



HAL
open science

Etude du stress oxydant chez *Faecalibacterium prausnitzii*

Sandrine S. Auger, Tatiana Botin

► **To cite this version:**

Sandrine S. Auger, Tatiana Botin. Etude du stress oxydant chez *Faecalibacterium prausnitzii*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2002. hal-04328411

HAL Id: hal-04328411

<https://hal.inrae.fr/hal-04328411>

Submitted on 7 Dec 2023

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

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



Etude du stress oxydant chez *Faecalibacterium prausnitzii*

Mémoire de stage Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire parcours
microbiologie fondamentale

Université de Paris Cité

Tatiana BOTIN
1 rue des moulins
78500 Sartrouville
06.14.39.06.13

Unité MICALIS, Equipe ProbiHôte dirigée par
P. LANGELLA, groupe de Jean-Marc CHATEL

Encadré par Sandrine AUGER
(sandrine.auger@inrae.fr)

Domaine Vilvert, Jouy en Josas 78352

Numéro : 01.34.65.24.69

Remerciements :

Je ne remerciais jamais assez Sandrine AUGER pour son soutien et ses encouragements tout le long de ce stage. Je tiens à la remercier aussi de l'aide quelle m'a apportée pour la rédaction de ce mémoire.

Je remercie Jean-Marc CHATEL de m'avoir accueillie dans son groupe pour ces 6 mois de stage et de son attention.

Je souhaite remercier aussi Véronique ROBERT d'avoir été disponible pour mes interrogations et de son expertise pour la manipulation de *Faecalibacterium*.

Je tiens à remercier Isabelle MARTIN-VERSTRAETE de m'avoir accueillie au sein de son équipe et épaulée pour ma mission au sein de l'Institut Pasteur. De plus, je la remercie de m'avoir suivie, guidée et soutenue depuis mes débuts en Licence professionnelle de l'Université de Paris cité.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Probihôte pour leur accueil, leur bonne humeur et leur convivialité.

Résumé :

Le microbiote gastro-intestinal humain est composé de milliards de bactéries commensales de différentes espèces, dont la plupart sont des anaérobies obligatoires résidants dans le côlon. *Faecalibacterium prausnitzii* est une bactérie abondante du côlon, représentant jusqu'à 5% de la communauté bactérienne connue du microbiote intestinale (Hold *et al.*, 2003). Chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les conditions physico-chimiques du tube digestif (tension en oxygène, pH, acides biliaires, espèces réactives de l'oxygène (ERO)) sont modifiées. L'augmentation de la tension en oxygène et la formation d'ERO sont responsables du stress oxydant qui pourrait conduire à une dysbiose. Toutes les bactéries n'ont pas la même capacité d'adaptation. Certaines disparaîtront (*Faecalibacterium*, *Clostridia*) tandis que d'autres profiteront des nouvelles conditions de croissance (*Entérobactéries*, *Fusobactéries*). Il est observé aussi qu'au niveau sous-espèce la souche de *F. prausnitzii* L2-6 prédomine par rapport à la souche de *F. prausnitzii* A2-165 chez les patients souffrant de dermatite atopique. Lors de ce projet nous avons observé que certaines souches contiennent dans leur génome des gènes potentiellement impliqués dans la résistance au stress oxydant. Par des stress de survie à l'oxygène ambiant ou au peroxyde d'hydrogène nous avons comparé la capacité à survivre des souches L2-6 et A2-165. Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés à la réponse transcriptionnelle de la souche L2-6 suite à une exposition à l'air ambiant ou au peroxyde d'hydrogène. L'expression des gènes codants des enzymes de détoxification a été quantifiée par qPCR. Les profils d'expression obtenus nous ont guidé vers la construction d'un premier modèle de régulation chez *F. prausnitzii*. Jusqu'à présent, aucun outil génétique n'est disponible chez *F. prausnitzii* pour étudier la fonction de gènes d'intérêt. Afin de valider la fonction des potentielles enzymes de détoxification de *F. prausnitzii*, nous avons donc cherché à compléter des mutants de *C. difficile* inactivés dans des gènes codant des enzymes de détoxification de l'O₂ et/ou des ROS.

Abréviations :

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

MICI : Maladies intestinales chroniques inflammatoires

MAM : Molécule Anti-inflammatoire Microbienne

FDP : Flavodiiron protein

Rbr : Rubrerythrine

revRbr : Reverse rubrerythrine

SOR : Superoxyde reductase

O₂ : Dioxygène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

O₂^{•-} : Anion superoxyde

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ADNc : ADN complémentaires

Cm : Chloramphénicol

Amp : Ampicilline

Tm : Thiamphénicole

XTT : 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Table des matières

Introduction	1
Matériel et méthodes	6
Matériel biologique et conditions de culture	6
Test de survie sur boîte à atmosphère ambiant	7
Test de survie en milieu liquide à atmosphère ambiant	7
Détermination de la concentration minimale inhibitrice en H ₂ O ₂	8
Croissance en présence d'un stress H ₂ O ₂	8
Extraction d'ARN et quantification des ARNm par PCR quantitative	9
Construction des mutants de <i>C. difficile</i> complémentés	9
Test de survie à l'air ambiant ou de faible tension en O ₂ chez <i>C. difficile</i>	11
Résultats	11
Identification <i>in silico</i> de gènes codant de potentiels systèmes de détoxification	11
Diversité de survie à l'air de souches de <i>F. prausnitzii</i>	12
Survie à l'air en milieu liquide des souches A2-165 et L2-6	13
Diversité de survie à H ₂ O ₂ de souches de <i>F. prausnitzii</i>	16
Expression transcriptionnelle en réponse à un stress oxydant	17
Analyses <i>in silico</i> des séquences promotrices des gènes d'intérêt et proposition d'un modèle hypothétique de régulation	20
Complémentation fonctionnelle chez <i>C. difficile</i>	22
Discussion	24
Bibliographie	28
Annexe	31

Introduction

Le microbiote intestinal humain est composé de milliards de microorganismes incluant les bactéries, champignons, archées et virus. La composition du microbiote dépend de nombreux facteurs tel que l'alimentation, le mode de vie, l'âge, l'utilisation d'antibiotiques. Il joue un rôle central dans la santé humaine en tant que source principale de nombreux métabolites essentiels pour l'homme (vitamines, acides gras à chaîne courtes, ...), dans le développement et la fonction du système immunitaire, et le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale (Zheng *et al.*, 2020 ; Agus *et al.*, 2021). L'altération qualitative et fonctionnelle de la flore intestinale, appelée dysbiose, prédispose à certaines pathologies métaboliques, immunitaires ou infectieuses (Figure 1). En particulier, un déséquilibre sévère du microbiote intestinal avec la prédominance de certaines familles de bactéries (*Entérobactéries*, *Fusobactéries*), ou la raréfaction d'autres espèces (*Faecalibacterium*, *Clostridia*) a été décrit chez des personnes atteintes de maladies intestinales chroniques inflammatoires (MICI) (Figure 1) (Ni *et al.*, 2017). Il a été montré que l'inflammation chroniquement active est directement couplée au stress oxydant qui est un déséquilibre entre la production et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Imlay, 2019). La génération et la libération par les cellules immunitaires d'ERO sert de molécules de signalisation importantes qui contribuent à leurs fonctions immunologiques. Cependant, les ERO peuvent également être nocives. Leur libération continue dans le microenvironnement des lésions de la muqueuse provoque des dommages collatéraux. Les ERO endommagent les composés cellulaires tels que l'ADN et les protéines notamment au niveau des groupements thiols et des clusters Fe-S.

Parmi les bactéries anaérobies strictes présentes dans le côlon humain, *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) est l'un des taxons les plus abondants. *F. prausnitzii* représente jusqu'à 5% de la communauté bactérienne connue du microbiote intestinale (Hold *et al.*, 2003). C'est une bactérie à coloration Gram négative, anaérobie stricte, appartenant à la classe des *Clostridia* (Arbre 1). Elle est considérée comme bactérie commensale de l'intestin, colonisant le côlon, de l'homme et des animaux. La taxonomie des souches *F. prausnitzii* n'est pas encore bien définie. Mais, d'un point de vue phylogénétique, ces souches constituent des groupes distincts qui constitueraient des espèces différentes (Sakamoto *et al.*, 2022).

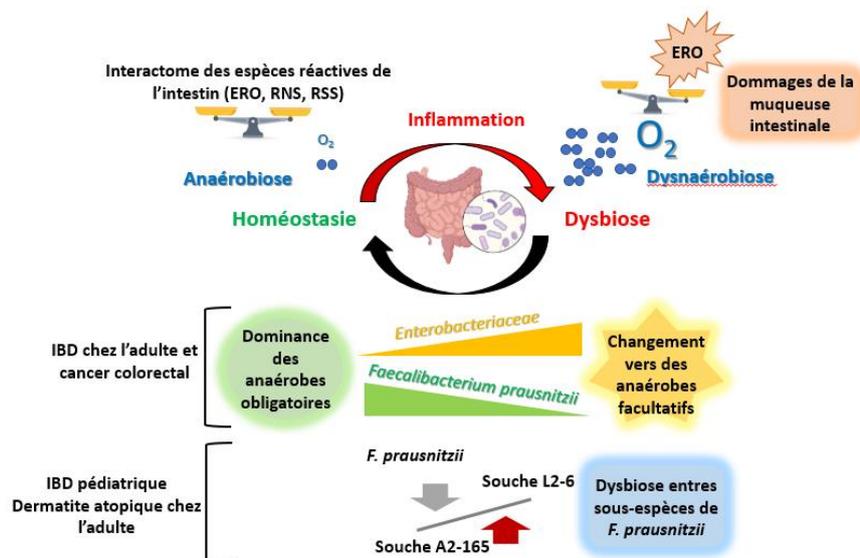
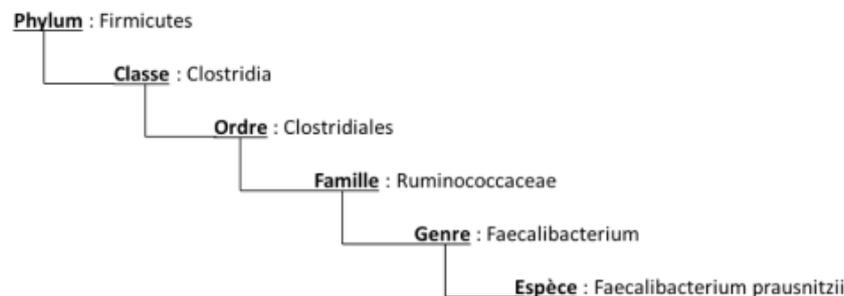


Figure 1 : Schéma synthétique des connaissances sur les corrélations entre le niveau de *F. prausnitzii* dans le microbiote intestinal et l'inflammation dans le côlon. L'état normal du microbiote s'oppose à la dysbiose souvent rencontrée dans des pathologies digestives comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'inflammation de l'intestin s'accompagne d'une surproduction d'ERO ainsi que d'une augmentation de la tension en O₂ favorisant le développement des bactéries anaérobies facultatives au détriment des aérobies stricts telle que *F. prausnitzii*. Dans certaines cohortes de patients, la souche de type A2-165 disparaît alors que l'abondance de la souche L2-6 augmente. D'après Sandrine Auger *et al.* (équipe ProbiHôte). IBD : Inflammatory Bowel Disease ; RNS : Reactive Nitrogen Species; RSS : Reactive Sulfur Species.



Arbre 1 : Taxonomie de *Faecalibacterium prausnitzii*.

F. prausnitzii produit plusieurs molécules bioactives qui affectent l'inflammation et la fonction de barrière intestinale comme la Molécule Anti-inflammatoire Microbienne (MAM) (Quévrain *et al.*, 2016). Cette protéine de 15 kDa est capable d'inhiber la voie NF-κB de nombreuses lignées de cellules épithéliales de l'intestin et, par conséquent, de modérer l'inflammation. *F. prausnitzii* est une bactérie consommant l'acétate et elle est une grande productrice de butyrate. Le butyrate est impliqué dans la physiologie de l'intestin car ses effets pléiotropes contribuent au déroulement du cycle de vie des cellules intestinales.

L'abondance de *F. prausnitzii* est influencée par l'état de santé de l'hôte et par l'environnement colique (Figure 1). Ainsi, il a été montré que la diminution de l'abondance de *F. prausnitzii* au sein du microbiote intestinal corrèle avec l'apparition de maladie comme les MICI, des maladies affectant le système nerveux (Alzheimer) (Ueda *et al.*, 2021) ou encore des

maladies de la peau (dermatite atopique) (Song *et al.*, 2016). Dans des échantillons de MICI pédiatriques, Zhang *et al.* ont montré que la souche de type L2-6 est dominante et que seule cette souche a une abondance intra-espèce plus élevée chez les malades de Crohn. Au contraire, la souche de type A2-165 montre une abondance intra-espèce significativement plus faible chez les malades de Crohn par rapport aux sujets témoins (Zhang *et al.*, 2018). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Song *et al.* qui a observé une dysbiose au niveau des sous-espèces de *F. prausnitzii* dans l'intestin des patients atteints de dermatite atopique avec une augmentation de la souche L2-6 et une diminution de la souche A2-165 (Song *et al.*, 2016). Il est proposé que la dysbiose au niveau des sous-espèces de *F. prausnitzii* serait directement liée à leur différente capacité de croissance en réponse au stress oxydant (Zhang *et al.*, 2018).

Tout le long de l'intestin se forme un gradient décroissant de concentrations en dioxygène (O₂) suivant l'axe longitudinale, d'environ 5% au niveau de l'estomac à 0,1-0,4% au côlon, et l'axe transversal, des cellules épithéliales (5%) vers le lumen de l'intestin (1 à 2%) (Figure 2) (Keeley & Mann, 2019). Chez une personne en bonne santé, la majorité des bactéries strictement anaérobies colonisent l'extrémité distale du tractus gastro-intestinal avec 10⁷ à 10⁸ bactéries g⁻¹ dans l'iléon distal et 10⁹ à 10¹¹ bactéries g⁻¹ dans le côlon (Rigottier-Gois, 2013). Plusieurs études suggèrent une association étroite entre la concentration d'O₂ dans des microenvironnements du côlon et le processus de l'inflammation intestinale dans les MICI (Karhausen *et al.*, 2004). De plus, une diminution des bactéries anaérobies strictes au profit d'une augmentation des anaérobies facultatives est observée dans l'intestin des patients atteints de MICI. Cela suggère fortement une perturbation de l'anaérobiose et indiquerait un rôle de l'O₂ dans la dysbiose intestinale (Rigottier-Gois, 2013). Il est donc important de comprendre comment les bactéries commensales intestinales s'adaptent à des changements majeurs de leur environnement afin de mieux comprendre le rôle du microbiote dans les pathologies (Rigottier-Gois, 2013).

