



HAL
open science

Study of biological networks involved in the adaptation of *Bacillus subtilis* and *Faecalibacterium* to their environment

Sandrine S. Auger

► **To cite this version:**

Sandrine S. Auger. Study of biological networks involved in the adaptation of *Bacillus subtilis* and *Faecalibacterium* to their environment. Life Sciences [q-bio]. Université Paris-Saclay, 2023. tel-04190291

HAL Id: tel-04190291

<https://hal.inrae.fr/tel-04190291>

Submitted on 29 Aug 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 de réseaux biologiques impliqués
dans l'adaptation de *Bacillus subtilis* et
de *Faecalibacterium* à leur
environnement

Habilitation à diriger des recherches
de l'Université Paris-Saclay

présentée et soutenue à centre INRAE, Jouy-en-Josas, le
21 mars 2023, par

Sandrine AUGER

Composition du jury

Anne-Judith Waligora-Dupriet

Maître de Conférence, Faculté de Pharmacie de Paris, UMR-INSERM S1139

Rapportrice

Luisa De Sordi

Maître de Conférence, Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint Antoine

Rapportrice

Vincent Fromion

Directeur de Recherche, Unité MaIAGE, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay

Rapporteur

Muriel Derrien

Senior gut microbiome Scientist, Danone Nutricia Research

Examinatrice

Olga Soutourina

Professeure, I2BC, UMR 9198, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Eric Guédon

Directeur de Recherche, Unité STLO, UMR 1253, INRAE, Institut Agro

Examineur

Titre : Etude de réseaux biologiques impliqués dans l'adaptation de *Bacillus subtilis* et de *Faecalibacterium* à leur environnement

Mots clés : régulation, métabolisme, homéostasie des ions métalliques, stress oxydant, microbiote

Résumé : Les bactéries sont fréquemment exposées à des conditions de limitation en nutriments ainsi qu'à de nombreux stress environnementaux. La capacité de la cellule bactérienne à survivre à de telles variations dépend de son aptitude à sentir ces changements et à y répondre via des réseaux de régulation parfaitement coordonnés. Ces phénomènes temporels avec de nombreux acteurs et des aspects dynamiques constituent des questions biologiques complexes qui m'ont toujours passionnées. Au cours de mes projets de recherche, j'ai étudié le rôle de régulateurs transcriptionnels impliqués dans le maintien de l'homéostasie des ions métalliques et dans la réponse au stress oxydant chez la bactérie du sol *Bacillus subtilis*. Plus récemment, j'ai réorienté

mes projets sur l'étude des bactéries commensales anaérobies strictes du genre *Faecalibacterium* qui jouent un rôle majeur dans la santé digestive au sein du microbiote intestinal humain. Je m'intéresse plus particulièrement à la diversité des protéines MAM (Microbial Anti-inflammatory Molecule) et à la réponse au stress oxydant de différentes souches dont l'abondance est altérée dans un contexte inflammatoire intestinal. Je mène aussi un projet à l'interface entre bioinformatique/microbiologie sur la prédiction et la validation de petites protéines synthétisées par *Faecalibacterium* et qui joueraient un rôle dans le maintien de l'holobionte microbiote-hôte.

Title : Study of biological networks involved in the adaptation of *Bacillus subtilis* and *Faecalibacterium* to their environment

Keywords : regulation, metabolism, homeostasis of metal ions, oxidative stress, microbiote

Abstract : Bacteria are frequently exposed to nutrient limiting conditions as well as many environmental stresses. The ability of the bacterial cell to survive such variations depends on its ability to sense these changes and respond to them through perfectly coordinated regulatory networks. These temporal phenomena with many actors and dynamic aspects constitute complex biological questions, which have always fascinated me. During my research projects, I have studied the role of transcriptional regulators involved in metal ion homeostasis and in the response to oxidative stress in the soil bacterium *Bacillus subtilis*.

More recently, I reoriented my projects on the study of the strict anaerobic commensal bacteria *Faecalibacterium*, which play a major role in digestive health within the human gut microbiota. I am particularly interested in the diversity of MAM (Microbial Anti-inflammatory Molecule) proteins and the oxidative stress response of different strains whose abundance is altered in an inflammatory intestinal context. I am also leading a project at the interface between bioinformatics / microbiology on the prediction and validation of small proteins synthesized by *Faecalibacterium* and which would play a role in the maintenance of the microbiota-host holobiont.

TABLE DES MATIERES

1	CURRICULUM VITAE	5
2	EXPOSE SYNTHETIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHES	12
3	Projets de recherche sur la régulation de l'homéostasie des ions métalliques chez <i>Bacillus subtilis</i>.....	17
3.1	Rôles des ions métalliques	17
3.2	Contribution des ions métalliques au cycle cellulaire de <i>Bacillus subtilis</i>	18
3.3	Liens entre ions métalliques et stress oxydant	19
3.3.1	Les espèces réactives de l'oxygène	19
3.3.2	Mécanismes de résistance au stress oxydant chez les bactéries aérobies	20
3.3.3	Régulation de l'homéostasie des ions métalliques et du stress oxydant chez <i>B. subtilis</i>	22
3.4	Résultats et publications	26
3.4.1	Identification des sites de fixation du régulateur Zur à l'échelle du génome	26
3.4.2	Impact global des délétions $\Delta mntR$ et Δzur sur le protéome de <i>B. subtilis</i>	28
3.4.3	Mise en évidence du rôle du régulateur YvmB dans la régulation de la biosynthèse d'acide pulcherriminique	30
4	Projets actuels sur la bactérie commensale <i>Faecalibacterium</i>	33
4.1	Composition du microbiote intestinal.....	33
4.2	Fonctions du microbiote intestinal.....	34
4.3	Notion de dysbiose du microbiote intestinal	35
4.4	<i>Faecalibacterium</i> , un genre bactérien au fort potentiel probiotique	36
4.5	Projet 1 : Etude de la diversité et de la fonction des protéines MAM	38
4.5.1	Contexte	38
4.5.2	Résultats	38
4.5.3	Perspectives.....	42
4.6	Projet 2 : Exploration des réseaux de co-expression génique chez la souche A2-165 avec WGCNA dans R-Shiny	44
4.6.1	Contexte	44
4.6.2	Résultats	44
4.7	Projet 3 : Recherche de petites protéines impliquées dans les relations bactéries-bactéries et bactéries-hôtes.....	46
4.7.1	Contexte	46
4.7.2	Résultats préliminaires	48
4.7.3	Perspectives.....	49
4.8	Projet 4 : Etude de la réponse au stress oxydant chez <i>Faecalibacterium</i>	49
4.8.1	Contexte	49
4.8.2	Résultats	52
4.8.3	Perspectives.....	62
4.9	Implication dans des projets transversaux sur le microbiote	65
4.10	Conclusion sur le rôle d'encadrant.....	65
5	REFERENCES	66

1 CURRICULUM VITAE

AUGER Sandrine, Chargée de Recherche (CRCN)

Née le 8 janvier 1976 à Paris 14^{ème}
Unité MICALIS, INRAE, Domaine de Vilvert
78352 Jouy-en-Josas, cedex
Email : sandrine.auger@inrae.fr

Formations Universitaires

Nov. 2020 Diplôme Universitaire de Bioinformatique intégrative, Université Paris Cité
Fév. 2003 Doctorat de Microbiologie, Université Paris VII-Denis Diderot
1999 DEA de Microbiologie, Université Paris VII-Denis Diderot
Diplômée du cours de Microbiologie Générale de l'Institut Pasteur
1998 Maîtrise de Biochimie, Université Paris VII-Denis Diderot
1997 Licence de Biochimie, Université Paris VII-Denis Diderot
1996 DEUG Sciences de la Nature et de la Vie, Université Paris VII-Denis Diderot

Parcours professionnel

Nov. 2018- Chargée de recherche, INRAE, Jouy-en-Josas, MICALIS, équipe de P. Langella, groupe de J. M. Chatel. "Rôle des protéines MAM, des petites protéines et du stress oxydant chez *Faecalibacterium*".
Juin 2017-2018 Chargée de recherche, INRAE, Jouy-en-Josas, MICALIS, équipe de N. Rama Rao. "Impact de la réponse nitrogène sur des bactéries du microbiote intestinal".
Jan. 2010-2017 Chargée de recherche 1^{ère} classe, INRA, Jouy-en-Josas, MICALIS, équipe de P. Noirot. "Etude des interconnexions entre les réseaux de régulation de voies métaboliques chez *Bacillus subtilis*".
Avril 2005-2009 Chargée de recherche 2^{ème} classe, INRA, Jouy-en-Josas, équipe de S. D. Ehrlich, groupe d'A. Sorokine. "Etude de l'évolution des génomes au sein du groupe *Bacillus cereus*".
2003- 2005 Post-doctorat, INRA, Thiverval-Grignon, équipe de S. Aymerich "Etude de la formation de biofilms par *B. cereus* sur substrats inertes".
1999-2003 DEA et Thèse à l'Institut Pasteur, équipe d'A. Danchin, sous la responsabilité d'I. Martin-Verstraete. "Caractérisation de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre chez *B. subtilis*".

Activités d'encadrement

Etudiants en thèse

Sept 2013-2016 Directrice de thèse par dérogation de P. Randazzo, Université Paris-Sud. 100% d'encadrement. Projet de la thèse : "Etude des interconnexions entre l'homéostasie des métaux et le métabolisme du carbone chez *B. subtilis*".

3 articles publiés associés, 3 présentations orales, 4 posters

Sept-nov 2014 D. Dhali étudiant en thèse à l'Université de Lille. 100% d'encadrement. Formation à la manipulation génétique de *B. subtilis*.

1 article publié associé, 2 posters

2006-2008 B. Moumen, étudiant en thèse, Université d'Aix-Marseille. 30% d'encadrement. Formation à la manipulation génétique de *B. cereus*.

Etudiants de niveau master

Déc-juin 2022 T. Botin, stage de Master 2, Biologie Moléculaire et Cellulaire, parcours Microbiologie fondamentale, Université Paris Cité, 100% d'encadrement.

1 article associé en cours de soumission

Avril-juill 2020 M.T. Barba Goudiaby, stage de Master 2, Microbiologie et Génie Biologique, Mention Nutrition et sciences des aliments. Université Paris-Saclay. 50% d'encadrement.

Fév-mars 2019 Q. Favreau, stage de Diplôme de formation approfondie en sciences pharmaceutiques, Université de Nantes. 50% d'encadrement

Avril-mai 2004 J. Nait-Abdallah, stage de maîtrise, Université Paris XI-Orsay. 50% d'encadrement.

