



HAL
open science

Étude de la croissance de *Faecalibacterium duncaniae* en présence de protéines d'origine végétale et sélection de variants aérotolérants.

Sandrine Auger, Rime Chebbo

► To cite this version:

Sandrine Auger, Rime Chebbo. Étude de la croissance de *Faecalibacterium duncaniae* en présence de protéines d'origine végétale et sélection de variants aérotolérants.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. hal-04664026

HAL Id: hal-04664026

<https://hal.inrae.fr/hal-04664026>

Submitted on 29 Jul 2024

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.



Étude de la croissance de *Faecalibacterium duncaniae* en présence de protéines d'origine végétale et sélection de variants aérotolérants

Mémoire de stage de Master 2 Biologie moléculaire et cellulaire parcours
Bactériologie moléculaire et médicale.

Université Paris Cité.

Rime CHEBBO

59^E Boulevard Jourdan

75014 Paris

06.02.49.15.98

Unité MICALIS, Equipe Probiôte dirigée par
Philippe LANGELLA, groupe de Jean-Marc CHATEL

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

Domaine Vilvert, Jouy-en-Josas 78352

Numéro : 01.34.65.24.69

2023-2024

Remerciements :

Je tiendrais à remercier particulièrement Sandrine AUGER de m'avoir accompagné le long de ce stage, d'avoir été toujours disponible et à l'écoute. Merci d'être une excellente encadrante et une bonne conseillère. J'étais chanceuse de faire mon stage à tes côtés.

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 Claire Lepoupon, Anne-Emmanuel Roux et Jade Loiseau d'avoir été toujours là pour me former aux manip cellulaires.

À Lise Sanchez, Thais Vileila, Monique Ferrary (la géographe), Bárbara Maria, Luis Lima, Mariachiara, Katel Hallaf, Liliia Paniushkina, Camille Vielhescaze, Augustin Guichard et Zoé Roussé, je garderai un excellent souvenir des moments qu'on a partagés et j'espère de tout cœur qu'on restera en contact bien après mon départ, vous allez BEAUCOUP me manquer...

À toi maintenant, à Adrien, Jérôme, Pascale, François Paravel, merci de m'avoir écouté attentivement tous les jours sans jamais te plaindre, de m'avoir donné goût à la recherche scientifique et de m'avoir toujours poussé à aller plus loin dans ce que je désirais. Merci d'avoir abouti à bien gérer mon stress, de m'avoir motivé, de m'avoir soutenu et d'être toujours là pour moi. Je ne t'oublierai jamais. MA VIE VA MANQUER DE TOI...

Je tiendrais aussi à remercier infiniment Hadi Al JAMAL qui était toujours à mon écoute malgré sa présence au Liban et de m'avoir toujours aidé, soutenu et motivé depuis mon arrivée en France.

Merci à ma famille, ma mère, mes sœurs, mes neveux et mon frère, qui m'ont porté tout l'amour et le soutien qu'on peut espérer. Merci pour votre sacrifice, confiance en moi et votre encouragement.

Résumé

Le microbiote gastro-intestinal humain est constitué de milliards de bactéries commensales de diverses espèces, principalement des anaérobies stricts vivant dans le côlon. Parmi elles, les bactéries du genre *Faecalibacterium* sont particulièrement abondantes, représentant jusqu'à 5% de la communauté bactérienne du microbiote intestinal (Martín et al., 2023). Chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les conditions physico-chimiques du tube digestif, telles que la tension en oxygène, le pH, les acides biliaires et les espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont altérées. L'augmentation de la tension en oxygène et la formation d'ERO induisent un stress oxydant pouvant entraîner une dysbiose. Une approche prometteuse pour restaurer un microbiote sain est l'utilisation de probiotiques, notamment les "Next Generation Probiotics" (NGP) comme *Faecalibacterium*.

Pour ce but industriel, ce projet avait pour but d'étudier l'impact des peptones d'origine végétale sur la croissance de la souche *Faecalibacterium duncaniae* A2-165, et de chercher à sélectionner des variants plus résistants au stress oxydant. Les résultats ont montré que les peptones de légumineuses et de céréales peuvent remplacer le mélange cœur/cerveille pour favoriser la croissance d'A2-165, avec une biomasse plus élevée, surtout notable dans les milieux à base de peptones de soja. Des études futures permettront de mieux comprendre les besoins nutritionnels de *Faecalibacterium* et l'importance des acides aminés sur son métabolisme. Concernant la sensibilité à l'oxygène, bien que les bactéries commensales anaérobies strictes soient très sensibles à l'O₂, *Faecalibacterium* possède des systèmes de détoxification de l'O₂ et des ERO. Des variants plus résistants à l'H₂O₂ ou à l'O₂ ont été obtenus. Un variant résistant à l'O₂ a montré des colonies accrues en taille, nécessitant une observation morphologique plus détaillée. A court terme, des études génétiques et transcriptomiques seront menées pour identifier les gènes ou voies impliquées dans cette résistance. Les variants résistants à l'H₂O₂ ont montré une absence de consommation d'acétate pour produire du butyrate, suggérant une redirection des flux métaboliques pour gérer le stress oxydatif. Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents de cette perte de production de butyrate.

Table des matières

1. Introduction	5
2. Matériel et méthodes	8
2.1 Matériel biologique et conditions de culture	8
2.2 Amplification de l'ADN par PCR	9
2.3 Dosage des Acides Gras à Chaine Courte	9
2.4 Test de survie sur boîte à atmosphère ambiant	9
2.5 Croissance en présence d'un stress H₂O₂	10
2.6 Culture cellulaire	11
2.7 Test de cytotoxicité du milieu de culture	11
3 Résultats	11
3.1 Effets des peptones d'origine végétale sur la croissance de <i>F. duncaniae</i>	11
3.2 Effet des peptones végétales sur la production de butyrate	14
3.3 Effet des peptones végétales sur la survie des cellules HT29 in vitro	15
3.4 Criblage de variants de <i>F. duncaniae</i> A2-165 plus résistants au stress H₂O₂	16
3.5 Criblage de variants de <i>F. duncaniae</i> A2-165 plus résistants au stress O₂	19
3.6 Vérification des variants sélectionnés par PCR	19
4 Discussion	20
4 Bibliographie	22

1. Introduction

Le microbiote humain est constitué de milliards de microorganismes (bactéries, archées, champignons, virus) interagissant entre eux, avec l'hôte et avec l'environnement, résultant en un formidable écosystème complexe et dynamique. Plusieurs microbiotes existent : dans le tractus digestif (de la bouche à l'anus), le système respiratoire, l'appareil uro-génital et sur la peau, la plus grande communauté de micro-organismes résidant dans l'intestin. Ces microbiotes ont un rôle important dans le maintien de la santé et du bien-être de l'hôte. Le microbiote intestinal est impliqué dans de nombreuses fonctions (voies métaboliques, effet barrière vis-à-vis de pathogènes, maturation du système immunitaire, ...) au sein du tractus digestif ou à distance, ce qui en fait un organe à part entière dans la physiologie humaine (Agus et al., 2021; Zheng et al., 2020). Un grand nombre de métabolites essentiels pour la santé de l'hôte sont produits par le microbiote intestinal à partir des aliments. Ainsi, la fermentation des glucides et des protéines est la source des métabolites les plus importants pour l'organisme (butyrate, acides aminés, vitamines ...).