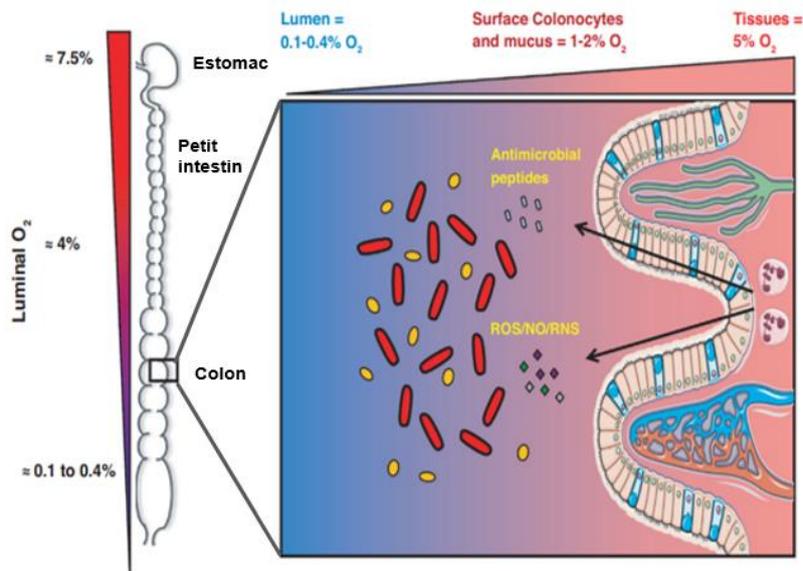


Figure 2 : Stress oxydant rencontré par les bactéries anaérobies dans le tractus intestinal. Dans le tube digestif, les bactéries anaérobies comme *F. prausnitzii* doivent faire face au gradient décroissant longitudinal, de l'estomac vers le rectum, et transversal, des cellules épithéliales vers le lumen, d'O₂. Les bactéries sont également exposées à des stress liés à la synthèse d'ERO et de peptide antimicrobiens par les cellules du système immunitaire. D'après Kint *et al.*, 2022.

Peu de recherches ont été menées sur la toxicité de l'O₂ chez les bactéries commensales. Dans le cas de *F. prausnitzii*, cette bactérie est extrêmement sensible à l'O₂ mais elle peut être maintenue en vie jusqu'à 24 heures à l'air ambiant en présence d'antioxydants tels que la riboflavine et la cystéine (Khan *et al.*, 2014). En effet, il a été montré qu'un mécanisme de transfert extracellulaire d'électrons par *F. prausnitzii* permettrait la survie de cette bactérie anaérobie dans un environnement oxygéné en présence de molécules médiatrices du potentiel redox (Khan *et al.*, 2012). Ainsi en présence d'O₂, les thiols libres de la cystéine (ou du glutathion) sont oxydés en ponts disulfures qui agissent alors comme accepteurs d'électrons. Des flavines extracellulaires agissent comme médiateurs du potentiel redox en transférant les électrons jusqu'à l'accepteur final qui est l'O₂ pour former de l'H₂O (Khan *et al.*, 2012). Dans l'intestin, les principales sources de flavines proviennent de la consommation de produits laitiers, de feuilles des plantes, des fruits et des fibres. Il a d'ailleurs été montré qu'une alimentation supplémentée en riboflavine favorise l'augmentation de la population *F. prausnitzii* chez des personnes volontaires en bonne santé (Sadabad *et al.*, 2015). Les thiols proviennent de diverses sources alimentaires telles que le jaune d'œuf, les produits laitiers et les céréales (Dangour *et al.*, 2010). De plus, la muqueuse de l'intestin abrite de fortes quantités de thiols (ex : glutathion) qui sont sécrétés par les colonocytes et agissent comme antioxydants (Keshavarzian *et al.*, 1992; Loguercio *et al.*, 2003). Plusieurs études ont démontré une augmentation du stress oxydant chez les patients atteints de colites, augmentation associée à une diminution des concentrations des thiols (Aw, 2003; Seril *et al.*, 2003).

La réponse au stress oxydant a davantage été étudiée chez la bactérie anaérobie pathogène *Clostridioides difficile* qui appartient à l'ordre des *Clostridiales* (*C. difficile*,

anciennement nommé *Clostridium difficile*). *C. difficile* est une bactérie sporulante. Lors de son cycle infectieux, ces spores sont exposées à l'O₂ et à certains désinfectants comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les cellules végétatives sont aussi exposées à la faible tension en O₂ du tube digestif et aux différentes ERO. *C. difficile* est capable de croître en condition d'anoxie non-stricte, c'est-à-dire de 1 à 3% d'O₂ (Giordano *et al.*, 2018). La survie et la croissance de *C. difficile* en présence de faibles concentrations d'O₂ sont possibles grâce à des enzymes permettant la détoxification de l'O₂ et de l'H₂O₂ (Figure 3A). Les « flavodiiron protein » (FDP) sont des protéines possédant au minimum deux domaines structuraux, un centre catalytique di-Fe contenu dans un domaine de type metallo-β-lactamase en N-terminal et d'une flavodoxine en C-terminal, permettant la détoxification de l'O₂ en H₂O (Figure 3B) (Martins *et al.*, 2019). Les rubrerythrine (Rbr) et reverse rubrerythrine (revRbr) sont une autre famille d'enzyme capable de convertir l'O₂ et le H₂O₂ en H₂O. Les Rbr possèdent un domaine rubredoxine like en C-terminal et un site catalytique di-Fe non-soufré en N-terminal, ces domaines sont retrouvés chez les revRbr en position inversée (Figure 3B) (Kint *et al.*, 2022). La superoxyde reductase (SOR), permet de détoxifier des anions superoxyde (O₂^{•-}) en H₂O₂ via leur domaine superoxyde reductase like (SORL) (Martins *et al.*, 2019).

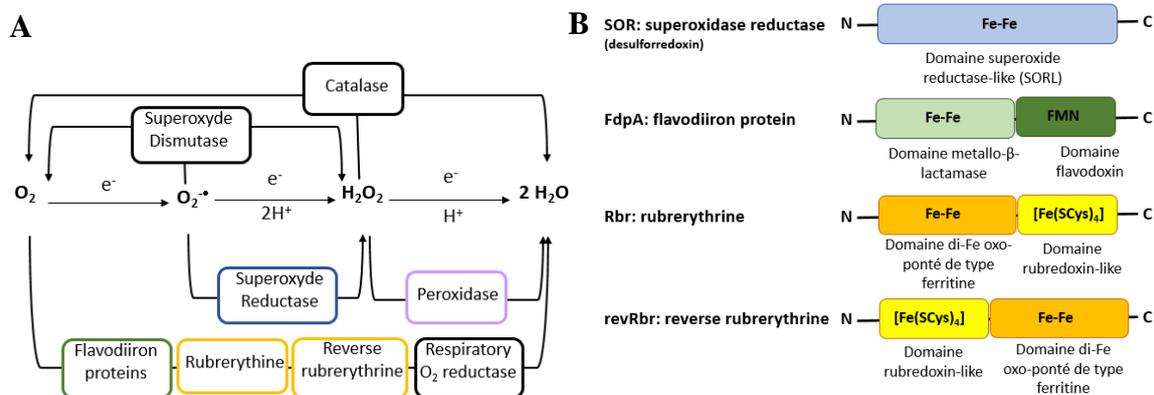


Figure 3 : Voie de détoxification d'O₂ et des ERO avec les enzymes impliquées. (A) Systèmes de détoxification connus chez les bactéries aérobies et anaérobies. Les FDP et les revRbr ou Rbr sont capables de réduire l'O₂ en H₂O grâce à leur activité O₂ reductase. Les revRbr et Rbr sont aussi capables, comme les peroxydases, de réduire l'H₂O₂ en H₂O par leur activité H₂O₂ reductase. Seules les SOR et Superoxyde dismutase peuvent réduire l'anion superoxyde, O₂^{•-}, en H₂O₂. (B) Schéma des domaines fonctionnelles des enzymes de détoxification étudiées.

Le but de notre projet est de comprendre si le stress oxydant généré par la présence d'O₂ ou de ERO dans le côlon est un facteur clé impactant l'abondance des différents types de souches de *F. prausnitzii* et de mettre en évidence des gènes impliqués dans des mécanismes de détoxification de l'O₂ ou des ERO. Dans un premier temps, nous avons comparé la sensibilité à l'O₂ et aux ERO (comme l'H₂O₂) de différentes souches de *F. prausnitzii*. Puis, nous avons étudié l'expression transcriptionnelle de gènes codant de potentielles enzymes de détoxification en réponse à un stress oxydant. Les manipulations génétiques n'étant pas encore possibles chez

F. prausnitzii, nous avons cherché à étudier la fonctionnalité de ces enzymes par complémentation fonctionnelle chez *C. difficile*.

Matériel et méthodes

Matériel biologique et conditions de culture

Les souches de *F. prausnitzii* utilisées lors de ce projet (Tableau 1) sont cultivées en milieu BHIS (Brain Heart Infusion, 37g/L, extrait de levure 20g/L) supplémenté avec 0.027 mol/L de sodium d'acétate tri-hydraté, 0.5 mg/mL de L-cystéine et 2 mg/mL de D-fructose. Le milieu est solidifié par l'ajout d'agar à 15 g/L. Les cultures de *F. prausnitzii* sont effectuées dans une chambre Coy dans des conditions anaérobies (5 % H₂, 5 % CO₂, 90 % N₂). Lors des expérimentations, *F. prausnitzii* est cultivée en tube Falcon (tube polypropylène SARSTEDT AG & Co de 15mL, référence : 62.554.002, ou 50mL, référence : 62.547.004) ou transférée dans des plaques 96 puits de 1 mL (plaque deepwell en polypropylène, Greiner bio-one, référence : 780201).

Souches	SOR	FdpA	Rbr	revRbr	AhpCF
CNCM4543		<i>peg.3223</i>		<i>peg.636</i>	
A2-165		<i>peg.2868</i>	<i>peg.2386</i>	<i>peg.331</i>	
M21/2	<i>peg.488;</i> <i>peg.1000; peg.669</i>	<i>peg.2188;</i> <i>peg.662;</i> <i>peg.666</i>	<i>peg.670</i>	<i>peg.2154</i>	
CNCM4541	<i>peg.1592</i>	<i>peg.1798</i>	<i>peg.2042</i>	<i>peg.1060</i>	
L2-6	<i>peg.1595;</i> <i>peg.3138</i>	<i>peg.38</i>	<i>peg.743</i>	<i>peg.1991</i>	<i>peg.541 et peg.542</i>

Tableau 1 : Souches de *F. prausnitzii* étudiées (collection équipe ProbiHôte, INRAE) et noms des gènes codant potentiellement des enzymes de type SOR, FdpA, Rbr, revRbr et AhpCF.

Les souches *Escherichia coli* (*E. coli*) utilisées comme outils génétique dans ce projet sont la souche commerciale *E. coli* chimiquement compétente One Shot™ TOP10 et la souche HB101. Toutes deux sont cultivées en milieu LB (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5 g/L). Les antibiotiques nécessaires sont ajoutés aux concentrations suivantes dans les milieux de culture : chloramphénicol (Cm) 15 µg/mL, ampicilline (Amp) 50 µg/mL.

Les souches de *C. difficile* sont cultivées en conditions anaérobies en milieu TY (bactotryptone 30g/L, extrait de levure 20g/L, pH 7,4) ou en BHI (Brain Heart infusion, 37 g/L). Ces souches correspondent à la souche *C. difficile* 630 Δ *erm* et à ses dérivés qui ont été mutés dans des gènes d'intérêt (collection I. Verstraete, I. Pasteur). Pour permettre la germination des spores, si nécessaire, 0,05% de taurocholate (Tau) sont ajoutés aux milieux.

Tableau 2 : Souches et plasmides construits lors de cette étude.

Souches	Génotypes
CD15	630 Δ erm pMTL84122
CD16	630 Δ erm <i>fdpA::erm</i> pMTL84122
CD17	630 Δ erm <i>fdpA::erm</i> pMTL84122-Fdp(<i>peg.2868</i>) A2-165
CD18	630 Δ erm <i>fdpA::erm</i> pMTL84122-Fdp(<i>peg.38</i>) L2-6
CD4	630 Δ erm Δ <i>fdpF fdpA::erm</i> pMTL84122
CD5	630 Δ erm Δ <i>fdpF fdpA::erm</i> pMTL84122-Fdp(<i>peg.2868</i>) A2-165
CD6	630 Δ erm Δ <i>fdpF fdpA::erm</i> pMTL84122-Fdp(<i>peg.38</i>) L2-6
CD8	630 Δ erm Δ <i>revRbr1 (CD1474) \Delta</i> revRbr2 (<i>CD1524</i>) pMTL84122
CD9	630 Δ erm Δ <i>revRbr1 (CD1474) \Delta</i> revRbr2 (<i>CD1524</i>) pMTL84122- <i>revRbr(peg.1991)</i> L2-6
CD10	630 Δ erm Δ <i>rbr (CD0825)</i> pMTL84122
CD12	630 Δ erm Δ <i>rbr (CD0825)</i> pMTL84122- <i>Rbr(peg.2386)</i> A2-165
CD11	630 Δ erm Δ <i>rbr (CD0825)</i> pMTL84122- <i>Rbr(peg.743)</i> L2-6
CD13	630 Δ erm Δ <i>sor (CD08127)</i> pMTL84122
CD14	630 Δ erm Δ <i>sor (CD08127)</i> pMTL84122- <i>SOR (peg.3138)</i> L2-6
Plasmides	Caractéristiques
pMTL84122	Plasmide répliquatif chez <i>E. coli</i> et transférable chez <i>C. difficile</i> par conjugaison
TB01	pMTL84122-Fdp(<i>peg.2868</i>) A2-165
TB02	pMTL84122-Fdp(<i>peg.38</i>) L2-6
TB03	pMTL84122- <i>Rbr(peg.2386)</i> A2-165
TB04	pMTL84122- <i>SOR (peg.3138)</i> L2-6
TB05	pMTL84122- <i>revRbr(peg.1991)</i> L2-6
TB06	pMTL84122- <i>revRbr(peg.331)</i> A2-165
TB07	pMTL84122- <i>Rbr(peg.743)</i> L2-6

Test de survie sur boîte à atmosphère ambiant

Une colonie isolée d'une souche de *F. prausnitzii* est resuspendue dans 1 mL de milieu BHIS supplémenté en acétate, fructose, cystéine. La suspension est incubée à 37°C toute la nuit. La culture de jour est inoculée à 1:50 à partir de la culture de nuit et mise à incubée à 37°C. Lorsque la culture atteint la phase exponentielle, correspondant à une densité optique (DO_{600nm}) comprise entre 0,4 et 0,6, la culture est diluée en série de 10⁻¹ à 10⁻⁴. Des gouttes de 10 μ L de la culture non-diluée et de chaque dilution sont déposées sur des boîtes BHIS supplémentées. Chaque boîte correspond à une durée d'exposition à l'O₂ (0, 2, 5, 10 ou 20 min.). Le temps d'exposition 0 min. correspond au contrôle restant en anaérobiose. Les boîtes exposées à l'O₂ sont ensuite remises en chambre anaérobie et mises à incuber à 37°C 24 h à 48 h.