Etudiants de niveau BTS

Mai-juin 2014 et nov-déc 2014 P. Testu, stages de 1ère année et 2ème année de BTS (ESTBA). 100% d'encadrement.

Personnels techniques

2007-2009 N. Galleron, assistante ingénieur. 100% d'encadrement. Encadrement journalier des projets et des activités de recherche.

4 articles publiés associés

2009-2014 Agents du laboratoire de préparation. Co-responsabilité.

Enseignement

Depuis 2020 Cours (5 heures) pour l'UE du M1 Bioinformatique « Génomique Microbienne et des virus » Université Paris Cité (responsable : Pierre-Emmanuel Ceccaldi).

Nov.-déc. 2017 Participation aux Travaux Pratiques des étudiants en M1 dans l'UE Biodiversité Génomique de l'Université Paris-Saclay (responsables : S. Chailloux et M. Leclerc).

Avril 2014 Cours (3 heures) sur le rôle des ions métalliques chez les bactéries pour les étudiants en thèse du programme Marie Curie Initial Training Network AMBER.

Oct.-nov. 2003 Participation aux Travaux Pratiques des étudiants en DEA de Physiologie et Génétique des Microorganismes de l'Université Paris XI-Orsay (responsable : P. Servant).

Activités d'évaluation

Evaluation d'articles

PLOS One, Microbiology, BMC Microbiology, Frontiers in Microbiology, Scientific Reports, Extremophiles, Pharmaceutical Nanotechnology, mSystems

Evaluation de projets de recherche

2017 Evaluation de projet dans le cadre de l'Appel à projets de recherche Environnement-Santé-Travail (Appel PR 2017/1) de l'ANSES.

2015 Evaluation de projet dans le cadre de l'Appel à projets de recherche sur la santé environnement et la santé au travail (Appel PR 2015/1) de l'ANSES.

Membre de jury de concours

2018 Concours de recrutement d'un Maître de Conférence à l'Université Paris VII-Denis Diderot

Membre de comité de thèse

2021-2024 Thèse de V. Leguillier supervisée par J. Vidic (MICALIS, INRAE) et B. Heddi (CNRS-ENS-Paris-Saclay) 2021-2024

Participation à des projets

2022-2023 Porteuse du projet PEPSMI « Identification de peptides impliqués dans les interactions bactéries-bactéries et bactéries-hôtes au sein du microbiote intestinal humain » (département MICA, INRAE).

2021-2023 Responsable de la tâche bioinformatique dans le projet Carnot-Qualiment GermAge "Etude de l'effet de farines germées chez le rat en croissance" coordonné par M. Gueugneau (INRAE, Clermont-Ferrand).

2020-2022 Responsable de la tâche bioinformatique dans le projet Carnot-Qualiment BP Acetate "Développement de co-cultures bactériennes pour potentialiser la biomasse et les effets santé de bactéries intestinales anaérobies strictes" coordonné par E. Huillet (INRAE, Jouy-en-Josas).

2017-2018 Participation au projet "Impact de la réponse nitrogène sur les bactéries pathogènes et le microbiote intestinal", financement Jeune Equipe du département MICA, INRA, coordonné par N. Rama Rao.

2017 Participation au projet "Biomarqueurs des *Bacillus cereus* pathogènes", financement Idex Paris-Saclay, coordonné par N. Rama Rao.

2013-2016 Responsable de la tâche WP6 dans le programme Marie Curie Initial Training Network FP7/2012 AMBER coordonné par L. Hamoen. "Central carbon metabolism and main cellular processes in *B. subtilis*".

2010-2013 Participation au projet européen BaSyntheccoordonné par P. Noirot. "Bacterial Synthetic minimal genomes for biotechnology".

2010-2011 Participation au projet européen BaSysBio coordonné par P. Noirot. "Towards an understanding of dynamic transcriptional regulation at global scale in bacteria : a systems biology approach".

2005-2008 Participation au projet national PNRA *B. cereus* coordonné par C. Nguyen. "Nouvelle approche et nouveaux outils pour étudier l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *B. cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement".

Recherche de financements

Demandes de financements en tant que porteur

ANR (2022), département MICA INRAE (2021), métaprogramme HOLOFLUX INRAE (2021), AAP Pocs in Labs (2019), département MICA INRAE (2018), Fondation pour la Recherche Médicale (2014), ANSES (2013 et 2015)

Participation à des demandes de financements

Programme européen Horizon 2020-RISE (2018), ANR (2014, 2015 et 2020)

Contrats de recherche financés

Financement d'un étudiant en thèse dans le projet AMBER (FP7 ITN Marie Curie Initial Training Network coordonné par L. Hamoen (Amsterdam Univ, Amsterdam, NL), 390 k€, pour l'INRA, 2013-2016

Financement d'un étudiant en alternance Licence professionnelle Bio-industries et biotechnologie, Université Paris-Saclay, financement INRAE, 2021-2022

Financement du projet PEPSMI, 30 k€, département MICA, INRAE, 2022-2023

Liste des publications

Article dans des revues généralistes

2021 Vidic, J. et **Auger, S.**, Nanoparticules d'oxydes métalliques dans les emballages alimentaires actifs, intelligents et non toxiques. *Techniques de l'Ingénieur*. Sous presse

2019 Vidic, J. et **Auger, S.**, Techniques moléculaires de détection de bactéries d'origine alimentaire. *Techniques de l'Ingénieur*. RE-281 Décembre

Chapitre d'ouvrage

2022 J. Vidic, **S. Auger**, M. Marin, F. Rizzotto, N. Haddad, S. Guillou, M. Guyard-Nicodème, P. Vizzini, A. Cossettini, M. Manzano, Z. Kotsiri, E. Panteleli, A. Vantarakis. Role of real-time DNA analyses, biomarkers, resistance measurement, and ecosystem management in *Campylobacter* risk analysis. Chapter 51. Present Knowledge in Food Safety: A Risk-Based Approach Through the Food Chain. ILSI.

Articles dans des revues internationales avec comité de lecture : 33 articles

2022 Borrás Nogues, E., Kropp, C., Bétemps, L., da Sousa, C., Chai, F., **Auger, S.**, Azevedo, V., Langella, Ph., Chatel, J.M. Recombinant *Lactococcus lactis* delivering hCAP18 cDNA alleviates DNBS-induced colitis in C57BL/6 mice by promoting IL17A and IL10 cytokine expression. *Sci Rep*. 2022 Sep 19;12(1):15641.

Verstraeten S, Sencio V, Raise A, Huillet E, Layec S, Deruyter L, Heumel S, **Auger S**, Robert V, Langella P, Beney L, Trottein F, Thomas M. Description of a Newly Isolated *Blautia faecis* Strain and Its Benefit in Mouse Models of Post-Influenza Secondary Enteric and Pulmonary Infections. *Nutrients*. 2022 Apr 1;14(7):1478.

Auger, S., Kropp, C., Borrás-Nogues, E., Chanput, W., Andre-Leroux, G., Gitton-Quent, O., Benevides, L., Breyner, N., Azevedo, V., Langella, P., Chatel, JM. Intraspecific Diversity of Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii*. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 1;23(3):1705.

- 2021 Nikolic, M., Vasiljevic, Z., **Auger, S.**, and Vidic, J. Metal Oxide Nanoparticles for Safe Active and Intelligent Food Packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, 16:655-668.
- 2020 Vasiljevic, Z., Dojcinovic, M., Krstic, J.B., Ribic, V., Tadic, N.B., Ognjanovic, M., **Auger, S.**, Vidic, J., and Nokolic, M.V. Synthesis and antibacterial activity of iron manganite (FeMnO₃) particles against the environmental bacterium *Bacillus subtilis*. *RSC Adv.* 2020, 10, 13879.
- Lapiere A, Geiger M, Robert V, Demarquay C, **Auger S**, Chadi S, Benadjaoud M, Fernandes G, Milliat F, Langella P, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Prophylactic *Faecalibacterium prausnitzii* treatment prevents the acute breakdown of colonic epithelial barrier in a preclinical model of pelvic radiation disease. *Gut Microbes*. 2020, 12(1):1-15.
- Randazzo, P., Anba-Mondolini, J, Aubert-Frambourg, A., Guillot, Pechoux, C., Vidic, J., **Auger, S.** *Bacillus subtilis* regulators MntR and Zur participate in redox cycling, antibiotic sensitivity, and cell wall plasticity. *J. Bact.* 2020, 202(5):e00547-19
- 2019 Zanet, V., Vidic, J., **Auger, S.**, Vizzini, P., Lippe, G., Iacumin, L., Comi, G., Manzano, M. Activity evaluation of pure and doped zinc oxide nanoparticles against prokaryotic and eukaryotic cells. *J Appl Microbiol.* 2019, 127(5):1391-1402.
- Auger, S.**, Henry, C., Péchoux, C., Lejal, N., Zanet, V., Manzano, M., Nikolic, M.V., Vidic, J. Exploring the impact of Mg-doped ZnO nanoparticles on a model soil microorganism *Bacillus subtilis*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 182:109421.
- 2018 **Auger, S.**, Henry, C., Péchoux, C., Suman, S., Lejal, N., Bertho, N., Larcher, T., Stankic, S., Vidic, J. Exploring multiple effects of Zn_{0.15}Mg_{0.85}O nanoparticles on *Bacillus subtilis* and macrophages. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):12276.
- 2017 Dhali, D., Coutte, F., Arias, AA., **Auger, S.**, Bidnenko, V., Chataigné, G., Lalk, M., Niehren, J., de Sousa, J., Versari, C., Jacques, P. Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C14 isoform. *Biotechnol J.*, 2017, 12(7).
- Bidnenko, V., Grylak, A., Delumeau, O., **Auger, S.**, Aucouturier, A., Guerin, C., Repoila, F., Bardowski, J., Aymerich, S., Nicolas, P., Bidnenko, E. Bacterial termination factor Rho: from control of pervasive transcription to cell fate determination. *PLoS Genet.*, 2017, 13(7):e1006909.
- Randazzo, P., Aucouturier, A., Delumeau, O., **Auger, S.** Revisiting the *in vivo* GlnR-binding sites at the genome scale in *Bacillus subtilis*. *BMC Res Notes*, 2017, 10(1):422.
- 2016 Randazzo, P., Aubert-Frambourg, A., Guillot, A. and **Auger, S.** The MarR-like protein PchR (YvmB) regulates expression of genes involved in pulcherriminic acid biosynthesis and in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology*, 2016, 16:190.
- 2015 Mirouze, N., Bidnenko, E., Noirot, P. and **Auger, S.** Genome-wide mapping of TnrA-binding sites provides new insights into the TnrA regulon in *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*, 2015, DOI: 10.1002/mbo3.249.
- Prestel, E., Noirot, P. and **Auger, S.** Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* Zur-binding sites associated with a Zur box expands its known regulatory network. *BMC Microbiology*, 2015, 15:13.

