exemple, De Filippo *et al.* (2010) ont comparé les microflores intestinales chez des enfants de 1 à 6 ans au Burkina Faso et en

Italie. La diète rurale traditionnelle burkinabée est hautement riche en fibres, amidon, polysaccharides d'origine végétale et pauvre en produits animaliers. La diète italienne est proportionnellement plus pauvre en fibres et comprend davantage de sources de gras et de protéines animales. Cette étude a démontré que l'embranchement des Bacteroidetes est significativement plus abondant chez les enfants burkinabés, tandis que les Firmicutes sont dominants chez les enfants italiens. Le microbiome d'une communauté de chasseurs-cueilleurs africains, les Hadza de la Tanzanie, a aussi été étudié et comparé à celui d'une communauté urbaine italienne (Schnorr *et al.* 2014). Selon cette recherche, les Hadza posséderaient une richesse et une diversité microbienne supérieure aux Italiens. Un enrichissement en *Prevotella* et en *Treponema*, notamment, permettrait probablement aux Hadza une meilleure fermentation bactérienne des fibres végétales. Un enrichissement en *Prevotella* a également été observé chez des participants africains en comparaison à des afro-américains (Ou *et al.* 2013). La comparaison des microbiomes intestinaux de Vénézuéliens, de Malawiens et d'Américains a montré que le microbiome américain semblait particulièrement distinct des autres, avec une diversité plus faible et une sous-représentation du genre *Prevotella*, pouvant peut-être agir comme un taxon discriminant entre les diètes occidentales et traditionnelles (Yatsunesko *et al.* 2012). Plusieurs études ont comparé le microbiome intestinal de participants s'alimentant d'une diète végétarienne ou d'une diète omnivore. Si aucune différence significative n'a été détectée dans un premier cas (Liszt *et al.* 2009), des études subséquentes ont trouvé de légères variations en termes d'abondance de quelques taxons bactériens, notamment responsables de la production de butyrates (Kabeerdoss *et al.* 2012, Matijašić *et al.* 2014). Les diètes riches en gras ont été moins étudiées. Toutefois, David *et al.* (2014) ont observé que la consommation d'une diète très concentrée en gras favoriserait l'abondance de taxons bactériens tolérants à la bile (*Alistipes*, *Bilophila* et *Bacteroides*), avec une diminution d'abondance de Firmicutes impliqués dans le métabolisme des polysaccharides végétaux. Certaines diètes traditionnelles reposent sur une forte consommation de gras et de protéines animales. Girard *et al.* (2017) ont comparé les compositions des microbiomes intestinaux de participants Inuits et de participants de descendance européenne, en réponse à une diète traditionnelle inuite et une diète occidentale, durant l'été. En général, les microbiomes avaient des compositions similaires. Toutefois, des différences ont été observées au niveau

du sous-genre bactérien. Par exemple, l'abondance de *Prevotella* était plus grande chez les participants, Inuits ou non, consommant une diète occidentale, associée à une plus grande consommation fibres.

1.4.3.4. Variations temporelles au sein des diètes humaines

David *et al.* (2013) ont souligné que le microbiome intestinal d'un individu adulte pouvait répondre rapidement à une altération diététique en adaptant sa composition bactérienne. Ces variations ont été caractérisées également dans d'autres recherches (Caporaso *et al.* 2011, Flores *et al.* 2014). Toutefois, les influences des changements de diète au cours du temps sur le microbiome ont été peu investiguées au sein de communautés humaines. L'étude de Davenport *et al.* (2014) est un rare exemple se penchant sur l'impact sur le microbiome de changements diététiques vécus par un groupe d'adultes, soit chez 60 membres de la communauté Huttérites (États-Unis). Ayant un mode de vie communautaire, ces individus auraient tendance à s'alimenter de ressources saisonnières en synchronie, permettant une évaluation de la variation saisonnière dans les microbiomes de cette cohorte. En hiver, la quantité d'aliments frais consommés est significativement plus faible. Malgré une stabilité du microbiome intestinal chez les individus au cours du temps, une transition saisonnière significative du microbiome intestinal au sein de la cohorte a cependant été observée. L'abondance de certains taxons, incluant les Firmicutes et les Bacteroidetes, était significativement différente en fonction de la saison. La diversité taxonomique était significativement plus faible en été, saison où une plus grande diversité d'aliments est disponible. Les auteurs supposent qu'en raison d'une alimentation plus variée en été, les aliments consommés comportent davantage de glucides complexes, ce qui favorise peut-être la prolifération d'espèces spécialisées qui abaisserait la diversité au sein du microbiome.

1.5. Mise en contexte de l'étude

1.5.1. La diète traditionnelle inuite

Les Inuits sont un peuple traditionnellement nomade, dont la culture s'ancre autour des pratiques de la chasse, de la pêche et de la cueillette (Sharma 2010). Leur diète traditionnelle se compose principalement de gibiers, notamment de mammifères marins (narvals, baleines, phoques) et terrestres (caribous), d'oiseaux sauvages (incluant leurs œufs) et de poissons (omble chevalier). Les viandes sont consommées gelées, crues, cuites ou fermentées. La collecte d'algues, de plantes et de baies peut être réalisée, selon les régions. La disponibilité des proies et des ressources varie au cours de l'année en réponse aux conditions environnementales saisonnières et à la présence, ou non, du couvert glaciaire. Le partage de la nourriture traditionnelle entre individus, familles et communautés est une pratique alimentaire courante qui permet de contrer les indisponibilités de certaines ressources (Ford 2009). La consommation de la diète traditionnelle est considérée comme bénéfique pour la santé des Inuits, pour ces apports nutritionnels riches en protéines et en vitamines essentielles, en plus de son importance culturelle et sociale (Furgal *et al.* 2005).

1.5.2. Transition et insécurité alimentaires au Nunavut

Au Nunavut, le réchauffement climatique global a des impacts importants, diminuant ou modifiant l'accessibilité et la disponibilité de plusieurs espèces composant la diète traditionnelle. Ces changements perturbent la sécurité alimentaire chez les Inuits (Rosol *et al.* 2016). La vulnérabilité des différentes communautés du Nunavut devant ces changements est influencée par de nombreux facteurs, incluant l'exposition aux dangers associés à l'amincissement des glaces ainsi que l'accès à des espèces de substitution (Wesche et Chan 2010). Comme plusieurs populations indigènes du monde, la consommation de la diète traditionnelle se transforme graduellement sous une transition alimentaire au profit d'une diète occidentalisation non-aborigène (Sharma 2010). L'amplitude de ce changement, dû à de nombreux facteurs (acculturation, sécurité alimentaire, changements climatiques, etc.), varie d'une communauté à l'autre, ainsi que d'une génération à l'autre. Les habitants du Nunavut ont accès à une diversité d'aliments

provenant du supermarché, dont les prix sont cependant jusqu'à 3 fois supérieurs qu'ailleurs au Canada (Chan *et al.* 2006, Beaumier et Ford 2010). De plus, la consommation d'aliments transformés issus de la diète occidentale, au détriment de la diète traditionnelle, serait associée à des déficiences nutritionnelles récemment remarquées (Kuhnlein *et al.* 2004, Sharma *et al.* 2010). Les pratiques alimentaires actuelles chez les Inuits sont donc un amalgame de diète traditionnelle et de diète occidentale, dont la proportion varie en fonction des individus et des communautés. Par exemple, les adultes des communautés du Nunavut consommeraient, en moyenne, jusqu'à 66% de viandes issues de la diète traditionnelle (Trait 2006). Les Inuits pourraient toutefois représenter un exemple de population indigène traversant une transition alimentaire draconienne vers une diète occidentalisation (Kuhnlein *et al.* 2004).

1.5.3. Problématique

La diète a un impact important sur la composition du microbiome intestinal ainsi que sur son activité métabolique. L'impact de diètes traditionnelles africaines et sud-américaines a été caractérisé et comparé à la diète occidentale. Contrairement à ces populations, les populations inuites du Canada dépendent d'une diète traditionnelle composée majoritairement de viandes, donc riche en graisses et protéines animales, qui varie fortement, en termes de composition, au gré des saisons. L'étude de Girard *et al.* (2017) a montré que les microbiomes intestinaux d'une population inuite (Nunavut, Canada) et d'une population d'origine européenne (Montréal, Canada) étaient globalement similaires, une exception car le microbiome autochtone est habituellement plus diversifié que le microbiome dit « occidental ». En effet, le microbiome est une caractéristique personnalisée aux communautés humaines, en termes de composition et de diversité. Or, bien que peu étudiée, la dynamique temporelle régissant la composition du microbiome est également personnalisée. La diète traditionnelle inuite varie à travers le temps, contrairement à l'alimentation occidentale qui est peu soumise à la disponibilité saisonnière des ressources. Les fluctuations considérables de l'alimentation des populations inuites pourraient donc se refléter dans la composition de leur microbiome et

ainsi permettre d'observer des différences entre les microbiomes inuit et occidental, différences indétectables lors de leur étude basée sur un échantillonnage ponctuel.

1.6. Objectifs et hypothèses du projet

L'objectif principal de ce projet consiste à caractériser les variations temporelles du microbiome intestinal en réponse à la diète traditionnelle inuite. Pour ce faire, des échantillons de papier hygiénique ont été récoltés mensuellement auprès de participants inuits de Resolute Bay (Nunavut, Canada) ainsi qu'auprès d'une cohorte de participants d'origine européenne de Montréal (Canada), durant une période de huit mois. La diète des participants a été caractérisée grâce à des questionnaires d'habitudes alimentaires complétés par les participants pour chaque échantillon. Le projet a été divisé en quatre sous-objectifs.

1) Réaliser la première comparaison entre deux méthodes d'échantillonnage du microbiome intestinal, soit la collecte de papier hygiénique et d'échantillons de selles, afin de situer les données obtenues par la première méthode, moins utilisée, au sein de la littérature. Nous posons l'hypothèse que la méthode de collecte par papier hygiénique offre un signal bactérien différent, puisqu'elle permet l'échantillonnage du microbiome épithélial et urogénital en plus du microbiome intestinal.

2) Évaluer l'impact de facteurs déterminants la stabilité temporelle du microbiome intestinal. Nous posons l'hypothèse que le microbiome de chaque participant conserve une composition lui étant propre, au cours du temps.

3) Définir l'importance des différences alimentaires et de leurs effets sur le microbiome chez les participants du Nunavut et de Montréal. Nous posons l'hypothèse que les diètes inuite et occidentale sont suffisamment différentes pour expliquer une portion importante de variation au sein des données, malgré la transition alimentaire vécue par les Inuits du Nunavut.

4) Comparer la variation temporelle des microbiomes inuit et dit « occidental » en termes de diversité alpha et bêta. Nous posons l'hypothèse d'un changement saisonnier au sein du microbiome de la cohorte de participants inuits, en réponse à une diète saisonnière, et d'une stabilité plus importante chez les participants de Montréal.



CHAPITRE 2. THE INUIT GUT MICROBIOME IS DYNAMIC OVER TIME BUT LACKS SEASONALITY

Geneviève Dubois¹, Catherine Girard^{1,2}, François-Joseph Lapointe¹ et B. Jesse Shapiro¹
(Article en préparation, non soumis)

¹ Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada

² Centre d'Études Nordiques, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada

2.1. Abstract

The human gut microbiome represents a diverse microbial community specific to individuals and populations, which is heavily influenced by factors such as genetics and lifestyle. Diet is a major force shaping the gut microbiome, and the effects of dietary choices on microbiome composition have been thoroughly investigated. It has been shown that a change in diet also changes the gut microbiome, but the effects of seasonal diets are poorly known. The traditional Inuit diet is primarily based on animal products, which vary seasonally based on prey availability. To investigate the dynamics of the Inuit diet over time, we collected gut microbiome samples from Inuit volunteers living in Resolute Bay (Nunavut, Canada), and compared them to samples collected from individuals of European descent living in Montréal (Québec, Canada) and consuming a typical Western diet. We sequenced the V4 region of the 16S rRNA gene to characterize the diversity and composition of the Inuit microbiome, and surveyed differences among samples collected with toilet paper or from stool. Our results show that these sampling methods provide similar, but non-identical portraits of the microbiome. Based on sequencing from toilet paper samples alone, we found that inter-individual variations of the microbiome community composition were greater than within-individual variations, both in Nunavut and Montreal, with significant differences in microbiome composition explained by dietary preferences. No defined seasonal shift of microbiome was detected in samples collected over time. However, within-individual microbial diversity fluctuated more with time in Nunavut than in Montreal. Together, these results underline that the traditional Inuit diet still has an important impact on the composition, diversity and stability of the Inuit gut microbiome, even if the traditional seasonality of the diet is less pronounced than expected, due to an increasingly westernized diet.

Key words: Gut microbiome, Inuit traditional diet, Temporal variation, Western diet, Dietary transition, 16S rRNA

2.2. Introduction

The human gut microbiome is a diverse community of microbial eukaryotes, viruses, archaea, and mostly bacteria (Hamad *et al.* 2012, Reyes *et al.* 2012, Hoffmann *et al.* 2013), many of which play important roles in immunity, metabolism and nutrition (Kau *et al.* 2011, Nicholson *et al.* 2012, Kamada *et al.* 2013). The community structure of the microbiome is determined by many factors, including geography, gender, host genetics and age (Mueller *et al.* 2006, Koenig *et al.* 2011, Yatsunenko *et al.* 2012, Goodrich *et al.* 2014).

Microbiome composition and structure may also vary within individuals over time, although most individuals have a relatively stable microbiome (David *et al.* 2014, Flores *et al.* 2014). Individuals with highly diverse microbiome tend to be more stable through time (Flores *et al.* 2014). Other studies have shown that individuality is preserved through time, underlying an overall stable and personalized microbiome (Schloissnig *et al.* 2013). On time scales of days to weeks, diet is the main factor driving composition and structure of the gut microbiome (David *et al.* 2014). For example, dietary fibers transit through the digestive tract without being assimilated by the human body, providing a food source for fermentative bacteria (Graf *et al.* 2015). High fiber intake favors the presence of several members of the phylum Bacteroidetes, which can break down complex carbohydrates (El Kaoutari *et al.* 2013). Impacts of fat intake on the gut microbiome are less well known. However, bile tolerant taxa such as *Alistipes*, *Bilophila* and *Bacteroides* have shown increased relative abundance after a week of high fat and protein diet consumption, while Firmicutes decreased (David *et al.* 2014).