L'altération qualitative et fonctionnelle de la flore intestinale, appelée dysbiose, est associée à diverses pathologies, notamment les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) (Agus et al., 2021; Lavelle & Sokol, 2020). Les stratégies prometteuses afin de restaurer un microbiote « sain » incluent l'administration orale de probiotiques. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui confèrent des bienfaits à la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates. Le microbiote intestinal est apparu récemment comme une nouvelle source prometteuse de probiotiques dits de prochaine génération (« Next generation probiotic » : NGP). Les premiers NGP caractérisés ont été *Bacteroides fragilis*, *Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii*. *Faecalibacterium* est un genre représentant des bactéries anaérobies strictes et extrêmement sensibles à l'oxygène (O₂) (Zhang et al., 2021). Ces bacilles sont à Gram + et non-mobiles. Ce genre regroupe 6 espèces récemment décrites : *F. longum*, *F. butyricigenans*, *F. hattorii*, *F. duncaniae* (souche type : A2-165) et *F. prausnitzii* qui sont d'origine humaine, et *F. gallinarum* chez le poulet (Martín et al., 2023). Le genre *Faecalibacterium* représente jusqu'à 5% de la population bactérienne présente au niveau de l'intestin des individus sains (Marcos-Fernández et al., 2023). En produisant du butyrate, les faecalibactéries jouent un rôle essentiel dans la production d'énergie des colonocytes et dans la préservation de la santé intestinale (Louis & Flint, 2009). En outre, elles sont impliquées dans l'amélioration de la fonction de barrière intestinale. Ce rôle est associé à la stimulation de l'expression de certaines protéines des jonctions serrées (Carlsson et al., 2013). La production de mucus O-glycanes stimulée par *Faecalibacterium* a également un impact sur la physiologie intestinale. Elles contribuent à

maintenir des proportions adéquates de diverses cellules sécrétoires dans l'épithélium intestinal (Wrzosek et al., 2013). Les faecalibactéries produisent également plusieurs molécules bioactives qui affectent l'inflammation comme la Molécule Anti-inflammatoire Microbienne (MAM). Cette protéine de 15 kDa est capable d'inhiber la voie NF- κ B de nombreuses lignées de cellules épithéliales de l'intestin et, par conséquent, de modérer l'inflammation (Auger et al., 2022). Certaines faecalibactéries sont impliquées dans la régulation de l'immunité de l'hôte via l'activation des lymphocytes CD4CD8 α productrices d'IL-10. Des études récentes ont montré leur capacité à moduler les cellules dendritiques pour stimuler les cellules productrices d'IL-10 via l'activation des récepteurs de l'immunité innée du type TLR, notamment TLR2 et 6 ainsi que la voie de signalisation JNK. Elles induisent aussi la production d'IL-27, CD39 et IDO-1 (Alameddine et al., 2019).

L'abondance des faecalibactéries est influencée par l'état de santé de l'hôte et par l'environnement colique. Par des approches de métagénomique, il a été montré qu'une forte diminution de *Faecalibacterium* au sein du microbiote intestinal corrèle avec l'apparition de maladie comme le diabète de type 2, le cancer colorectal et le syndrome du côlon irritable (Borges Canha, 2015; Miquel et al., 2013; Sokol et al., 2008). Par ailleurs, il a été observé une augmentation des bactéries anaérobies facultatives appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et une diminution des bactéries anaérobies strictes telles que le genre *Faecalibacterium* chez les patients MICI en comparaison des individus sains [4] (Sokol et al., 2008).

La dynamique de l'O₂ joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie intestinale. 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 1) (Keeley & Mann, 2019).

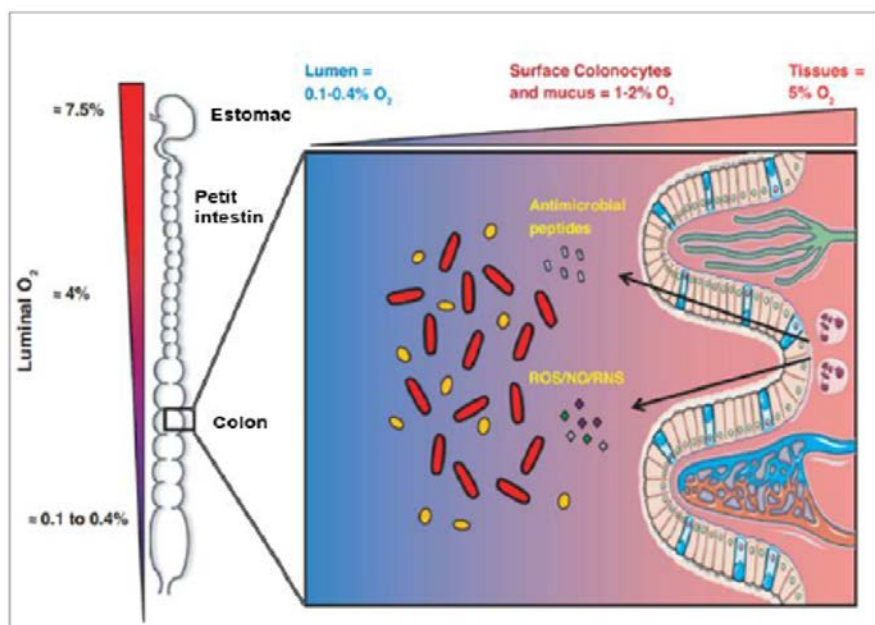


Figure 1. Stress oxydant rencontré par les bactéries anaérobies dans le tractus intestinal. Dans le tube digestif, les bactéries anaérobies comme *F. prausnitzii* doivent faire face au gradient décroissant longitudinal, de l'estomac vers le rectum, et transversal, des cellules épithéliales vers le lumen, 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.

Chez une personne en bonne santé, la majorité des bactéries strictement anaérobies colonisent l'extrémité distale du tractus gastro-intestinal avec 10^7 à 10^8 bactéries g^{-1} dans l'iléon distal et 10^9 à 10^{11} bactéries g^{-1} dans le côlon. 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). Au cours du développement des MICI (Altwegg & Michon, 2020), l'inflammation du tractus digestif est liée à l'afflux de neutrophiles et de macrophages, entraînant la production de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Sahoo et al., 2023). La réactivité de ces dérivés d'O₂ provoque des dommages cellulaires à la fois cytotoxiques et mutagènes (Shah & Rogoff, 2021). Pour les neutraliser, les bactéries ont mis en place des mécanismes de protection, notamment des enzymes anti oxydantes telles que les superoxydes dismutases et les catalases (He et al., 2017). En revanche, dans les MICI, les cellules immunitaires humaines libèrent d'importantes quantités d'ERO, notamment les anions superoxydes (O₂^{o-}) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il en résulte alors une activation prolongée et anormale de la réponse immunitaire entraînant un stress oxydant du tractus digestif (Zeng et al., 2023). Ce stress oxydant défini par un déséquilibre entre la production et l'élimination des ERO perturbe l'homéostasie intestinale (Forman & Zhang, 2021).

L'extrême sensibilité à l'O₂ et aux ERO des faecalibactéries limite très fortement leur production à l'échelle industrielle et leur utilisation comme probiotiques supplémentés par voie

orale. Cependant, en présence d'antioxydants tels que la cystéine et la riboflavine, *F. prausnitzii* peut survivre jusqu'à 24 heures à l'air ambiant (Khan et al., 2014). En présence d'O₂, les thiols libres de la cystéine (ou du glutathion) sont transformés en ponts disulfures qui jouent le rôle d'accepteurs d'électrons. Selon Khan et al. (Khan et al., 2012), les flavines extracellulaires jouent le rôle de médiateurs du potentiel redox en transportant les électrons vers l'accepteur final, l'O₂, afin de générer de l'H₂O. D'autre part, l'équipe ProbiHôte a montré que des gènes codant pour différents systèmes de détoxification de l'O₂ et/ou des ERO sont présents chez les faecalibactéries, et que leur expression peut être induite en réponse au stress oxydatif (Botin et al., 2023). Une récente étude a décrit l'adaptation d'une souche *Faecalibacterium* (DSM 32186) pour tolérer des expositions à l'O₂ tout en conservant ses propriétés bénéfiques (référence Bircher). Ainsi la production de variants adaptés pour tolérer l'exposition à l'O₂ semble une stratégie prometteuse afin d'accélérer l'utilisation des bactéries commensales anaérobies et des probiotiques pour la santé humaine et animale.

Le but de ce stage était tout d'abord d'adapter le milieu de culture de *Faecalibacterium* en testant la possibilité de remplacer la source protéique animale par une source protéique végétale (légumineuse ou céréale). En effet, le milieu de culture de laboratoire de *Faecalibacterium* contient un mélange cœur/cervelette. Or la production industrielle de *Faecalibacterium* nécessite la substitution des composés d'origine animale afin de répondre aux normes réglementaires. Les protéines végétales se révèlent être des sources protéiques de choix en raison de leur innocuité, de leur compatibilité biologique, de leur valeur nutritionnelle élevée, ainsi que de leur coût réduit. Le deuxième objectif était de cribler des mutants de *Faecalibacterium* ayant une tolérance accrue au stress oxydant et donc potentiellement plus aptes à être exploités à l'échelle industrielle.