- 2013 Guinebretière, MH., **Auger, S.**, Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, ML., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, PE., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C. and Sorokin, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst Evol Microbiol.*, 2013, 63:31-40.
- 2012 **Auger, S.**, Galleron, N., Segurens, B., Dossat, C., Bolotin, A., Wincker, P. and Sorokin, A. Complete genome sequence of highly hemolytic strain *Bacillus cereus* F837/76. *J. Bacteriol.*, 2012, 194:1630.
- 2010 Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, MH., **Auger, S.**, Sorokine, A., and Nguyen-thé, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, 2010, 43:1885-1894.
- 2009 **Auger, S.**, Rama Rao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S. and Gohar, M. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *AEM*, 2009, 75:6616-6618.
- 2008 Lapidus, A., Goltsman, E., **Auger, S.**, Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M. L., Broussolle, V., Brillard, J., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Winker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 171:236-249.
- Auger, S.**, Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S. D., Lapidus, A. and Sorokin, A. The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *AEM*, 2008, 74:1276-1280.
- 2007 Hullo, MF., **Auger, S.**, Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. The conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *J. Bacteriol.*, 2007, 189:187-197.
- 2006 **Auger, S.**, Krin, E., Aymerich, S. and Gohar, M. Autoinducer 2 affects biofilm formation in *Bacillus cereus*. *AEM*, 2006, 72:937-941.
- Even, S., Burguière, P., Soutourina, O., **Auger, S.**, Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. Global control of cysteine metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 2006, 188:2184-2197.
- 2005 **Auger, S.**, Gomez, M. P., Danchin, A. and Martin-Verstraete I. The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. *Biochimie*, 2005, 87:231-238.
- Burguière, P., Fert, J., Guillouard, I., **Auger, S.**, Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. Regulation of the *Bacillus subtilis* *ytml* operon involved in sulfur metabolism. *J. Bacteriol.*, 2005, 187:6019-6030.
- 2004 Hullo, M.F., **Auger, S.**, Dassa, E., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. The *metNPQ* operon of *Bacillus subtilis* encodes an ABC permease transporting methionine sulfoxide, D- and L-methionine. *Research in Microbiology*, 2004, 155:80-86.
- Burguière, P., **Auger, S.**, Hullo, M.F., Danchin, A. and Martin-Verstraete I. Three different systems participate to L-cystine uptake in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 2004, 186:4875-4884.

- 2002 **Auger, S.**, Huen, W.H., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. The *metIC* operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* controlled by transcription antitermination. *Microbiology*, 2002, 148:507-518.
- Guillouard, I., **Auger, S.**, Hullo, M.F., Chetouani, F., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. Identification of CysL, a regulator of the *cysII* operon encoding sulfite reductase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 2002, 184:4681-4689.
- Auger, S.**, Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. Global expression profile of *Bacillus subtilis* grown in the presence of sulfate or methionine. *J. Bacteriol.*, 2002, 184:5179-5186.
- 2001 Coppée, J. Y, **Auger, S.**, Turlin, E., Sekowska, A., Le Caer, J. P., Labas, V., Vagner, V., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. Sulfur-limitations-regulated proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study. *Microbiology*, 2001, 147:1631-1640.

Articles soumis pour publication

Pinchaud, K., Zeeshan, H., **Auger, S.**, Chatel, J.M., Chadi, S., Langella, P., Paoli, J., Dary-Mouro, A., Maguin-Gaté, K., Olivier, J.L. Gut microbiota modifications and gut-brain axis impact by dietary arachidonic acid in male BALB/C mice.

Auger, S., Mournetas, V., Chiapello, H., Loux, V., Langella, P., Chatel, J.M. Gene co-expression network analysis of the human gut commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* based on WGCNA in R-Shiny. *PlosOne*, in revision.

Communiqué scientifique

2019 Etude de l'impact de nanoparticules mixtes Mg-ZnO sur la bactérie environnementale *Bacillus subtilis*. **Auger S.** et Vidic J. 2019 Aug 21 Scoop.it ! Life Sciences UPSaclay.

2 EXPOSE SYNTHETIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHES

Reconstruction de réseaux biologiques impliqués dans l'adaptation des bactéries à leur environnement

Les bactéries sont fréquemment exposées à des conditions de limitation en nutriments ainsi qu'à de nombreux stress environnementaux. La capacité de la cellule bactérienne à survivre à de telles variations dépend de son aptitude à sentir ces changements et à y répondre via des réseaux de régulation parfaitement coordonnés. Ces phénomènes temporels avec de nombreux acteurs et des aspects dynamiques constituent des questions biologiques complexes qui m'ont toujours passionnées.

J'ai commencé mon parcours scientifique en 1998 sous la responsabilité d'Isabelle Martin-Verstraete à l'Institut Pasteur dans l'Unité de Génétique des Génomes Bactériens. Cette unité avait participé au séquençage du génome de *Bacillus subtilis*, première bactérie à Gram positif dont la séquence complète du génome a été achevée en 1997. *B. subtilis* est une bactérie de l'environnement à coloration de Gram positive qui est capable de sporuler. Avec d'autres Bacillacées elle présente un intérêt industriel et commercial majeur car elle produit un grand nombre d'enzymes (protéases, amylases, cellulases) permettant de dégrader une variété de substrats. C'est aussi un modèle pour des bactéries utilisées dans l'industrie agro-alimentaire telles que les bactéries lactiques, ainsi que pour des pathogènes phylogénétiquement proches comme les *Listeria*, *Clostridia*, *Staphylocoques* et *Streptocoques*. *B. subtilis* est la bactérie à Gram-positif sur laquelle le plus grand nombre d'études génétiques, biochimiques et physiologiques ont été conduites depuis plus de cinquante ans. Elle constitue donc un organisme de choix pour aborder l'étude des voies métaboliques et le contrôle de l'expression génétique.

Mon projet de recherche en DEA puis en thèse portait sur l'**étude du métabolisme du soufre chez *B. subtilis***. Le soufre est un élément structural indispensable chez tous les organismes. Chez les bactéries, il représente de 0,5 à 1 % du poids sec cellulaire. Cet élément est impliqué dans un grand nombre de processus métaboliques cellulaires centraux comme la synthèse des acides aminés soufrés. La **méthionine** est nécessaire au démarrage de la traduction et elle est le précurseur de la S-adénosylméthionine qui est un donneur de groupement méthyl dans un grand nombre de réactions. La **cystéine** est impliquée dans des phénomènes d'adaptation aux conditions environnementales tels que le maintien de l'équilibre oxydo-réductif, la protection contre les radicaux libres et la signalisation cellulaire. Lorsque j'ai commencé ce projet peu de données étaient disponibles sur le métabolisme du soufre et sa régulation chez les bactéries à Gram-positif. Mon travail de thèse avait donc pour objectif l'étude de la régulation de ce métabolisme et la caractérisation de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de la méthionine et de la cystéine. Par des approches méthodologiques multiples (biologie moléculaire, génétique, enzymologie, biochimie, transcriptomique) j'ai mis en évidence les gènes et les activités enzymatiques qui sont impliqués dans les voies métaboliques de synthèse de la méthionine et de sa conversion en cystéine (Figure 1). J'ai participé à la caractérisation de plusieurs transporteurs de composés soufrés.

former des biofilms dans une collection de souches de *B. cereus* qui avaient été isolées de l'environnement, de produits alimentaires ou de cas cliniques chez l'homme avec des souches diarrhéiques et émétiques. Nous avons aussi examiné l'hydrophobicité de surface des cellules qui est un facteur important dans leur capacité d'adhésion au substrat, ainsi que la présence d'une couche S qui est composée de sous-unités glycoprotéiques contenant de nombreux acides aminés hydrophobes. Ce travail a permis d'établir des corrélations entre la capacité à former des biofilms et les propriétés hydrophobes de surface (Auger *et al.*, 2009).

En parallèle, j'ai développé un projet dans lequel j'ai montré que *B. cereus* synthétise des molécules de type AI-2 qui dérivent du métabolisme de la méthionine (Figure 1). Ces molécules ont un effet inhibiteur sur la formation des biofilms par *B. cereus* et constituent donc un signal extracellulaire dans le développement de ce style de vie (Auger *et al.*, 2006).

En avril 2005, j'ai été recrutée au sein de l'INRA comme Chargée de recherche dans le laboratoire de Génétique Microbienne (dirigé par Dusko Ehrlich), dans l'équipe d'Alexei Sorokine. J'ai travaillé sur l'étude de l'**évolution des génomes des bactéries du groupe *B. cereus*** en participant à un projet ANR et en m'impliquant dans le séquençage et l'analyse des génomes de trois souches du groupe *B. cereus* (Lapidus *et al.*, 2008; Carlin *et al.*, 2010; Auger *et al.*, 2012). Le résultat le plus marquant concerne la souche pathogène NVH 391-98 que nous avons identifiée comme étant la représentante d'une nouvelle espèce appelée *Bacillus cytotoxicus* au sein du groupe *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2013). Les souches de *B. cytotoxicus* produisent une toxine spécifique appelée CytK. L'article associé publié en 2013 a fait l'objet de plus de 300 citations. Contrairement aux souches mésophiles de *B. cereus* qui poussent jusqu'à 47°C, la souche NVH 391-98 présente la particularité de pousser à 53°C, ce qui peut poser des problèmes de contamination dans les procédés de fabrication des industries agroalimentaires (Auger *et al.*, 2008). Il est donc important de comprendre comment évoluent les génomes au sein du groupe *B. cereus* et comment certaines souches deviennent pathogènes. Les phages tempérés jouent un rôle majeur dans l'évolution des génomes et dans le transfert de gènes impliqués dans la pathogénicité. Plusieurs phages capables d'effectuer la transduction généralisée de matériel génétique ont été mis en évidence chez *B. cereus* mais aucun n'avait été caractérisé au niveau moléculaire. J'ai donc poursuivi mes projets sur la caractérisation d'un phage tempéré dans la souche *B. cytotoxicus* NVH 391-98 et sur la mise en évidence de phages tempérés actifs au sein de l'espèce psychrotrophe *B. weihenstephanensis*.