Test de survie en milieu liquide à atmosphère ambiant

Une culture en milieu BHIS supplémenté est inoculée à 2% à partir d'une culture de nuit de la souche de *F. prausnitzii* dans le même milieu. Lorsque la culture arrive en phase exponentielle (DO_{600nm} = \pm 0,5), la culture est transvasée dans un erlenmeyer à bouchon vissé. Cet erlenmeyer est sorti de la chambre en même temps qu'une plaque 96 puits contenant dans chaque puit 450 μ L de BHIS supplémenté et 200 μ L d'huile minérale. La culture est placée de

façon statique sous hotte PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) ou à faible agitation à 37°C pendant l'exposition à l'air ambiant. A différentes durées d'exposition à l'atmosphère ambiant, 50 µL de culture sont resuspendus en anoxie dans un puit (sous la goutte d'huile) de la plaque pré-conditionnée. Une fois l'exposition terminée, la culture et la plaque 96 puits sont rentrées en chambre anaérobie. Un dénombrement des différents inoculas de la plaque est réalisé par des dilution en série de 10⁻¹ à 10⁻⁴ puis par dépôt de gouttes de 10 µl sur boîtes BHIS supplémentées. Les boîtes sont mises à incuber 24 à 48 h à 37°C. En parallèle, la culture est remise à incuber à 37°C et un suivi de DO_{600nm} est réalisé.

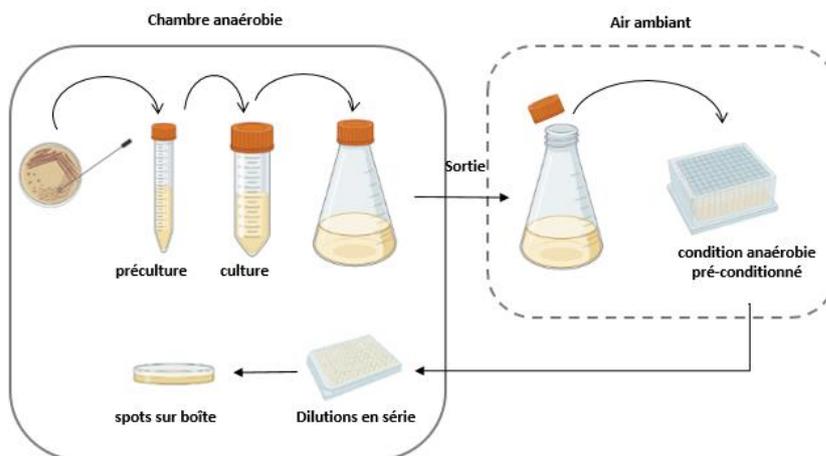


Figure 4 : Schéma expliquant le protocole mis au point pour le test de survie à l'atmosphère ambiant en milieu liquide.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice en H₂O₂

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en H₂O₂ des souches *F. prausnitzii*, une culture est inoculée à 1:100 et mise à incuber jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,05 et 0,1. Dans des tubes de 1,5 mL, 1 mL de la culture est mis en présence d'une gamme de concentrations d'H₂O₂ de 10 µM à 200 µM (solution d'H₂O₂, référence : H1006, Sigma-Aldrich). Pour chaque concentration d'H₂O₂, 150 µL de la culture sont déposés en triplicat dans une plaque 96 puits. La plaque est mise à incuber 24 h à 37°C. La CMI est déterminée par lecture de la densité optique à 600 nm.

Croissance en présence d'un stress H₂O₂

Une culture de jour de *F. prausnitzii* est réalisée à partir d'une dilution au 1:50 d'une culture de nuit dans un milieu BHIS supplémenté. Lorsque la croissance atteint une DO_{600nm} = ± 0,5, une quantité d'H₂O₂ correspondant à la CMI ou à 0,5 x CMI est ajoutée dans la culture. La DO_{600nm} de la culture est suivie toutes les heures pour réaliser une cinétique de croissance. Afin de réaliser une étude de la régulation transcriptionnelle en réponse à l'H₂O₂, des prélèvements de 2 mL de culture sont effectués avant et 5, 15 et 30 min. après l'ajout de l'H₂O₂ (concentré à 0,5 x CMI). Les prélèvements sont centrifugés 2 min. à 15 000 g à 4°C. Les culots sont conservés à -80°C en attendant l'extraction d'ARN.

Extraction d'ARN et quantification des ARNm par PCR quantitative

Les ARN de *F. prausnitzii* sont extraits à l'aide du kit RNeasy mini de Qiagen. Après extraction, la concentration des ARN extraits est mesurée à 260 nm avec un spectromètre NanoDrop™. Puis, les échantillons sont analysés avec un système Bioanalyser (Agilent) pour vérifier la qualité des ARN. Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus à partir de 0,5 µg d'ARN extraits et du kit « High capacity cDNA reverse transcription » (Invitrogen). Les ADNc utilisés pour la PCR quantitative sont dilués aux 1:100. La quantification de 4 µL d'ADNc dilué est réalisée par l'ajout de 16 µL d'un mélange réactionnelle SYBR Green contenant du 1X SYBR Green Master Mix, 300 nM de chaque oligonucléotide et de l'eau pour biologie moléculaire. La réaction de PCR quantitative est effectuée dans un thermocycler StepOne plus en suivant le programme : une première étape de dénaturation complète de l'ADNc (95°C, 10 min.), suivi du premier cycle. Le cycle, répété 40 fois, contient une phase de dénaturation (95°C, 15 s.) et d'une phase d'hybridation/élongation (60°C, 1 min.). A la fin de chaque cycle, la fluorescence est mesurée. Les 40 cycles sont suivis par une phase de dénaturation progressive pour atteindre 95°C avec une mesure de la fluorescence tous les 0,5°C. Cette dénaturation progressive permet de déterminer le T_m du produit de PCR et de détecter les amplifications non spécifiques (dimère d'oligonucléotides) grâce à leur T_m. Lorsque la quantité d'ADN couplée au SYBR Green permet de dépasser la valeur seuil de détection de fluorescence par l'appareil, le nombre de cycle PCR, appelé C_T, est déterminé. La valeur de C_T est normalisée par rapport à celle du gène de référence choisi qui code pour un facteur d'élongation de la traduction (*tgfC*). Les différences d'expression pour chaque condition sont déterminées par la méthode comparative de Livak, aussi nommée $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Construction des mutants de *C. difficile* complémentés

- Optimisation des séquences codantes de *F. prausnitzii* et clonage dans pMTL84122

Les séquences codantes des potentielles enzymes de détoxification des souches de *F. prausnitzii* A2-165 et L2-6 (Tableau 1) sont optimisées via le serveur www.jcat.de pour une expression optimale chez *C. difficile*. Ces séquences optimisées sont synthétisées par la société GeneCust dans le vecteur puc57. Elles sont ensuite clonées par la méthode d'assemblage de Gibson avec le kit « Simply Seamless DNA assembly » dans un vecteur d'expression pMTL84122 (Heap *et al.*, 2007) sous le promoteur constitutif du gène *thl* de *C. difficile* 630 (Figure 5). Le gène *thl* code pour une Acétyl-CoA C-acétyltransférase.

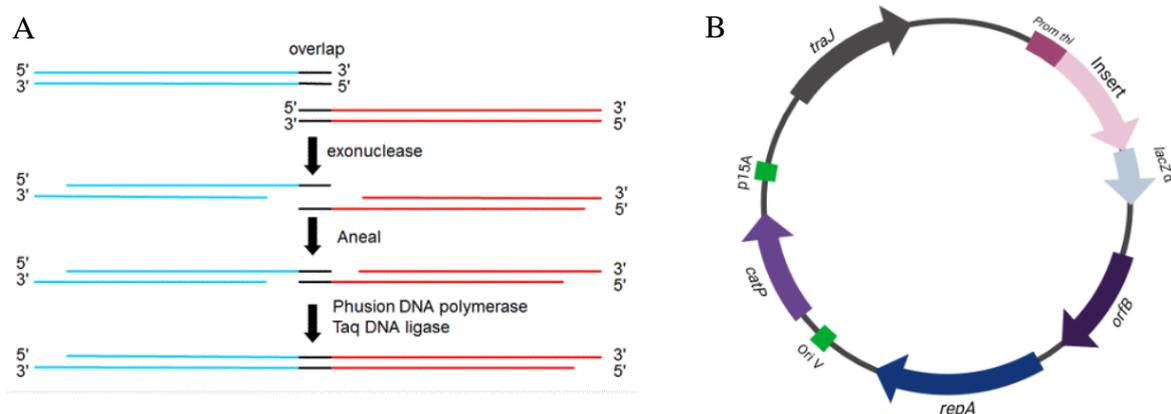


Figure 5 : (A) Schéma mécanistique du clonage Gibson. Deux fragments d'ADN partageant des extrémités complémentaires sont joints par une étape de réaction isotherme. Une exo nucléase T5 va dégrader les nucléotides de l'extrémité 5' du double brin d'ADN, ainsi les simple brin 3' sortant vont s'apparier par complémentarité de base. Après appariement des simples brins, une ADN polymérase Phusion comble les trous et la Taq ligase lie les jointures. (B) Schéma du vecteur d'expression pMTL84122 avec un gène issu de *F. prausnitzii* sous le contrôle du promoteur constitutif *Pthl* de *C. difficile* 630.

- Transformation chez *E. coli*

Les produits issus de l'assemblage de Gibson sont introduits par choc thermique dans la souche d'*E. coli* One Shot™ TOP10 chimiquement compétente. Après des PCR sur colonies permettant d'identifier les colonies d'*E. coli* contenant le plasmide avec l'insert d'intérêt, des préparations plasmidiques sont préparées avec le kit Wizard® plus SV minipreps DNA purification system puis envoyées à séquencer pour vérification des constructions (Eurofins). Les plasmides sont alors introduits dans la souche *E. coli* HB101. *E. coli* HB101 est rendue compétente par un traitement au CaCl₂. Une culture d'*E. coli* HB101 en phase exponentielle est centrifugée à 4°C. Dans de la glace, le culot est repris dans un demi-volume du volume initial de CaCl₂ 50 mM et mise à incuber 20 min. La suspension est de nouveau centrifugée à 4°C et le culot est repris dans 1:20 du volume initial de CaCl₂ 50 mM. Ces bactéries sont transformées avec l'ADN plasmidique par un choc thermique. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB + Cm 15 µg/mL + Amp 50 µg/mL.

- Conjugaison d'*E. coli* HB101 avec les différentes souches mutées de *C. difficile*

E. coli HB101 est capable de transférer les plasmides dérivés de pMTL84122 portant les différents gènes de *F. prausnitzii* chez *C. difficile* par conjugaison. Les transconjugants sont sélectionnés sur un milieu BHI supplémenté en cyclosérine et céfotaxime, pour contre-sélectionner *E. coli*, et du thiamphénicole (Tm), de la même famille que le chloramphénicol, pour sélectionner le transfert de plasmide chez *C. difficile*. Les transconjugants sélectionnés sont ré-isolés sur milieu BHI céfotaxime et Tm.

Test de survie à l'air ambiant ou de faible tension en O₂ chez *C. difficile*

Une culture en milieu TY avec du Tau et Tm est inoculée à 1:50 à partir d'une culture de nuit de la souche de *C. difficile* dans le même milieu. Après 3 h, lorsque la culture est en phase exponentielle (DO_{600nm} entre 0,35 et 0,8), une suspension ajustée à une DO_{600nm} de 0,5 est réalisée en milieu TY en présence de Tau (0,05 %) pour induire la germination et éviter les spores. Pour chaque souche, des dilutions en séries jusqu'à 10⁻⁵ sont réalisées. Des gouttes de 5 µL de chaque dilution sont ensuite déposées sur des boîtes TY Tau. Les boîtes sont incubées à 37°C à l'air ou en hypoxie (5 % CO₂, 0,4 % O₂, 94 % N₂) pendant des temps variables (1 à 3 h à l'air ; 48 h en hypoxie). Les boîtes exposées à l'air sont ensuite ré-incubées pendant 24 h à 37°C en anaérobiose, avant lecture des résultats. Afin de déterminer la concentration bactérienne initiale, une boîte contrôle non exposée à l'O₂ est dans chaque cas incubée à 37°C en anaérobiose.

Résultats

Identification *in silico* de gènes codant de potentiels systèmes de détoxification

Une analyse *in silico* de 15 génomes des souches *F. prausnitzii* nous a permis de mettre en évidence la présence de systèmes homologues à des enzymes connues pour être capables de détoxifier l'O₂ ou les ERO chez les bactéries aérobies ou anaérobies. Les séquences cibles proviennent de *Bacillus subtilis*, *Clostridium* spp. et *Desulfovibrio* spp. De façon intéressante, la présence de ces systèmes varie énormément d'une souche à une autre (Figure 6). Ceci est illustré par la souche CNCM4543 qui possède deux enzymes prédites de détoxification tandis que la souche M21/2 possède au moins 8 de ces enzymes (Figure 6). De plus, seule la souche L2-6 contient un système de détoxification de l'H₂O₂ de type alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF). Les résultats de cette analyse soulèvent la question si cette disparité entre les souches est corrélée à une différence de tolérance à l'oxygène et aux ERO.

Souches	SOR	FdpA	Rbr	revRbr	AhpCF	
cluster B	CNCM4543	0	1	0	1	0
	CNCM4574	0	1	0	1	0
	A2-165	0	1	1	1	0
cluster A	SL3/3	2	3	0	1	0
	M21/2	3	3	1	1	0
	CNCM4546	3	3	1	1	0
cluster C	CNCM4542	2	1	1	1	0
	CNCM4544	2	1	1	1	0
	KLE1255	3	3	2	1	0
	942/18_1	3	3	2	1	0
Autres groupes	CNCM4575	2	3	2	1	0
	CNCM4541	1	1	1	1	0
	AHMP21	1	3	2	1	0
	942/8-14-2	1	1	1	1	0
	L2-6	2	1	1	1	1

Figure 6 : Nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la détoxification de l'O₂ ou des ERO chez 15 souches isolées et séquencées représentatives des différents groupes de *F. prausnitzii*. AhpCF est une potentielle alkyl peroxydase uniquement présente dans la souche L2-6.

Diversité de survie à l'air de souches de *F. prausnitzii*

Dans un premier temps, nous avons voulu comparer la capacité de plusieurs souches de *F. prausnitzii* à survivre à l'air ambiant (environ 20% d'O₂). Sur la base du contenu en enzymes de détoxification, cinq souches avec différents profils ont été sélectionnées : A2-165, L2-6, M21/2, CNCM4541 et CNCM4543. Les souches sont cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis déposées en goutte sur boîtes avec des dilutions en série. Les boîtes ont été exposées à l'O₂ atmosphérique pendant différents temps, puis réintroduites en chambre anaérobie (voir Matériel et méthodes).