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique et conditions de culture

La souche utilisée lors de ce projet est *F. duncaniae* A2-165. Elle est cultivée en milieu BHI (Brain Heart Infusion, 37g/L, extrait de levure 20g/L) supplémenté avec 2.7 M de sodium d'acétate tri-hydraté, 0.05 g/mL de L-cystéine et 0.2 g/mL de D-fructose. Le milieu est solidifié par l'ajout de Phytigel™ (Sigma-Aldrich) à 6 g/L ou d'agar. Dans les milieux contenant des peptones végétales, le mélange Brain Heart Infusion est remplacé par les peptones issues de légumineuse et ou de céréale. Les cultures d'A2-165 sont effectuées dans une chambre Coy dans des conditions anaérobies (5 % H₂, 5 % CO₂, 90 % N₂). Lors des expérimentations, *F.*

duncaniae est cultivée en tube Falcon (tube polypropylène SARSTEDT AG & Co de 15mL, référence : 62.554.502, ou 50mL, référence : 62.547.254) ou transférée dans des plaques 12 puits (plaque deepwell en polypropylène, SARSTEDT AG & Co, référence : 83.3921.500).

2.2 Amplification de l'ADN par PCR

Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant 1 colonie de bactéries. Cette colonie est resuspendue dans 10 µL d'eau peptonée, chauffée à 90°C pendant 5 minutes puis centrifugée pendant 5 minutes à 19000 g. 10 µL du surnageant récupéré, 10 µM d'amorces, 10 mM de dNTP et 1U/ µl de Taq polymérase sans ADN. Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *mam* était 5'-GGC GCT AAC TTC ATC GAC GCT ATC GGC GC-3' et 5'-GCA TAG TCA CCA AAG TTG TTC TTC TCG ATC-3'. Les amplifications ont été réalisées en utilisant le profil suivant : 1 cycle à 95°C pendant 15 min, suivi de 38 cycles à 95°C pendant 30 s, 52°C pendant 30 s, 72°C pendant 1 min 30 s, et terminant par une étape à 72°C pendant 10 min avec une étape à 20°C pendant un temps infini. Les produits de PCR ont été révélés sur un gel d'agarose 1% contenant du midori.

2.3 Dosage des Acides Gras à Chaine Courte

La teneur en acides gras à chaine courte (AGCC), acétate et butyrate, a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, GC-FID Agilent 7890B avec passeur 50 vials G4567A. Les échantillons bactériens ont été centrifugés à 12 000 × g pendant 15 minutes et le surnageant a été recueilli. Les protéines ont été précipitées à l'aide d'une solution saturée d'acide phosphotungstique 10% (Sigma, réf : P4006 - 50g dilué dans 20 mL d'eau MilliQ 18 MΩ Cm / système Millipore et conservé à 4°C). Un volume de 0,1 ml du surnageant a été ensuite analysé. Les données ont été collectées et les pics intégrés à l'aide du logiciel OpenLab Chemsation Agilent (version 2.3.53).

2.4 Test de survie sur boîte à atmosphère ambiant

Une colonie isolée d'une souche de *F. duncaniae* est resuspendue dans 2 mL de milieu contenant des peptones de pomme de terre (Figure 2). La suspension est incubée à 37°C pendant 7 heures. Cette pré-culture est diluée au 1 :10 et mise à incuber à 37°C pendant toute la nuit. Cette culture de nuit est centrifugée pendant 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Le culot est resuspendu ensuite dans 1 ml d'eau peptonée. Des volumes de 100 µL de la culture sont ensuite étalés sur boîtes. Chaque boîte correspond à une durée d'exposition à l'O₂ (0, 2, 5 ou 7 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.

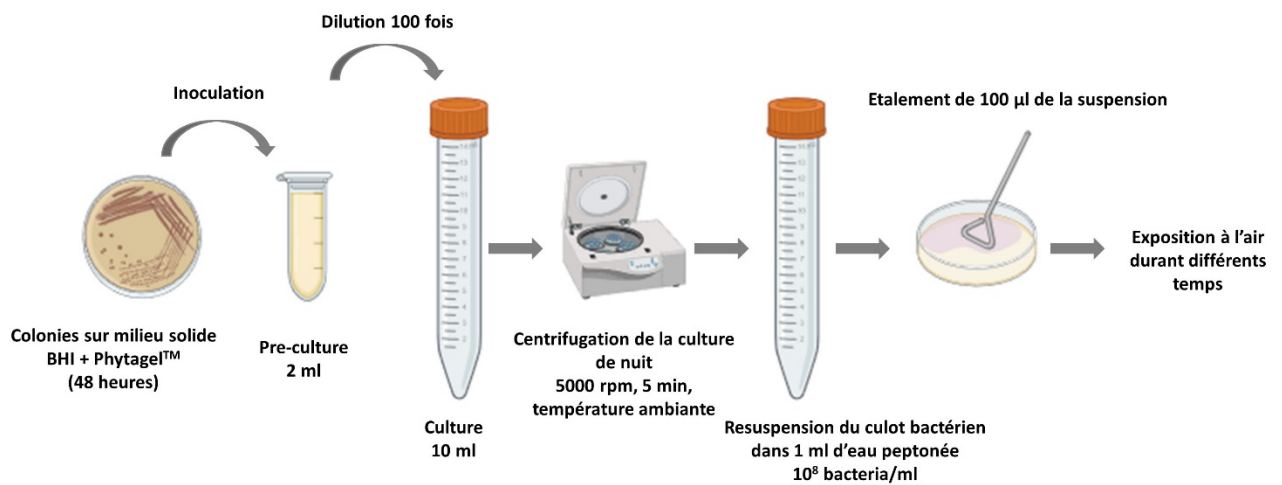


Figure 2. Schéma du protocole mis au point pour le test de survie à l'atmosphère ambiant sur boîte.

2.5 Croissance en présence d'un stress H₂O₂

Une culture de jour de *F. duncaniae* est réalisée à partir d'une dilution au 1:10 d'une pré-culture de 7 heures d'une colonie dans le milieu à base de peptones de pomme de terre (Figure 3). 1 ml de cette culture est distribué dans 11 puits d'une plaque de 12 puits. Le dernier puit est inoculé par 1 ml de milieu seul servant ainsi comme contrôle négatif. Des concentrations croissantes d'H₂O₂ 0, 100 et 200 µM sont ensuite ajoutées. La croissance a été suivie en mesurant la densité optique à 600 nm toutes les 15 minutes dans une chambre anaérobie pendant 18 à 24 h à l'aide d'un lecteur de plaques Cerillo Stratus (Cerillo, Charlottesville, VA) avec une faible agitation (environ 80 rpm).

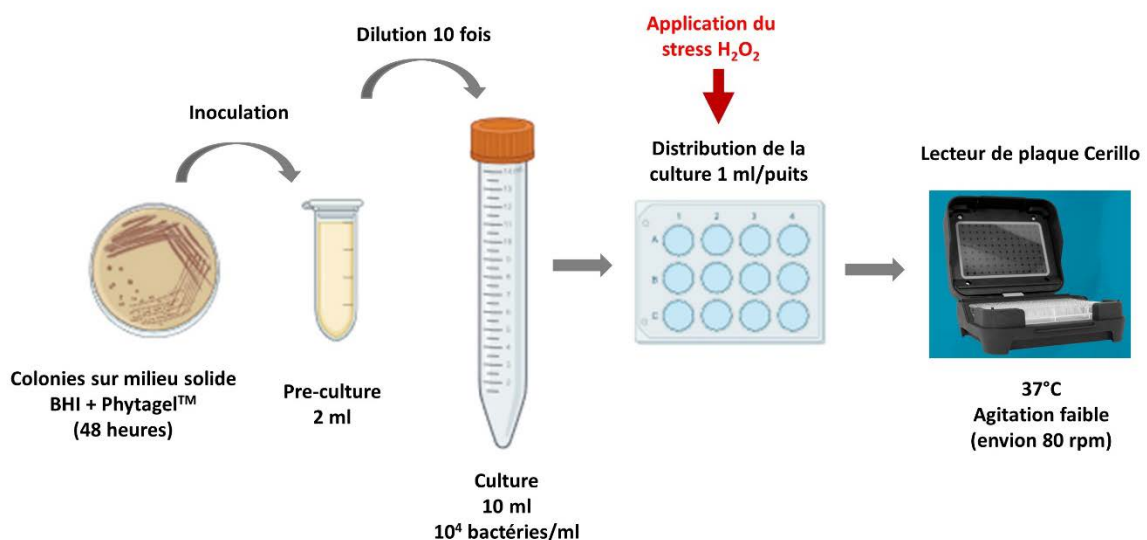


Figure 3. Schéma expliquant le protocole mis au point pour le test de survie au peroxyde d'hydrogène en milieu liquide.

2.6 Culture cellulaire

Les cellules HT29 ont été obtenues auprès du Max Rubner-Institut (IRM, Karlsruhe, Allemagne). Elles ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels, 2 mM de L – glutamine et une solution antimycosique à 0,1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Les cellules ont été cultivées pendant 7 jours à 37°C dans une atmosphère de carbogène (95 % O₂, 5 % CO₂), le milieu de culture étant changé tous les jours.