En janvier 2010 j'ai rejoint l'équipe de Philippe Noirot intitulée "Intégration fonctionnelle des processus cellulaires". A mon arrivée cette équipe était fortement impliquée dans le programme européen BaSysBio (Bacillus Systems Biology). L'objectif de ce programme était de générer des données quantitatives afin d'identifier les réseaux de régulation mis en place chez *B. subtilis* lors d'un changement de la source carbonée ou en réponse à un stress. Je me suis rapidement intégrée dans le programme BaSysBio en m'investissant dans certains projets déjà initiés sur le rôle de régulateurs impliqués dans la régulation du métabolisme central chez *B. subtilis*. Les résultats les plus remarquables ont été obtenus sur la protéine TnrA qui est le régulateur principal du **métabolisme de l'azote**. TnrA était connu pour contrôler directement ou indirectement l'expression d'une centaine de gènes en réponse à une limitation en azote. En utilisant la méthodologie de

Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip (ChIP-on-chip), j'ai mis en évidence *in vivo* que TnrA se lie de façon reproductible à 42 sites sur le chromosome. Des analyses complémentaires avec l'étude de profils de transcription *in vivo* et une analyse bioinformatique, nous a permis de définir le régulon primaire de TnrA. Ainsi nous avons identifié 35 régions promotrices répondant aux 3 critères : (i) liaison directe de TnrA sur l'ADN ; (ii) présence d'un motif nucléique de type « boîte TnrA »; (iii) régulation transcriptionnelle dépendante de TnrA. La délimitation du régulon primaire de TnrA a permis d'améliorer la séquence consensus du motif boîte TnrA. Ce travail a aussi mis en évidence de nouvelles interconnexions entre la régulation du métabolisme de l'azote et d'autres processus cellulaires tels que la réponse au stress oxydant (Mirouze *et al.*, 2015).

En parallèle, j'ai développé ma propre thématique de recherche en étudiant la **régulation de l'homéostasie des ions métalliques et du stress oxydant** chez *B. subtilis*. En effet, les ions métalliques tels que Fe(II), Mn(II) et Zn(II) sont essentiels dans un grand nombre de processus cellulaires en tant que cofacteur d'enzymes ou en tant qu'élément structural dans les protéines. Cependant ils sont toxiques à trop fortes concentrations en endommageant la membrane cellulaire et l'ADN ainsi qu'en inactivant la fonction de certaines protéines. De plus, dans des conditions aérobies, *B. subtilis* produit du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui réagit avec les ions Fe(II) pour produire des radicaux libres hautement toxiques pour la cellule. La concentration interne des ions métalliques doit donc être parfaitement régulée et coordonnée avec les autres processus cellulaires.

Dans le cadre d'un projet européen Marie Curie Training Network, j'ai **encadré la thèse de Paola Randazzo** dont le projet portait sur l'étude des interconnexions entre l'homéostasie des ions métalliques et le métabolisme du carbone chez *B. subtilis*. Par des approches transcriptomiques et protéomiques elle a étudié la perturbation de l'homéostasie du fer, du zinc et de manganèse à l'échelle de la cellule. Nous avons aussi mis en évidence le rôle du régulateur transcriptionnel YvmB (de fonction inconnue) dans la transcription de gènes liés au métabolisme du fer. Les projets menés avec P. Randazzo ont donné lieu à **3 publications dont elle est premier auteur** (Randazzo *et al.*, 2016; Randazzo *et al.*, 2017; Randazzo *et al.*, 2020). J'ai assisté le 26 octobre 2016 à sa soutenance de thèse en tant que directrice de thèse par dérogation (Université Paris Sud).

Au cours de l'année 2015, le départ de P. Noirot pour les Etats-Unis a impacté la structuration de l'équipe. J'ai alors initié une réflexion personnelle sur mon positionnement au sein de l'unité MICALIS tout en poursuivant mes projets en cours. L'intérêt que je portais à l'homéostasie des ions métalliques m'a amené à m'intéresser aux **nanoparticules d'oxyde métallique** car certaines d'entre elles présentent des propriétés antimicrobiennes contre un large spectre d'espèces, notamment par leur capacité à induire un stress oxydant. L'augmentation de la résistance bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques est devenue un problème de santé mondial. Les nanomatériaux présentent des propriétés biophysiques particulières qui peuvent être employées afin de lutter contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques. En tant qu'experte en microbiologie, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec des biophysiciens de l'unité VIM (INRAE, Jouy-en-Josas), de l'Institut des Nanosciences (Paris), de l'Université d'Udine (Italie) et de Belgrade (Serbie) afin d'étudier le rôle antibactérien de nanoparticules néosynthétisées. Ce travail collaboratif a donné lieu à 5 publications (Auger *et al.*, 2018; Auger *et al.*, 2018; Auger *et al.*, 2019; Vasiljevic *et al.*, 2020;

Nikolic *et al.*, 2021).

En 2017, mes projets de recherche n'étant plus en cohérence avec les nouvelles thématiques de l'équipe, j'ai dû me repositionner par rapport aux thématiques menées dans l'unité MICALIS. Cela m'a donné l'opportunité de poursuivre mes travaux de recherche en m'ouvrant à une autre dimension : celle d'un écosystème microbien, et plus particulièrement du microbiote intestinal humain. En novembre 2018 j'ai rejoint l'équipe de Philippe Langella (équipe ProbiHôte) afin de travailler dans le groupe de Jean-Marc Châtel sur **le rôle des protéines MAM, des petites protéines et du stress oxydant chez la bactérie commensale *Faecalibacterium prausnitzii***. J'ai choisi de me lancer de nouveaux défis en réorientant mes recherches à l'aide de la bioinformatique. Ce choix m'est apparu naturellement : au fil des années, j'ai pris conscience que l'utilisation de méthodologies de type « omiques » pour la compréhension de processus biologiques nécessitent de s'approprier les méthodes et les outils de biostatistique et de bioinformatique. Avec la diversité des nouvelles technologies et la massification des données à traiter, la bioinformatique est devenue une discipline à part entière, au carrefour de l'informatique, des statistiques (Big Data) et de la biologie. En 2020, j'ai concrétisé mon nouveau projet professionnel en acquérant un Diplôme Universitaire de Bioinformatique Intégrative (Université Paris Cité). Cette formation m'a donné accès à un nouvel univers afin de mener mes actuels projets de recherche sous un nouvel angle.

J'ai souhaité me concentrer dans ce document sur une partie des travaux de recherche que j'ai réalisés sur la régulation de l'homéostasie des ions métalliques chez *B. subtilis*, notamment dans le cadre de l'encadrement de la thèse de P. Randazzo. Puis je présente mes projets de recherche actuels ainsi que leurs perspectives.

3 Projets de recherche sur la régulation de l'homéostasie des ions métalliques chez *Bacillus subtilis*

3.1 Rôles des ions métalliques

En réponse aux fluctuations permanentes de leur environnement, les bactéries mettent en oeuvre des mécanismes adaptatifs qui incluent une régulation de la transcription de gènes dont les produits contribuent à leur résistance et à leur survie.

L'une de mes thématiques de recherche a concerné l'étude des réseaux de régulation en lien avec l'homéostasie des ions métalliques chez *B. subtilis*. Les ions métalliques tels que **Fe(II)**, **Mn(II)** et **Zn(II)** sont essentiels dans un grand nombre de processus cellulaires en tant que **cofacteur d'enzymes ou en tant qu'élément structural dans les protéines** (Figure 2) Cependant, à trop hautes concentrations, ils peuvent avoir des **effets toxiques** en endommageant la membrane cellulaire et l'ADN ainsi qu'en inactivant la fonction de certaines protéines. De plus, en condition aérobie, *B. subtilis* produit du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui réagit avec les ions Fe(II) pour produire des radicaux libres hautement toxiques pour la cellule. La régulation de l'homéostasie des ions métalliques doit donc être parfaitement régulée et coordonnée avec les autres processus cellulaires. J'ai essayé de comprendre de façon globale, via des approches expérimentales à grande échelle, les interconnexions entre la régulation de l'homéostasie des ions métalliques et : (i) la réponse au stress oxydant et (ii) la régulation du métabolisme central du carbone.

Fonctions essentielles des ions métalliques chez les êtres vivants fer, cuivre, zinc, manganèse, cobalt, nickel

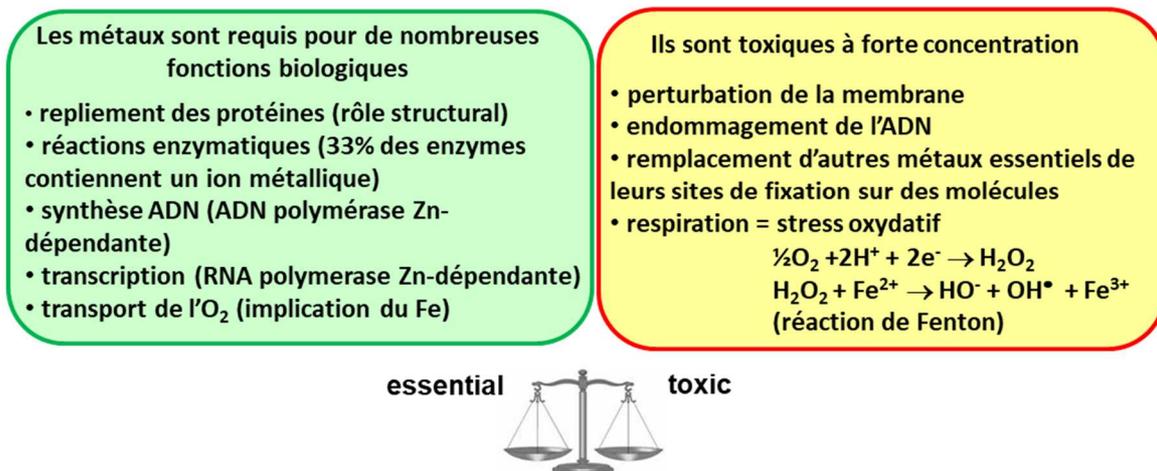


Figure 2. Dualité entre les rôles essentiels et la toxicité des ions métalliques chez tous les êtres vivants.