Traditional diets vary widely across human populations. The microbiome of children from Burkina Faso, consuming a carbohydrate-based traditional diet, was compared to the microbiome of Italian children eating a westernized diet containing more animal fats and proteins (De Filippo *et al.* 2010). Bacteroidetes and *Prevotella* were prevalent among Burkinabés while Firmicutes were prevalent amongst Italians. The Italian gut microbiome was also compared to hunters-gatherers from the Hadza community in Tanzania (Schnorr *et al.* 2014). Significantly higher microbial diversity was observed in the Hadza cohort. Notably, enrichment in *Prevotella* and *Treponema* was observed, possibly allowing efficient fiber fermentation in the gut. Yatsunenko *et al.* (2012) also showed significant differences

between rural Malawians, Venezuelans and American, with an under-representation of *Prevotella* in participants from the US.

Although diet is known to alter microbiome composition over short time scales (David *et al.* 2014), few studies have followed seasonally variable diets and their impacts on the microbiome. One exception is Davenport *et al.* (2014), who studied temporal changes in the microbiome in the Hutterite Anabaptist community (United States), in which traditional diet relies on seasonal food availability. In particular, significant amounts of fruits and vegetables are only available during the summer. This study revealed a significant shift in species composition, as well as a lower diversity in the summer compared to winter. The increased consumption of fibrous fruits and vegetables during summer could be responsible for these differences, favoring blooms of bacteria specialized in fiber digestion.

The Inuit people are Arctic inhabitants whose culture is profoundly anchored in hunting and gathering practices, since the polar environment is hostile to agriculture (Sharma 2010). The traditional Inuit diet is subject to seasonal variation, depending on ice cover and prey availability. The Inuit traditionally consume an animal-rich diet, composed mainly of marine and terrestrial mammals (*e.g.* seal and caribou), as well as wild birds and fish. Meat and fish can be consumed raw, frozen, cooked or fermented. The traditional Inuit diet is rich in proteins and essential vitamins, and also contributes to social bonding and cultural preservation (Furgal *et al.* 2005). However, with increasing access to imported supermarket foods, Inuit populations are experiencing a dietary transition toward a more Western diet (Kuhnlein *et al.* 2004, Sharma 2010). Global warming, ice thinning and changing prey migratory patterns and availability to hunters also contribute to this transition. The Inuit diet is now a mixture of traditional and Western diet foods, depending on the individual and the community (Trait 2006).

The Inuit microbiome has recently been characterized and compared to Western microbiomes (Girard *et al.* 2017). This study showed that gut microbial communities were mostly similar in terms of composition and diversity, possibly owing to the increasing resemblance of Inuit and Western diets. However, the study was based on a single time point, taken in the summer. It is possible that the Inuit and Western diets (and microbiomes) are more distinct at other times of year, due to seasonal variation in traditional food availability.

To investigate the seasonal dynamics of the Inuit gut microbiome, we collected time-course microbiome samples from Inuit volunteers from a community in Nunavut (Canada), and compared them to a control group from Montreal (Canada), consuming a typical Western diet. We used deep amplicon sequencing of the 16S marker gene to assess the diversity and composition of the gut microbiome. We hypothesized that Westerners consume a fairly stable diet over time, due to yearlong availability of a variety of foods at the supermarket, which we expected would result in a relatively stable microbiome. In contrast, we hypothesized that Inuit microbiomes would be more variable over time, due to seasonal availability of different traditional foods. For ease of sample collection and shipping, participants used toilet paper to sample stool. This convenient sampling method has been used previously (*e.g.* Flores et al. 2014) but the differences in microbiome surveys between toilet paper and whole stool have not yet been characterized. Here we show that toilet paper and whole stool provide similar, but non-identical portraits of the microbiome, with toilet paper sampling some skin and vaginal microbes, in addition to the gut. Based on sequencing these toilet paper samples, we found that microbiome community composition varies within individuals over time, but there is greater variation between individuals than within an individual over time, both in the Nunavut and Montreal cohorts. Diet differed markedly between Montreal and Nunavut, and explained a significant amount of the variation in microbiome composition. Within-individual temporal variation was higher in Nunavut than in Montreal, suggesting a more variable microbiome, possibly due to a more variable diet. However, no seasonal variation of microbiome composition was detected in either Nunavut or Montreal. Together, our results suggest that the traditional Inuit diet still has an important impact on the composition, diversity and stability of the Inuit microbiome, even if the traditional seasonality of the diet is less pronounced than expected.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Participant recruitment and sample collection

Prior to the fieldwork, the recruitment and sampling protocols were approved by the Université de Montréal Faculty of Arts and Sciences ethical review board (CERFAS, certificate # 2015-16-039-D). Permission for this work was granted by the Nunavut

Research Institute (licences # 02 037 15N-M and # 02 040 16 R-M), as well as the Hunters & Trappers Association and the Hamlet of Resolute Bay. Before participating in the study, the objectives and potential outcomes of the research project were explained, and each participant provided written consent.

Resolute Bay, Nunavut, is the second northernmost community in Canada (Figure S1). We recruited 15 Inuit participants between 24 and 67 years old (mean of 46.5 years old) from this small hamlet (approximate population: 215 inhabitants, principally of Inuit descent [Statistics Canada, 2011]). Nine non-Inuit participants of European descent living in Montreal, Canada, between 23 and 48 years old (mean of 30.2 years old) and mostly from a university community, were also recruited as a control group. Each participant provided paired stool sample and toilet paper sample containing stool (from the same bowel movement) at the beginning of the study, for methodological comparisons. Subsequent samples were taken once per month, using toilet paper only. Samples were collected from July 2015 to January 2016 and also in July 2016 in Resolute Bay, and from October 2015 to June 2016 in Montreal. Each sample was accompanied by a dietary habits questionnaire containing information about food consumption in the 48 hours preceding the sampling event (Appendix 1). During the sample collection, participants wore sterile gloves and used sterile toilet paper. In Nunavut, when the sampling coordinator was present (July 2015 and July 2016), the samples were kept outside (temperature < 4°C) for a maximum of 12 hours before being collected and frozen at -80°C until DNA extraction. During the rest of the year, a local resident was hired as a sampling assistant. The toilet paper samples were kept outside (temperature between -35 and 0°C) for a maximum of two days and were shipped along with self-reported questionnaires by mail, without additional conservation methods. Shipment duration varied between 5 and 7 days. Upon reception in Montreal, the samples were kept frozen at -80°C until DNA extraction. For the sample collection in Montreal, the samples were kept in a fridge for a maximum of 12 hours before being frozen at -80°C. Therefore, Nunavut samples from July were kept under optimal conservation conditions while samples from other months were kept in sub-optimal conservation conditions. The possible influences of those differences are considered in the discussion.

2.3.2. DNA extraction, libraries preparation and sequencing

Prior to all laboratory work, each sample was assigned an anonymized number and was processed in a random order to avoid confounding batch effects and temporal variation in the data. DNA was extracted from stool and toilet paper sample with PowerSoil® DNA isolation kit (MO BIO Laboratories) using the stool sample protocol provided with the kit for both types of samples. A sample-free tube was used as a negative control in the extraction process. DNA concentration for each sample was measured using Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) and then normalized to a 5 ng/μL concentration. The library preparation was performed by two-step polymerase chain reaction (PCR) method. The V4 region of the 16S ribosomal RNA gene segment was amplified in a first step PCR reaction (Step 1), set up in 25 μL volumes, each containing 5 ng/μL of template DNA, 1x of 5X Phusion HF, 1 mmol/L of each dNTP, 3 μmol of each primer (Appendix 2), Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Life Technologies) and 9.25 μL of sterile H₂O. The amplifications were performed in a Eppendorf® Mastercycler® nexus thermal cycler (Fisher Scientific), programmed with an initial denaturation step at 98°C for 30s, followed by 20 cycles at 98°C for 25s, 54°C for 40s, 72°C for 30s and a final elongation step at 72°C for 2min. PCR quadruplicates were performed for each sample, which were then pooled and purified using Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). PCR products of the expected size (350-360 pb) were verified using the QIAxel® Advanced System (QIAGEN) with the method 0M500, using 10s injections with a 30 ng/μL marker. Step-2 PCR reactions were performed to attach 9bp sequencing barcodes and Illumina® adapter sequences to each sample, using step 1 PCR purified products as template DNA. Step 2 PCR was carried out in 25 μL volume, using the same reagent concentrations as in step 1 PCR, with 4μL of Step 1 PCR products and specific primers for this step (Appendix 2). Amplifications were performed with an initial denaturation step at 98°C for 30s and 7 cycles of amplification at 98°C for 30s, 83°C for 30s, and 72°C for 30s. Three amplification replicates of each sample were performed and then pooled. Step-2 PCR products' purification and quantification were done as for Step 1. All barcoded samples were pooled together, denatured and sequenced on a MiSeq® sequencer (Illumina®). Paired end sequencing (2 x 250bp) was performed using MiSeq® reagent Kit V2 (Illumina®). Samples were sequenced in two batches producing a total of

7,962,457 reads with an average of 38,020 reads per samples. Q score was greater than Q30 for 93 % of reads.

2.3.3. OTU picking

Using the SmileTrain pipeline (<https://github.com/almlab/SmileTrain/wiki>), chimera filtering, paired-end joining and post-clustering dereplication were performed on raw sequences using USEARCH v. 7.0.1090 (Edgar 2010). Operational taxonomic units (OTUs) were called from the filtered reads, using a distribution-based clustering method, with *otu_caller.py* script from SmileTrain. Based on dbOTUcaller algorithm (Preheim *et al.* 2013), this clustering method takes into account the distribution of DNA sequences across samples and as well as sequences distances. Subsequent analyses were performed using QIIME software version 1.8.0. (Caporaso *et al.* 2010). Using *assign_taxonomy.py* script, taxonomy was assigned to samples at a 97% identity level with GreenGenes database version 13_8 (McDonald *et al.* 2012). To produce a filtered OTU table, used for the majority of the subsequent analysis, OTUs with fewer than 10 observations across all samples were filtered from the OTU table using *filter_otus_from_otu_table.py* script. In parallel, an unfiltered table including rare OTUs was kept to perform alpha diversity analyses. Each sample was then rarefied to 10,000 reads using the *single_rarefaction.py* script, yielding two rarefied OTU tables, one filtered for rare OTUs and one unfiltered. Twelve samples were eliminated by this step (<10,000 reads), including PCR negative controls and majority of extraction negative controls, leaving a total of 172 samples remaining for all downstream analyses. The four remaining negative samples clustered with microbiome samples in a PCoA ordination. To check for potential contamination, samples were compared across rows, columns and sections, according to their location in the 96 wells-plates used for library preparation, using Permanova (Anderson 2001) with the R vegan package (Oksanen *et al.* 2007). No correspondence between negatives and their proximate samples were observed ($p > 0.05$). Aside from negative controls, no samples were eliminated from the study, based on read quality and the apparent absence of a strong link between negative and actual samples.

2.3.4. Statistical analysis

Except where noted, R software (R development core team 2008) and packages were used for all statistical analyses. A threshold of $\alpha = 0.05$ was considered statistically significant.

To assess alpha diversity within each sample, four metrics were computed from the unfiltered OTU table (i.e., containing rare OTUs with fewer than 10 observations across all samples) using the phyloseq package (McMurdie and Holmes 2013). Observed OTUs is a metric that counts the number of distinct OTUs in every sample. Chao1 is a non-parametric community richness estimator (Hughes *et al.* 2001), whereas Shannon and Simpson indices are diversity estimators considering both community richness and evenness. To compare alpha diversity estimates obtained from paired stool and toilet paper samples from the same individual, a paired t-test was performed for each metric.

To perform beta diversity analysis between samples, distance matrices were computed from the filtered OTU tables to avoid any biases caused by the presence of rare OTUs. Jenson-Shannon divergence (JSD), unweighted UniFrac, and weighted UniFrac distances were calculated using the phyloseq package. JSD is a distance measure based on Shannon entropy (Lin 1991), whereas UniFrac uses distances between samples on a phylogenetic tree, either accounting for the relative abundance of OTUs (weighted) or not (unweighted) (Lozupone *et al.* 2011). Principal coordinate analyses (PCoA) were then calculated from the resulting distance matrices using the ggplot2 package (Wickham 2009). Before computing the ordinations, the Euclidean nature of the distances was verified with the ade4 package (Dray and Dufour 2007). A square-root transformation was applied when Euclidean property was not respected (the majority of cases, except for fig. S7-A- Unweighted UniFrac), ensuring an accurate representation of distances. Sample clustering hypotheses were tested using a permutational multivariate analysis of variance (permanova) whereas homogeneity of dispersion among sample groups was assessed using the betadisper function (Anderson *et al.* 2006). Permanova was selected because it has been shown to be more powerful than other tests to detect differences in community structure, even when group dispersions are heterogeneous (Anderson and Walsh 2013). To compare distance matrices computed from toilet paper and stool samples from the same individual, a

Mantel (1967) test was computed using the *ade4* package. All permutations tests were based on 9999 iterations.

Information about food consumption, collected with dietary questionnaires, was compiled in a tabular matrix. Similar food categories were grouped to limit the number of variables and avoid highly correlated variables (Appendix 3). The mean number of servings per day (\pm standard deviation) of the different food categories was calculated for each sample, from 48 hours dietary recall information provided in the questionnaires. Food categories were then used as an explanatory variable in a redundancy analyses (RDA) computed on squared-root-transformed unweighted UniFrac distances, using the R *vegan* package. A scaling of 2 was used to provide optimal visualization of the explanatory variables. An adjusted R^2 statistic was computed to produce an unbiased estimator of explained variation, accounting for the number of predictors in the model.