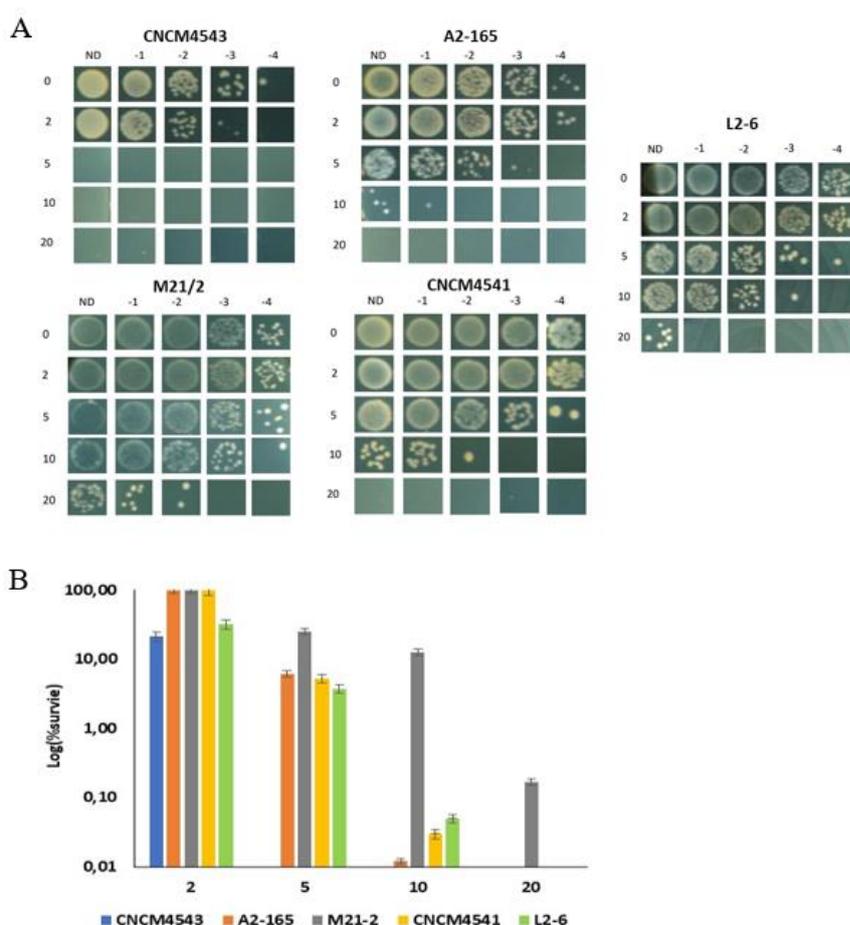


Figure 7 : Test de survie à l'air ambiant de plusieurs souches de *F. prausnitzii*. (A) Photos des souches de *F. prausnitzii* exposées à l'air. Les cultures diluées en série ont été déposées en gouttes sur milieu gélosé et exposées à l'air ambiant 2, 5, 10 ou 20 min. La souche CNCM4543 est la plus sensible à l'atmosphère ambiante contrairement à la souche M21-2 qui est la plus tolérante à 20% d'O₂. (B) Pourcentages de survie des souches de *Faecalibacterium* en fonction de la durée d'exposition à l'air ambiant calculé à partir du nombre de CFU/mL. Pour chaque souche, 4 à 5 tests indépendants ont été effectués.

Comme illustré sur la figure 7A, les souches de *Faecalibacterium* ne peuvent supporter un temps prolongé d'exposition à l'atmosphère ambiante. La gamme testée ici n'excède pas les 20 min. d'exposition. Les souches testées montrent une sensibilité différente à l'air. La souche la plus sensible CNCM4543 atteint 100% de mortalité après 5 min. d'exposition. Environ 5% des cellules A2-165, CNCM4541 ou L2-6 survivent après 5 min. d'exposition. Ce pourcentage diminue à 0,01-0,05 % après seulement 10 min. (Figure 7B). Ces cellules ne peuvent survivre après 20 min. d'exposition. En revanche, 0,15 % des cellules M21/2 survivent encore après

20 min. d'exposition à l'air ambiant (Figure 7B). La souche L2-6 survit mieux que la souche A2-165 après 10 min. d'exposition. De façon remarquable, la sensibilité élevée de la souche CNCM4543 corrèle avec le peu de systèmes de défense prédits (Figure 6). De même, la tolérance plus élevée de la souche M21/2 est en corrélation avec la présence de nombreuses enzymes de détoxification.

Survie à l'air en milieu liquide des souches A2-165 et L2-6

Afin de pouvoir étudier de façon plus fine les différences de survie entre les souches, nous avons mis au point un protocole permettant de quantifier la survie de *F. prausnitzii* en milieu liquide après un stress à l'air ambiant. Dans notre procédure, nous avons pensé à prélever des aliquotes de cultures exposées à l'air et à les remettre rapidement en conditions anaérobies dans une plaque en polypropylène contenant du milieu anaérobie pré-conditionné (Figure 4). Nous nous sommes concentrés sur les souches A2-165 et L2-6 car leur niveau est corrélé à une dysbiose du microbiote dans plusieurs troubles gastro-intestinaux (Figure 1). Ainsi, nous avons pu suivre la biomasse (DO_{600nm}) et quantifier (CFU/mL) la survie de ces deux souches exposées 30 min. à l'air ambiant, sans agitation, en phase exponentielle de croissance. Les courbes de croissance montrent qu'après 30 min. d'exposition à l' O_2 , la souche A2-165 reprend progressivement sa croissance 1 h après son retour en chambre anaérobie (Figure 8A). Pour la souche L2-6, sa croissance reste stable 3 h après restauration de l'anaérobie (Figure 8B) mais elle ne reprend pas. Les quantifications des CFU/mL montrent que ces deux souches présentent 100% de survie après 30 min. d'exposition à l'air (Figure 8 C et D). A ce stade, il est possible de conclure que les souches A2-165 et L2-6 ont des systèmes de détoxification de l' O_2 suffisamment efficaces pour maintenir leur survie à l'air ambiant pendant 30 min. sans agitation. Par contre, le phénomène de reprise de la croissance en anaérobie semble plus complexe.

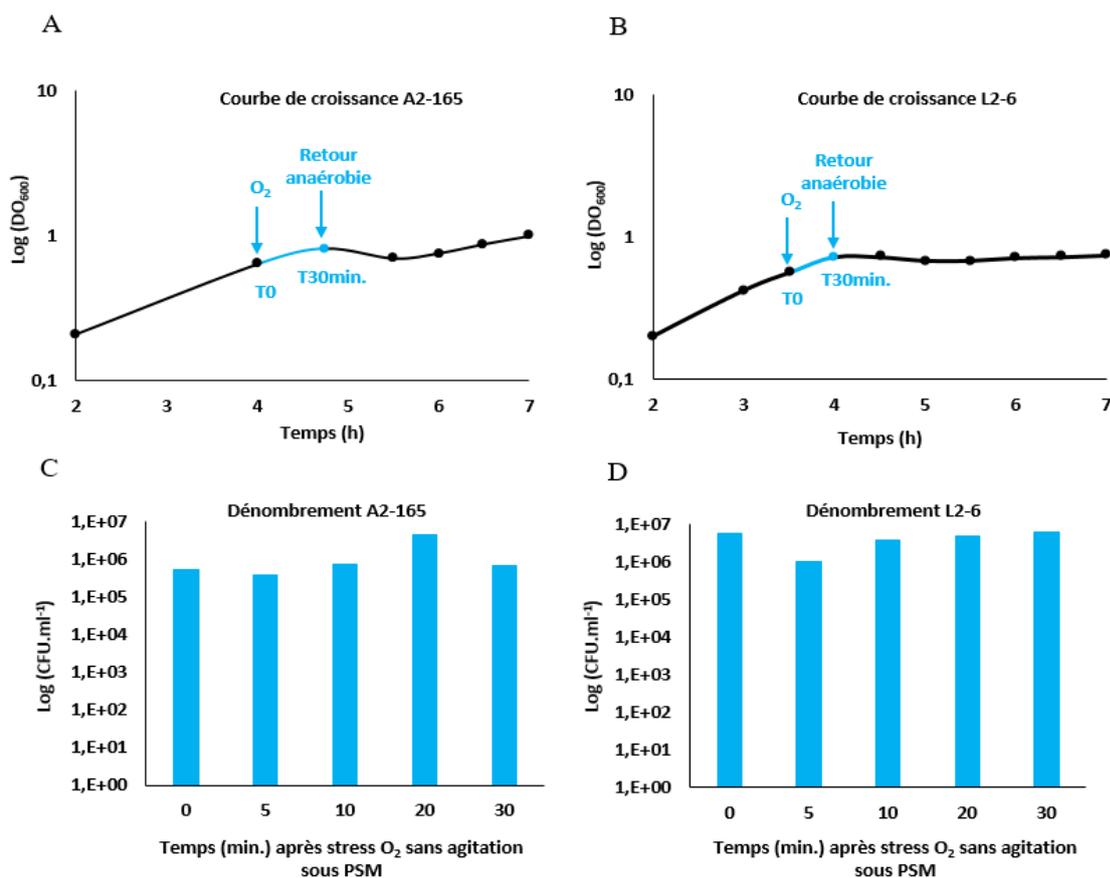


Figure 8 : Effet de l'air ambiant sans agitation sur la survie des souches de *F. prausnitzii* A2-165 et L2-6. (A) et (B) Courbes représentatives de la croissance d'A2-165 et de L2-6 avant et après une exposition de 30 min. à l'air ambiant. Les flèches indiquent la sortie et l'entrée de la chambre anaérobie. La portion bleue de la courbe correspond à la durée d'exposition à l'air ambiant sous PSM. (C) et (D) Dénombrement des CFU/ml des souches A2-165 et L2-6, respectivement, lors des 30 min. d'exposition à l'atmosphère ambiant.

Nous avons ensuite testé la croissance et la survie de A2-165 et L2-6 dans des conditions plus drastiques en les exposant à l'air mais avec agitation (Figure 9). D'autre part, nous avons comparé l'effet de la présence ou de l'absence de cystéine dans le milieu pour la survie à l'O₂. Pour cela, les cellules ont été cultivées dans le milieu BHIS + cystéine en anaérobie. Au moment de la sortie des cellules à l'air ambiant, une partie de la culture a été déplétée en cystéine. En présence de cystéine dans le milieu, la souche A2-165 survit jusqu'à 20 min. d'aération (Figure 9C) alors que la souche L2-6 ne survit que jusqu'à 10 min. (Figure 9D). En absence de cystéine, la DO_{600nm} diminue très fortement pour ces deux souches (Figure 9A et B). Ceci est corrélé à une très faible survie, 10 min. pour A2-165 et 5 min. pour L2-6 (Figure 9C et D). Ce résultat confirme le rôle de la cystéine dans le processus de réduction de l'O₂ exogène observé chez *F. prausnitzii* (Khan *et al.*, 2012).

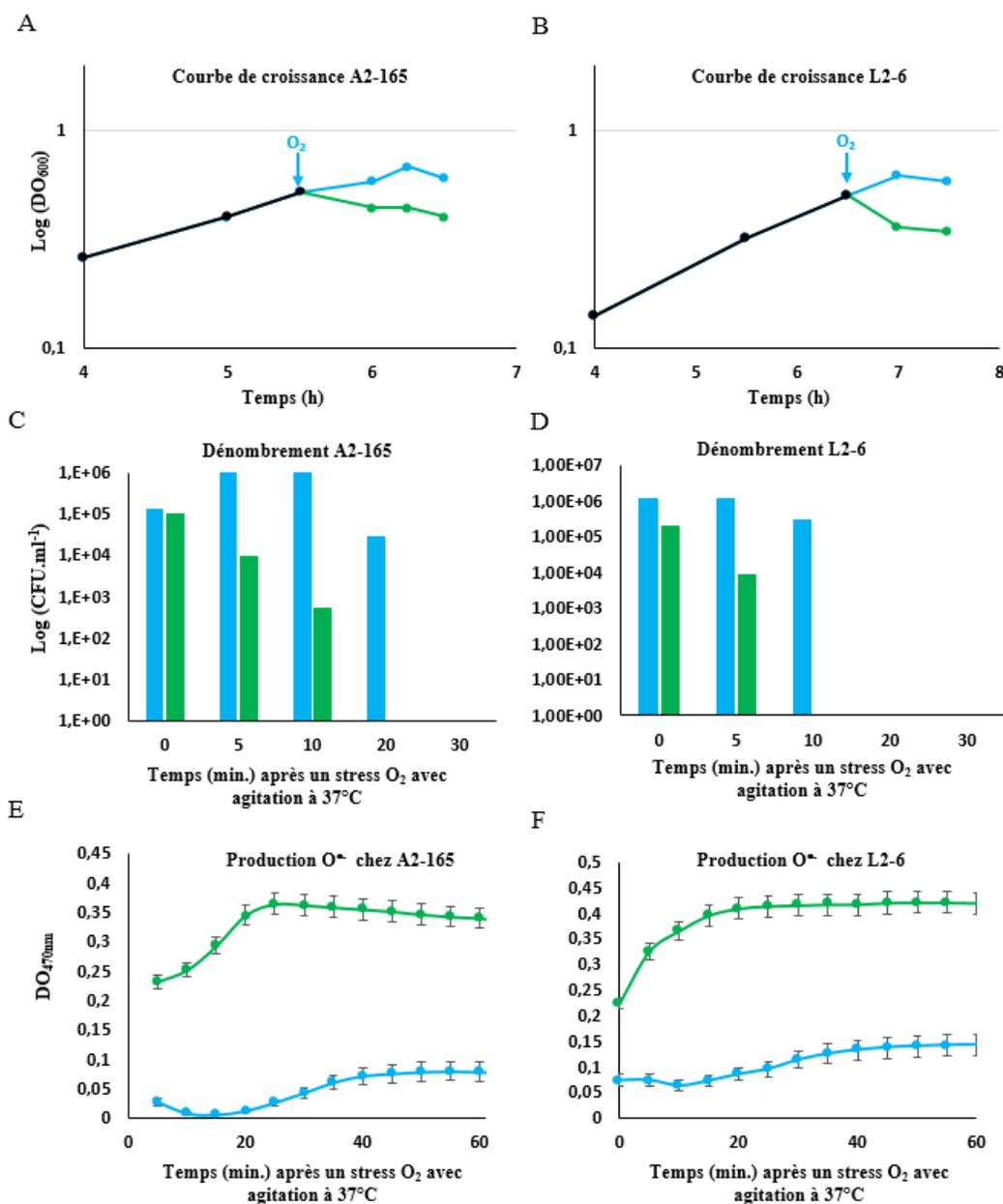


Figure 9 : Effet de l'air ambiant avec agitation sur la survie des souches de *F. prausnitzii* A2-165 et L2-6. (A) et (B) Courbes représentatives de la croissance d'A2-165 et de L2-6 avant et pendant une exposition à l'air ambiant avec agitation. La flèche indique la sortie de la chambre anaérobie. La portion noire de la courbe correspond à la croissance en anaérobie en présence de cystéine; la portion bleue à la croissance en aérobie en présence de cystéine; la portion verte, à la croissance en aérobie en absence de cystéine. (C) et (D) Dénombrement des CFU/ml des souches A2-165 et L2-6, respectivement, après exposition à l'atmosphère ambiante. (E) et (F) Dosage de la production d'anion superoxyde avec le XTT après sortie des cultures à l'air ambiant. En bleu : dans les cultures contenant de la cystéine. En vert : dans les cultures déplétées en cystéine.

Le fait que la souche L2-6 soit plus sensible que la souche A2-165 est un résultat inattendu car L2-6 contient plus d'enzymes de détoxification que la souche A2-165. Cependant, les conditions testées ici sont très drastiques et bien éloignées des conditions physiologiques rencontrées par *F. prausnitzii* au sein du côlon.