3.2 Contribution des ions métalliques au cycle cellulaire de *Bacillus subtilis*

Chez *B. subtilis*, les ions métalliques jouent un rôle dans la croissance et le maintien des fonctions métaboliques. Les protéines contenant du **Fe(II)** participent à de nombreux processus tels que de la respiration (cytochromes) et la détoxification des peroxydes (catalases), la biosynthèse des acides aminés (glutamate synthases) et des enzymes du cycle de Krebs (comme la fumarase, l'aconitase, la succinate déshydrogénase) (Hartford and Dowds, 1994; Lancaster and Kröger, 2000; Suzuki and Knaff, 2005; Smaldone *et al.*, 2012b). Le **Zn(II)** est requis pour la structure de nombreuses protéines, telles que des enzymes ou des protéines régulatrices (McCall *et al.*, 2000). Il est également impliqué dans les processus de transcription et de traduction (Markov *et al.*, 1999; Nanamiya *et al.*, 2004). Le Zn(II) est un cofacteur dans les enzymes catalytiques, par exemple dans les métalloprotéases et hydrolases à zinc (Ma *et al.*, 2009). Les enzymes dépendantes du **Mn(II)** sont impliquées dans le métabolisme du carbone et de l'azote (phosphoglycérate mutase, glutamine synthétase), la détoxification de molécules toxiques (superoxyde dismutase) et la signalisation du stress (PPM-II phosphatase) (Deuel and Stadtman, 1970; Watabe and Freese, 1979; Inaoka *et al.*, 1999; Teh *et al.*, 2015). Le **Cu(II)** sert à la respiration aérobie car il est un cofacteur des oxydases hème-cuivre (Mattatall *et al.*, 2000).

L'ajout d'ions métalliques au milieu de culture peut déterminer la progression et la redirection du cycle cellulaire de *B. subtilis*, de la croissance végétative vers des programmes de développement alternatifs (Figure 3). L'acquisition de zinc est importante pour le développement de la compétence (Ogura, 2011). De plus, les bactéries adoptent de multiples mécanismes pour coloniser les surfaces en fonction de la disponibilité des métaux comme le Mn(II) et le Fe(II) (Fall *et al.*, 2006). Des conditions limitant l'accessibilité en fer (mutation dans les gènes codant la synthèse du sidérophore bacillibactine) affectent le développement de colonies complexes. En fait, le fer est indispensable à la synthèse de ménaquinone qui elle-même est directement impliquée dans l'expansion des colonies complexes (Pelchovich *et al.*, 2013). Un mélange de manganèse et de glycérol favorise la formation d'un biofilm robuste et d'une pellicule (Shemesh and Chai, 2013).

Des concentrations appropriées de Ca(II), Mn(II), Mg(II), Fe(II) et Zn(II) sont nécessaires pour le développement des spores (Hageman *et al.*, 1984). En particulier, le Mn(II) est connu comme un micronutriment essentiel requis pour la différenciation des endospores. Les composants des voies de phosphorelay de sporulation détectent les ions Mn(II) pour activer la cascade de phosphorylation (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Levdikov *et al.*, 2012).

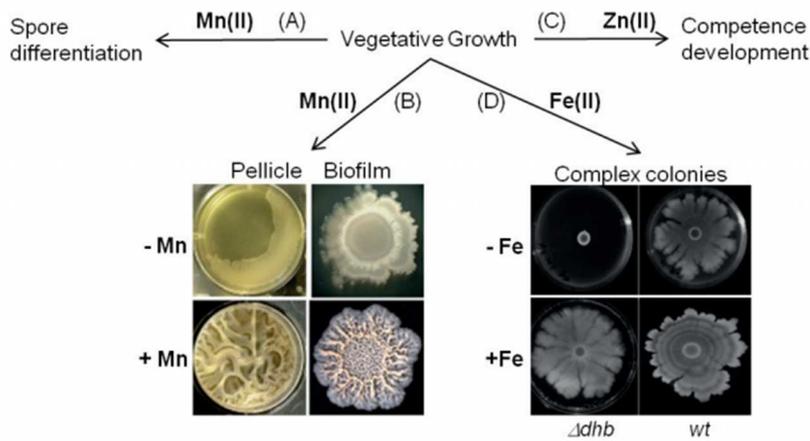


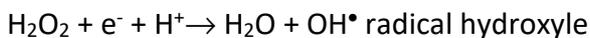
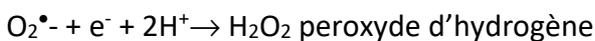
Figure 3. Effets des ions métalliques sur les modes de vie de *B. subtilis*.(A) Le manganèse est nécessaire au processus de sporulation et (B) à la formation de biofilms et de pellicules à l'interface air-liquide (adapté de Perchovich *et al.*, 2013); (C) la carence en zinc réduit la compétence naturelle; (D) le niveau en fer intracellulaire influence la formation de colonies complexes par la souche sauvage (wt) et par un mutant (Δdhb) délété des gènes codant un sidérophore majeur (adapté de Shemesh and Chai, 2013).

3.3 Liens entre ions métalliques et stress oxydant

3.3.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydant peut être défini fonctionnellement comme un excès d'espèces oxydantes au sein de la cellule : ce sont essentiellement les **espèces réactives de l'oxygène** (Reactive Oxygen Species : ROS). Cet excès peut être dû soit à une surproduction de ROS soit à une carence au niveau des systèmes de défense.

Au cours de leur croissance les bactéries aérobies utilisent l'oxygène comme accepteur final des électrons dans les chaînes respiratoires selon la réaction suivante : $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$. Différentes ROS sont générées par l'acceptation successives d'électrons et de protons :



Les ROS sont des molécules instables capables de causer des dommages importants à l'ADN, aux lipides membranaires, ou aux protéines, entre autres en oxydant les ions utilisés comme co-facteurs (Imlay, 2019). Une conséquence importante de la modification des protéines par oxydation est qu'elles deviennent sensibles à la dégradation protéolytique. Les anions $O_2^{\bullet -}$ attaquent les enzymes comportant des hèmes (centres [4Fe-4S]), provoquant le relargage du fer et la perte de l'activité enzymatique. Par une réaction de dismutation, les ions $O_2^{\bullet -}$ sont rapidement convertis en **peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**. Ce dernier peut réagir avec les groupements thiol des résidus cystéines créant ainsi des ponts disulfures ou des dérivés d'acide sulfonique. Il est aussi capable de générer des groupes carbonyles dans les résidus lysine, arginine, thréonine ou proline, et d'oxyder la méthionine en méthionine sulfoxyde (Stadtman and Levine, 2003). Mais de façon la plus importante, H_2O_2 est

capable d'oxyder le fer intracellulaire libre dans la réaction de Fenton menant à la production de radicaux libres : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^- + \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$.

Les cellules doivent faire face à un paradoxe : le besoin en fer en tant que cofacteurs d'enzymes ou élément structural et son activité destructrice quand il réagit avec les ROS. L'homéostasie du fer joue donc un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant.

3.3.2 Mécanismes de résistance au stress oxydant chez les bactéries aérobies

La stratégie la plus importante chez les bactéries pour minimiser l'action toxique du Fe^{2+} est la modulation du contenu cellulaire en ions métalliques (Faulkner and Helmann, 2011a). Le stress à H_2O_2 induit des changements significatifs dans la composition cytosolique des métaux. Le **niveau intracellulaire de Fe^{2+} réactif est diminué** tandis que sont augmentées les concentrations en ions divalent non-réactifs Mn^{2+} et Zn^{2+} . Ces derniers peuvent se lier aux cibles de Fe^{2+} par compétition et ainsi prévenir les effets délétères du fer. L'homéostasie du fer peut être modifiée par plusieurs voies possibles :

- (1) la répression de la synthèse des systèmes d'importation du fer
- (2) la séquestration du Fe^{2+} cytosolique libre
- (3) l'incorporation du fer dans l'assemblage de nouveaux centres [4Fe-4S].

En parallèle, les ions Mn^{2+} et Zn^{2+} sont activement importés par des systèmes dont la synthèse est induite par H_2O_2 . Le manganèse, en particulier, joue un rôle central dans la résistance au ROS en raison de son potentiel de réduction élevé selon la réaction : $\text{ROO}^\bullet + \text{Mn(II)} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ROOH} + \text{Mn(III)}$ (Coassin *et al.*, 1992). Ainsi, **le ratio intracellulaire Mn::Fe est un facteur clé** pour la protection des protéines contre les dommages dus aux radicaux libres.

En première ligne de défense, plusieurs systèmes enzymatiques permettent aussi de détoxifier les ROS telles que les superoxydes dismutases, les catalases, les alkyl hydroperoxyde réductases (Figure 4).

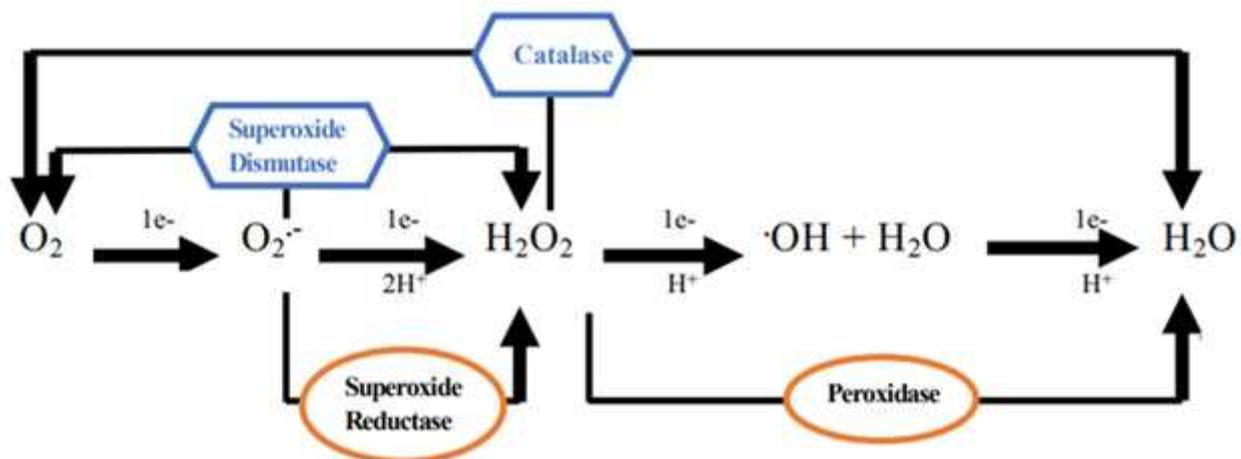


Figure 4. Systèmes enzymatiques de détoxification des ROS chez les bactéries aérobies.

Stockage du fer

De nombreuses bactéries conservent des réserves intracellulaires de fer dans des protéines de stockage. Trois familles sont connues sous le nom de **ferritines, bactérioferritines contenant de**

l'hème et protéines Dps (DNA-binding proteins from starved cells) (Andrews *et al.*, 2003). Au cours de l'acquisition du fer, les protéines de stockage du fer catalysent l'oxydation de Fe(II) en Fe(III).