We used linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) (Segata *et al.* 2011) to identify differentially abundant phyla and genera between groups of samples (Afgan *et al.* 2016). This analysis combines a Kruskal-Wallis test, followed by an LDA step. The subset of OTUs violating the null hypothesis of the Kruskal-Wallis test serves to build the LDA model. From this model, each OTU is assigned an LDA score to assess its association with the categorical variables of interest (e.g. geography, gender). A Fisher's exact test was used to examine the association between gender and toilet paper samples categories, from genera identified by LEfSe as prevalent within those categories (LDA score > 2).

To investigate the stability of microbiome diversity within individuals over time, we computed the same four alpha diversity metrics for each sample, as described above (Observed OTUs, Chao1, Shannon, Simpson). Mean alpha diversity values were calculated for each individual. We then defined the dispersion as the absolute difference in alpha diversity from each sample from an individual to that individual's mean alpha diversity value. We pooled the dispersion values separately for individuals from Montreal or Nunavut. To compare the two populations, a permuted t-test with 9999 permutations was used to assess the statistical significance of the difference in dispersion for each alpha diversity measure.

2.4. Results

2.4.1. Stool and toilet paper provide similar but non-identical pictures of the microbiome

To compare sampling methods, we obtained and sequenced stool and toilet paper samples produced in pair at a same time point by participants, with seven participants sampled twice within more than one-year interval ($n = 28$ pairs). We found that stool and toilet paper samples did not differ significantly in terms of OTU richness and diversity (paired t-test, $p > 0.05$) (Figure 1.A and Figure S2). However, we observed significant differences in microbial community composition between stool and toilet paper samples, explaining 2.8-4.8% of data variation depending on the metric (Figure 1.B and Figure S3). Dispersion was homogeneous in toilet paper and stool samples, both with weighted and unweighted UniFrac distances (betadisper, $p > 0.05$). Despite slight differences in community composition, most stool and toilet paper samples collected from the same individuals tended to cluster together in PCoA plots based on unweighted UniFrac distances (Figure 1.B), or other distance measures among communities (Figure S3). A Mantel test comparing unweighted UniFrac distances among individuals based on the paired samples showed higher correlation ($r = 0.476$; $p = 0.0001$), whereas Mantel tests comparing JSD distances ($r = 0.343$; $p = 0.0380$) and weighted UniFrac distances ($r = 0.223$; $p = 0.0001$) revealed a higher level of divergence between stool and toilet paper samples (Figure S4). Therefore, the community composition of toilet paper samples assessed with unweighted UniFrac is most reliable with stool, and this measure of beta diversity was used for further analyses of toilet paper samples. LEfSe identified 27 bacterial genera prevalent in toilet paper, and 10 genera associated with stool samples (LDA score > 2) (Table S1). From the 27 genera associated with toilet paper, 5 were prevalent in women (*Bifidobacteriaceae*, *Megasphaera* *Moryella*, *Gemalla* and *Aerococcaceae*), and 2 in men (*Prevotella* and *Sutterella*) (Table S2). A Fisher's exact test conducted for genera association with gender and toilet paper shows that there is no significant association between those two classifications ($p = 0.1621$), indicating that, overall, there is no large gender-bias in toilet paper samples. Overall, these results show that toilet paper provides a similar sampling of

the gut microbiome as stool samples, with notable differences, probably due to the sampling of skin and genital microbes on toilet paper.

2.4.2. Individuality, geography and gender shape microbiome composition

Having established that toilet paper and stool samples have similar microbiome compositions, we proceeded to analyze the remaining 128 toilet paper samples, across 15 individuals from Nunavut and 9 individuals from Montreal (average of 5 time points per individuals). On average, slightly more OTUs were observed in Montreal compared to Nunavut, but other measures of alpha diversity were similar (Figure S5). We found a significant clustering of microbiomes according to geography (Montreal or Nunavut), explaining 3-5% of variation in community structure, depending on the metrics employed (Figure 2.A and Figure S6.A). Gender (male or female) explained about 3-4% of the variation (Figure 2.B and Figure S4.B). Individuality (participant identity) was a much stronger driver of community structure, explaining between 44% and 60% of the data variation, depending on the metrics (Figure 2.B and Figure S4.B). All tests of multivariate dispersion were significant, (betadisper, $p < 0.05$), with greater dispersion in the Nunavut samples compared to Montreal, and in women compared to men.

LEfSe revealed four phyla more prevalent in Montreal (Firmicutes, Tenericutes, Elusimicrobia, Lentisphaerae) and one in Nunavut (Fusobacteria) (LDA score > 2) (Table S3). LEfSe also revealed 2 divergent phyla associated with gender, Bacteroidetes being more prevalent in men, and Spirochaetes in women. At the genus level, 24 genera were more prevalent in women, and 16 in men (Table S2).

2.4.3. Diet contribution to microbiomes in Montreal and Resolute

The Inuit of Nunavut are in the midst of a dietary transition, from a highly traditional to a more westernized diet (Sharma 2010, Kuhnlein 2004). Based on our dietary surveys, we established that most types of foods were consumed with similar frequencies in Montreal and Nunavut, except for cooked, raw, and fermented game meats, which were exclusively consumed in Nunavut (Figure 3.A). On the other hand, fruits, vegetables, and alcoholic beverages were more frequently consumed in Montreal (Figure 3.A). As food

servings were self-reported by the participants, this information was deemed semi-quantitative and was not used for statistical tests. To assess the extent of variation in microbiome community composition explained by food, an RDA using only the self-reported number of serving of food categories as explanatory variables was thus performed. A significant model explaining 12% of community structure variation is illustrated in Figure 3.B. Notably, when microbiome samples cluster by food category, they also cluster according to geography (Figure 3.B), highlighting the contrasting diets of Montreal and Nunavut. For example, raw game meat, raw fish, and coffee are associated with microbiomes samples from Nunavut, whereas fruits and vegetables, cooked meat, and alcohol are associated with Montreal samples. These dietary factors also explain much of the variation in microbiome composition. On the other hand, tea, cooked fish, cooked meat, and grains represent the food categories associated with either location, indicating similar consumption within both groups.

2.4.4. Temporal variations of the Inuit microbiome

We expected that the Inuit microbiome would vary seasonally, while the Montreal microbiome would not (because commercial foods are available all year long). Contrary to this expectation, we observed no significant clustering of microbiomes according to season (or month) in either Nunavut or Montreal (Figure S7, permanova $p > 0.05$). Multivariate dispersion among months and seasons were similar in Montreal (betadisper $p > 0.05$), but not in Nunavut (betadisper $p < 0.05$). Consistent with this greater variability of beta diversity among individuals in Nunavut, two measures of alpha diversity (Shannon and Simpson) also varied more within individuals over time in Nunavut compared to Montreal (permutational t-test, $p < 0.05$), suggesting a more dynamic microbiome in Nunavut (Figure 5).

Microbiomes were sampled as consistently as possible in Nunavut and Montreal, but Nunavut toilet paper samples were stored longer at room temperature during shipping. To assess the impact of sample storage on our results, we compared a set of "optimally conserved" toilet paper samples from Resolute (frozen at -80°C within 24 hours of sampling, exactly as in Montreal) to "sub-optimal" samples that were stored at room

temperature for several days before freezing. We detected no significant differences in alpha diversity between optimal and sub-optimal Nunavut samples (Wilcoxon-test, $p > 0.05$) with four diversity estimates (Figure S8). Furthermore, no significant effect of conservation methods was observed in beta diversity (permanova $p > 0.05$), and dispersion across samples was similar for the three distance measures employed (betadisper $p > 0.05$). These results suggest that subtle differences in sample conservation are unlikely to explain the observed differences in alpha and beta diversity stability between Montreal and Nunavut.

2.5. Discussion

2.5.1. Stool and toilet paper provide similar but non-identical pictures of the microbiome

Temporal sample collection in remote communities, with no field coordinator always on location, forced us to use adapted strategies to facilitate collection and shipping of samples. Consequently, we collected mainly toilet paper containing stool, instead of stool, to sample the gut microbiome. Although this method has been used in previous studies (Flores *et al.* 2014, Stewart *et al.* 2016), divergence between stool and toilet paper sample was never compared. We hypothesized that these collection methods would provide distinct results due to the sampling of a possibly mixed gut and skin microbiome, as well as a smaller volume of biological material obtained with toilet paper samples. Our comparative analyses show that toilet paper and stool samples exhibit non-identical (4 % of variation explained by method) but similar results, as demonstrated by significant Mantel correlations between methods. The microbial communities sampled by these methods are somewhat distinct, with a differential prevalence of specific OTUs. Namely, toilet paper samples were associated with 27 OTUs, including many genera linked with the urogenital and skin microbiome, whereas stool samples were associated with only 10 distinctive OTUs. However, no significant differences in alpha diversity measures were detected, underlying the ability of both methods to sample the gut microbiome with a similar cover of species and community structure. Unweighted UniFrac was better at preserving the relationships among gut microbiomes collected with those two sampling methods. Since

this metric only accounts phylogenetic relationships between taxa and ignores differences in relative abundance, it allowed us to focus on broad comparisons. Therefore, our results are mostly a portrait of the gut microbiome with some contribution (3-5%) of the skin and urogenital microbiome to be kept in mind.

Conservation conditions were less optimal for samples collected from August to December in Nunavut, which could also account for additional variations in the data. Previous studies have underlined the impact of conservation methods on the microbiome sampled with stool (Choo *et al.* 2015), whereas other studies were not able to detect significant differences in diversity and relative abundances profiles, even for samples stored at room temperature for weeks (Lauber *et al.* 2010, Song *et al.* 2016). In the present case, toilet paper sample may represent a dryer environment where bacterial blooms are less likely to occur. Supporting this hypothesis, we found that optimal and non-optimal samples were not significantly different, both in term of alpha and beta diversity. Therefore, we are confident that the sub-optimal conservation of samples collected in the North could not by itself explain observed differences between Montreal and Nunavut.

2.5.2. Individuality, geography and gender shape microbiome composition

Previous studies looking at temporal variations of individual microbiomes showed that within-individual differences were usually less pronounced than among-individuals differences (Costello *et al.* 2009, Turnbaugh *et al.* 2009). Microbiome composition tends to be stable over time for any given individual. Our results partly confirm this hypothesis, with participant identity explaining up to 60% of data variation. Also, clusters of samples from the same individuals were observed in PCoA plots. Nevertheless, differential multivariate dispersion among participants was observed, supporting the idea that within-individuals variation of microbiome is a personalized feature, as observed previously in other time-course studies (Flores *et al.* 2014). It appears that individuality is a major factor shaping both the composition and temporal dynamics of the gut microbiome.

Gender is known to impact the composition of the gut microbiome (Mueller *et al.* 2006, Falcony *et al.* 2016), notably with a higher abundance of *Prevotella* in males, as observed in our data. Our analysis revealed such significant differences between women

and men, probably strengthened by the toilet paper method, which also samples bacteria from the skin and the urogenital tract. Indeed, male-associated genera were previously associated with the gut microbiome. It is the case for *Prevotella*, *Bifidobacterium* and *Faecalibacterium* the top genera with highest LDA score. On the other hand, many female-associated genera have been linked to the vaginal microbiome, including *Megasphaera*, *Sneathia* and *Lactobacillus* (Zhou *et al.* 2004, Thies *et al.* 2007, Ravel *et al.* 2011), which showed the highest LDA scores. Some of those genera have been also largely associated with the gut microbiome (Walter 2008). Therefore, it is impossible to determine their provenance (gut or skin) when using toilet paper samples.

Geography has been reported as a significant driver of divergence in microbiomes, notably on account of differential lifestyle and diet (Yatsunenko *et al.* 2012). Comparison of Western diet-associated microbiome with traditional African and Papua New Guineans diet-driven microbiomes revealed important differences in terms of composition and diversity (De Filippo *et al.* 2010, Schnorr *et al.* 2014, Martínez *et al.* 2015). In a recent study on Inuit populations, Girard *et al.* (2017) found an interesting exception, where overall similarities, in term of alpha and beta diversity were observed in Montreal and Nunavut samples, based on a single time point. This resemblance may be explained by the dietary transition experienced by Nunavut population. The present time-course study, to the contrary, observed significant differences in term of beta diversity between Nunavut and Montreal samples, underlined, among others, by five different bacterial phyla associated with geography.

2.5.3. Diet contribution to microbiomes in Montreal and Resolute

The Inuit of Nunavut are known to be in the midst of a dietary transition, from a highly traditional to a more westernized diet (Sharma 2010). Our sampling captured a certain amount of raw and cooked game meat, as well as fermented meat consumption, which is unique to Nunavut participants. Fruit and vegetable availability, as well as alcohol, are limited in Nunavut. However, dietary surveys revealed that Inuit and Montrealers consume for the most part the same food groups in similar proportions, supporting the idea of an advanced level of diet transition in Resolute Bay. Some food categories co-varied with

geography, indicating significant differences between those groups. Dietary differences explained 12% of the variation in Nunavut and Montreal microbiomes samples together and are associated with geography. We found 4 phyla more prevalent in Montreal, including Firmicutes and Tenericutes, which contain bacterial genera specialized in the degradation of a variety of indigestible fibers (El Kaoutari *et al.* 2013). Grain consumption was higher among Montreal participants, which could explain this stronger prevalence. Participant from Montreal might also have access to a greater variety of products, including fresh fruits and vegetables, and therefore need a larger community of specialized bacteria to digest a wider range of complex carbohydrates. Firmicutes have also been observed in lower concentrations following a high-fat diet, which is consistent with a greater consumption of fat in Nunavut (David *et al.* 2014).