2.7 Test de cytotoxicité du milieu de culture

La libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu a été quantifiée à l'aide du kit de cytotoxicité non radioactive Cytotox96 (Promega, Madison, WI, USA), en suivant les instructions du fabricant. La libération de LDH (% de cytotoxicité) a été calculée selon la formule :

% de cytotoxicité

$$= \frac{\text{DO492 pour la libération expérimentale} - \text{DO492 pour la libération spontanée}}{\text{DO492 pour la libération maximale} - \text{DO492 pour la libération spontanée}} \times 100$$

La libération spontanée était la quantité de LDH libérée par le cytoplasme des cellules non infectées, tandis que la libération maximale était la quantité de LDH libérée par la lyse totale des cellules non infectées. Le test a été fait une fois.

3 Résultats

3.1 Effets des peptones d'origine végétale sur la croissance de *F. duncaniae*

Au cours de ce projet, nous nous sommes concentrés sur la souche *F. duncaniae* A2-165 qui constitue la souche de référence de *Faecalibacterium* la plus étudiée dans la communauté scientifique. Dans un premier temps, nous avons comparé la croissance d'A2-165 dans des milieux de culture contenant différentes peptones d'origine végétale (pomme de terre E210, soja, pois, riz ou blé) en remplacement de l'extrait de cœur/cerveille présent dans le milieu BHI. Pour cela les milieux de culture ont été préparés selon le même protocole (voir Matériel et méthodes), la seule différence étant l'origine des peptones. Les cellules d'A2-165 ont été mises en culture dans ces différents milieux à 37°C en chambre anaérobie. Une première observation en microscopie optique des cellules bactériennes en fin de croissance a révélé que les bactéries cultivées en BHI présentent une apparence filamenteuse avec une formation de chaînettes

pouvant atteindre 5 bactéries par chaîne (Figure 4A). En revanche, dans les différents milieux d'origine végétale, les bactéries apparaissent couplées 2 à 2 et l'aspect filamenteux est absent (Figure 4B à F). Une observation en microscopie confocale illustre plus précisément l'aspect des bactéries dans le milieu contenant des peptones de soja (Figure 4G). En parallèle, pour chacun des milieux de culture, nous avons dénombré le nombre de bactéries/ml en phase stationnaire de croissance afin d'estimer la biomasse finale. Comme le montre la Figure 5, le nombre de bactéries est plus important dans les milieux à base de peptones végétales que dans le milieu BHI. En particulier, la biomasse est plus importante avec les peptones de soja ce qui corrèle avec l'observation faite en microscopie (Figure 4C).

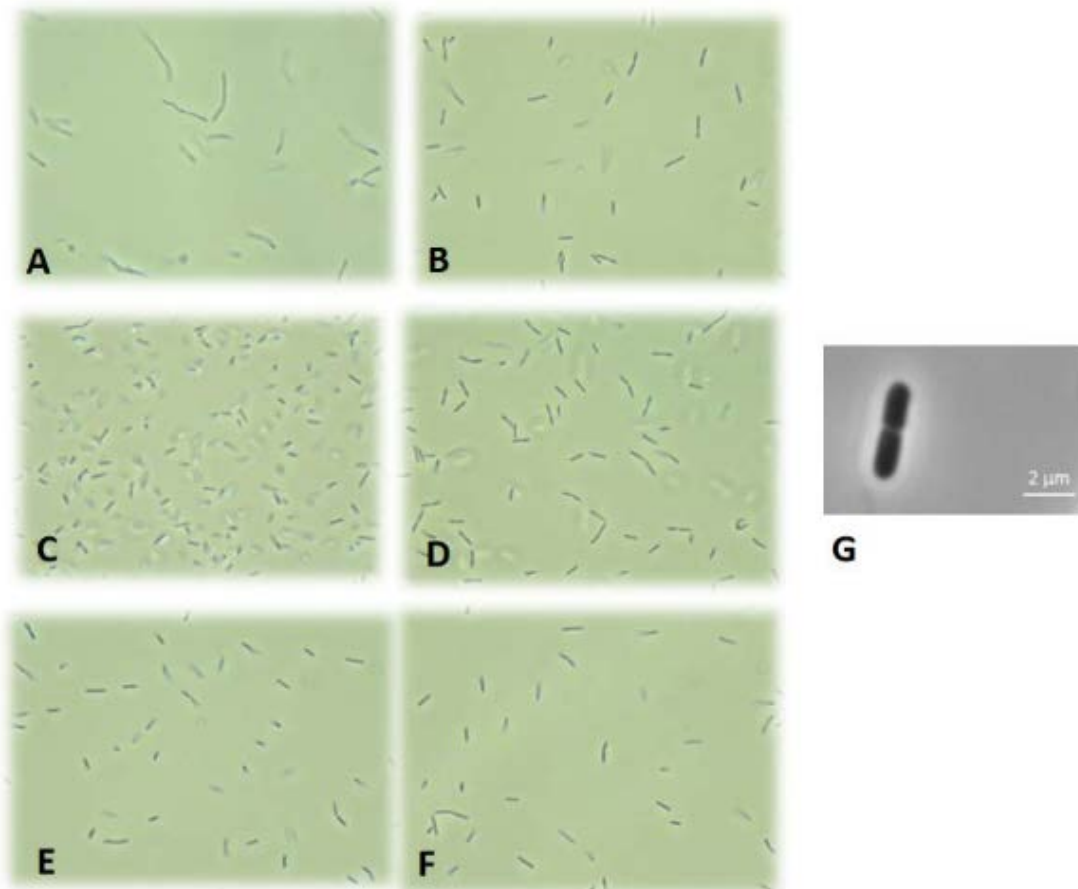


Figure 4. Observation microscopique des cellules bactériennes de *F. duncaniae* A2-165 en phase stationnaire en présence de différentes sources de peptones. A : BHI ; B : Peptones de riz ; C : Peptones de soja ; D : Peptones de blé ; E : Peptones de pois ; F : Peptones de pomme de terre E210 ; G : bactéries en présence de peptones de soja en microscopie confocale.

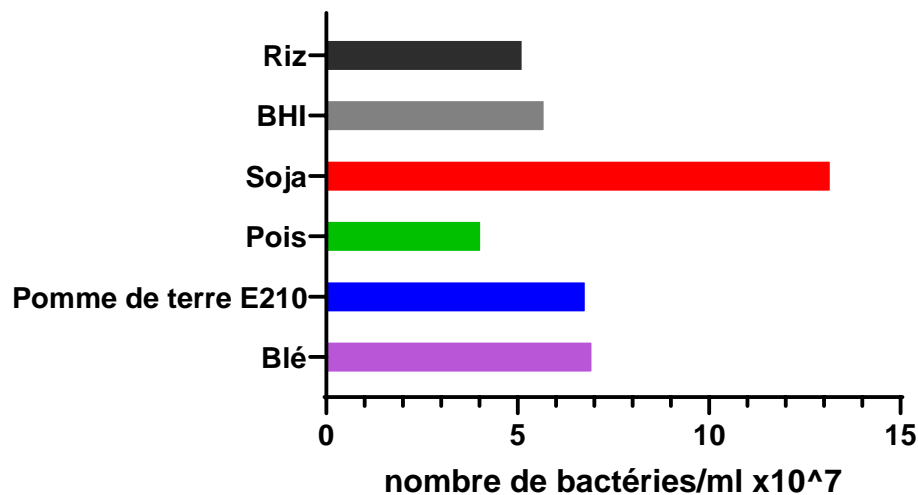


Figure 5. Dénombrement des bactéries en phase stationnaire dans les différents milieux de culture.

Afin de comparer plus précisément les performances de croissance d'A2-165 dans les différents milieux, les croissances ont été obtenues en suivant la DO_{600nm} à l'aide d'un lecteur de plaque de type Cerillo™ Stratus installé dans la chambre anaérobie. A mon arrivée au laboratoire, l'équipe ProbiHôte venait tout juste de s'équiper de ce type d'appareil de mesure et nous ne savions pas si la croissance de *Faecalibacterium* était possible en plaque. J'ai donc mis au point les conditions de croissance en testant différents paramètres (type de plaque 96 ou 12 puits, volume de culture dans les puits, avec ou sans agitation). Ainsi les courbes de croissance ont pu être obtenues dans des conditions optimisées dans des plaques de 12 puits contenant 2 ml de volume de culture et une faible agitation (Figure 6A et B). Le temps de doublement dans chaque milieu et la DO_{600nm} maximale sont indiqués sur la Figure 6C et D. Dans les milieux peptones de pomme de terre E210 et BHI le temps de doublement est similaire avec environ 120 minutes. Avec les autres peptones végétales, les temps de doublement sont supérieurs à 150 minutes. Les DO_{600nm} maximales les plus élevées sont obtenues avec les peptones de pomme de terre E210 et celles de soja, aux alentours de 1,2. Les DO_{600nm} maximales sont inférieures à 1 pour les autres milieux.