En parallèle, nous avons mesuré la production d'anion superoxyde (O₂^{•-}) dans les souches A2-165 et L2-6 en le dosant avec le XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-

2H-tetrazolium-5-carboxanilide] (Figure 9 E et F). Cette molécule, une fois réduite par l' $O_2^{\bullet-}$, forme un composé soluble, nommé XTT-formazan, absorbant la lumière à 470 nm. Comme indiqué sur les figures 9E et F, une accumulation d' $O_2^{\bullet-}$ est observée au cours du temps : en présence de cystéine l'accumulation est progressive jusqu'à environ 40 min. d'aération alors qu'en absence de cystéine, l'accumulation est 4 fois plus forte, dès les premières minutes d'oxygénation. Ainsi, la cystéine dans le milieu joue un rôle primordial et immédiat pour la détoxification de l' O_2 . En absence de cystéine, la très forte accumulation d' $O_2^{\bullet-}$ est observée à la fois chez A2-165, ne possédant pas de SOR, et chez L2-6, qui possède deux SOR. Dans ces conditions (20% d' O_2), la présence de deux SOR chez la L2-6 n'est pas suffisante pour détoxifier l' $O_2^{\bullet-}$ (Figure 3A).

Diversité de survie à H_2O_2 de souches de *F. prausnitzii*

Nous avons poursuivi par l'étude de la diversité de sensibilité des 5 souches sélectionnées face à un stress oxydant induit par H_2O_2 . Pour cela, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque souche a été déterminée après 24 h d'incubation dans des plaques à 96 puits avec une gamme étendue, de 10 μM à 200 μM , d' H_2O_2 . Comme indiqué dans le tableau 3, les CMI varient de 75 à 200 μM . De façon inattendue, la souche A2-165 est la plus tolérante à l' H_2O_2 avec une CMI de 200 μM d' H_2O_2 . La souche L2-6 tolère de manière intermédiaire l' H_2O_2 avec une CMI de 100 μM . Les 3 dernières souches sont les plus sensibles avec une CMI égale à 75 μM . Comme pour le test de sensibilité à l' O_2 , nous retrouvons une hétérogénéité de la sensibilité à l' H_2O_2 .

Souche	H_2O_2 concentration							
	10 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM	125 μM	150 μM	200 μM
A2-165	+	+	+	+	+	+	+	-
L2-6	+	+	+	+	-	-	-	-
M21-2	+	+	+	-	-	-	-	-
CNCM4541	+	+	+	-	-	-	-	-
CNCM4543	+	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 3 : Détermination de la CMI d' H_2O_2 chez plusieurs souches de *F. prausnitzii*. La souche A2-165 est la plus tolérante à l' H_2O_2 . Les souches M21-2, CNCM4541 et CNCM4543 sont les plus sensibles avec une CMI de 50 μM . L'expérience a été réalisée 3 fois pour chaque souche donnant les mêmes résultats.

La CMI des souches A2-165 et L2-6 a été confirmée par la réalisation de croissance en tubes mais avec un stress à l' H_2O_2 lors de la phase exponentielle et non en début de croissance comme précédemment (Figure 10). Pour la souche A2-165, une concentration de 200 μM d' H_2O_2 inhibe la croissance de la bactérie. Avec une concentration correspondant à 0,5 fois la CMI, soit 100 μM d' H_2O_2 , la croissance de A2-165 est ralentie mais pas inhibée. Les résultats

obtenus dans ces conditions sont bien en accord avec les résultats précédents (Tableau 3). De même pour la souche L2-6, la CMI est confirmée par une inhibition de la croissance en phase exponentielle avec 100 μM d' H_2O_2 et un ralentissement de la croissance avec l'ajout de 50 μM d' H_2O_2 (0,5 fois la CMI). La détermination de ces conditions de stress avec l' H_2O_2 nous a été utile afin d'étudier par la suite la régulation transcriptionnelle de gènes cibles.

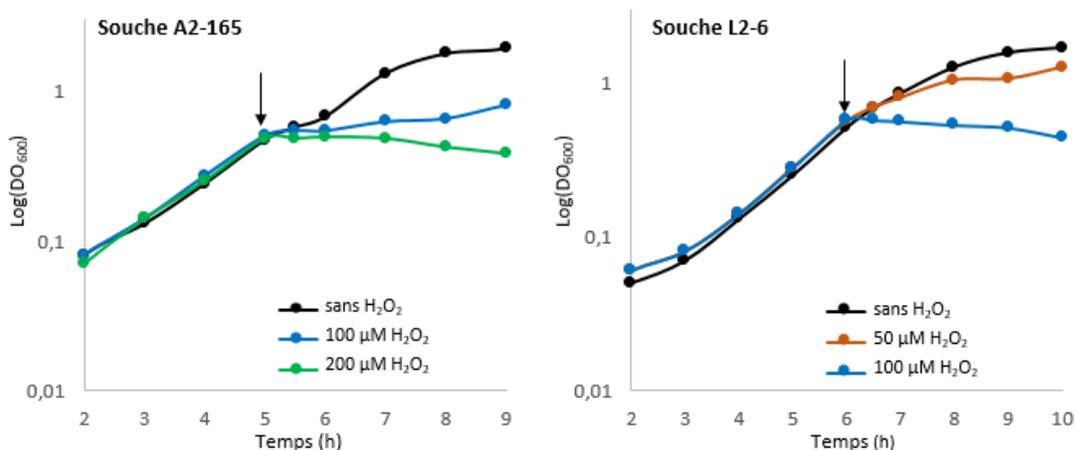


Figure 10 : Effet de l' H_2O_2 sur la croissance d'A2-165 et de L2-6. Courbes représentatives de la croissance des souches A2-165 et L2-6 de *F. prausnitzii* avec un stress H_2O_2 (CMI ou 0,5 x CMI). La CMI de la souche A2-165 est 200 μM et celle de L2-6 est 100 μM . Les flèches noires symbolisent l'ajout d' H_2O_2 .

Expression transcriptionnelle en réponse à un stress oxydant

La souche de *F. prausnitzii* L2-6 possède au total six gènes codant de potentiels systèmes de détoxification de l' O_2 et des ERO : Fdp, Rbr, revRbr, AhpC et 2 SOR (Tableau 1, Figure 6). L'étude de l'expression transcriptionnelle de ces 6 gènes a été réalisée par la quantification des ARNm par PCR quantitative lorsque la souche L2-6 est soumise à un stress oxydant comme l'exposition à l'atmosphère ambiante (Figure 11) ou à l' H_2O_2 (Figure 12). L'expression des 6 gènes a été rationalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage sélectionné pour la souche L2-6. Ce gène de référence, *peg.52*, code un facteur d'élongation de la traduction (TefG). L'expression de ce gène n'est pas modifiée lors l'un stress oxydant (Figure 11).

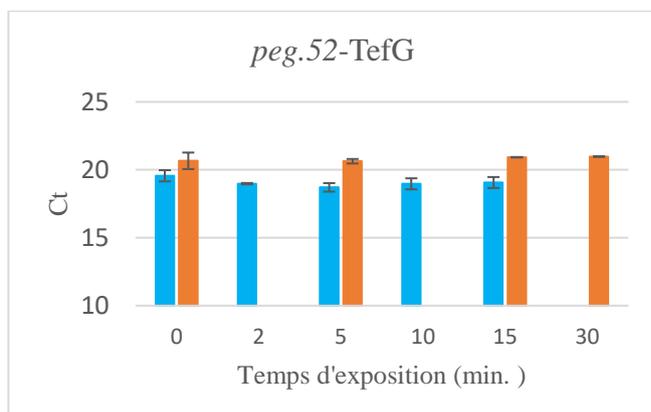


Figure 11 : Expression du gène de référence, *peg.52-TefG*, en fonction du temps d'exposition à un stress oxydant : 20% d' O_2 (en bleu) ou 50 μM H_2O_2 (en orange).

Après un stress à l'air ambiant (Figure 8B), les deux gènes codant les SOR montrent une surexpression de plus de 150 fois après 10 min. d'exposition par rapport au temps 0 où la souche est en anaérobiose (Figure 12 A et B). Le gène codant la Rbr est surexprimé 30 fois par rapport au temps 0, après 15 min. de stress (Figure 12E). Enfin, les gènes codant AhpC et la revRbr sont très faiblement surexprimés après les 10 min. de stress (Figure 12 C et F). Le gène codant la Fdp n'est pas significativement surexprimé dans ces conditions (Figure 12D). Ces résultats suggèrent que les deux SOR sont les enzymes les plus impliquées dans la détoxification de l'O₂.

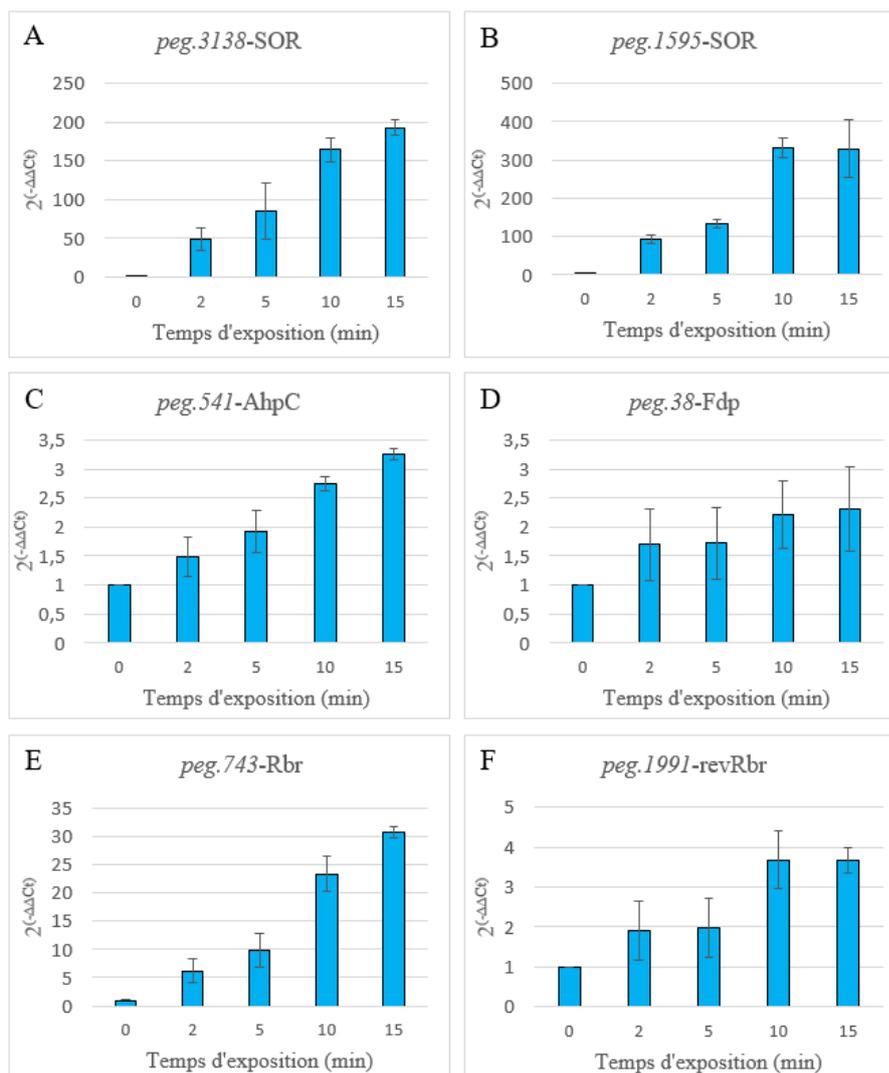


Figure 12 : Expression de gènes d'intérêt chez la souche L2-6 en réponse à un stress à l'air ambiant. Les gènes *peg.3138* et *peg.1595*, codant les deux SOR, sont les plus surexprimés. En revanche, la régulation de *peg.38-Fdp* n'est pas modifiée après un stress à l'air ambiant.

L'expression transcriptionnelle de ces gènes a également été étudiée après l'exposition de la souche L2-6 à un stress H₂O₂ de concentration 0,5 fois la CMI (Figure 10). Parmi les six gènes étudiés, deux profils d'expression se distinguent. L'un des profils montre une forte surexpression transitoire dès 5 min. d'exposition puis une diminution progressive de l'expression. Ce profil inclut les gènes codants les deux SOR, la Rbr et la revRbr (Figure 13). Cette surexpression concerne principalement *peg743_Rbr* qui est induit d'un facteur 25 seulement 5 min. après le stress (Figure 13E). Le second profil observé concerne les gènes

codant les enzymes AhpC et Fdp. Il montre une augmentation progressive de l'expression avec un pic d'expression à 30 min. après le stress à H₂O₂. Il faut noter que cette surexpression reste très faible, de l'ordre d'un facteur 3. En conclusion, ces résultats suggèrent que Rbr est l'enzyme la plus impliquée dans la détoxification à H₂O₂.

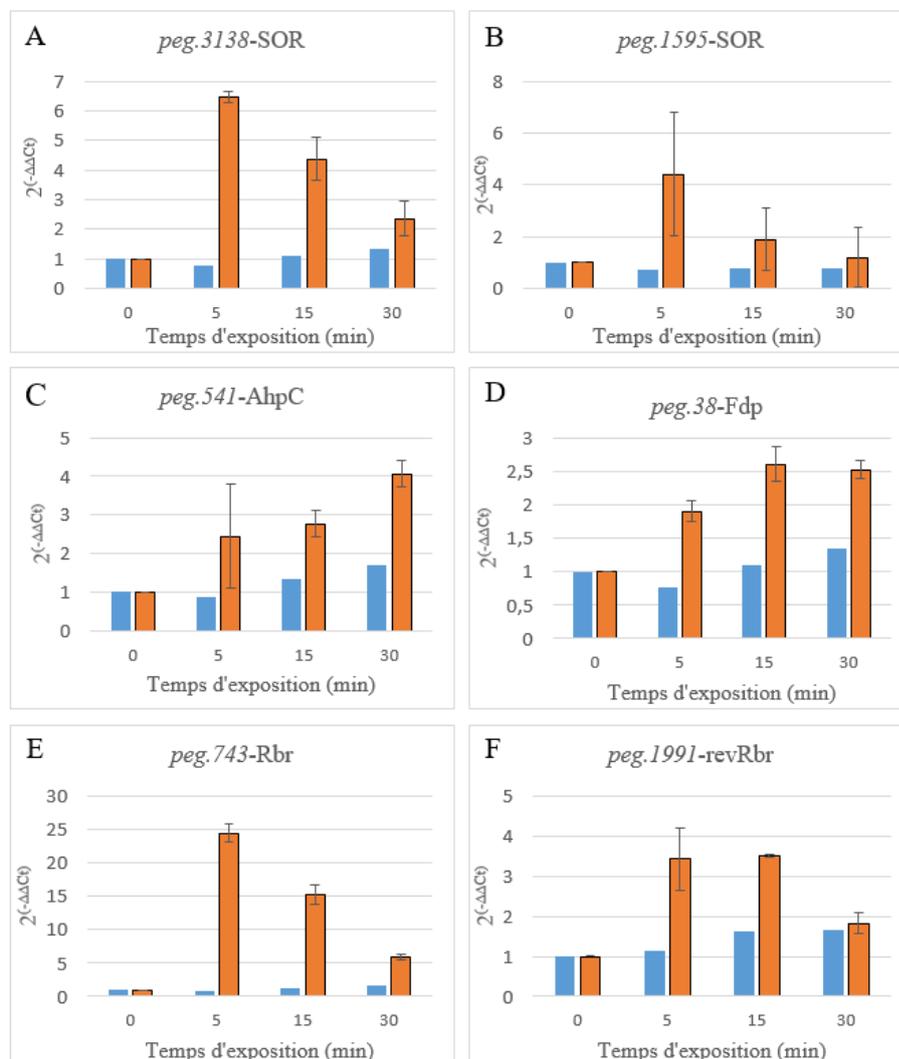


Figure 13 : Expression de gènes d'intérêt chez la souche L2-6 en réponse à un stress à H₂O₂. Les barres oranges : Stress à 0,5 x CMI en H₂O₂ ; les barres bleues : sans stress oxydant. Deux profils d'expression se distinguent après ce stress oxydant. Le premier montre une surexpression immédiate après le stress puis d'une retombée de la surexpression pour les gènes *peg.3138*, *peg.1595*, *peg.743* et *peg.1991*, respectivement, (A), (B), (E) et (F). Le second profil est une surexpression progressive pour les gènes *peg.541* et *peg.38*.