Chez *B. subtilis*, deux homologues distincts de type Dps sont codés par les gènes *dps* et *mrgA*. La Dps est induite après un stress dû à la chaleur, au sel et à l'éthanol ou à une carence en glucose. En condition non stressante, le gène *dps* est exprimé à partir d'un promoteur de type σ^B à l'entrée en phase stationnaire pour la résistance au H₂O₂ intrinsèque (Antelmann *et al.*, 1997). En revanche, MrgA est synthétisé après un stress extracellulaire à H₂O₂ (Chen *et al.*, 1993a).

« Low Molecular Weight thiols » (LMW Thiol)

Les molécules à thiols de faible poids moléculaire sont largement distribuées chez les eucaryotes et les bactéries. Ce sont généralement des **dérivés du métabolisme de la cystéine**. La LMW Thiol majeure des bactéries est le **glutathion** existant sous forme réduite (GSH) ou sous forme disulfure (GSSG) (Fang and Dos Santos, 2015). La forme GSH maintient le bon état d'oxydation des thiols protéiques et protège les cellules de nombreux stress, comme le stress oxydant. GSH est lié au métabolisme fer-soufre. GSH est capable de complexer le Fe(II) libre et est ainsi utilisé comme substrat de la glutarédoxine pour la biosynthèse des protéines à cluster Fe-S (Hider and Kong, 2011). De plus, les enzymes à cluster Fe-S dépendent de GSH pour la restauration du centre Fe-S après exposition au stress oxydant. C'est l'exemple de l'aconitase d'*Escherichia coli*, dont l'activité est réduite dans un mutant déficient en GSH en raison de l'accumulation de molécules ROS (Gardner and Fridovich, 1993). GSH n'est pas présent dans de nombreuses bactéries Gram-positives, dont *B. subtilis*.

D'autres LMW Thiols ont été mises en évidence. De nombreuses espèces de *Bacillus* utilisent le **bacillithiol** (BSH) qui est le glycoside α -anomérique de la L-cystéinyl-D glucosamine avec l'acide L-malique (Newton *et al.*, 2009). BSH participe à la réponse au stress des métaux. Ce métabolite protège contre le stress au cuivre et au cadmium, à la carence en fer et au stress superoxyde (Fang and Dos Santos, 2015). BSH fonctionne dans l'homéostasie du Zn(II) en tant que molécule tampon qui, en protégeant le pool labile de Zn(II), livrerait le métal aux protéines dépendantes du zinc via une réaction d'échange direct du ligand (voir Figure 5) (Ma *et al.*, 2014).

Les superoxyde dismutases

Chez les bactéries aérobies, les superoxyde dismutases (SOD) sont une classe d'enzymes re-dox qui participent à la **détoxification des ROS**. En particulier, les SOD sont capables de catalyser la dismutation des anions superoxydes toxiques en oxygène et peroxyde d'hydrogène ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) (McCord and Fridovich, 1969). Ce sont souvent des enzymes cytoplasmiques, mais certaines peuvent aussi être exportées. Elles utilisent un **co-facteur métallique** pour leur activité catalytique. Les enzymes SOD sont généralement classées en trois groupes : (1) les Cu,Zn-SOD utilisent le cuivre pour l'activité catalytique et le zinc avec un rôle structural; (2) les Ni-SOD sont des SOD spécifiques au nickel; (3) les Mn/Fe-SOD peuvent avoir du manganèse ou du fer comme cofacteur catalytique (Aguirre and Culotta, 2012).

Les catalases

En phase végétative de croissance la catalase KatA de *B. subtilis* catalyse la décomposition de H₂O₂ en O₂ et H₂O. La catalase KatX est essentielle à la résistance à H₂O₂ lors de la germination des spores (Bagyan *et al.*, 1998).

Les alkyl hydroperoxyde réductases (ou thiol-specific peroxidases)

Cette enzyme catalyse la réduction de H₂O₂ en eau. Elle est composée de 2 sous-unités :

- AhpC fait partie de la famille des « thiol-specific antioxydant (TSA) proteins », elle porte l'activité peroxidase;
- AhpF est une flavoprotéine. AhpF utilise le NADH ou le NADPH comme donneur d'électron à AhpC.

3.3.3 Régulation de l'homéostasie des ions métalliques et du stress oxydant chez *B. subtilis*

Chez *B. subtilis*, **quatre métalloprotéines interviennent dans la régulation de la réponse à H₂O₂ et la régulation du métabolisme du fer, du zinc et du manganèse** (Figure 5). Il s'agit du régulateur du transport du manganèse MntR (Que and Helmann, 2000) et de trois protéines de type Fur qui contrôlent les régulons impliqués dans la réponse au stress à H₂O₂ (le répresseur PerR), dans le transport du fer (le régulateur Fur) et dans le transport de zinc (le répresseur Zur) (Bsat *et al.*, 1998; Gaballa and Helmann, 1998a). Toutes ces protéines sont des dimères possédant un site de fixation du zinc pour leur structure ainsi que des sites de fixation d'ions métalliques qui modulent leurs activités répresseurs.

Le régulateur **PerR** de *B. subtilis* est l'un des senseurs du stress au peroxide le mieux caractérisé chez les bactéries. L'expression des gènes correspondants est induite par l'entrée des cellules aérobies en phase stationnaire, lorsque l'activité de la chaîne respiratoire est la plus élevée. En étant capable de « sentir » à la fois la présence intracellulaire d'H₂O₂ et le niveau intracellulaire des métaux, **PerR illustre le lien étroit entre la réponse au stress au peroxide et la modulation de l'homéostasie des ions métalliques** (Faulkner and Helmann, 2011b). La protéine PerR contient deux sites de fixation d'ions divalents (Figure 5). Le premier joue un rôle structural en liant un cation Zn²⁺. Le deuxième site peut lier un ion Mn²⁺ ou Fe²⁺ nécessaire à l'activité répresseur de PerR (Herbig and Helmann, 2001; Mongkolsuk and Helmann, 2002; Jacquamet *et al.*, 2009). PerR réprime la transcription quand il est associé à Mn²⁺ ou Fe²⁺ mais seule la forme PerR:Fe est inactivée par l'H₂O₂. Cette inactivation est due à l'oxydation irréversible du résidu histidine H38 (Lee and Helmann, 2006a; Lee and Helmann, 2006b). Dans la plupart des conditions de croissance riches, PerR est lié à Fe²⁺ pour former la forme active PerR:Zn,Fe qui réprime l'expression du régulon PerR. Dans des conditions de croissance déficientes en fer et manganèse, ou dans des cellules traitées avec de l'H₂O₂, PerR:Zn est inactif et de nombreux gènes du régulon PerR sont exprimés (Fuangthong *et al.*, 2002).

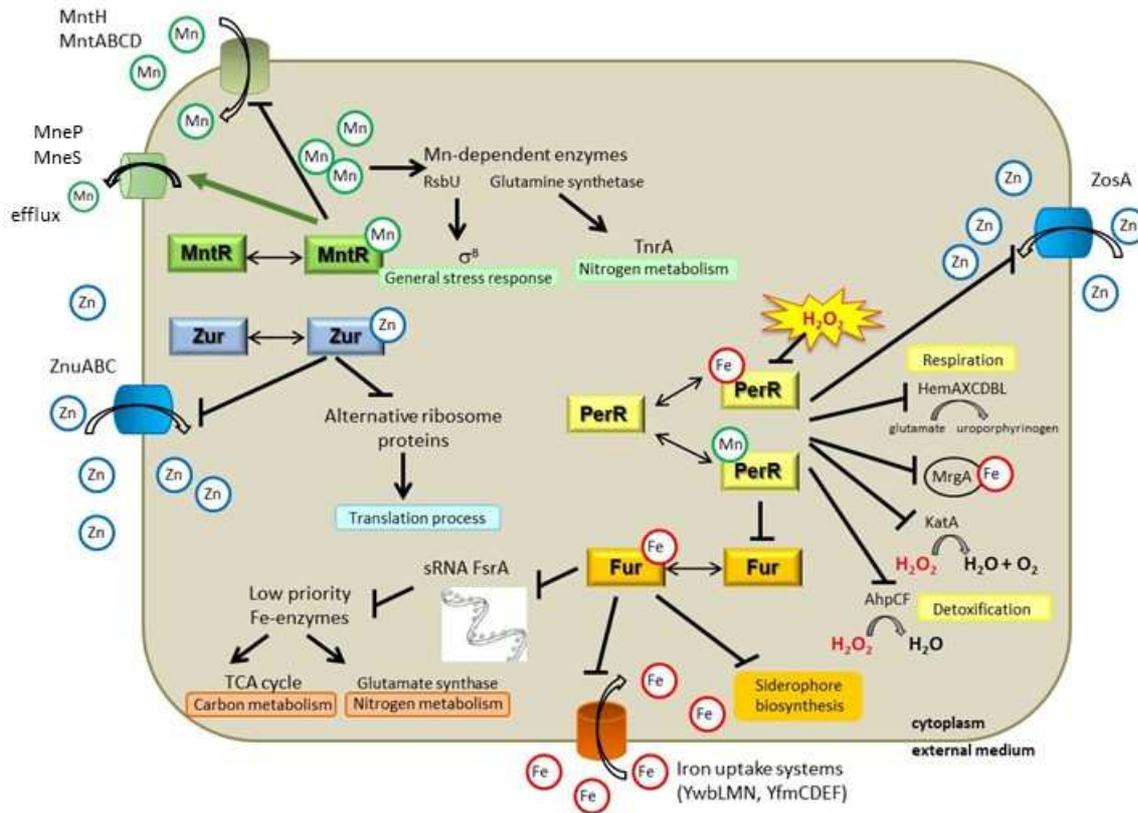


Figure 5. Rôles des régulateurs transcriptionnels PerR, Fur, Zur et MntR et interconnexions de leurs réseaux de régulation avec d'autres processus cellulaires chez *B. subtilis*.

Le régulon PerR inclue la catalase KatA (Chen *et al.*, 1995a), l'alkyl hydroperoxide réductase AhpCF (Bsat *et al.*, 1996), une protéine de séquestration du fer de type Dps, MrgA (Chen *et al.*, 1993b; Chen and Helmann, 1995), des enzymes de biosynthèse de l'hème HemAXCDBL (Chen *et al.*, 1995b), ainsi qu'un transporteur du zinc ZosA (Gaballa *et al.*, 2002; Helmann *et al.*, 2003) (Figure 5). L'induction de ZosA en réponse à un stress à H₂O₂ a pour conséquence une augmentation du transport des ions Zn²⁺ qui jouent un rôle protecteur face aux endommagements causés par les radicaux libres.