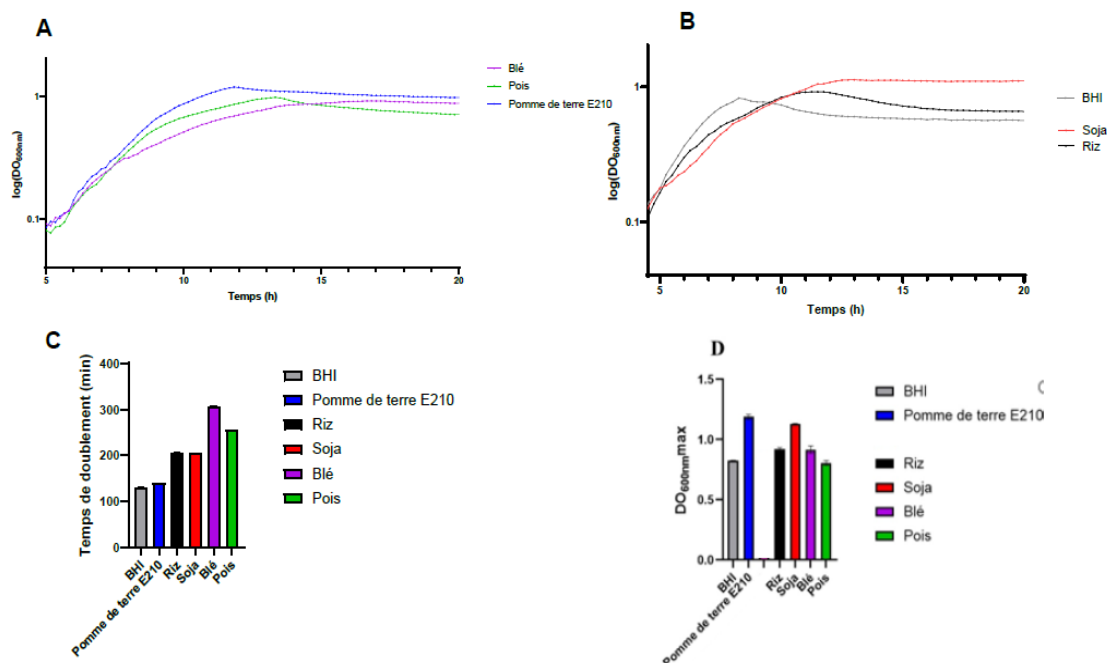


Figure 6. Effets des peptones d'origine végétale sur la croissance de *F. duncaniae* A2-165. Courbes représentatives de la croissance d'A2-165 dans les différents milieux de culture : blé, pois et pomme de terre E210 et soja, riz et BHI (A) et (B) respectivement. (C) et (D) Temps de doublement et DO_{600nm} maximales de la souche dans les différents milieux de culture. Les données sont issues de trois réplicats indépendants.

Ainsi, les peptones d'origine végétale permettent bien la croissance de la souche A2-165 en remplacement du BHI. Les peptones de pomme de terre E210 ainsi que celles de soja montrent des performances de croissance intéressantes dans les conditions testées et méritent une attention particulière pour mettre au point la culture de *Faecalibacterium* en bioréacteurs en conditions industrielles.

3.2 Effet des peptones végétales sur la production de butyrate

L'une des caractéristiques des souches de *Faecalibacterium* qui joue un rôle majeur dans leurs effets bénéfiques est leur capacité à produire du butyrate à partir de l'acétate. Nous avons voulu tester si la source protéique en peptones végétales a un effet sur la production de butyrate par la souche A2-165. Après croissance dans les différents milieux de culture, les surnageants de culture en phase stationnaire ont été prélevés et analysés pour mesurer la quantité d'acétate et de butyrate. En parallèle, les mêmes milieux nonensemencés ont été analysés comme témoins. La teneur en AGCC, acétate et butyrate, a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Les concentrations en acétate et butyrate dans les surnageants sont présentées sur la Figure 7. Les milieux qui n'ont pas étéensemencés avec *Faecalibacterium* contiennent uniquement de l'acétate, comme attendu. De façon surprenante, nous avons ajouté la même quantité d'acétate dans chacun des 7 milieux testés. Or, les milieux contenant des peptones de blé, de riz, de pois et de soja montrent une quantité très élevée

d'acétate, ce qui laisse supposer que de l'acétate est déjà présent dans les extraits de peptones végétales utilisés.

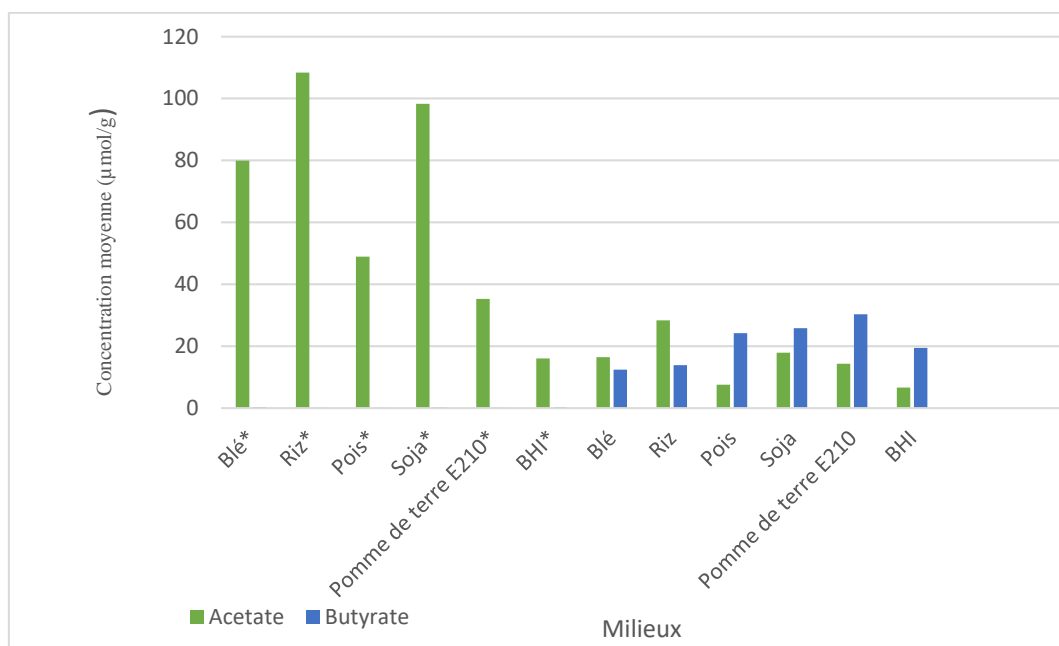


Figure 7. Dosage de l'acétate et du butyrate dans les surnageants de culture de *F. duncaniae* A2-165. Les concentrations d'acétate et de butyrate ont été déterminées en phase stationnaire de croissance dans les différents milieux. *Milieux témoins non ensemencés. Les données sont issues d'un seul réplicat biologique.

Une réduction évidente de la concentration d'acétate est observée avec une production de butyrate allant de 12 jusqu'à 30 $\mu\text{mol/g}$ dans tous les milieux. La production de butyrate semble la plus importante dans le milieu contenant des pommes de terre E210. Cependant, les dosages ont été effectués sur un seul réplicat biologique. Il est nécessaire d'analyser au moins trois réplicats indépendants afin d'en tirer des conclusions plus précises. En l'état, nous pouvons conclure que d'un point de vue métabolique, la souche A2-165 est toujours capable d'utiliser l'acétate pour produire du butyrate quel que soit la source de peptones présentes dans le milieu.