D'après le tableau 4 récapitulant les ratios d'expression maximale pendant un stress à l'atmosphère ambiante ou à l'H₂O₂, nous pouvons voir une faible surexpression des gènes codant Fdp, revRbr et Ahp en réponse à ces deux types de stress. Le gène codant Rbr est 24 à 30 fois plus exprimée en réponse à H₂O₂ et à l'air, respectivement, le facteur de surexpression est donc à peu près similaire. En revanche, l'expression des gènes codant les SOR est nettement plus élevée lors d'une exposition à l'O₂ qu'à une exposition à l'H₂O₂.

	<i>peg.38-Fdp</i>	<i>peg.743-Rbr</i>	<i>peg.1991-revRbr</i>	<i>peg.1595-SOR</i>	<i>peg.3138-SOR</i>	<i>peg.541-AhpC</i>
20% O ₂	x2	x30	x3,5	x330	x190	x3
50 μM H ₂ O ₂	x2,5	x24	x3,5	x4,5	x6,5	x4

Tableau 4 : Bilan des ratios d'expression des différents gènes étudiés après un stress à 20% d'O₂ ou 50 μM H₂O₂ (soit 0,5 fois la CMI).

Analyses *in silico* des séquences promotrices des gènes d'intérêt et proposition d'un modèle hypothétique de régulation

La similarité de profil d'expression des gènes codant Rbr, revRbr et les deux SOR en réponse à un stress à H₂O₂ suggère que ces gènes appartiennent à un même régulon. Nous avons cherché à identifier la présence d'un motif nucléotidique commun dans les régions promotrices de ces quatre gènes grâce à l'outil MEME suite 5.4.1 (Bailey & Elkan, 1994). Nous avons lancé la requête sur les régions de 300 pb en amont des +1 de traduction des 4 gènes d'intérêt. Il en ressort un motif consensus commun dans la région promotrice de ces gènes (Figure 14 A et B). Ce motif n'est pas retrouvé en amont des gènes codant Fdp et AhpC. Nous avons alors procédé à une recherche de ce motif sur l'ensemble du génome de *F. prausnitzii* L2-6 avec l'outil FIMO de la suite MEME. De façon intéressante, ce motif est retrouvé en amont de trois gènes codant une thioredoxine, une flavodoxine et une glutathione-dependant thiol reductase. Ces enzymes pourraient être impliquées dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire en réponse au stress oxydant.

A



Figure 14 : Analyse des régions promotrices des gènes codant la Rbr, revRbr et les SOR. (A) Motif consensus identifié en amont des gènes codant la Rbr, revRbr et les SOR avec MEME suite 5.4.1.

(B) Séquences nucléiques des régions promotrices des gènes *peg.743*, *peg.1991*, *peg.1595* et *peg.3138*.

Motif consensus (lettres en jaune), potentielles boîtes -10 et -35 (soulignés et lettres en rouge), séquence Shine-Dalgarno (soulignée en noir).

B

```
>P_peg.743_Rbr
TACCACGGTGCAGCTGGTGTGGTTCGGTGGCCATCGCCGTCCTGACTGACCTA
TCCGGCGCAGCGTGGGGATGCTGAGCGTGGCTGCGGTGCTGATGTATCAGCGGCATGGAG
CGCTCTCAGCATCGCCGTGTGCGCACTCAAGCAGCATAGTTGAAAAATAAATAGGAAAT
ATTCTCAAATAAATAGGAATAATTCTTGCATTTCTGCCCAAATTTCTGGTATAATACCCT
CAGAGACAAGGAGACCTATCGCACACCCGGTACCAGAACAAAGCGGGCTGTGCGTAGAAT
AAACCAACCGGACACAGCCCATACTGGCAGTCTCAGACTATCTGAGAGGAGAACAGATT
ATG
>P_peg.1991_revRbr
GTACGAGTTTCGACTCTGCGGATGGTGCCTGCTCCTCCAGCGGCAATCTGCAGTCTGA
CCTCGACAGGGAAGCCCTTCTTCGGCAGAAGTGACAGCTTTTTGAAATGTCTTTAAGCA
AGGTGCGGAGACTTCAAATAAATGAGAATAATCTTAAAATCAGCCTTGACTAACCCAGGAA
TCATTGGCTATAATAGAGTCAGGAACAAGATCTGCTGTACCAGAGCAGACCCTAAAAAAA
CAACAACCAATGGAGGATAAATCTTATG
>P_peg.1595_SOR
ACATCAATGCTGCGCGGCTGGCGGTGCGCAGAAATTTGCGCAGAAAGCCATTGAGATTTA
TTGCAAGTGAGCCCAAAAACGCTTTGCGTGTTCAGTTACAGAAATCAATAATAGGAAATG
TTATCATATAGATACAAGAAACACACCGGATAACATTCAGTGGAGGATTTCCGATATG
>P_peg.3138_SOR
GCTGCCATCATGCCATTGCGGTGTTGGTGGTGGTGCATATTGCCATGGGAAGCTGAGG
GCATTTCCACAGCACCAGGCTGCTTGCCTGACCCGTCACAGAAATCTAACTAGGAAATG
TTATCATATAGTACAGAAACACCGGATAACATTCAGTGGAGGATTTTAAATATG
>P_peg.38_Fdp
TTATATTAGAACTTGGTCATATAACCTACCGCAGTAGAACGTCATTCCGCCATCCGGCCT
GATAAATAGTTGACGAGGCGGCAGACTGTGCTATACTGAGAAGCTTTCCCTGAAATAAAT
GCCAGCCATGGCAGACCATACACAAGATAACAGAGAGGAAATGTGCTTATG
>P_peg.539
CAATAGATATTTGCAAAAAAGTGAGAAATCTTTAATTTGTAGTTGACA AAAAGAAGAAATG
GATAATAATAAGATAAAGAAATAAGACTTATTTCTGATTTAGGGGGCGGCAGTATG
```

Aucun régulateur transcriptionnel n'a jusqu'à ce jour été mis en évidence chez *F. prausnitzii*. A partir de nos résultats, nous proposons un premier modèle hypothétique de régulation (Figure 15). Notre hypothèse est que le motif nucléotidique identifié serait le site de reconnaissance d'un régulateur transcriptionnel qui répondrait au stress H₂O₂ et régulerait de manière coordonnée l'expression d'au moins 7 gènes.

Chez *C. difficile*, la réponse générale aux stress et l'adaptation à l'entrée en phase stationnaire sont médiées par le facteur σ alternatif, σ^B (Kint *et al.*, 2017). Les facteurs σ sont des sous-unités de l'ARN polymérase permettant la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles. Le régulon σ^B comprend de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress et en particulier la réponse aux stress oxydants via la détoxification de l'O₂, des ERO ou du NO (Kint *et al.*, 2017; Boekhoud *et al.*, 2020). Or, les souches de *F. prausnitzii* ne contiennent pas d'homologue potentiel à σ^B .

Nous avons alors cherché la présence des sites de fixation -10 et -35 du facteur σ^A dans les régions promotrices de nos 6 gènes d'intérêt avec l'outil BPROM (Solovyev & Salamov, s. d.). Nous n'avons pas pu identifier de promoteurs de type σ^A dans la région promotrice de *peg.541_AhpC* ce qui laisse supposer que l'expression de ce gène dépend d'un facteur σ alternatif ou bien du promoteur σ^A en amont du gène *peg.539* (Figure 14 B et Figure 15A).

Comme indiqué sur la Figure 14B, nous retrouvons des promoteurs de type σ^A en amont des gènes *peg.743_Rbr*, *peg.1991-revRbr* et *peg.38_Fdp* avec une distance optimale de 17 ± 1 pb entre les éléments -10 et -35. De même pour les gènes *peg.743_Rbr*, *peg.1991-revRbr* et *peg.38_Fdp* mais avec une distance sous-optimale de 19 ± 1 pb entre les éléments -10 et -35.

De façon intéressante, un gène codant un régulateur transcriptionnel de type MerR est localisé en amont du gène *peg.1595_SOR* (Figure 15B). Les régulateurs de type MerR qui ont été étudiés expérimentalement activent des promoteurs dépendants de σ^{70} ou de σ^A sous-optimaux, dans lesquels l'espacement entre les éléments -35 et -10 reconnus par le facteur σ est supérieur aux 17 ± 1 pb (Brown *et al.*, 2003). L'activation de la transcription se fait par la distorsion de l'ADN via l'interaction MerR-ADN. La majorité des régulateurs de la famille MerR réagissent aux stimuli environnementaux, tels que le stress oxydatif, les métaux lourds ou les antibiotiques.

Pour compléter notre modèle hypothétique de régulation, nous proposons que la forte activation des gènes codant les deux SOR, soit sous le contrôle du régulateur de type MerR (codé par le gène *peg.1594*) en réponse à un stress O₂ (Figure 15).

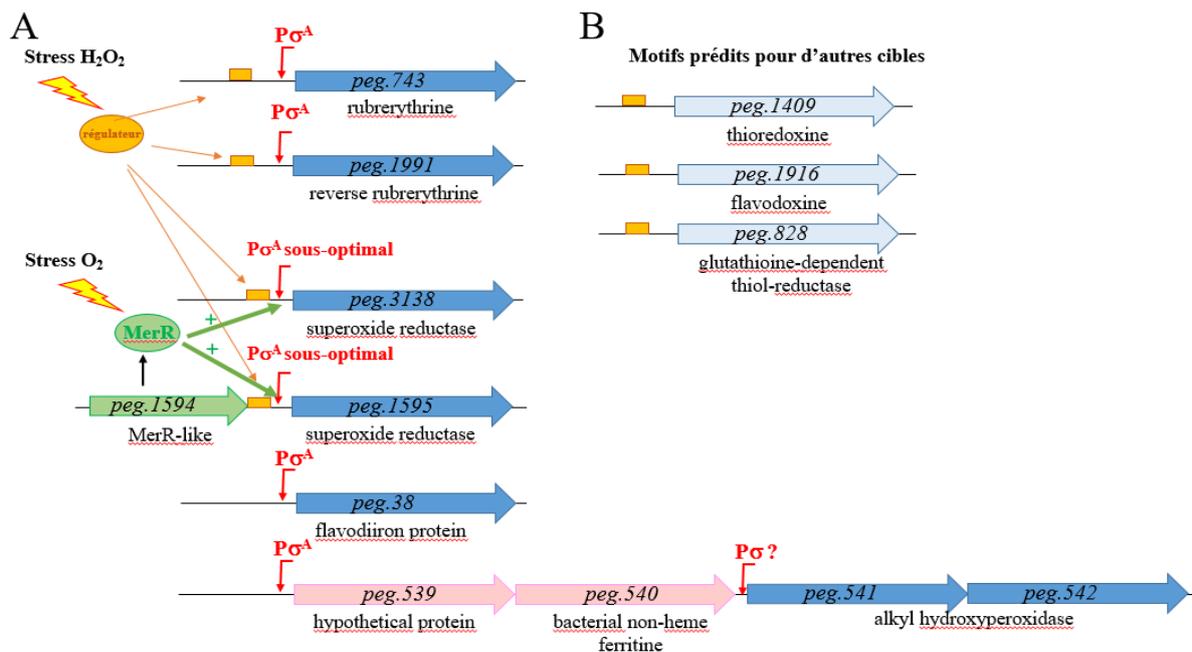


Figure 15 : Modèle hypothétique de régulation des gènes impliqués dans la détoxification de l' O_2 et des ERO après un stress oxydant. (A) Régulation hypothétique des gènes *peg.743*, *peg.1991*, *peg.3138* et *peg.1595* après un stress H_2O_2 ou un stress O_2 . L'activateur MerR pourrait être activé par l' H_2O_2 et aller activer les gènes codant les SOR. (B) Potentiels gènes impliqués dans la détoxification de l' O_2 et des ERO possédant le motif consensus dans leur région promotrice.

Complémentation fonctionnelle chez *C. difficile*

Jusqu'à présent, aucun outil génétique n'est disponible chez *F. prausnitzii* pour étudier la fonction de gènes d'intérêt. Afin de valider la fonction des potentielles enzymes de détoxification de *F. prausnitzii*, nous avons donc cherché à compléter des mutants de *C. difficile* inactivés dans des gènes codant des enzymes de détoxification de l' O_2 et/ou des ROS. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Martin-Verstraete à l'Institut Pasteur. Nous nous sommes concentrés sur l'étude de la fonction des enzymes de détoxification présentes dans les souches A2-165 et L2-6.

Les séquences nucléotidiques des souches de A2-165 et L2-6 (Tableau 1) prédites pour coder des protéines de détoxification de l' O_2 et des ERO sont optimisées et clonées dans un vecteur d'expression pMTL84122 pouvant se répliquer chez *C. difficile*. *F. prausnitzii* est une bactérie possédant un génome riche en GC, environ 60%, alors que *C. difficile* possède un pourcentage en GC proche de 30%. Par conséquent, l'usage des codons par la machinerie de traduction est différent. L'optimisation de séquences de *F. prausnitzii* pour une expression optimale chez *C. difficile* consiste à baisser les pourcentages en GC des séquences codantes d'intérêt au même pourcentage en GC que *C. difficile* sans modifier la séquence en acides aminés grâce à la redondance du code génétique. Les séquences optimisées sont clonées dans un vecteur d'expression en aval du promoteur *thL* qui permet une expression constitutive des

gènes insérés en aval chez *C. difficile*. Les différents plasmides ainsi construits ont alors été introduits dans une série de mutants de *C. difficile*.