Il faut noter que la réponse au stress oxydant chez *B. subtilis* fait aussi intervenir le facteur général de la réponse aux stress σ^B ainsi que le régulateur **OhrR** (Helmann *et al.*, 2003). OhrR est un régulateur de type MarR qui réprime l'expression du gène *ohrA* codant une peroxirédoxine (Fuangthong *et al.*, 2001). Contrairement à PerR, OhrR est faiblement inactivé par H₂O₂ mais il est plus sensible à l'inactivation par les peroxydes organiques qui agissent via la thiolation d'un résidu cystéine (Lee *et al.*, 2007; Duarte and Latour, 2010).

Le régulateur **Zur** fonctionne avec les ions Zn²⁺ comme co-répresseurs (Figures 5 et 6) (Gaballa and Helmann, 1998b). Zur contient plusieurs sites de fixation d'ions Zn²⁺ ce qui lui permettrait de répondre graduellement à différents niveaux de concentrations intracellulaires en zinc (Gaballa *et al.*, 2002; Gabriel *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011). Son régulon inclue un ABC transporteur à haute affinité pour le zinc, ZnuABC, un probable système de transport à faible affinité YciBC, une GTP cyclohydrolase (YciA) impliquée dans la synthèse du folate (Sankaran *et al.*, 2009) ainsi que des protéines ribosomales alternatives indépendantes du zinc (RpmEB, RpmGC, and

RpsNB) (Nanamiya *et al.*, 2004; Akanuma *et al.*, 2006). Lorsqu'il y a suffisamment de zinc disponible dans le milieu, une partie des sous-unités des ribosomes fonctionnent avec des ions Zn^{2+} comme co-facteurs. Par contre lorsque le zinc est en quantité limitante, ces sous-unités sont remplacées par d'autres protéines ribosomales dont l'activité est indépendante du zinc. Cette stratégie doit permettre aux cellules de disposer d'ions Zn^{2+} au profit d'autres fonctions essentielles à la survie (Panina *et al.*, 2003).

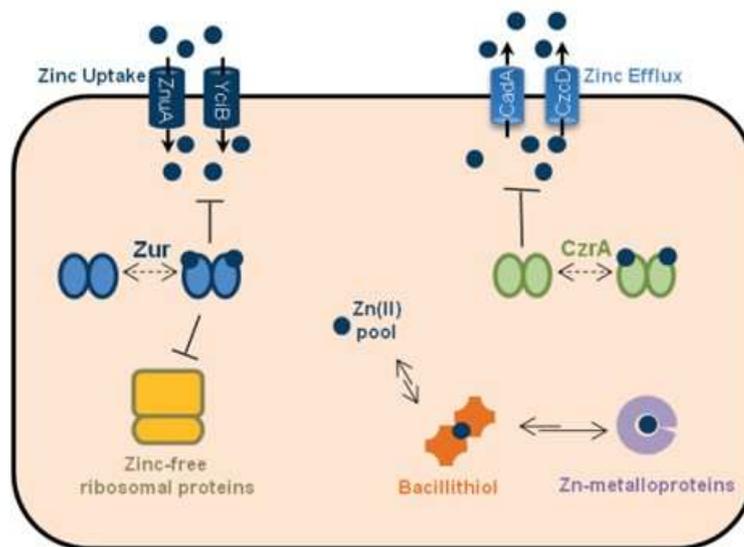


Figure 6. Schéma de l'homéostasie du zinc chez *Bacillus subtilis*. Le pool intracellulaire de Zn(II) est distribué entre les protéines à zinc (telles que certaines sous-unités ribosomales) et le bacillithiol. Les ions Zn(II) agissent comme co-répresseur de Zur et comme dé-répresseur de CzaA qui régule l'expression des gènes d'un système exporteur de Zn(II). D'après Paola Randazzo (manuscrit de thèse).

Le régulateur de l'homéostasie du fer, **Fur**, lie des ions Fe^{2+} qui jouent le rôle de co-répresseurs (Figure 5) (Bsat *et al.*, 1996; Bsat and Helmann, 1999). Bien que l'expression du gène *fur* soit sous le contrôle du répresseur PerR (Figure 1), elle n'est pas induite par un stress à H_2O_2 . Il semble plutôt que PerR contrôle l'expression de *fur* en réponse aux niveaux relatifs entre les cations Fe^{2+} et Mn^{2+} disponibles (Fuangthong *et al.*, 2002). La protéine Fur réprime le transport du fer, en agissant sur des gènes impliqués dans la biosynthèse de sidérophores (Baichoo *et al.*, 2002) ou sur des gènes codant des transporteurs de citrate ferrique, ferrichromes, ferrioxamines et d'hydroxamates (Ollinger *et al.*, 2006).

La protéine Fur coordonne aussi une réponse à la carence en fer via la régulation d'un **petit ARN non codant** appelé FsrA. La séquence de FsrA est partiellement anti-sens à celles de plusieurs ARN messagers, bloquant ainsi la traduction de ces derniers en protéines (Gaballa *et al.*, 2008). Dans des conditions de limitation en fer, FsrA est dérégulé et inhibe la traduction d'enzymes contenant du fer et qui ne sont pas "prioritaires" : l'aconitase CitB et la succinate déshydrogénase SDH qui appartiennent au cycle de Krebs, une dicarboxylate perméase DctP qui est importante pour la croissance sur des intermédiaires du cycle de Krebs, la lactate oxydase LutABC ainsi que la glutamate synthase GltAB qui fait le lien entre le métabolisme du carbone et celui de l'azote (Figure 7). Ainsi en **réponse à la carence en fer, le métabolisme central est remodelé** afin de prioriser l'usage du fer. Dans ce système de régulation complexe, le petit ARN FsrA fonctionne en collaboration avec

trois petites protéines basiques (FbpABC) qui jouent le rôle de co-répresseurs (Smaldone *et al.*, 2012b; Smaldone *et al.*, 2012a). Elles pourraient agir en tant que chaperones d'ARN ou en recrutant la machinerie de dégradation de l'ARN.

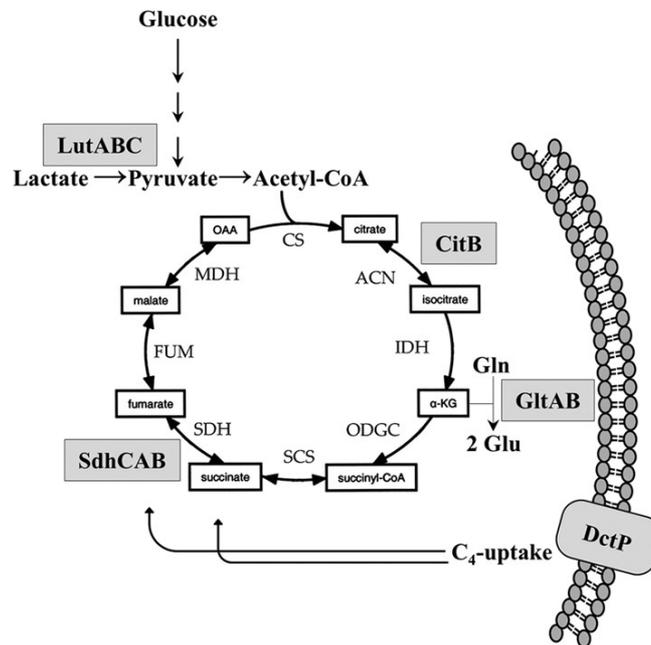


Figure 7. Schéma métabolique mettant en évidence les cibles de la répression traductionnelle médiée par le petit ARN FsrA : enzymes du cycle de Krebs (CitB, SdhCAB), glutamate synthase (GltAB), l'importation de succinate et de fumarate (DctP) ou enzymes métaboliques à proximité du cycle de Krebs (LutABC, PdhABCD). D'après Smaldone *et al.*, 2012.

Il est à noter qu'un autre petit ARN, nommé *S313*, régule positivement l'importation de fer (Nicolas *et al.*, 2012 ; Suarez *et al.*, 2016). Une analyse *in silico* a identifié l'ARNm *efeUOB* comme cible potentielle de *S303*. L'opéron *efeUOB* code pour un système de transport de fer. La suppression de *S313* réduit considérablement le niveau de la protéine EfeM. *S313* agirait comme un régulateur positif direct de l'acquisition du fer via le transporteur EfeUOB (Suarez, 2006).

L'homéostasie du manganèse est principalement régulée au niveau du transport chez *B. subtilis*. Le régulateur **MntR** possède des sites de fixation d'ions Mn^{2+} qui agissent comme co-répresseurs de l'expression de gènes d'import du Mn(II) (*mntH* et *mntABC*) et comme co-activateurs de gènes codant des pompes d'efflux du Mn(II) (*mneP* et *mneS*) (Huang *et al.*, 2017). Des mutants délétés du gène *mntR* ou des deux gènes *mneP* et *mneS* sont extrêmement sensibles à l'intoxication au Mn(II).

Par ailleurs, il a été montré qu'un niveau relativement élevé d'ions Mn^{2+} dans le cytoplasme a un effet sur :

- (1) la répression du régulon Fur. En déplaçant et en remplaçant les ions ferriques, le manganèse doit faire augmenter la quantité d'ions Fe^{2+} libres et donc renforcer l'activité répresseur de Fur
- (2) l'induction de la réponse générale aux stress sous le contrôle de σ^B , en modulant l'activité de la phosphatase RsbU dépendante du manganèse
- (3) une augmentation de l'activité du régulateur du métabolisme de l'azote TnrA, via la modulation de l'activité de la glutamine synthétase dépendante du manganèse (Guedon *et al.*, 2003).

Enfin, chez *B. subtilis*, les ions métalliques Mn(II) intracellulaires peuvent réagir avec un système de « **riboswitch** » **Mn-dépendant** afin d'activer la transcription des gènes *yybP* et *ykoY* (Figure 8). Les riboswitches sont des régions en 5' des ARNm. En général, les riboswitches sont formés d'un domaine capteur de liaison au ligand (également connu sous le nom d'aptamère) et d'une plate-forme d'expression qui permet la régulation de la séquence en aval. Les riboswitches peuvent opérer soit au niveau transcriptionnel en contrôlant la formation d'un terminateur de transcription intrinsèque, soit au niveau de l'initiation de la traduction en contrôlant la séquestration des sites de liaison du ribosome. Chez *B. subtilis*, Dambach *et al.*, 2015 ont montré que le motif *yybP-ykoY* répond directement aux ions manganèse chez *B. subtilis* (Dambach *et al.*, 2015). Par similitude avec *E. coli*, *ykoY* a été proposé pour coder un transporteur impliqué dans la détoxification du manganèse (Paruthiyil *et al.*, 2020).