3.3 Effet des peptones végétales sur la survie des cellules HT29 *in vitro*

Il a été montré dans l'équipe ProbiHôte que le surnageant de la souche A2-165 cultivée dans le milieu BHI présente une activité anti-inflammatoire sur les cellules HT29 activée avec du TNF α *in vitro*. Afin de tester si les surnageants de culture d'A2-165 cultivée en présence de peptones végétales conservent bien une activité anti-inflammatoire, il a tout d'abord été nécessaire de tester si ces milieux affectent la viabilité des cellules HT29. Pour cela, les milieux non dilués ont été mis en contact sur les cellules HT29. L'activité lactate déshydrogénase (LDH) de ces dernières a été testée (Figure 8). Les résultats ont révélé que le milieu de peptones

de pomme de terre E210 produisait des effets cytotoxiques importants (plus de 90 % de perte de la viabilité) sur les cellules HT29 (Figure 8). L'effet des autres milieux est en cours d'analyse. Par la suite, il sera envisagé de tester l'effet de dilutions successives des milieux de culture afin d'essayer de pallier à ce problème de cytotoxicité.

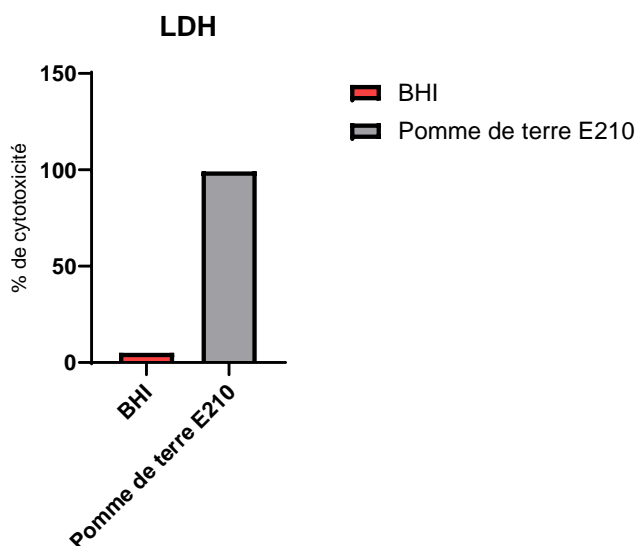


Figure 8. Tests de cytotoxicité des milieux BHI et pomme de terre E210 contre la lignée cellulaire HT29. Les milieux ont été incubés avec une monocouche de cellules HT29 dans une plaque à 96 puits à 37°C pendant 6h en présence de 5 % de CO₂ et dans des conditions humidifiées. La LDH libérée par les cellules a été mesurée comme décrite dans la section Matériel et méthodes.

3.4 Criblage de variants de *F. duncaniae* A2-165 plus résistants au stress H₂O₂

Pour débiter notre étude, nous avons tester la croissance d'A2-165 en présence de différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène, H₂O₂, qui induit un stress oxydant. Ce test a été effectué avec le lecteur de plaques Cerillo (Figure 9A). Le H₂O₂ a été ajouté au début de la phase exponentielle de croissance à 10⁴ bactéries/ml et son effet sur la dynamique de croissance a été suivi pendant 24 heures. Une gamme d'H₂O₂ de 50 µM à 200 µM a été testée.

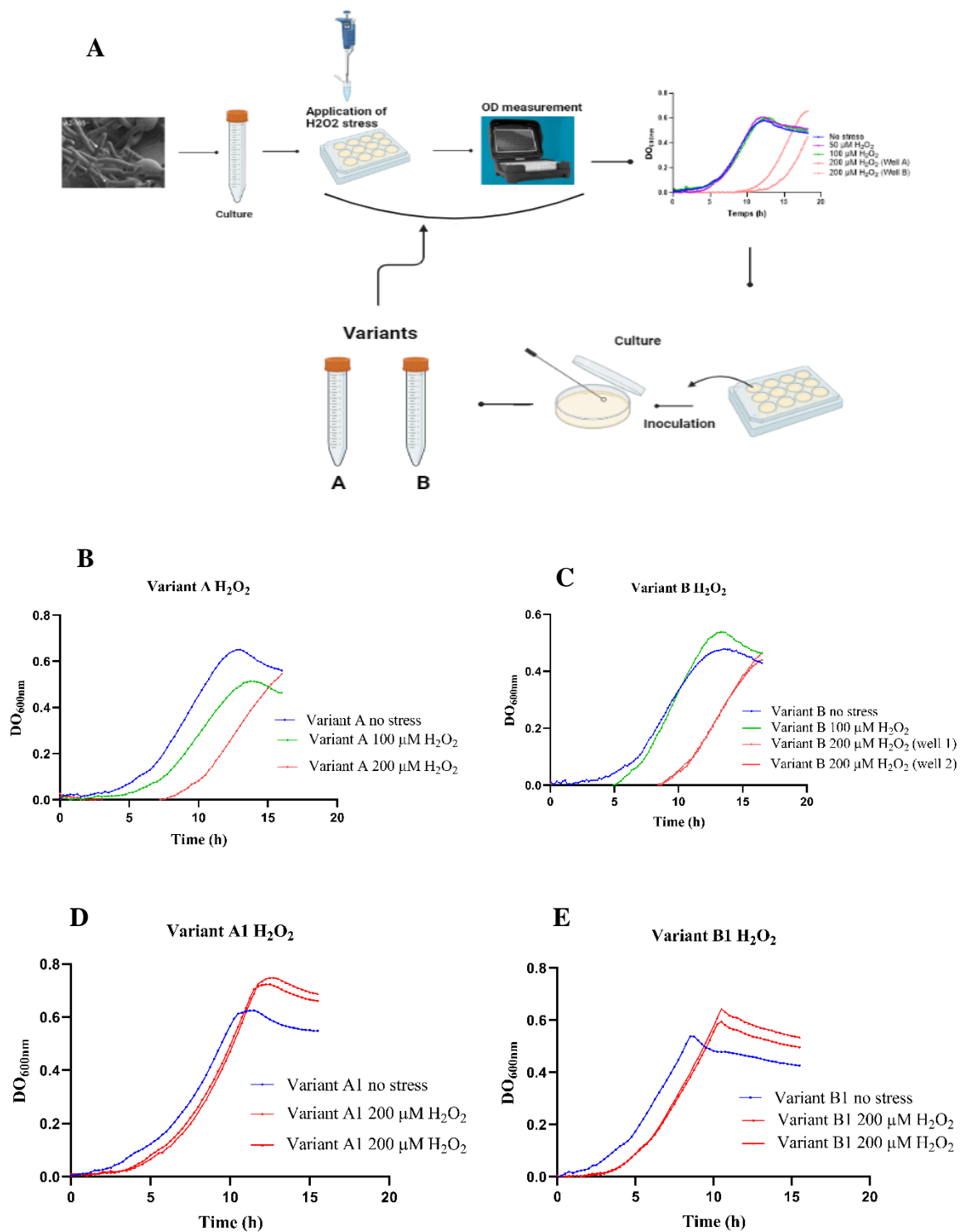


Figure 9. Effet du stress à l'H₂O₂ appliqué sur plusieurs générations successives sur la croissance de *F. duncaniae* A2-165. (A) Schéma représentatif des différentes étapes de criblage de variants plus résistants à l'H₂O₂. A droite : croissance de la souche A2-165 de type sauvage en l'absence d'H₂O₂ et en présence de trois concentrations différentes d'H₂O₂ : 50, 100 et 200 µM. (B) et (C) Effet de l'H₂O₂ à 100 et 200 µM sur les variants A et B. (D) et (E) Effet de 200 µM d'H₂O₂ sur les variants A1 et B1. L'H₂O₂ a été ajouté au début de la phase exponentielle de croissance. Les résultats représentent la moyenne d'une expérience (trois répétitions pour chaque concentration d'H₂O₂).

La souche A2-165 présente une croissance similaire en présence de 50 µM et 100 µM d'H₂O₂ qu'en absence de stress, avec une entrée en phase exponentielle dès 3h après la mise en

culture (Figure 9A). En présence de 200 μM d' H_2O_2 , A2-165 entre en phase exponentielle 10h à 15h après la mise en culture. Les 2 puits testés présentent une croissance différente (courbes rouges sur la Figure 9A) ce qui suggère des mécanismes d'adaptation et/ou des mutations différent(e)s. Les bactéries issues de cette première génération de cellules stressées (appelées variant A et variant B) ont été isolées sur boîte de Pétri et remises en culture afin de leur appliquer à nouveau un stress à l' H_2O_2 200 μM . Comme le montre les Figures 9B et C, ces variants présentent une certaine tolérance à l' H_2O_2 200 μM avec une entrée en phase exponentielle au bout de 8h. Des variants A1 et B1 ont été de nouveau isolés puis mis en culture et soumis au stress H_2O_2 200 μM (Figure 9D et E). Ils présentent une résistance accrue à l' H_2O_2 200 μM qui n'a plus d'effet inhibiteur sur leur croissance. Les cellules ainsi stressées ont été appelées variants A2 et B2.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'observer un phénomène d'adaptation de la souche A2-165 à un stress oxydant généré par l' H_2O_2 . A ce stade, il n'est pas possible d'affirmer si ce phénotype de résistance accrue à l' H_2O_2 est corrélé à des mutations génétiques ou si cela est de l'adaptation transitoire. De futures expériences sont nécessaires en augmentant les concentrations d' H_2O_2 , et cela sur plusieurs générations, afin d'obtenir des mutations génomiques et ainsi un phénotype de résistance durable.