Des tests de survie à 2 h et 3 h à l'atmosphère ambiante (Figure 16) ou 48 h en hypoxie (0,4% d'O₂) (Figure 17) des mutants inactivés pour des gènes impliqués dans la détoxification de l'air ou des ERO de *C. difficile* complémentés par les copies venant de *F. prausnitzii* sont réalisés afin de voir si l'expression des gènes codant les protéines de *F. prausnitzii* permettait de restaurer le phénotype sauvage. Le gène codant une Fdp potentielle chez la souche A2-165 de *F. prausnitzii* semble restaurer partiellement le phénotype sauvage du simple mutant (*fdpA::erm*) et du double mutant ($\Delta fdpF$ *fdpA::erm*) (Figure 16). La séquence codant potentiellement une Rbr de la souche L2-6 restaurerait partiellement le phénotype de survie du mutant Δrbr après 2 h d'exposition à l'air ambiant (Figure 16). De même pour la séquence codant la revRbr de L2-6, le phénotype de survie à l'air est plus visible à 3 h d'exposition (Figure 16). Le gène codant l'une des SOR de L2-6 restaure partiellement le phénotype de survie à l'air ambiant. L'ensemble des résultats observés avec ces tests de survie à 2 h ou 3 h d'exposition à l'air ambiant montre une restauration seulement très partielle du phénotype sauvage avec une survie augmentée d'un facteur 10 au maximum. Il nous faudra faire encore des mises au point des tests de survie à l'air sur boîte pour un temps d'exposition plus long pour certains mutants et aussi changer de promoteur (voir Discussion).

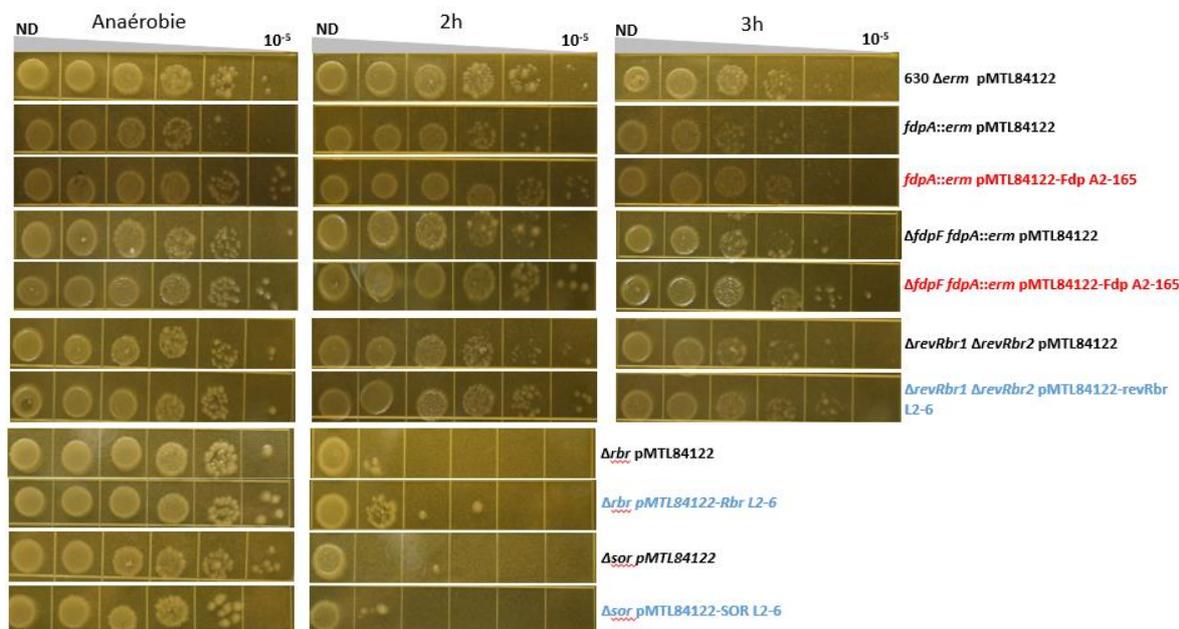


Figure 16 : Hétérogénéité de survie à l'air ambiant des complémentations fonctionnelles de *C. difficile*. Les génotypes notés en rouge correspondent à des mutants complémentés avec un gène de la souche de *F. prausnitzii* A2-165, ceux en bleu correspondent à une complémentation avec un gène de la souche de *F. prausnitzii* L2-6 et ceux en noir sont les contrôles portant le vecteur d'expression pMTL84122 vide. (n=4)

Dans une chambre d'hypoxie où il est possible de contrôler la concentration en O₂, on observe pour les mutants une meilleure survie comparé au test de survie à l'air ambiant comme attendu. Une complémentation partielle du gène codant la Fdp de A2-165 chez le simple mutant *fdpA* de *C. difficile* après 48 h d'exposition à 0,4% d'O₂ est observée (Figure 17). De manière surprenante, chez le double mutant, l'expression du gène codant la Fdp de A2-165 semble toxique pour la cellule avec une exposition prolongée à l'hypoxie, ce résultat est observé sur les deux essais réalisés. Chez le double mutant $\Delta revRbr1 \Delta revRbr2$, nous n'observons aucune complémentation avec le gène codant la revRbr de L2-6. Alors que l'on observait une complémentation partielle lors des tests de survie à l'air ambiant. Le test de survie à 0,4% d'O₂ n'a pas été réalisé pour les mutants Δrbr et Δsor qui n'ont pas de phénotypes à ces tensions en O₂.

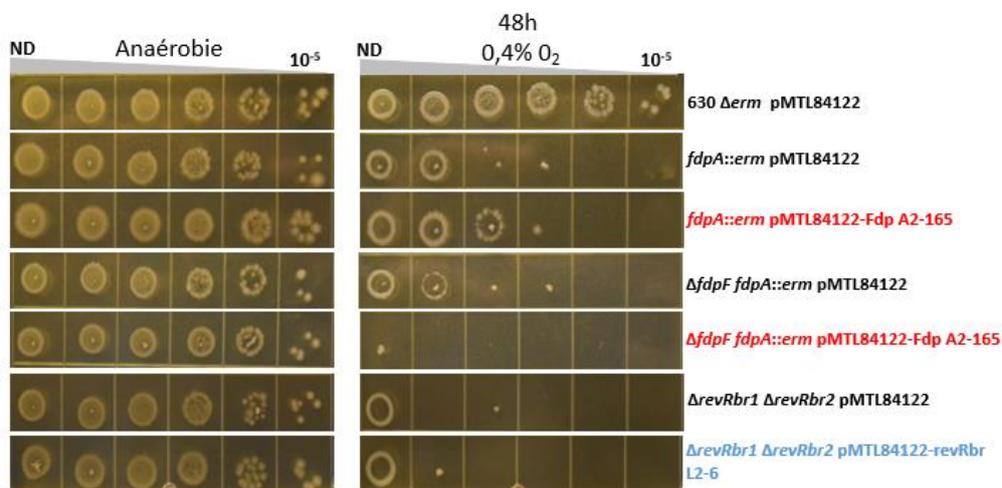


Figure 17 : Hétérogénéité de survie à l'hypoxie (0,4 % O₂) des complémentations fonctionnelles de *C. difficile*. Les génotypes écrits en rouge correspondent à des mutants complémentés avec un gène de la souche de *F. prausnitzii* A2-165, ceux écrits en bleu correspondent à une complémentation avec un gène de la souche de *F. prausnitzii* L2-6 et ceux écrits en noir sont les contrôles portant le vecteur d'expression pMTL84122 vide. (n=2)

Discussion

Généralement, la dysbiose du microbiote intestinal montre une réduction de la diversité microbienne et une raréfaction des bactéries strictement anaérobies comme *F. prausnitzii* (Zhang *et al.*, 2018). Ce changement d'état est corrélé à l'augmentation de la concentration en O₂ dans les dysbioses intestinales. Des études sur la bio-structure du microbiote fécale chez des individus sains ont montrés la localisation de *F. prausnitzii* à de faible concentration dans le mucus (Swidsinski *et al.*, 2008). Le mucus est une zone de l'intestin avec une faible tension en O₂ (1 à 2%). Par conséquent, ce projet de recherche avait comme premier but de comparer la diversité de la sensibilité au stress oxydant chez des souches du genre *Faecalibacterium*.

Les résultats de nos analyses *in silico* montrent qu'il existe une grande diversité dans le contenu en systèmes de détoxification de l'O₂ et des ERO au sein de ce groupe bactérien (Figure 6). Les comparaisons de la sensibilité à l'air ambiant et à l'H₂O₂ dans des essais *in vivo* montrent aussi une grande diversité dans la capacité à résister au stress oxydant. Mais la relation directe entre contenu en enzymes de détoxification et capacité de résistance n'est pas évidente. Si la souche CNCM4543 qui contient seulement une Fdp et une revRbr est bien la souche la plus sensible (2 min. de résistance à l'air ambiant et CMI en H₂O₂ relativement basse), les observations pour les autres souches sont hétérogènes (Figure 7 et Tableau 3). Notre hypothèse de départ était que la souche L2-6 serait plus résistante au stress oxydant que la souche A2-165 car elle a été décrite comme persistante dans des cas d'inflammations gastro-intestinales (Song *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018). Or, dans les conditions testées, il s'avère que la souche L2-6 est plus sensible à l'O₂ ambiant et à H₂O₂ que la souche A2-165 (Figures 9 et 10). En ce qui concerne le stress O₂, nous nous sommes placés dans des conditions drastiques (20% d'O₂) bien éloignée des conditions physiologiques rencontrées dans le côlon (0,1-0,4% dans la lumière du côlon chez une personne saine) (Keeley & Mann, 2019). Aussi, il serait plus pertinent de comparer la résistance à l'O₂ et la capacité de croissance des différentes souches à des niveaux de tensions en O₂ plus physiologiques. Durant mon stage, j'ai effectué un premier essai de croissance à 1% d'O₂ dans l'équipe d'Isabelle Martin-Verstraete. De façon intéressante, excepté la souche CNCM4543, les 4 autres souches ont montré une capacité de croissance dans ces conditions (données non présentées). Ces tests prometteurs pourront être poursuivis en augmentant graduellement la tension en O₂. D'autre part, il serait intéressant d'étendre l'étude à un plus grand nombre de souches, afin d'avoir une vision plus exhaustive de la tolérance à l'O₂ au sein du genre *Faecalibacterium*.

La différence inattendue entre L2-6 et A2-165 soulève de nombreuses questions. La sensibilité au stress oxydant repose sur des phénomènes très complexes. Elle ne dépend pas uniquement de la présence et de l'efficacité des enzymes de détoxification. L'O₂ et les ERO réagissent de manière non spécifique avec de nombreuses enzymes/protéines redox conduisant à leur inhibition en raison de l'endommagement des centres catalytiques, des groupements Fe/S ou des co-facteurs flaviniques. Parmi les enzymes « empoisonnées » par l'O₂ chez les bactéries anaérobies, plusieurs sont impliquées dans des étapes métaboliques de la conversion de l'énergie tels la pyruvate ferredoxine oxydoréductase, la pyruvate formiate lyase, les CO-déshydrogénases ou la 4-hydroxy-butyryl CoA déshydratase. Pour échapper à ce goulot d'étranglement, les bactéries anaérobies redirigent, lorsque cela est possible, leur métabolisme carboné et énergétique vers des voies plus résistantes à l'O₂ qui varient selon la spécificité de leur métabolisme (Morvan *et al.*, 2021). Dans une publication précédente sur la souche

F. prausnitzii A2-165, il a été montré qu'en absence d'O₂, les cellules métabolisent le glucose en acétate, CO₂ et électrons, qui sont utilisés dans la production d'acides gras à chaîne courtes tel que le butyrate (Khan *et al.*, 2012). Par contre, en présence de trace d'O₂, les électrons sont pris en charge par un système redox flavine-cystéine extracellulaire, ce qui aboutit à la réduction de l'O₂ en H₂O. La production de butyrate est alors fortement diminuée (Khan *et al.*, 2012). La différence entre L2-6 et A2-165 pourrait donc s'expliquer par (i) une différence de sensibilité à l'oxydation de certaines enzymes métaboliques et/ou (ii) par une différence de capacité d'adaptation du métabolisme. Il serait intéressant de doser les métabolites (butyrate, formate, lactate) produits par les différentes souches de *F. prausnitzii* dans des conditions anaérobies et en présence de faibles tensions en O₂ afin de comparer leur capacité d'adaptation métabolique. Cela est d'autant plus important que le butyrate est impliqué dans le maintien de la muqueuse intestinale et dans la lutte contre l'inflammation (Leonel & Alvarez-Leite, 2012; Miquel *et al.*, 2015; Lenoir *et al.*, 2020). Une troisième hypothèse est que toutes les souches de *F. prausnitzii* n'ont peut-être pas la même capacité à réparer les groupes thiols oxydés. L'étude des systèmes de protection et de réparation des groupes thiols chez *F. prausnitzii* mérite une attention particulière.

Enfin, il faut noter que dans un intestin inflammé, le potentiel redox est aussi modifié (Million & Raoult, 2018). De nombreuses maladies sont soupçonnées d'être associées à une altération du microbiote liée à un potentiel redox anormal de l'intestin. Au niveau cellulaire, il a été montré qu'il existe un lien entre la régulation du potentiel redox et l'activation de la voie NF- κ B (Flohé *et al.*, 1997). Aussi, la capacité à persister de la souche L2-6 dans un contexte colique inflammé pourrait être due à une capacité à croître à un potentiel d'oxydo-réduction plus élevé que la souche A2-165. Cette hypothèse mérite aussi de plus amples investigations.

Aucune régulation transcriptionnelle n'est jusqu'à présent connue chez *F. prausnitzii*. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'expression transcriptionnelle de certains gènes potentiellement impliqués dans la réponse à un stress oxydant dans la souche L2-6. Ces gènes codent pour des enzymes de type Rbr, revRbr, Fdp et SOR qui sont présentes chez les bactéries anaérobies, comme *C. difficile*. Le gène codant AhpCF, uniquement retrouvé chez la souche L2-6, est un gène présent majoritairement chez des bactéries aérobies. L'expression des six gènes de la L2-6 a été étudiée lors d'un stress à l'atmosphère ambiante (Figure 12) ou à une concentration en H₂O₂ égale à 0,5 fois la CMI (Figure 13). Les profils d'expression de ses six gènes sont différents en fonction du stress subi et entre eux. Nous proposons l'identification d'un potentiel régulon après l'analyse de l'expression des gènes codant les SOR, la Rbr et la revRbr. Ces quatre gènes possèdent un motif commun en amont de boîtes -10 et -35 typiques du facteur σ^A suggérant l'implication d'un régulateur transcriptionnel en réponse à un stress H₂O₂.

En ce qui concerne le stress à l'atmosphère ambiant, une très forte surexpression des gènes codant les SOR est observée. Le gène, *peg.1595*, codant l'une des SOR est en opéron avec un régulateur transcriptionnel de type MerR (Figure 15A). Les régulateurs de type MerR sont connus comme activateur en se fixant entre la boîte -10 et -35 pour distordre l'ADN et permettre au complexe facteur σ /ARN polymérase de se fixer sur l'ADN et de commencer la transcription. La majorité des régulateur MerR répondent à un stimuli environnemental tel que le stress oxydant, les métaux lourds ou les antibiotiques. Par la suite, il serait intéressant de purifier le régulateur MerR de la souche L2-6 et de vérifier sa fixation sur les régions promotrices des gènes codant les SOR par une expérience de retard sur gel. Un autre régulateur connu pour réguler de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress tel que le stress oxydant est le facteur σ^B . Ce facteur σ a été très étudié chez la bactérie modèle *B. subtilis*. Il est aussi connu chez *C. difficile* pour réguler de nombreux gènes impliqués dans la détoxification de l'O₂ comme les gènes codant les Fdp et revRbr. En revanche, chez *F. prausnitzii*, on ne retrouve pas de facteur de type σ^B .