2.5.4. Temporal variations of the Inuit microbiome

A previous study of a traditional Hutterites community showed a significant shift in the gut microbiome composition between winter and summer, due to seasonal changes in diet (Davenport *et al.* 2014). In another study, Flores *et al.* (2014) found that less diverse microbiome communities correlate with more variable microbiomes through time. Here, we hypothesized that we could detect similar patterns of variations in Nunavut samples, answering to the seasonality of diet. Even if not seasonal, Nunavut samples were shown to vary significantly more over time than in Montreal, both in terms of alpha diversity (Figure 4) and beta diversity (Betadisper; Figure S6.B). However, consistent with results from Girard *et al.* (2017), alpha diversity levels were not statistically different in both locations. Such results could be explained by the opportunistic dietary habits of the Inuit, resulting in a more flexible composition of the gut microbiome over time. Food sharing and trading between families or within communities has been, and remains, a common practice, which takes place in this socio-economic model (Ford, 2009). In addition, food security is an important issue in the North, creating another factor impacting the level of food consumption. Commercial food supply is subjected to severe fluctuations, and hunting-gathering practices remain seasonally driven. In contrast, most products are available in Montreal all year long, allowing people to include a diversity of food categories in their

diets. Taken together, such differences in terms of availability, diversity, and quality of food sources in the North are affecting the traditional Inuit diet, which in turn impacts the diversity and stability of the gut microbiome.

2.6. Conclusion

We used toilet paper samples and compared it to stool samples, helping future projects to determine whether this collection method provides unbiased estimates of the gut microbiome composition. We suggest that toilet paper is a valid sampling method, to be cautiously compared with stool samples. Our results based on toilet paper samples alone thus suggest that the traditional Inuit diet has a noticeable impact on the diversity and stability of the Inuit microbiome, even if seasonality of the diet is less pronounced than expected. Whereas Inuit and Western microbiomes have been shown to be similar when compared at a single time point (Girard *et al.* 2017), our results revealed the dynamics of the gut microbiome over time. We were able to show that the Inuit microbiome is more variable within individuals than Western microbiome. Participant identity is a strong driver of the microbiome composition and dynamics, as well as food choices. To a lesser extent, geography and gender also influenced the microbiome. To better capture the real diversity of the human microbiome, time course studies should be preferred over single time points.

2.7. Author contributions

G.D., C.G., F.-J.L. and B.J.S. designed the study, G.D. and C.G. collected the samples, C.G. provided the protocols for laboratory work and bioinformatics, G.D. performed the analyses, G.D., B.J.S. and F.-J.L. wrote the manuscript, F.-J.L. and B.J.S. acquired funding for the project.

2.8. Acknowledgements

We would like to thank our field assistants Pilipoosie and Debbie Iqaluk, The Hamlet of Resolute Bay as well as the Hunters & Trappers association for their support, and the residents of Resolute Bay for their participation. We also thank all the Montreal participants, and Virginie Lemieux-Labonté, Inès Levade, and Julie Marleau for help in the lab and with data analysis.

2.9. Tables and figures

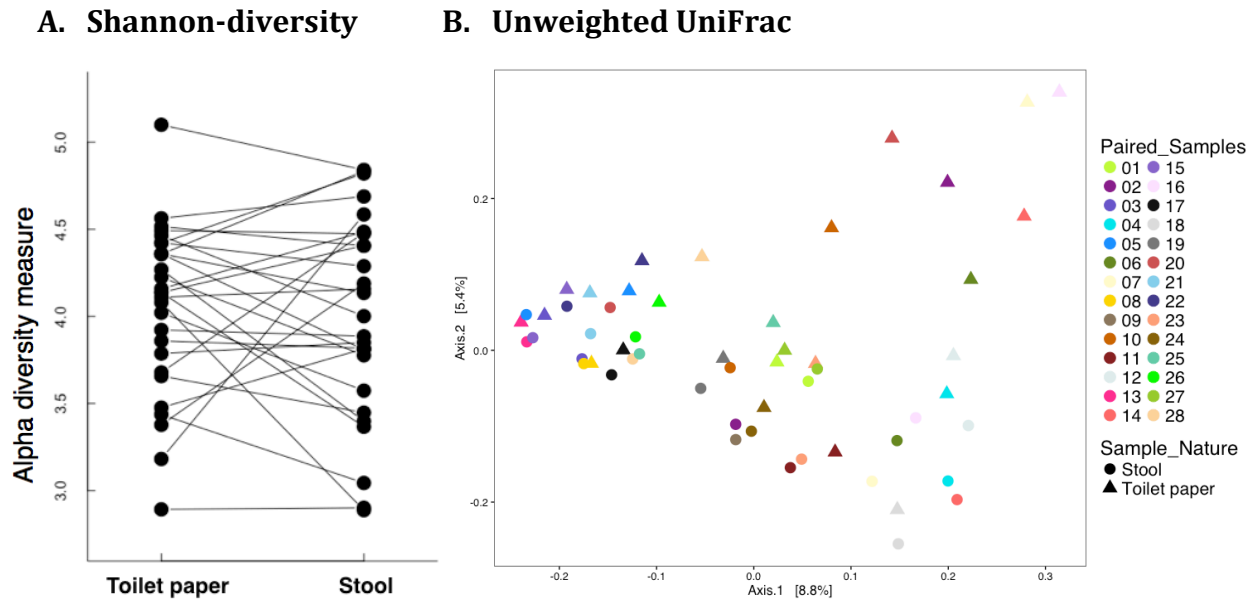
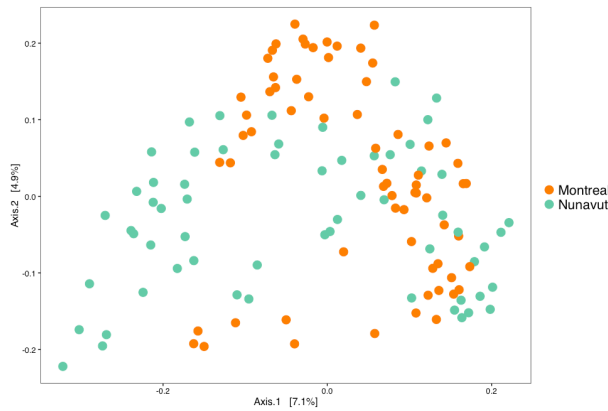


Figure 1. Paired toilet paper and stool samples from the same individual do not differ in microbial richness, but differ slightly in community composition. **A.** Comparison of Shannon alpha diversity between paired stool and toilet paper samples. No significant difference in diversity was observed (paired t-test, $p = 0.7053$). See Figure S2 for additional alpha diversity measures. **B.** Principal coordinates analysis (PCoA) of Unweighted UniFrac distances computed between paired stool and toilet paper samples (see Figure S3 for additional distances metrics). Each color represents a single individual and the shapes identify the sample type. A small but significant difference was observed between the community compositions of the two sample types (permanova $R^2 = 0.03$, $p = 0.0049$).

A. Geography



B. Participant and Gender

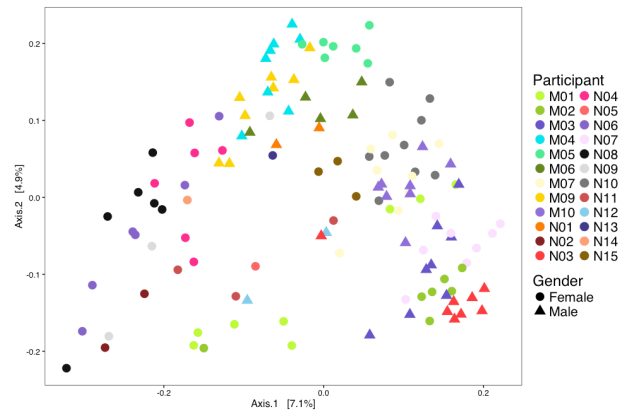


Figure 2. Microbiomes vary mainly by participant, and slightly by geography. Principal coordinates analysis (PCoA) of Unweighted UniFrac distances computed between paper toilet samples (see Figure S4 for additional distances metrics). Montreal and Nunavut microbiomes cluster by **(A)** geography (permanova $R^2 = 0.04$, $p = 0.0001$), by **(B)** participant (permanova $R^2 = 0.45$, $p = 0.0001$), and by gender (permanova $R^2 = 0.03$, $p = 0.0001$).

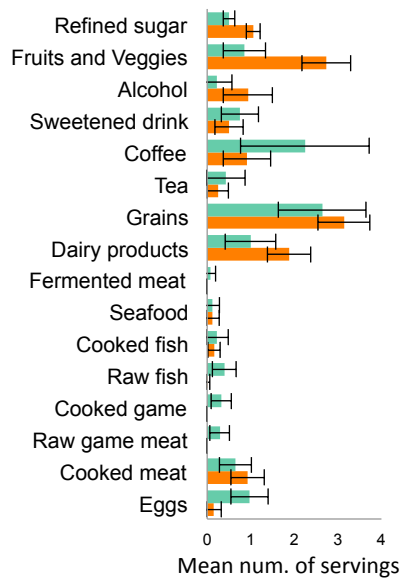
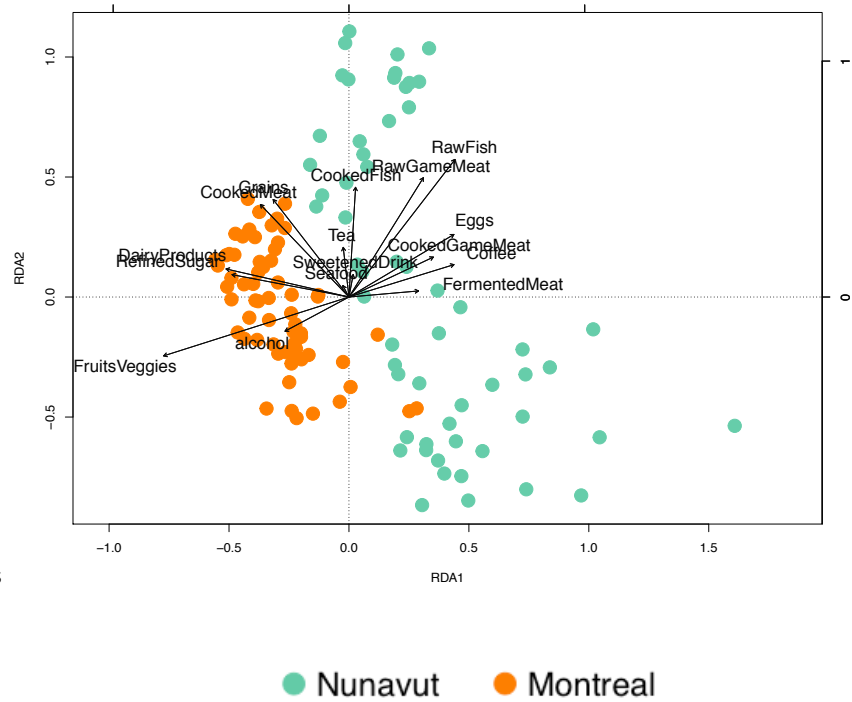
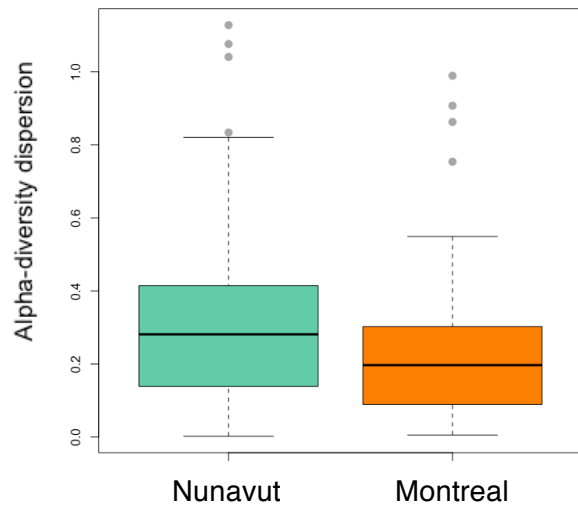
A.**B.**

Figure 3. Variation in diet explains differences in microbial community structure between Montreal and Nunavut. **A.** Bar chart showing the mean number of daily servings (+/– standard deviation) of different food groups consumed by the participants for each sample. **B.** Canonical redundancy analysis (RDA, scale=2) of Unweighed UniFrac distances calculated between the toilet paper samples from Montreal and Nunavut, with food groups as explanatory variables (adjusted $R^2 = 0.12$, $p = 0.001$).

A. Shannon



B. Simpson

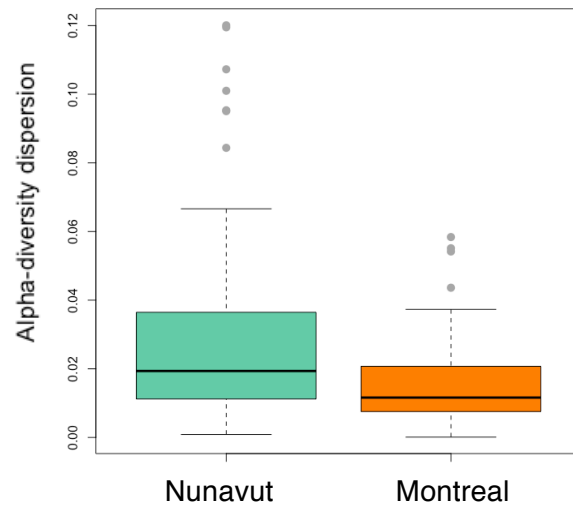


Figure 4. Greater temporal alpha diversity variation among individuals in Nunavut. Distribution of within-individual alpha diversity dispersion for Nunavut and Montreal using **A.** Shannon and **B.** Simpson diversity indices. Significant differences were observed between locations for both indices (permutational t-test, $p = 0.0061$ and $p = 0.0005$ respectively).