Afin de déterminer l'impact de l'adaptation à l' H_2O_2 sur la production de butyrate, nous avons analysé les surnageants des variants A2 et B2. Le dosage de l'acétate et du butyrate a révélé que ces clones ne produisent pas de butyrate en les comparant avec la souche sauvage dans le même milieu (milieu peptone de terre E210) (Figure 10). Il semblerait donc que la résistance accrue à H_2O_2 soit corrélée à des modifications du métabolisme.

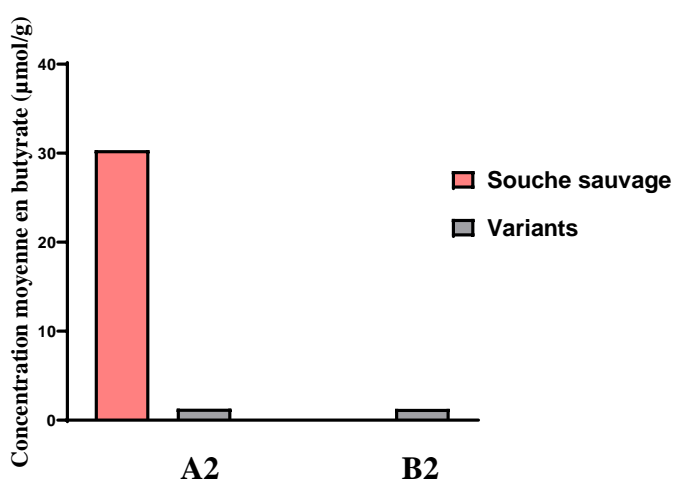


Figure 10. Dosage du butyrate dans les surnageants de culture de 2 variants résistants à l' H_2O_2 après 2 stress. Les clones ont été cultivés dans le milieu peptone de pomme de terre E210 jusqu'en phase stationnaire de croissance.

3.5 Criblage de variants de *F. duncaniae* A2-165 plus résistants au stress O₂

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à sélectionner des variants d'A2-165 plus résistants à l'air ambiant (environ 20% de tension en oxygène). Dans une étude précédente, l'équipe ProbiHôte avait montré que la souche A2-165 ne résiste pas plus de 5 minutes à une exposition sur boîte à l'air ambiant (Botin et al., 2023). Cette souche a été cultivée jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis 100 µL ont été déposés sur boîtes. Les boîtes ont été exposées à l'O₂ atmosphérique pendant différents temps, puis réintroduites en chambre anaérobie (voir Matériel et méthodes). Après une succession de stress à l'O₂ à des temps d'exposition de plus en plus longs, nous avons obtenu un clone résistant à 7 minutes d'exposition. De façon intéressante, le morphotype de ces colonies montre une taille 5 fois plus importante que la souche sauvage initiale cultivées en anaérobie ou exposée à l'air ambiant pendant 3 minutes (Figure 11). Il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie ce clone et de poursuivre l'exposition à des temps plus longs à l'air ambiant.

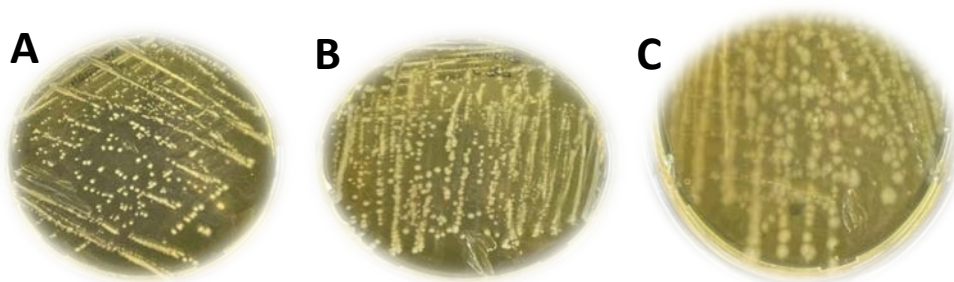


Figure 11. Photographie de boîtes de milieux gélosés montrant la forme des colonies bactérienne de *F. duncaniae* A2-165. (A) Souche sauvage sans stress. (B) Souche sauvage après 3 minutes d'exposition à l'air ambiant. (C) Mutant obtenue après 7 minutes d'exposition à l'air ambiant.

3.6 Vérification des variants sélectionnés par PCR

Afin de vérifier à chaque étape de criblage des variants résistants à H₂O₂ ou à O₂, si les clones isolés correspondent bien à la souche A2-165 et non pas à des contaminants, nous avons effectué des vérifications par une approche de PCR sur colonies. Pour ce faire, une PCR permettant d'amplifier spécifiquement le gène *mam* codant la protéine MAM a été faite. Comme le montre la Figure 12, une bande correspondante à la taille attendue de 210 paire de bases est détectée pour les clones sélectionnés. Ceci confirme bien que les clones sélectionnés correspondent à la souche A2-165.

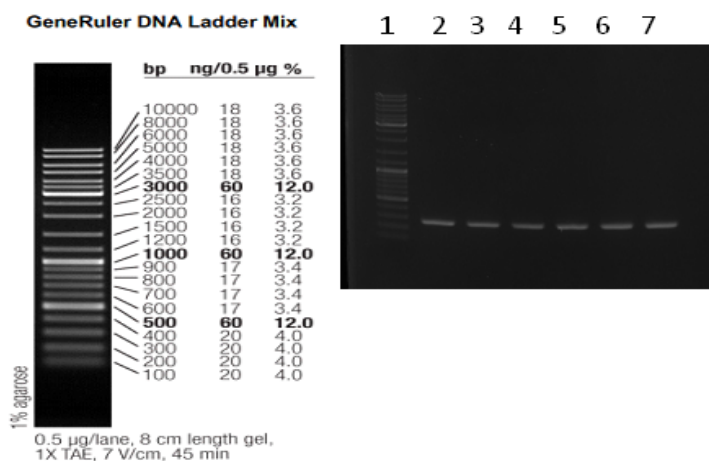


Figure 12. Vérification par PCR de l'amplification du gène *mam* dans l'ADN des variants d'intérêts. Gel d'électrophorèse à 1% pour la migration des produits de PCR. 1 : marqueur de taille moléculaire ; 2 : témoin positif (souche sauvage A2-165) ; 3 : variant A1 ; 4 : variant B1 ; 5 : variant A2 ; 6 : mutant résistant 3 minutes à l'O₂ ; 7 : mutant résistant 7 minutes à l'O₂.

4 Discussion

L'intérêt du monde scientifique et industriel pour les bactéries du genre *Faecalibacterium* a été croissant dans les dernières années en raison de leurs effets anti-inflammatoires et de leur potentiel dans le traitement de diverses pathologies. Ces bactéries sont cependant très difficiles à cultiver et à maintenir viables en raison de leurs exigences nutritionnelles et de leur sensibilité à l'O₂ (Heinken et al., 2014). Il existe ainsi une attente forte dans le développement de stratégies qui pourrait permettre de produire ces bactéries à l'échelle industrielle. Dans ce contexte, le but de ce projet était de tester les effets de peptones d'origine végétale sur les performances de croissance de *F. duncaniae* A2-165 d'une part, et de sélectionner des variants plus résistants au stress oxydant d'autre part.

Nous avons montré dans ce projet que les peptones issues de diverses légumineuses ou céréales peuvent être substituées au mélange cœur/cervelle afin de promouvoir la croissance d'A2-165. Les résultats montrent une croissance plus importante dans les milieux à base de peptones végétales par rapport au milieu BHI avec une biomasse plus élevée, particulièrement notable dans le milieu contenant des peptones de soja. Cela pourrait être attribué à une meilleure disponibilité ou à une meilleure utilisation des nutriments à base de peptones de soja. Il sera intéressant par la suite de caractériser la structure et la composition en acides aminés des différentes peptones d'origine végétales. De plus, pour mieux comprendre ces différences observées, des études métabolomiques et transcriptomiques pourraient être menées afin d'analyser les voies métaboliques et les gènes de *Faecalibacterium* activés dans les différents milieux. Ce savoir est essentiel pour mieux caractériser les besoins nutritionnels de *Faecalibacterium* et pour comprendre l'importance des acides aminés sur son métabolisme et

ses propriétés fonctionnelles. Dans la suite de ce projet, les sources protéiques pourraient également être prétraitées (ex : hydrolyses) afin d'optimiser leur assimilation par les bactéries et/ou optimiser leurs propriétés techno-fonctionnelles en vue de leur utilisation pour une culture en bioréacteur.