Lors de ce projet, nous avons tenté de démontrer la fonction des enzymes prédites de *F. prausnitzii* par une expérience de complémentation fonctionnelle chez *C. difficile* car il n'y a aucun outil génétique disponible chez *F. prausnitzii*. Nous n'avons pu observer que des complémentations très partielles du phénotype sauvage lors de survie à l'atmosphère ambiant ou à de faible tension en O₂ et des mises au point des tests seront nécessaires. De plus, dans nos essais, l'expression des gènes codant les enzymes potentielles de détoxification des souches A2-165 ou L2-6 était sous contrôle du promoteur *thL* qui est un promoteur constitutif présent dans le vecteur pMTL84122. Des expériences très récentes suggèrent que ce promoteur est un promoteur faible qui pourrait ne pas permettre une complémentation optimale chez *C. difficile* (données d'Isabelle Martin-Verstraete). Nous proposons donc d'utiliser un autre promoteur constitutif fort tel que le promoteur *vegA* de *B. subtilis* qui fonctionne bien chez *C. difficile* ou les promoteurs des gènes correspondant chez *C. difficile*. Enfin, si l'expression de certains gènes sous le contrôle d'un promoteur fort était toxique pour la bactérie, il serait envisageable d'utiliser un promoteur inductible comme le promoteur *tet*.

Chez *C. difficile* la réponse au stress O₂ entraîne un remaniement dans l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du carbone, des acides aminés, du soufre, du fer ou de co-facteurs, ainsi que dans la réparation de molécules endommagées par l'oxydation telles que les groupements thiols et l'ADN (revue Morvan *et al.*, 2021). Afin d'avoir une vision globale de la réponse au stress oxydant chez *F. prausnitzii*, le projet pourrait être poursuivi par l'utilisation d'approches de type transcriptomique et/ou protéomique. Cela permettrait de mettre en évidence des gènes/protéines directement impliqués dans les processus

de détoxification (notamment les protéines partenaires des enzymes de détoxification pour le transfert des électrons jusqu'au NADP), des régulateurs transcriptionnels spécifiquement impliqués dans la réponse au stress ainsi que des voies métaboliques réorientées en réponse au stress oxydant. Ainsi une vision intégrée de la réponse au stress oxydant chez *F. prausnitzii* permettrait de mieux comprendre la disparition, le maintien ou la domination de certaines souches au sein d'un environnement colique inflammé.

Bibliographie

- Agus, A., Clément, K., & Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*, 70(6), 1174-1182. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323071>
- Aw, T. Y. (2003). Cellular redox : A modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 18, 201-204. <https://doi.org/10.1152/nips.01448.2003>
- Bailey, T. L., & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 2, 28-36.
- Boekhoud, I. M., Michel, A.-M., Corver, J., Jahn, D., & Smits, W. K. (2020). Redefining the *Clostridioides difficile* σ B Regulon : σ B Activates Genes Involved in Detoxifying Radicals That Can Result from the Exposure to Antimicrobials and Hydrogen Peroxide. *MSphere*, 5(5), e00728-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00728-20>
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 145-163. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00051-2)
- Dangour, A. D., Lock, K., Hayter, A., Aikenhead, A., Allen, E., & Uauy, R. (2010). Nutrition-related health effects of organic foods : A systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(1), 203-210. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29269>
- Flohé, L., Brigelius-Flohé, R., Saliou, C., Traber, M. G., & Packer, L. (1997). Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(6), 1115-1126. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00501-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00501-1)
- Giordano, N., Hastie, J. L., & Carlson, P. E. (2018). Transcriptomic profiling of *Clostridium difficile* grown under microaerophilic conditions. *Pathogens and Disease*, 76(2). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty010>
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., & Minton, N. P. (2007). The ClosTron : A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 452-464. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.05.021>
- Hold, G. L., Schwierz, A., Aminov, R. I., Blaut, M., & Flint, H. J. (2003). Oligonucleotide Probes That Detect Quantitatively Significant Groups of Butyrate-Producing Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4320-4324. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4320-4324.2003>
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? : Oxidative stress in natural environments. *Environmental Microbiology*, 21(2), 521-530. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14445>
- Karhausen, J., Furuta, G. T., Tomaszewski, J. E., Johnson, R. S., Colgan, S. P., & Haase, V. H. (2004). Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1098-1106. <https://doi.org/10.1172/JCI200421086>

- Keeley, T. P., & Mann, G. E. (2019). Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans. *Physiological Reviews*, 99(1), 161-234. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2017>
- Keshavarzian, A., Sedghi, S., Kanofsky, J., List, T., Robinson, C., Ibrahim, C., & Winship, D. (1992). Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: Analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology*, 103(1), 177-185. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91111-g](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91111-g)
- Khan, M. T., Duncan, S. H., Stams, A. J. M., van Dijk, J. M., Flint, H. J., & Harmsen, H. J. M. (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *The ISME Journal*, 6(8), 1578-1585. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.5>
- Khan, M. T., van Dijk, J. M., & Harmsen, H. J. M. (2014). Antioxidants Keep the Potentially Probiotic but Highly Oxygen-Sensitive Human Gut Bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* Alive at Ambient Air. *PLoS ONE*, 9(5), e96097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096097>
- Kint, N., Janoir, C., Monot, M., Hoys, S., Soutourina, O., Dupuy, B., & Martin-Verstraete, I. (2017). The alternative sigma factor σ_B plays a crucial role in adaptive strategies of *Clostridium difficile* during gut infection. *Environmental Microbiology*, 19(5), 1933-1958. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13696>
- Kint, N., Morvan, C., & Martin-Verstraete, I. (2022). Oxygen response and tolerance mechanisms in *Clostridioides difficile*. *Current Opinion in Microbiology*, 65, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.009>
- Lenoir, M., Martín, R., Torres-Maravilla, E., Chadi, S., González-Dávila, P., Sokol, H., Langella, P., Chain, F., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2020). Butyrate mediates anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in intestinal epithelial cells through Dact3. *Gut Microbes*, 12(1), 1-16. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1826748>
- Leonel, A. J., & Alvarez-Leite, J. I. (2012). Butyrate: Implications for intestinal function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(5), 474-479. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835665fa>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loguercio, C., D'Argenio, G., Delle Cave, M., Cosenza, V., Della Valle, N., Mazzacca, G., & Del Vecchio Blanco, C. (2003). Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 35(9), 635-641. [https://doi.org/10.1016/s1590-8658\(03\)00379-7](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(03)00379-7)
- Martins, M. C., Romão, C. V., Folgosa, F., Borges, P. T., Frazão, C., & Teixeira, M. (2019). How superoxide reductases and flavodiiron proteins combat oxidative stress in anaerobes. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 36-60. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.051>
- Million, M., & Raoult, D. (2018). Linking gut redox to human microbiome. *Human Microbiome Journal*, 10, 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.07.002>
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., Hudault, S., Bridonneau, C., Northen, T., Bowen, B., Bermúdez-Humarán, L. G., Sokol, H., Thomas, M., & Langella, P. (2015). Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio*, 6(2), e00300-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00300-15>
- Morvan, C., Folgosa, F., Kint, N., Teixeira, M., & Martin-Verstraete, I. (2021). Responses of *Clostridia* to oxygen: From detoxification to adaptive strategies. *Environmental Microbiology*, 23(8), 4112-4125. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15665>
- Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., & Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(10), 573-584. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.88>

- Quévrain, E., Maubert, M. A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L. G., Pigneur, B., Lequin, O., Kharrat, P., Thomas, G., Rainteau, D., Aubry, C., Breyner, N., Afonso, C., Lavielle, S., Grill, J.-P., ... Seksik, P. (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*, 65(3), 415-425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307649>
- Rigottier-Gois, L. (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases : The oxygen hypothesis. *The ISME Journal*, 7(7), 1256-1261. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.80>
- Sadabad, M. S., Khan, M. T., van Dijn, J. M., & Harmsen, J. M. (2015). *Riboflavin increases the abundance of Faecalibacterium prausnitzii and Roseburia in fecal samples of healthy volunteers and positively affects the overall microbial balance in the gut.* 11.
- Sakamoto, M., Sakurai, N., Tanno, H., Iino, T., Ohkuma, M., & Endo, A. (2022). Genome-based, phenotypic and chemotaxonomic classification of *Faecalibacterium* strains : Proposal of three novel species *Faecalibacterium duncaniae* sp. nov., *Faecalibacterium hattorii* sp. nov. and *Faecalibacterium gallinarum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(4). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005379>
- Seril, D. N., Liao, J., Yang, G.-Y., & Yang, C. S. (2003). Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis : Studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*, 24(3), 353-362. <https://doi.org/10.1093/carcin/24.3.353>
- Solovyev, V., & Salamov, A. (s. d.). *AUTOMATIC ANNOTATION OF MICROBIAL GENOMES AND METAGENOMIC SEQUENCES.* 19.
- Song, H., Yoo, Y., Hwang, J., Na, Y.-C., & Kim, H. S. (2016). *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(3), 852-860. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.021>
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Verstraelen, H., Osowska, S., & Doerffel, Y. (2008). Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology*, 135(2), 568-579. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.017>
- Ueda, A., Shinkai, S., Shiroma, H., Taniguchi, Y., Tsuchida, S., Kariya, T., Kawahara, T., Kobayashi, Y., Kohda, N., Ushida, K., Kitamura, A., & Yamada, T. (2021). Identification of *Faecalibacterium prausnitzii* strains for gut microbiome-based intervention in Alzheimer's-type dementia. *Cell Reports Medicine*, 2(9), 100398. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100398>
- Zhang, X., Deeke, S. A., Ning, Z., Starr, A. E., Butcher, J., Li, J., Mayne, J., Cheng, K., Liao, B., Li, L., Singleton, R., Mack, D., Stintzi, A., & Figeys, D. (2018). Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, 9(1), 2873. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05357-4>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, 30(6), 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

Annexe

Construction dans pMTL84122 avec séquences optimisées pour complémentation fonctionnelle chez <i>C. difficile</i>		
TB037	CATGATTACGAATTCGAGCTCatgtcagttaaaaaatatcag	Forward- <i>peg2868</i> A2-165
TB038	TGACGTCGACTCTAGAGGATttatttagctaataattcatcagc	Reward- <i>peg2868</i> A2-165
TB039	CATGATTACGAATTCGAGCTCatgtcagttaaaaatataatcatcag	Forward- <i>peg.38</i> L2-6
TB040	TGACGTCGACTCTAGAGGATttattttgataataattcttcaacc	Reward- <i>peg.38</i> L2-6
TB041	CATGATTACGAATTCGAGCTCatggaattaaaggaactaaaactg	Forward- <i>peg.2386</i> A2-165
TB042	TGACGTCGACTCTAGAGGATttaataattatgttttttaattc	Reward- <i>peg.2386</i> A2-165
TB043	CATGATTACGAATTCGAGCTCatggaattaaaggaactaaaactg	Forward- <i>peg.743</i> L2-6
TB044	TGACGTCGACTCTAGAGGATttaataatttttagcttttaattc	Reward- <i>peg.743</i> L2-6
TB045	CATGATTACGAATTCGAGCTCatggaagatatattaatg	Forward- <i>peg.331</i> A2-165
TB046	TGACGTCGACTCTAGAGGATttaataatcaacattaaaatc	Reward- <i>peg.331</i> A2-165
TB047	CATGATTACGAATTCGAGCTCatgaaaaatattgtttgtactg	Forward- <i>peg.1991</i> L2-6
TB048	TGACGTCGACTCTAGAGGATttaaacttcagtattaaaatc	Reward- <i>peg.1991</i> L2-6
TB049	CATGATTACGAATTCGAGCTCatgaaagctaaattttatatatg	Forward- <i>peg.1595</i> L2-6
TB050	TGACGTCGACTCTAGAGGATttataatttagtcatccataatcc	Reward- <i>peg.1595</i> L2-6
TB051	CATGATTACGAATTCGAGCTCatgaaagctaaattttatatatgtg	Forward- <i>peg.3138</i> L2-6
TB052	TGACGTCGACTCTAGAGGATttataatttagtcatccataatcc	Reward- <i>peg.3138</i> L2-6
TB053	ATCCTCTAGAGTCGACGTCA	Forward- pMTL84122 région NdeI /BamHI
TB054	GAGCTCGAATTCGTAATCATG	Reward- pMTL84122 région NdeI /BamHI
RT-qPCR chez <i>F. prausnitzii</i>		
TB019	ACACCCTGACCTTTGTGCTT	Forward- <i>peg.2868-A2/165</i>
TB020	CAGTCGGCGTTTTTCGTCAA	Reward- <i>peg.2868-A2/165</i>
TB021	GGTGAGCTATGAGTCCACCG	Forward- <i>peg.38-L2/6</i>
TB022	TGCCACGATGTTTCAGGTAG	Reward- <i>peg.38-L2/6</i>
TB023	CGCCAAGATGTGGTTCAAGG	Forward- <i>peg.2386-A2/165</i>
TB024	GAAGCCCTCTTCCTTGGCTT	Reward- <i>peg.2386-A2/165</i>
TB025	TTGCTGCCAACCTCAAGGAG	Forward- <i>peg.743-L2/6</i>
TB026	AAGTAGCTCTGGGGATGTGC	Reward- <i>peg.743-L2/6</i>
TB027	GTCGTGACCGATAGCACCAA	Forward- <i>peg.331-A2/165</i>
TB028	TTGCCATTTTCGTGGACGGTA	Reward- <i>peg.331-A2/165</i>
TB029	ACAAGCGCTATGCCTACGAG	Forward- <i>peg.1991-L2/6</i>
TB030	TCTTGGCCAGGTCCATCTTG	Reward- <i>peg.1991-L2/6</i>
TB031	CCCATGGCGGATGTTCACTA	Forward- <i>peg.1595-L2/6</i>
TB032	GCAGTATGCGTAAACAGCCA	Reward- <i>peg.1595-L2/6</i>
TB033	TCCAGTGGCTCTTTGTGGAG	Forward- <i>peg.3138-L2/6</i>
TB034	TCGTCATCCACAGACCATGC	Reward- <i>peg.3138-L2/6</i>
TB071	CCGACACACATTTTCGTGCAT	Forward- <i>peg.541</i> L2-6
TB072	AATGAAGCTTCCGCGCTCT	Reward- <i>peg.541</i> L2-6
TB073	AGCTGGCATACTTCCGTGTC	Forward- <i>peg.52</i> L2-6
TB074	AGCAGCAATATCACCTGCGT	Reward- <i>peg.52</i> L2-6
TB075	CTATATGCCCGCACCTACCG	Forward- <i>peg.3000</i> A2-165
TB076	ACCGGAGTAGACACGGAAGT	Reward- <i>peg.3000</i> A2-165