2.10. Supplementary Tables and figures

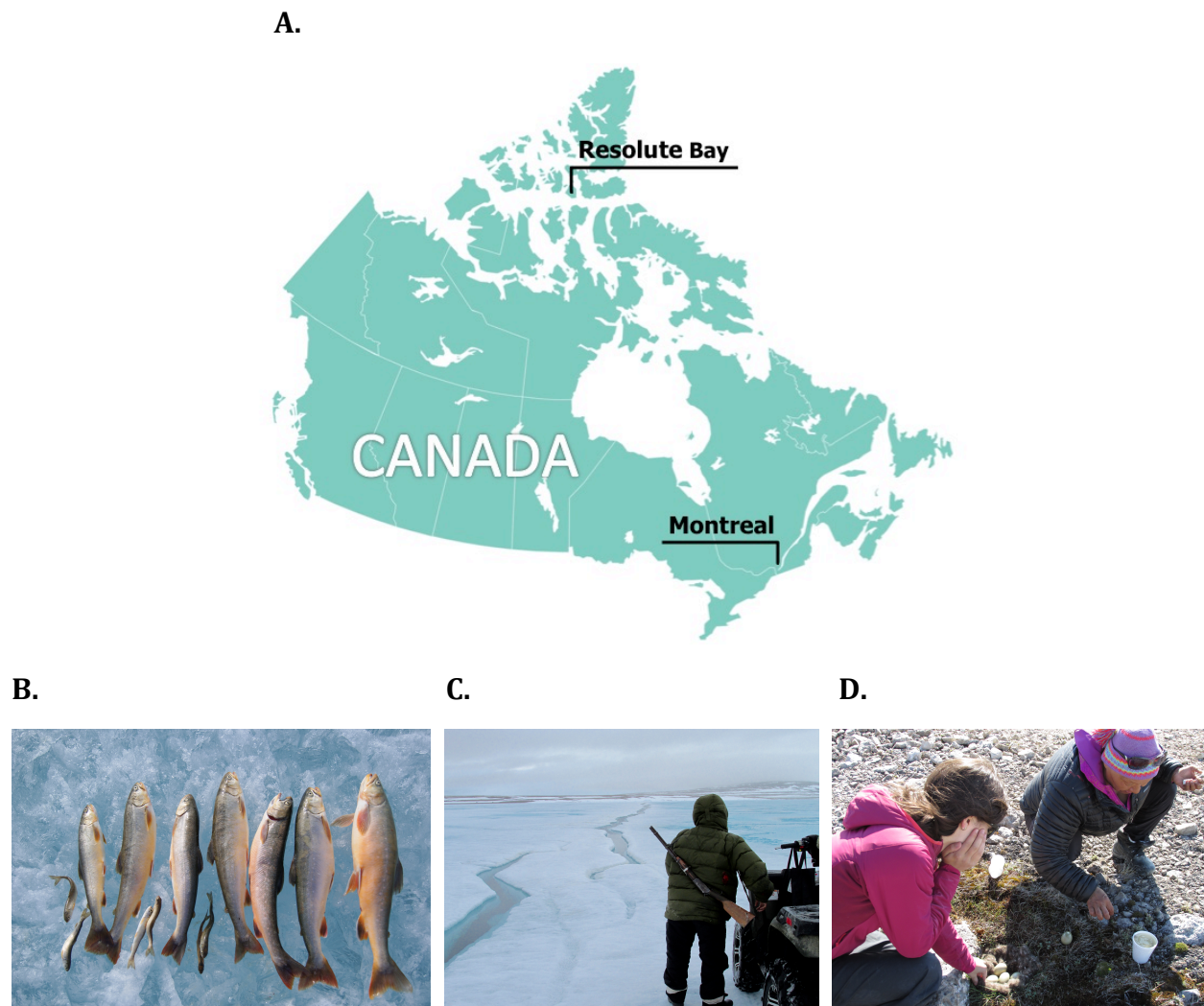


Figure S1. Sampling locations in Nunavut and Montreal and examples of Inuit hunting practices.

- A. Location of Resolute Bay (Nunavut, Canada) and Montreal (Quebec, Canada)
- B. Freshly caught Arctic char
- C. Seal hunting during summer
- D. Gathering of wild bird eggs

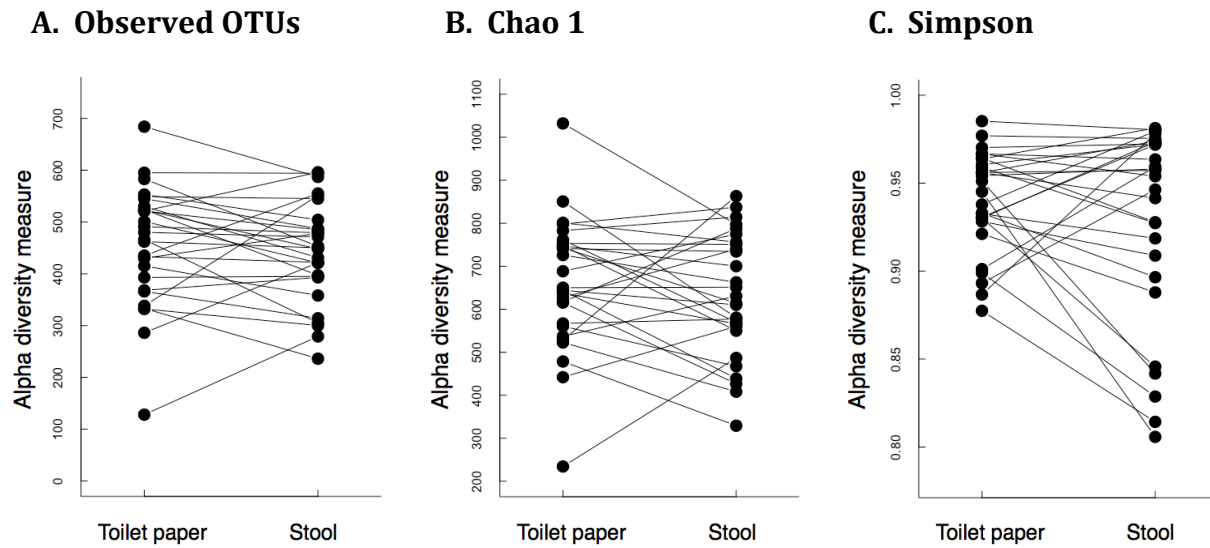
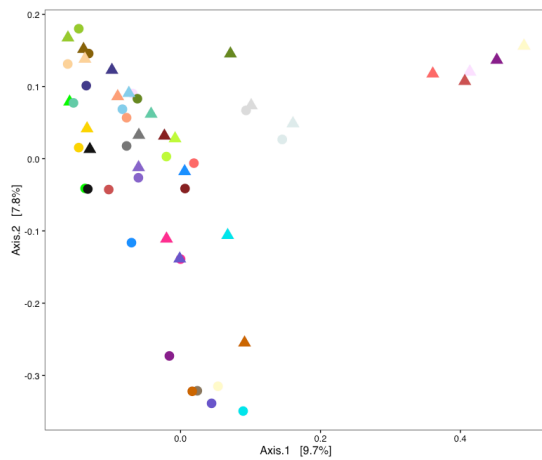


Figure S2. Comparison of alpha diversity estimates between paired stool and toilet paper samples. No significant difference between methods were observed in (A) observed OTUs (paired t-test, $p = 0.3726$), (B) Chao1 (paired t-test, $p = 0.3187$) and (C) Simpson (paired t-test, $p = 0.2915$).

A. Weighted UniFrac



B. Jenson-Shannon divergence

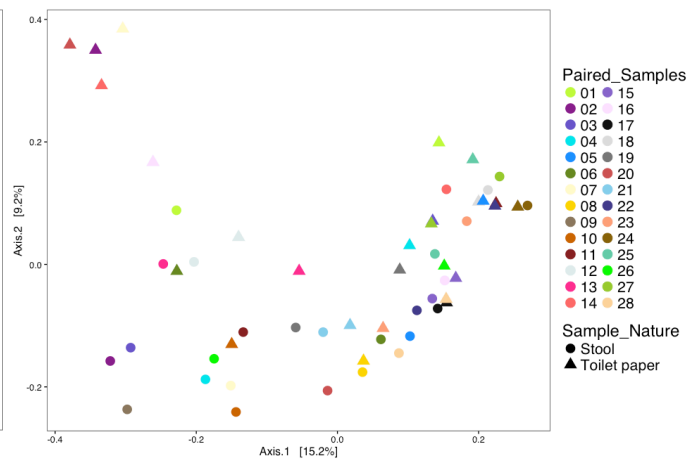
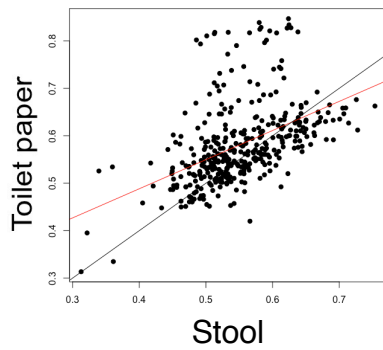
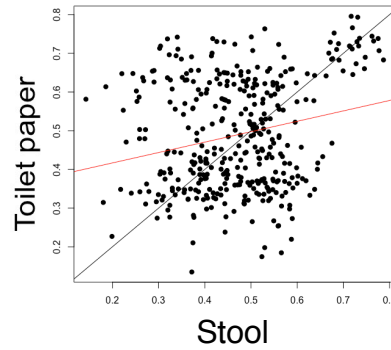


Figure S3. Comparison of beta diversity between paired stool and toilet paper samples. Principal coordinates analysis (PCoA) of **A.** weighted UniFrac distances, and **B.** Jenson-Shannon divergence computed between paired stool and toilet paper samples. The different colors represent sample pairs and the shapes indicate sample types. Significant differences were observed between the two sampling types, both with weighted UniFrac distances ($R^2 = 0.048$, $p = 0.0069$) and Jenson-Shannon divergence ($R^2 = 0.028$, $p = 0.0265$).

A. Unweighted UniFrac
Mantel statistic : 0.477
 $p = 0.0001$



B. Weighted UniFrac
Mantel statistic : 0.223
 $p = 0.038$



C. JSD
Mantel statistic : 0.343
 $p = 0.0001$

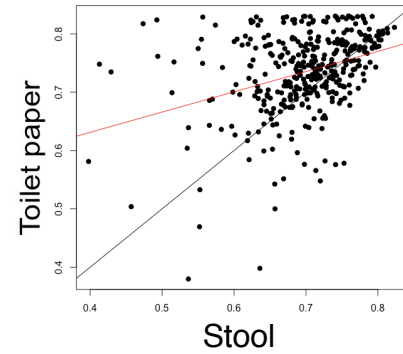


Figure S4. Unweighted UniFrac distance metric offers a more comparable portrait of microbiome beta diversity with toilet paper and stool. Scatter plot of distances between paired samples obtained with stool and toilet paper for **(A)** unweighted UniFrac distances, **(B)** weighted UniFrac distances, and **(C)** Jensen-Shannon divergence. Results of Mantel tests are provided for each metric.

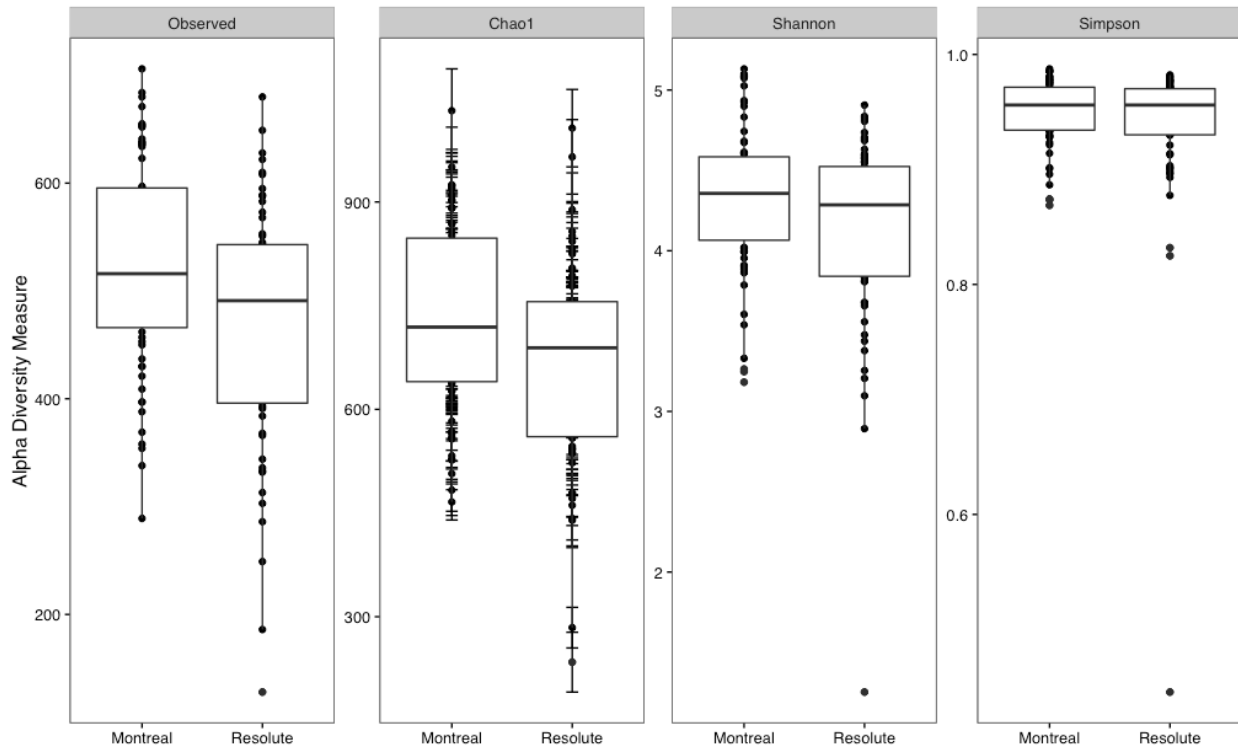
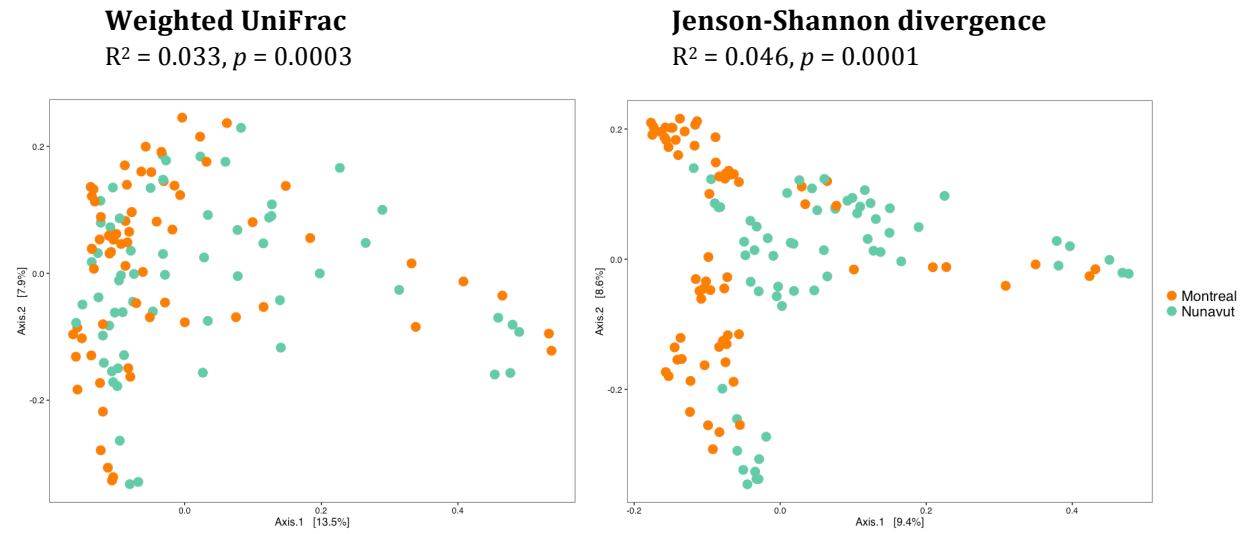