La sensibilité à l'O₂ des bactéries commensales anaérobies strictes est un phénomène encore largement incompris. Bien qu'étant extrêmement sensibles à l'O₂, les faecalibactéries possèdent des systèmes de détoxification de l'O₂ et des ERO (Botin et al., 2023). La souche A2-165 contient quatre systèmes potentiels de détoxification qui sont une protéine flavodiiron, une rubrérythrine, une réverse rubrérythrine et une flavine réductase (Botin et al., 2023). De plus, il a été montré récemment qu'une souche de *Faecalibacterium* (appelée DSM32186) peut être adaptée à tolérer l'O₂ après plusieurs étapes d'adaptation progressive dans un bioréacteur SHIRM (Khan et al., 2023). Au cours de ce stage, nous avons cherché à obtenir des variants plus résistants à l'H₂O₂ ou à l'O₂. Ces deux approches ont permis d'obtenir des clones plus résistants aux deux types de stress. De façon intéressante l'un des clones plus résistants à l'O₂ montre des colonies dont la taille est accrue par rapport à la souche initiale. Nous envisageons une observation plus détaillée de sa morphologie par microscopie électronique (Plateforme MIMA2, INRAE, *en cours*). Des études génétiques et transcriptomiques seront nécessaires pour identifier les gènes ou les voies régulatrices impliqués dans cette résistance à l'O₂. Une évaluation de la production de butyrate et d'autres métabolites bénéfiques sera nécessaire pour s'assurer que l'adaptation à l'O₂ n'a pas compromis ses fonctions probiotiques.

De façon inattendue, nous avons constaté que les clones plus résistants à l'H₂O₂ ne consomment plus de l'acétate pour produire du butyrate. Or, l'utilisation de l'acétate pour produire du butyrate permet la régénération du NAD⁺ à partir du NADH. L'exposition à l'H₂O₂ pourrait avoir entraîné une régulation différentielle des gènes impliqués dans la fermentation butyrique ou une redirection des flux métaboliques vers des voies de production d'énergie alternatives pour gérer le stress oxydatif, réduisant ainsi la disponibilité des précurseurs nécessaires à la synthèse du butyrate. Pour comprendre pleinement l'impact du stress oxydatif sur les voies métaboliques, des études transcriptomiques et protéomiques ainsi que des tests fonctionnels des enzymes impliquées dans la synthèse du butyrate seront nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents de la perte de production du butyrate.

D'autres cycles de stress devront être poursuivis sur les différents clones obtenus, en faisant augmenter la concentration en H₂O₂ ou le temps d'exposition à l'air, afin d'obtenir des mutations génétiques permettant une capacité de résistance stable et transmissible au cours des générations. Les variants ainsi obtenus pourront être séquencés et étudiés par l'utilisation d'approches de type transcriptomique et/ou protéomique. Cela devrait permettre de mettre en

évidence des gènes/protéines directement impliqués dans les processus de détoxification (notamment les enzymes), des régulateurs transcriptionnels spécifiquement appliqués dans la réponse au stress ainsi que des voies métaboliques réorientées en réponse au stress oxydant.

4 Bibliographie

- Agus, A., Clément, K., & Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*, *70*(6), 1174–1182.
- Alameddine, J., Godefroy, E., Papargyris, L., Sarraïbayrouse, G., Tabiasco, J., Bridonneau, C., Yazdanbakhsh, K., Sokol, H., Altare, F., & Jotereau, F. (2019). Faecalibacterium prausnitzii Skews Human DC to Prime IL10-Producing T Cells Through TLR2/6/JNK Signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 Induction. *Frontiers in Immunology*, *10*, 143.
- Altwegg, R., & Michon, A. L. (2020). La dysbiose intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2020*(527), 47–54.
- Auger, S., Kropp, C., Borrás-Nogues, E., Chanput, W., Andre-Leroux, G., Gitton-Quent, O., Benevides, L., Breyner, N., Azevedo, V., Langella, P., & Chatel, J.-M. (2022). Intraspecific Diversity of Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from Faecalibacterium prausnitzii. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1705.
- Borges Canha, M. (2015). Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, *107*.
- Botin, T., Ramirez-Chamorro, L., Vidic, J., Langella, P., Martin-Verstraete, I., Chatel, J.-M., & Auger, S. (2023). The Tolerance of Gut Commensal *Faecalibacterium* to Oxidative Stress Is Strain Dependent and Relies on Detoxifying Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(7), e00606-23.

- Carlsson, A. H., Yakymenko, O., Olivier, I., Håkansson, F., Postma, E., Keita, Å. V., & Söderholm, J. D. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48(10), 1136–1144.
- Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 689–709.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553.
- Heinken, A., Khan, M. T., Paglia, G., Rodionov, D. A., Harmsen, H. J. M., & Thiele, I. (2014). Functional Metabolic Map of *Faecalibacterium prausnitzii*, a Beneficial Human Gut Microbe. *Journal of Bacteriology*, 196(18), 3289–3302.
- 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.
- 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.
- Khan, M. T., Duncan, S. H., Stams, A. J., Van Dijl, J. M., Flint, H. J., & Harmsen, H. J. (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic–anoxic interphases. *The ISME Journal*, 6(8), 1578–1585.
- Khan, M. T., Dwibedi, C., Sundh, D., Pradhan, M., Kraft, J. D., Caesar, R., Tremaroli, V., Lorentzon, M., & Bäckhed, F. (2023). Synergy and oxygen adaptation for development of next-generation probiotics. *Nature*, 620(7973), 381–385.

- Khan, M. T., van Dijk, J. M., & Harmsen, H. J. (2014). Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* alive at ambient air. *PLoS One*, *9*(5), e96097.
- Lavelle, A., & Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *17*(4), 223–237.
- Louis, P., & Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, *294*(1), 1–8.
- Marcos-Fernández, R., Riestra, S., Alonso-Arias, R., Ruiz, L., Sánchez, B., & Margolles, A. (2023). Immunomagnetic Capture of *Faecalibacterium prausnitzii* Selectively Modifies the Fecal Microbiota and Its Immunomodulatory Profile. *Microbiology Spectrum*, *11*(1), e01817-22.
- Martín, R., Rios-Covian, D., Huillet, E., Auger, S., Khazaal, S., Bermúdez-Humarán, L. G., Sokol, H., Chatel, J.-M., & Langella, P. (2023). *Faecalibacterium*: A bacterial genus with promising human health applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *47*(4), fuad039.
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L., Chatel, J., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J., & Langella, P. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(3), 255–261.
- Sahoo, D. K., Heilmann, R. M., Paital, B., Patel, A., Yadav, V. K., Wong, D., & Jergens, A. E. (2023). Oxidative stress, hormones, and effects of natural antioxidants on intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1217165.
- Shah, M. A., & Rogoff, H. A. (2021). Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. *Seminars in Oncology*, *48*(3), 238–245.

- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(43), 16731–16736.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Chevalier-Curt, M. J., Robert, V., Philippe, C., Bridonneau, C., Cherbuy, C., Robbe-Masselot, C., Langella, P., & Thomas, M. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology*, *11*(1), 61.
- Zeng, Z., Li, C., Liu, Y., Chen, H., & Feng, X. (2023). Delivery of Transcriptional Factors for Activating Antioxidant Defenses against Inflammatory Bowel Disease. *ACS Applied Bio Materials*, *6*(3), 1306–1312.
- Zhang, J., Huang, Y.-J., Yoon, J. Y., Kemmitt, J., Wright, C., Schneider, K., Sphabmixay, P., Hernandez-Gordillo, V., Holcomb, S. J., Bhushan, B., Rohatgi, G., Benton, K., Carpenter, D., Kester, J. C., Eng, G., Breault, D. T., Yilmaz, O., Taketani, M., Voigt, C. A., ... Griffith, L. G. (2021). Primary Human Colonic Mucosal Barrier Crosstalk with Super Oxygen-Sensitive *Faecalibacterium prausnitzii* in Continuous Culture. *Med*, *2*(1), 74-98. e9.
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, *30*(6), 492–506.