Figure S5. Similar levels of richness and diversity are observed in Nunavut and Montreal samples. Comparison of alpha diversity value distributions across Montreal and Nunavut samples, using observed OTUs, Chao1, Shannon, and Simpson indices. Observed OTUs is the only measure revealing significant differences between locations (Wilcoxon-test, $p = 0.0179$).

A. Geography



B. Participant and Gender

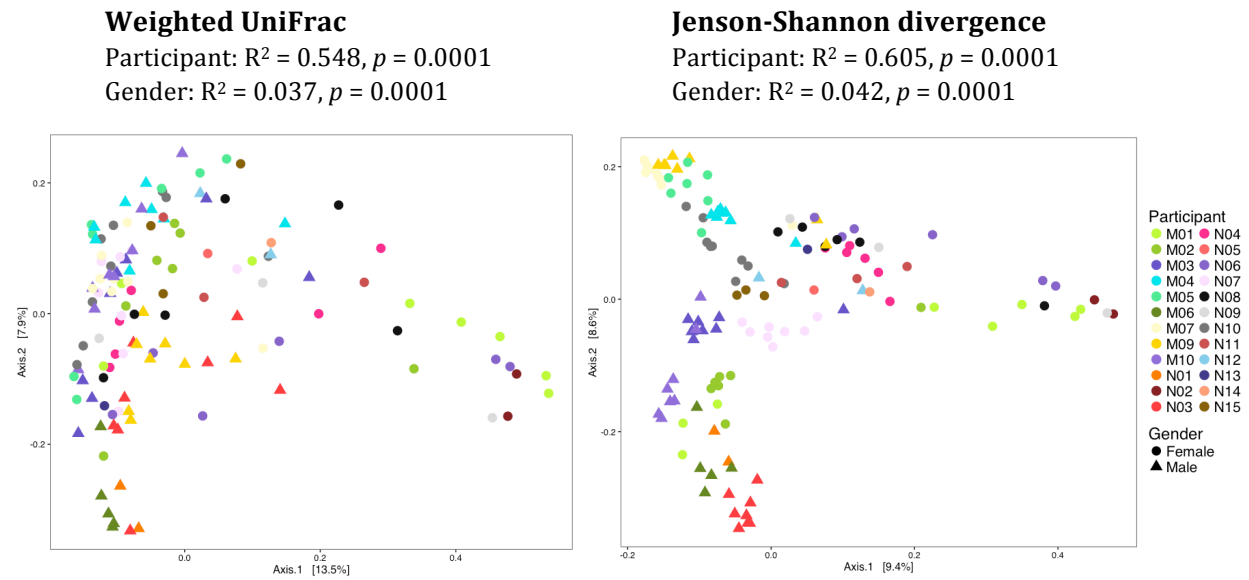
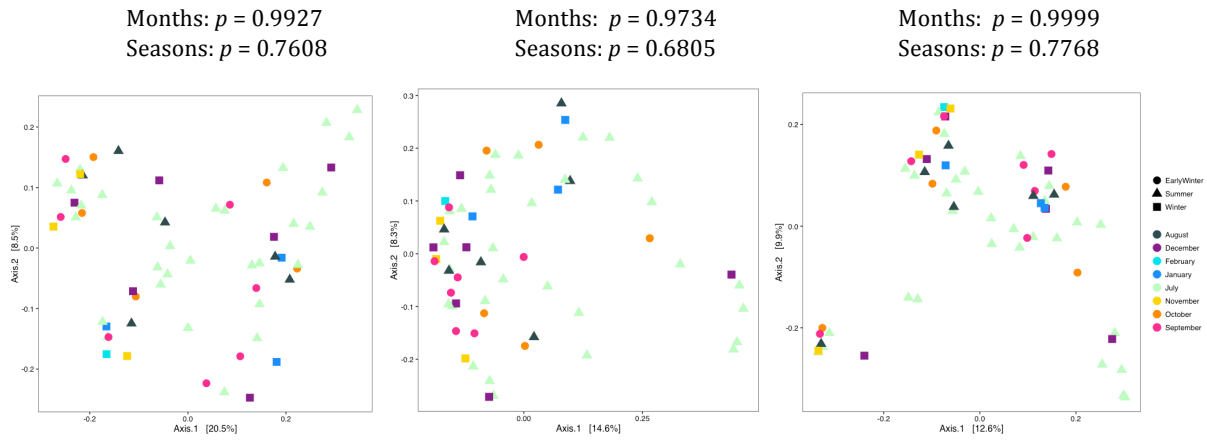


Figure S6. Geography, participants and gender viewed with additional distance metrics. Principal coordinates analysis (PCoA) of weighted UniFrac distances and Jenson-Shannon divergence computed between paper toilet samples. Montreal and Nunavut gut microbiomes cluster by (A) geography, by (B) participants and by gender. Results of permanova are provided for each comparison. Multivariate dispersions among groups (geographic, gender, or participant) were all significantly different (betadisper, $p < 0.05$).

A. Nunavut



B. Montreal

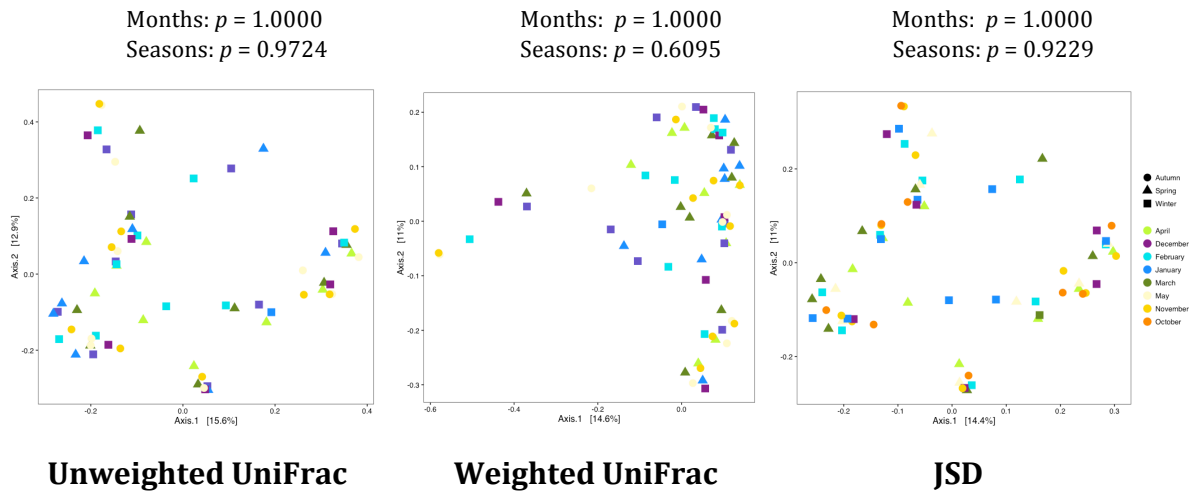


Figure S7. No clear temporal or seasonal clustering of samples in either Nunavut or Montreal. Principal coordinates analysis (PCoA) of unweighted UniFrac, weighted UniFrac, and Jensen-Shannon divergence computed between paper toilet samples from Nunavut and Montreal. Permanova p -values are provided for each metric.

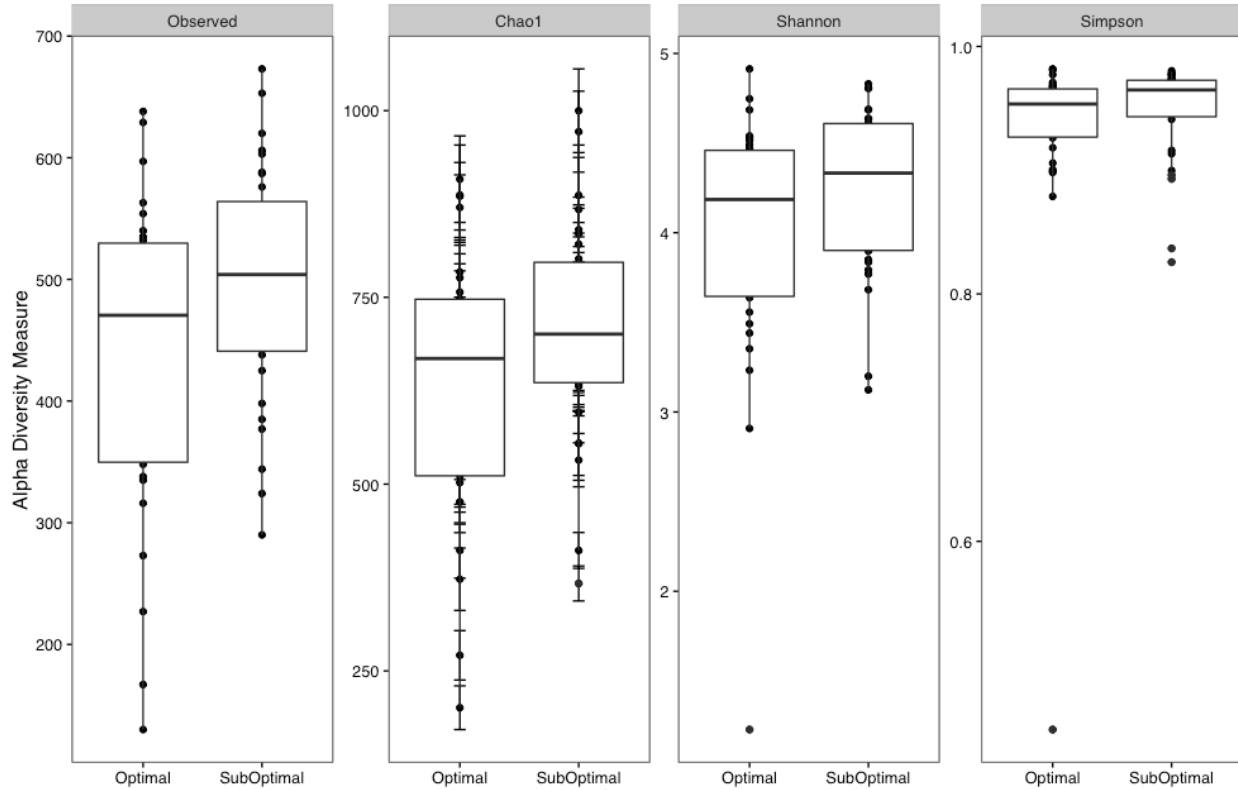


Figure S8. No significant difference in diversity between optimal and sub-optimally conserved samples. Alpha diversity comparisons between sub-optimal and optimal conservation of the toilet paper samples, using four different metrics. All comparisons are not significantly different (Wilcoxon $p > 0.05$), except observed OTUs (Wilcoxon $p = 0.05$).

Table S1. Differentially abundant taxa between stool and toilet paper samples. Bacterial taxa identified as more prevalent by LEfSe analysis (LDA score >2) in either stool or toilet paper samples are shown, along with their associated LDA score.

Stool samples	
Phylum.Class.Order.Family.Genus	score
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae	4.54
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Bifidobacteriales.Bifidobacteriaceae.Bifidobacterium	3.96
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae	3.49
Archaea.Euryarchaeota.Methanobacteria.Methanobacteriales.Methanobacteriaceae.Methanobrevibacter	3.40
Bacteria.Cyanobacteria.Chloroplast.Streptophyta	3.30
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Other.Other	3.14
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Coproccoccus	3.03
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiaceae	2.94
Archaea.Euryarchaeota.Methanobacteria.Methanobacteriales.Methanobacteriaceae.Methanosphaera	2.53
Bacteria.TM7.TM73	2.14
Toilet paper samples	
Phylum.Class.Order.Family.Genus	score
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella	4.54
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Bifidobacteriales.Bifidobacteriaceae.Other	4.50
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Megasphaera	4.12
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.WAL1855D	3.55
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.Anaerococcus	3.48
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyrimonadaceae.Porphyrimonas	3.47
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.Sutterella	3.47
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.Peptoniphilus	3.44
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Dialister	3.30
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiaceae.Clostridium	3.17
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.168	3.04
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.Finegoldia	3.01
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Aerococcaceae.Aerococcus	2.90
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Moryella	2.87
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.Parvimonas	2.81
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.ph2	2.81
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Mogibacteriaceae.Other	2.80
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Peptostreptococcaceae.Peptostreptococcus	2.73
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Corynebacteriaceae.Corynebacterium	2.72
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Other	2.72
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.Gallicola	2.64
Bacteria.Proteobacteria.Epsilonproteobacteria.Campylobacteriales.Campylobacteraceae.Campylobacter	2.63
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Gemellales.Gemellaceae.Gemella	2.60
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Tissierellaceae.Other	2.59
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Actinomycetaceae.Mobiluncus	2.58
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Actinomycetaceae.Varibaculum	2.56
Bacteria.TM7.TM73.I025.Rs045	2.47

Table S2. Differentially abundant taxa between genders. Bacterial taxa identified by LEfSe (LDA score >2) as being associated with host gender, and their associated LDA score. Taxa identified as associated with toilet paper (Table S1) are shown in bold.

Female samples	
Phylum.Class.Order.Family.Genus	Score
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Bifidobacteriales.Bifidobacteriaceae.Other	4.36
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Other	4.14
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Megasphaera	3.78
Bacteria.Fusobacteria.Fusobacteriia.Fusobacteriales.Leptotrichiaceae.Sneathia	3.70
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Lactobacillaceae.Lactobacillus	3.52
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.S247	3.39
Bacteria.Spirochaetes.Brachyspirae.Brachyspirales.Brachyspiraceae.Brachyspira	3.18
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Other	3.17
Bacteria.Firmicutes.Erysipelotrichi.Erysipelotrichales.Erysipelotrichaceae.Eubacterium	3.08
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Shuttleworthia	2.95
Bacteria.Actinobacteria.Coriobacteriia.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae.Adlercreutzia	2.84
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Megamonas	2.83
Bacteria.Synergistetes.Synergistia.Synergistales.Synergistaceae.Other	2.67
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Micrococcaceae.Rothia	2.54
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Moryella	2.46
Bacteria.Proteobacteria.Alphaproteobacteria.RF32	2.46
Bacteria.Tenericutes.Mollicutes.Mycoplasmatales.Mycoplasmataceae.Ureaplasma	2.38
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Actinomycetaceae.Other	2.35
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Gemellales.Gemellaceae.Gemella	2.28
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Anaerotruncus	2.28
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Aerococcaceae.aerococcus	2.21
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae	2.15
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Peptococcaceae.Peptococcus	2.06
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Actinomycetaceae.Arcanobacterium	2.03
Male samples	
Phylum.Class.Order.Family.Genus	Score
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella	4.81
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Bifidobacteriales.Bifidobacteriaceae.Bifidobacterium	3.73
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Faecalibacterium	3.65
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Barnesiellaceae	3.42
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.Sutterella	3.20
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Phascolarctobacterium	3.12
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Paraprevotellaceae.Other	3.02
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Lachnospira	2.89
Bacteria.Actinobacteria.Coriobacteriia.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae.Collinsella	2.86
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Paraprevotellaceae.Paraprevotella	2.86
Bacteria.Tenericutes.Mollicutes.Anaeroplasmatales.Anaeroplasmataceae	2.54
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.Other	2.53
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Comamonadaceae	2.50
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Turicibacterales.Turicibacteraceae.Turicibacter	2.48
Bacteria.Actinobacteria.Coriobacteriia.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae.Slackia	2.10
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Peptococcaceae	2.05

Table S3. Differentially abundant taxa between Nunavut and Montreal samples.
 Bacterial phyla revealed as more prevalent by LEfSe analysis (LDA score >2) in either Nunavut or Montreal samples and their associated LDA score.

Nunavut samples	
Phylum.Class	score
Bacteria.Fusobacteria	3.41
Montreal samples	
Phylum.Class	score
Bacteria.Firmicutes	4.17
Bacteria.Tenericutes	2.94
Bacteria.Elusimicrobia	2.82
Bacteria.Lentisphaerae	2.57

2.11. Appendix

2.11.1. *Appendix 1 – Dietary habits questionnaire*

DIETARY HABIT QUESTIONNAIRE

Project title

Temporal variation of the Inuit gut microflora in response to seasonal dietary changes

Researchers

- Geneviève Dubois: M. Sc. candidate, fieldwork coordinator
 - o Address:
 - o Telephone:
- Catherine Girard: Ph. D. candidate, associate researcher
 - o Address:
 - o Telephone:
- François-Joseph Lapointe: professor, supervisor
 - o Address:
 - o Telephone:
- Jesse Shapiro: co-supervisor
 - o Address:
 - o Telephone:

Information on participant

Participant number:

Participant age:

Health state

1. In the last month, have you been sick (diarrhea, vomiting)?
Yes No
2. In the last month, did you take any antibiotics?
Yes No
3. In the last month, have you been taking any prescription drugs?
Yes No
4. In the last month, did you become you pregnant?
Yes No

Daily diet

This section concerns your food consumption in the **last two days**.

1. Meat, fish, and seafood

In the last two days, did you eat **meat, fish or seafood**? Yes No

If you answered yes, check the boxes indicating what you ate, how you ate it, and indicate how many meals:

- | | | |
|---|--|----------------------|
| <input type="checkbox"/> Chicken | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Turkey | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Goose or duck | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Ptarmigan | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Eggs | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Polar bear | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Muskox | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Caribou | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Arctic Hare | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Seal | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Walrus | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Whale | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Cow meat (steak, hamburger, etc.) | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Pork meat (bacon, ham, chops, etc.) | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Other mammals: _____ | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Market fish | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Arctic char | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Other fishes (caught in Resolute Bay): _____ | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Oysters, mussels, scallops | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Other seafood (shrimps, crab, etc.) | Cooked <input type="checkbox"/> Raw <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |

3. Dairy products

In the last two days, did you eat **dairy products**? Yes No

If you answered yes, check the boxes indicating what you ate, and indicate approximately how many meals:

- | | |
|---|----------------------|
| <input type="checkbox"/> Cheese | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Yogurt | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Evaporated milk (canned) | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Milk | How many meals _____ |
| <input type="checkbox"/> Ice cream | How many meals _____ |

4. Grains

In the last two days, did you eat **grains**? Yes No

If you answered yes, check the boxes indicating what you ate, and indicate approximately how many meals:

- | | | | | | |
|-------------|--------------------------|----------------------|------------|--------------------------|----------------------|
| Cereal | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ | Bannock | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| Oatmeal | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ | Brown rice | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| Brown bread | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ | White rice | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |
| White bread | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ | Pasta | <input type="checkbox"/> | How many meals _____ |

5. Beverages

In the last two days, what **beverages did you drink**?

Check the boxes indicating what you drank, and indicate approximately how many glasses or cups:

- | | | |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|
| Green tea | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |
| Black tea | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |
| Coffee | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |
| Milk | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |
| Soft drink | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |
| Fruit juice | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |
| Alcohol | <input type="checkbox"/> | How many glasses/cups _____ |

6. Fruits and vegetables

In the last two days, did you eat **Fruits and vegetables**? Yes No

If you answered yes, indicate approximately how many meals included fruits or vegetables _____

7. Others

In the last two days, did you eat **sweets** or **salty snacks**? Yes No

If you answered yes, check the boxes indicating what you ate:

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| Candy, chocolate | <input type="checkbox"/> |
| Chips | <input type="checkbox"/> |
| Donuts, cake, cookies | <input type="checkbox"/> |
| Others: _____ | <input type="checkbox"/> |

6. Fruits and vegetables

In the last two days, did you eat **Fruits** and **vegetables**? Yes No

If you answered yes, indicate approximately how many meals included fruits or vegetables _____

7. Others

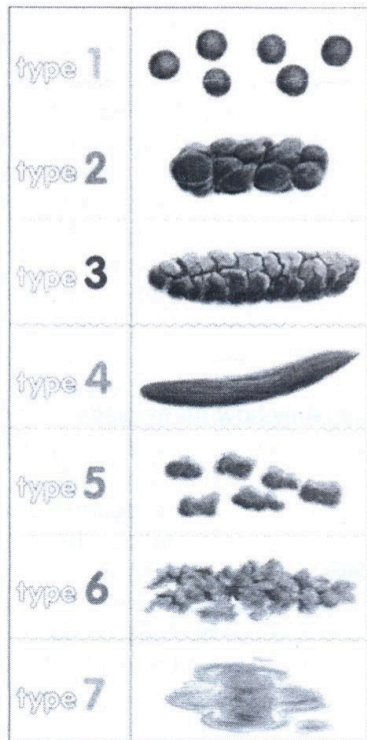
In the last two days, did you eat **sweets** or **salty snacks**? Yes No

If you answered yes, check the boxes indicating what you ate:

- Candy, chocolate
- Chips, crisps, cheese puffs
- Donuts, cake, cookies
- Others: _____

Stool consistency

Circle the picture that looks most like your stool.



2.11.2. Appendix 2 – Primer sequences

Table A1. Primers names and DNA sequences used in the two-step PCR method for library preparation.

	Primer	Sequence
Step 1	PE16S_V4_U515_F	5' ACACG ACGCT CTTCC GATCT YRYRG TGCCA GCMGC CGCGG TAA-3'
	PE16S_V4_E786_R	5'-CGGCA TTCCT GCTGA ACCGC TCTTC CGATC TGGAC TACHV GGGTW TCTAA T 3'
Step 2	PE-III-PCR-F	5'-AATGA TACGG CGACC ACCGA GATCT ACACT CTTTC CCTAC ACGAC GCTCT TCCGA TCT 3'
	PE-III- PCR-001-096	5'-CAAGC AGAAG ACGGC ATACG AGATN NNNNN NNNCG GTCTC GGCAT TCCTG CTGAA CCGCT CTTCC GATCT 3'

** Ns represent unique barcode

2.11.3. Appendix 3 – Pooled food categories

Table A2. Dietary categories from merged food types, based on dietary habit questionnaires.

Dietary Category	Food type
Alcohol	Alcohol
Coffee	Coffee
Cooked fish	Cooked market fish; Cooked arctic char; Cooked other fish
Cooked meat	Chicken; Turkey; Cowmeat; Porkmeat; Other mammal
Dairy Products	Cheese; Yogurt; Evaporated milk; Milk; Ice cream
Eggs	Raw eggs; Cooked eggs
Fermented meat	Fermented meat
Fruits and Veggies	Fruits and Veggies
Grains	Cereal; Bannock; Oatmeal; Brown rice; Brown bread; White rice; White bread; Pasta
Raw fish	Raw market fish; Raw arctic char; Raw other fish
Raw game meat	Caribou; Seal; Walrus; Whale; Ptarmigan; Goose or duck
Seafood	Raw oysters, mussels, scallops; Cooked oysters, mussels, scallops; Other seafood
Refined sugar	Candy, chocolate; donuts, cake, cookies
Sweetened drink	Soft drink; Fruit juice
Tea	Green tea; Black tea



Crédit photo : Catherine Girard

CHAPITRE 3. CONCLUSION

3.1. Conclusion Générale

L'évolution rapide des méthodes de séquençage de nouvelle génération offre une puissante résolution permettant de caractériser la diversité et la composition de vastes communautés bactériennes et est conséquemment responsable de l'important engouement scientifique envers le microbiome. Les diètes humaines, par leur influence majeure sur le microbiome intestinal, sont ainsi un sujet de grand intérêt dans le domaine, puisque les aliments que nous consommons auront des répercussions directes et rapides sur notre microbiome, lui-même très influent pour notre santé. Le dynamisme au sein de la diversité et de la structure du microbiome, en réponse à ces altérations régulières, n'est toutefois pas bien compris. Notamment, la composition de certaines diètes humaines change à travers le temps, répondant à la disponibilité saisonnière des aliments qui aura un impact temporel sur la composition du microbiome. Dans ce contexte, le présent projet de maîtrise visait principalement à caractériser les variations saisonnières du microbiome intestinal inuit en réponse à la diète traditionnelle. La consommation de cette diète hautement variable saisonnièrement, et fortement concentrée en protéines et gras animaux, a été partiellement capturée par notre échantillonnage malgré la transition alimentaire vécue par les Inuits du Nunavut qui s'alimentent de plus en plus d'aliments typiquement associés à la diète occidentale. La comparaison des variations temporelles au sein du microbiome inuit à un groupe contrôle caucasien a été possible grâce au séquençage du gène 16s de l'ARN ribosomal. Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière les particularités des variations temporelles du microbiome intestinal inuit.

La méthode utilisée pour récolter le microbiome intestinal dans ce projet, soit le papier hygiénique, a été comparée à la méthode de la collecte de selles pour la première fois dans notre étude. Nous avons pu observer que ces deux méthodes offrent des portraits globalement similaires du microbiome. Il faut toutefois noter que l'utilisation de papier hygiénique peut, dans certains cas, récolter des bactéries provenant du microbiome épithélial et génital, ce qui pourrait affecter les résultats des analyses et limiter les comparaisons possibles avec la littérature. Cependant, un choix judicieux d'outils analytiques pour l'étude de la diversité bêta peut minimiser les différences potentielles

entre ces méthodes. Nous considérons que les résultats obtenus peuvent être comparés à la littérature en ce qui a trait à la diversité bêta qui se base sur le calcul de distances entre les échantillons et non sur un calcul de diversité alpha au sein d'un échantillon. Par ailleurs, le papier hygiénique semble avoir très bien répondu à des conditions de conservation plus ou moins optimales. En raison des conditions de terrain particulières à notre étude, la congélation immédiate des échantillons n'était pas réalisée en l'absence de l'équipe de terrain sur place. Les échantillons récoltés, avant d'être congelés, étaient plutôt conservés un ou deux jour(s) à l'extérieur, sous une gamme de température variable [-35, 4°C], pour ensuite être expédiés par courrier à température pièce (5 à 7 jours). Ces conditions de conservation n'ont pas affecté la qualité et l'intégrité des échantillons. Prises ensemble, ces observations nous portent à croire que, dans le cadre de l'étude du microbiome intestinal, le papier hygiénique peut être utilisé pour faciliter la collecte, la conservation et le transport d'échantillons de selles.

L'identité des participants au cours du temps est fortement conservée tout au long de l'étude. Ce résultat, de concert avec la littérature, démontre l'importance de l'individualité dans la composition du microbiome. L'identité microbienne des participants est façonnée par de nombreux facteurs, dont certains ont été étudiés dans ce mémoire, tels que la géographie, la diète et le genre des individus. Ces facteurs sont probants de la singularité des participants. Nos résultats soutiennent ainsi l'idée que le microbiome est une empreinte personnalisée à chaque individu. De plus, il est relativement stable à travers le temps chez ces mêmes individus. Des variations temporelles intra-individuelles, plus ou moins accrues, en fonction des participants ont toutefois été observées. Cette observation, corroborée par la littérature, met également en évidence que, tout comme la composition bactérienne du microbiome, le taux de variation de la composition microbienne à travers le temps est également une caractéristique personnalisée du microbiome, certainement corrélée aux habitudes de vie.

Peu d'études se sont penchées sur la temporalité du microbiome. Encore moins d'études auront liées ces variations à une diète fortement variable dans le temps. Les Inuits avaient traditionnellement une diète épousant les saisons, qui s'amalgame maintenant de plus en plus avec la diète occidentale. Cependant, nos résultats indiquent que, malgré une

occidentalisation de l'alimentation, les habitudes alimentaires demeurent plus variables au Nunavut qu'à Montréal. Ces variations ne vont toutefois pas de concert avec les saisons, contrairement à ce que nous attendions. Des pratiques telles que la chasse et la pêche ainsi que l'échange ou le partage de nourriture sont sujettes au hasard, ce qui entraîne une offre alimentaire très variable. L'approvisionnement en supermarché est également sujet à la fluctuation des stocks et du marché. La pauvreté et l'insécurité alimentaire sont également des facteurs pouvant influencer fortement l'alimentation des populations nordiques. Ces changements ponctuels de la composition de la diète semblent se refléter dans la dynamique du microbiome intestinal inuit plus irrégulière temporellement qu'à Montréal. Malgré des diètes fortement similaires, d'importantes différences persistent dans l'alimentation des Inuits et des Caucasiens. D'une part, l'accès aux aliments étant plus limité au Nunavut, la consommation de fruits, de légumes et d'alcool y semble beaucoup moins fréquente.

Les études précédentes, basées sur un échantillonnage ponctuel, n'avaient pas capturé de différences globales entre la composition du microbiome intestinal des Inuits et des Caucasiens. Nos résultats permettent de mettre en évidence la singularité du microbiome inuit, dont les variations temporelles semblent suivre une diète opportuniste. Au contraire le microbiome des participants montréalais semble plus stable, en réponse à une diète également moins variable et plus prévisible dans le temps. L'étude du microbiome réalisée en un seul moment représente un arrêt sur image qui ne permet pas de saisir les fluctuations dynamiques du microbiome intestinal. La composition et la variation temporelle du microbiome sont des caractéristiques particulières des individus et des communautés. L'étude de ces deux éléments, pris de concert, nous aide à dresser un portrait plus fidèle du microbiome.

Les implications des travaux sur le microbiome humain sont nombreuses et l'exploration de ce champ de recherche est très prometteuse pour nous permettre de mieux comprendre l'impact de nos modes de vie sur notre flore intestinale. La caractérisation de la dynamique temporelle du microbiome s'inscrit dès lors dans une meilleure compréhension de l'importance de la diète en tant que facteur d'influence sur les communautés bactériennes qui nous habitent.

RÉFÉRENCES

- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., ... & Grüning, B. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, gkw343.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32-46.
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., & McArdle, B. H. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*, 9(6), 683-693.
- Anderson, M. J., & Walsh, D. C. (2013). PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing?. *Ecological Monographs*, 83(4), 557-574.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., & Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*, 86(1), 13-15.
- Beaumier, M. C., & Ford, J. D. (2010). Food insecurity among Inuit women exacerbated by socioeconomic stresses and climate change. *Canadian Journal of Public Health*, 196-201.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., ... & Kachman, S. D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18933-18938.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., ... & Gordon, J. I. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, 12(5), 1.
- Chan, H. M., Fediuk, K., Hamilton, S., Rostas, L., Caughey, A., Kuhnlein, H., ... & Loring, E. (2006). Food security in Nunavut, Canada: barriers and recommendations. *International Journal of Circumpolar Health*, 65(5).
- Choo J.M., L.E., Leong, G.B., Rogers (2015). Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Scientific Reports* 5:16350.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326(5960), 1694-1697.

- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J., & Relman, D. A. (2012). The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*, *336*(6086), 1255-1262.
- Davenport, E. R., Mizrahi-Man, O., Michelini, K., Barreiro, L. B., Ober, C., & Gilad, Y. (2014). Seasonal variation in human gut microbiome composition. *PLoS ONE*, *9*(3), e90731.
- David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., ... & Alm, E. J. (2014). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology*, *15*(7), 1.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., ... & Biddinger, S. B. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559-563.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J. B., Massart, S., ... & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(33), 14691-14696.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, *33*(1), 1-10.
- Dray, S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, *22*(4), 1-20.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308*(5728), 1635-1638.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, *26*(19), 2460-2461.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(7), 497-504.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., ... & Rosenbaum, M. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, *341*(6141), 1237439.
- Flint, H. J. (2012). The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews*, *70*(suppl 1), S10-S13.
- Flores, G. E., Caporaso, J. G., Henley, J. B., Rideout, J. R., Domogala, D., Chase, J., ... & Dunn, R. R. (2014). Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biology*, *15*(12), 1.

- Ford, J. D. (2009). Vulnerability of Inuit food systems to food insecurity as a consequence of climate change: a case study from Igloodik, Nunavut. *Regional Environmental Change*, 9(2), 83-100.
- Foster, J. A., & Neufeld, K. A. M. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, 36(5), 305-312.
- Furgal, C. M., Powell, S., & Myers, H. (2005). Digesting the message about contaminants and country foods in the Canadian North: A review and recommendations for future research and action. *Arctic*, 103-114.
- Girard, C., Tromas, N., Amyot, M., & Shapiro, B. J. (2017). Gut Microbiome of the Canadian Arctic Inuit. *mSphere*, 2(1), e00297-16.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhan, R., ... & Spector, T. D. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789-799.
- Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., & Watzl, B. (2015). Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26.
- Grönlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., & Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28(1), 19-25.
- Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Hamad, I., Sokhna, C., Raoult, D., & Bittar, F. (2012). Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from Senegal. *PLoS ONE*, 7(7), e40888.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(1), 61-67.
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., ... & Bushman, F. D. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS ONE*, 8(6), e66019.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283-307.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannan, B. J. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4399-4406.

- Islam, K. S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., ... & Yokota, A. (2011). Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, *141*(5), 1773-1781.
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., ... & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, *63*(4), 559-566.
- Kabeerdoss, J., Devi, R. S., Mary, R. R., & Ramakrishna, B. S. (2012). Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *British Journal of Nutrition*, *108*(06), 953-957.
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, *13*(5), 321-335.
- Kanno, T., Matsuki, T., Oka, M., Utsunomiya, H., Inada, K., Magari, H., ... & Iguchi, M. (2009). Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *381*(4), 666-670.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., & Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, *474*(7351), 327-336.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement 1), 4578-4585.
- Kuhnlein, H. V., Receveur, O., Soueida, R., & Egeland, G. M. (2004). Arctic indigenous peoples experience the nutrition transition with changing dietary patterns and obesity. *The Journal of Nutrition*, *134*(6), 1447-1453.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., ... & Taylor, T. D. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *Dna Research*, *14*(4), 169-181.
- Lauber, C. L., Zhou, N., Gordon, J. I., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiology Letters*, *307*(1), 80-86.
- Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PLoS ONE*, *8*(3), e59310.
- Ley, R. E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, *26*(1), 5-11.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, *124*(4), 837-848.

- Li, H., Limenitakis, J. P., Fuhrer, T., Geuking, M. B., Lawson, M. A., Wyss, M., ... & Stolp, B. (2015). The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nature communications*, 6.
- Liszt, K., Zwielehner, J., Handschur, M., Hippe, B., Thaler, R., & Haslberger, A. G. (2009). Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(4), 253-257.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, 5(2), 169.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220-230.
- Lin, J. (1991). Divergence measures based on the Shannon entropy. *IEEE Transactions on Information Theory*, 37(1), 145-151.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2 Part 1), 209-220.
- Martínez, I., Stegen, J. C., Maldonado-Gómez, M. X., Eren, A. M., Siba, P. M., Greenhill, A. R., & Walter, J. (2015). The gut microbiota of rural Papua New Guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Reports*, 11(4), 527-538.
- Matijašić, B. B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Grabnar, I., Avguštin, G., & Rogelj, I. (2014). Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European Journal of Nutrition*, 53(4), 1051-1064.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, 6(3), 610-618.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
- McNeil, N. I. (1984). The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39(2), 338-342.
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., ... & Bousvaros, A. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, 13(9), 1.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., ... & Clavel, T. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1027-1033.

- Mulle, J. G., Sharp, W. G., & Cubells, J. F. (2013). The gut microbiome: a new frontier in autism research. *Current Psychiatry Reports*, *15*(2), 1-9.
- Neu, J., Lorca, G., Kingma, S. D., & Triplett, E. W. (2010). The intestinal microbiome: relationship to type 1 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *39*(3), 563-571.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, *336*(6086), 1262-1267.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, *7*(7), 688-693.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, M. H. H., Oksanen, M. J., & Suggests, M. A. S. S. (2007). The vegan package. *Community Ecology Package*, *10*.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., ... & Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, *336*(6080), 489-493.
- Ou, J., Carbonero, F., Zoetendal, E. G., DeLany, J. P., Wang, M., Newton, K., ... & O'Keefe, S. J. (2013). Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(1), 111-120.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, *5*(7), e177.
- Preheim, S. P., Perrotta, A. R., Martin-Platero, A. M., Gupta, A., & Alm, E. J. (2013). Distribution-based clustering: using ecology to refine the operational taxonomic unit. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(21), 6593-6603.
- Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., ... & Tinahones, F. J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *95*(6), 1323-1334.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing.
- Rafter, J. J., Child, P., Anderson, A. M., Alder, R., Eng, V., & Bruce, W. R. (1987). Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *45*(3), 559-563.
- Reyes, A., Semenkovich, N. P., Whiteson, K., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2012). Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(9), 607-617.
- Rosol, R., Powell-Hellyer, S., & Chan, H. M. (2016). Impacts of decline harvest of country food on nutrient intake among Inuit in Arctic Canada: impact of climate change and possible adaptation plan. *International Journal of Circumpolar Health*, *75*.

- Savage, D. C. (1986). Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 6(1), 155-178.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., ... & Brotman, R. M. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4680-4687.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), 1.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *BioRxiv*, 036103.
- Sharma, S. (2010). Assessing diet and lifestyle in the Canadian Arctic Inuit and Inuvialuit to inform a nutrition and physical activity intervention programme. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 23(s1), 5-17.
- Sharma, S., Cao, X., Roache, C., Buchan, A., Reid, R., & Gittelsohn, J. (2010). Assessing dietary intake in a population undergoing a rapid transition in diet and lifestyle: the Arctic Inuit in Nunavut, Canada. *British Journal of Nutrition*, 103(05), 749-759.
- Schloissnig, S., Arumugam, M., Sunagawa, S., Mitreva, M., Tap, J., Zhu, A., ... & Kota, K. (2013). Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*, 493(7430), 45-50.
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., ... & Fiori, J. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications*, 5.
- Song, S. J., Amir, A., Metcalf, J. L., Amato, K. R., Xu, Z. Z., Humphrey, G., & Knight, R. (2016). Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies. *MSystems*, 1(3), e00021-16.
- Statistics Canada (2011) 2011 National Household Survey.
- Stephen, A. M., & Cummings, J. H. (1980). The microbial contribution to human faecal mass. *Journal of Medical Microbiology*, 13(1), 45-56.
- Stewart, C. J., Nelson, A., Campbell, M. D., Walker, M., Stevenson, E. J., Shaw, J. A., ... & West, D. J. (2016). Gut microbiota of Type 1 diabetes patients with good glycaemic control and high physical fitness is similar to people without diabetes: an observational study. *Diabetic Medicine*.
- Thies, F. L., König, W., & König, B. (2007). Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *Journal of Medical Microbiology*, 56(6), 755-761.
- Trait, H. (2008). Aboriginal Peoples Survey, 2006: Inuit health and social conditions. Statistics Canada, Social and Aboriginal Statistics Division.

- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., ... & Egholm, M. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, *457*(7228), 480-484.
- Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Tito, R. Y., Joossens, M., & Raes, J. (2015). Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*, gutjnl-2015.
- Walter, J. (2008). Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(16), 4985-4996.
- Wesche, S. D., & Chan, H. M. (2010). Adapting to the impacts of climate change on food security among Inuit in the Western Canadian Arctic. *EcoHealth*, *7*(3), 361-373.
- Wickham, H. (2009). ggplot2: elegant graphics for data analysis. *Springer Science & Business Media*.
- Yasuda, K., Oh, K., Ren, B., Tickle, T. L., Franzosa, E. A., Wachtman, L. M., ... & Miller, G. M. (2015). Biogeography of the intestinal mucosal and lumenal microbiome in the rhesus macaque. *Cell host & microbe*, *17*(3), 385-391.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... & Heath, A. C. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, *486*(7402), 222-227.
- Zhou, X., Bent, S. J., Schneider, M. G., Davis, C. C., Islam, M. R., & Forney, L. J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*, *150*(8), 2565-2573.