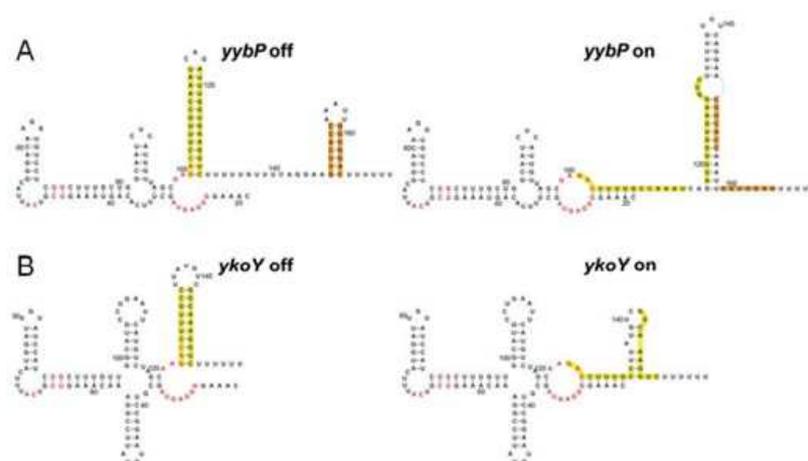


Figure 8. Structures secondaires prédites de la région en 5' des transcrits *yybO* et *ykoY* dans les états « on » et « off ». Les régions en structure tige-boucles prédites comme s'appariant en absence de Mn(II) sont surlignées en jaune et en orange (d'après Dambach *et al.*, 2015).

En conclusion, les activités des régulateurs PerR, Zur, Fur et MntR, du petit ARN *fsrA*, des éléments riboswitchs sensibles au Mn(II) soulignent la complexité dans la régulation de l'homéostasie des ions métalliques, avec des régulations qui se chevauchent et qui sont encore mal comprises. Comme nous venons de le voir, le réseau de régulation de l'homéostasie des métaux est non seulement interconnecté avec celui du stress oxydant mais il l'est aussi avec d'autres processus cellulaires tels que la traduction, le métabolisme du carbone et le métabolisme de l'azote. Le but de mes projets de recherche a été de mieux comprendre ces connexions.

3.4 Résultats et publications

3.4.1 Identification des sites de fixation du régulateur Zur à l'échelle du génome

Prestel, E., Noirot, P. and Auger, S. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* Zur-binding sites associated with a Zur box expands its known regulatory network. BMC Microbiology, 2015, 15:13.

J'ai mené ce travail de recherche en collaboration avec E. Prestel, en contrat post-doctoral dans l'équipe de P. Noirot. Le répresseur Zur est connu pour son rôle dans la régulation de sept opérons via la reconnaissance d'un motif spécifique d'ADN appelé "boîte Zur". Par la méthode de ChIP-on-chip (Figure 9), j'ai montré que Zur se fixe *in vivo* au niveau de **80 régions chromosomiques inter- ou intra-géniques** lors de la croissance de *B. subtilis* en phase exponentielle en milieu LB.

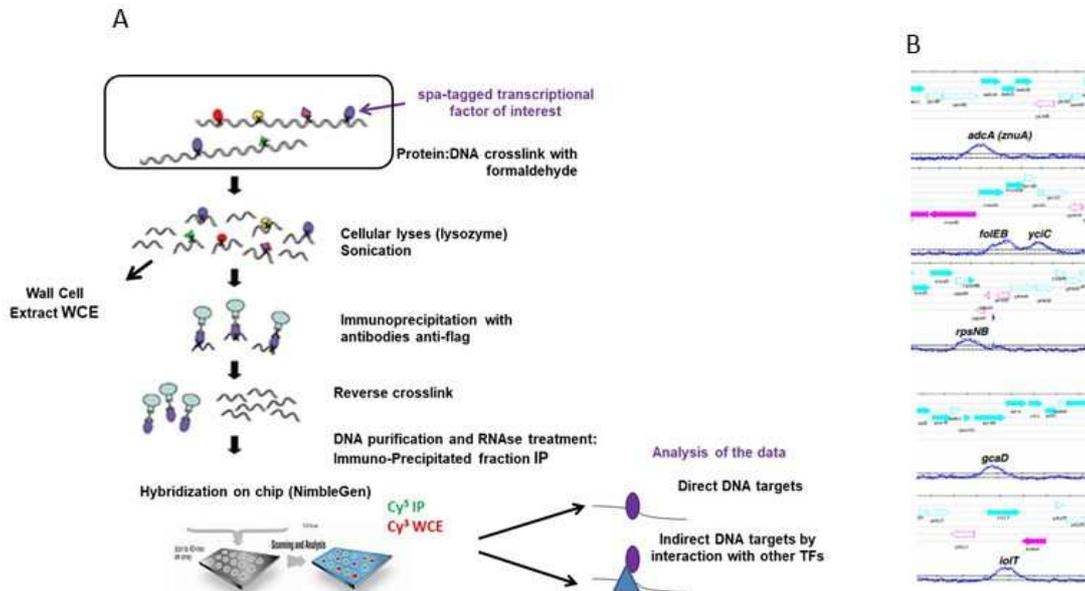


Figure 9. Principe de la méthode de « Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip ». (A) Le facteur de transcription pour lequel sont recherchés les partenaires protéiques est marqué avec une étiquette SPA dans la région C terminale. (B) Illustration de la détection de sites de fixation de Zur^{SPA} sur le génome de *B. subtilis*. Les pics de fixation détectés sont en bleu.

Par une analyse *in silico*, il en ressort que la moitié de ces sites de fixation contient un motif consensus boîte Zur (Figure 10).

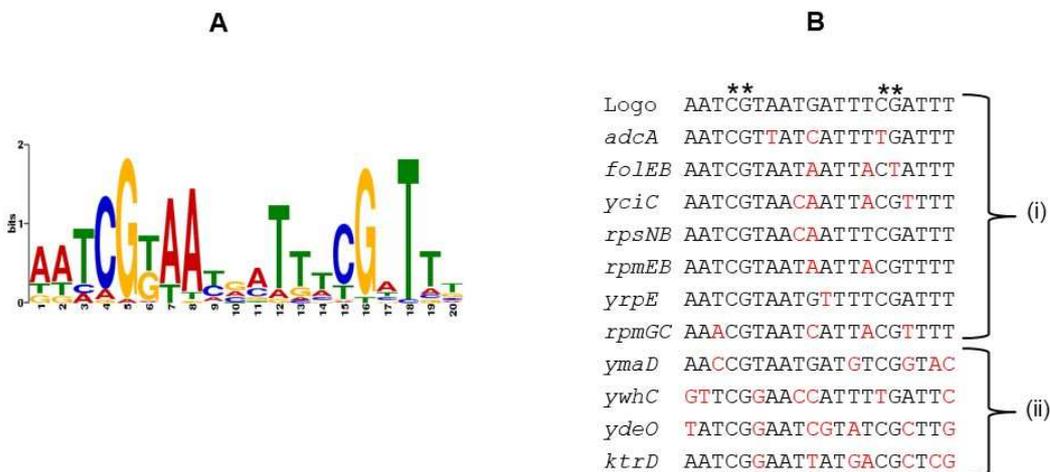


Figure 10. Mise en évidence de motifs boîtes Zur dans des régions de fixation de Zur^{SPA} sur le génome de *B. subtilis*. (A) Séquence palindromique consensus, de 20 nucléotides, identifiée dans les sites de fixation de Zur^{SPA} *in vivo*. Elle matche avec la boîte Zur décrite précédemment (Gabriel *et al.*, 2008). (B) Alignement des motifs boîtes Zur : (i) boîtes Zur présentes dans les régions promotrices des gènes appartenant au régulon Zur ; (ii) boîtes Zur localisées dans des régions de fixation intragéniques de Zur^{SPA}. Les étoiles indiquent des nucléotides très importants pour la fixation de Zur sur l'ADN.

Nous avons aussi montré que certaines boîtes Zur intragéniques jouent un effet répresseur (3 à 10 fois) sur la transcription des gènes *ymaD* (putative peroxiredoxine), *ydeO* (putative protéine membranaire), *ywhC* (putative zinc metalloprotéase) et *ktrD* (K⁺-transporting ATPase). Ainsi, les boîtes Zur intragéniques pourraient être impliquées dans des mécanismes de régulation de l'élongation de la transcription.

D'autre part, la plupart des sites reconnus par Zur ont été identifiés dans ou à proximité de gènes dont l'expression est modulée par un stress au disulfide, de type diamide. Cela indique une forte **interconnexion entre l'homéostasie du zinc et l'homéostasie du potentiel redox**. Mais en raison de l'effet pléiotrope d'une délétion Δzur , il a été difficile de mettre en évidence les mécanismes de régulation liés à la fixation du régulateur Zur sur ses cibles.

Les résultats obtenus dans ce projet ont étendu de façon considérable le régulon Zur et ont révélé un nouveau niveau de complexité dans la fixation de Zur sur ses cibles. Notre étude suggère que la liaison de Zur aux cibles nouvellement identifiées permettrait d'affiner l'expression de certains gènes en interaction avec d'autres facteurs de transcription en réponse à des conditions spécifiques.

3.4.2 Impact global des délétions $\Delta mntR$ et Δzur sur le protéome de *B. subtilis*

Randazzo, P., Anba-Mondolini, J, Aubert-Frambourg, A., Guillot, Pechoux, C., Vidic., J., Auger, S. *Bacillus subtilis* regulators MntR and Zur participate in redox cycling, antibiotic sensitivity, and cell wall plasticity. *J. Bact.* 2020 Feb 11;202(5):e00547-19

Ce travail fait partie du projet de thèse de P. Randazzo que j'ai encadré. Nous avons utilisé une approche protéomique afin d'étudier l'impact global des délétions $\Delta mntR$ et Δzur sur la composition protéique des cellules. Il en résulte que 21 et 43 protéines sont différentiellement abondantes dans les cellules $\Delta mntR$ et Δzur , respectivement. Ceci inclue des protéines impliquées dans l'acquisition des métaux, la traduction, le métabolisme central et l'homéostasie de la paroi cellulaire (Figure 11).

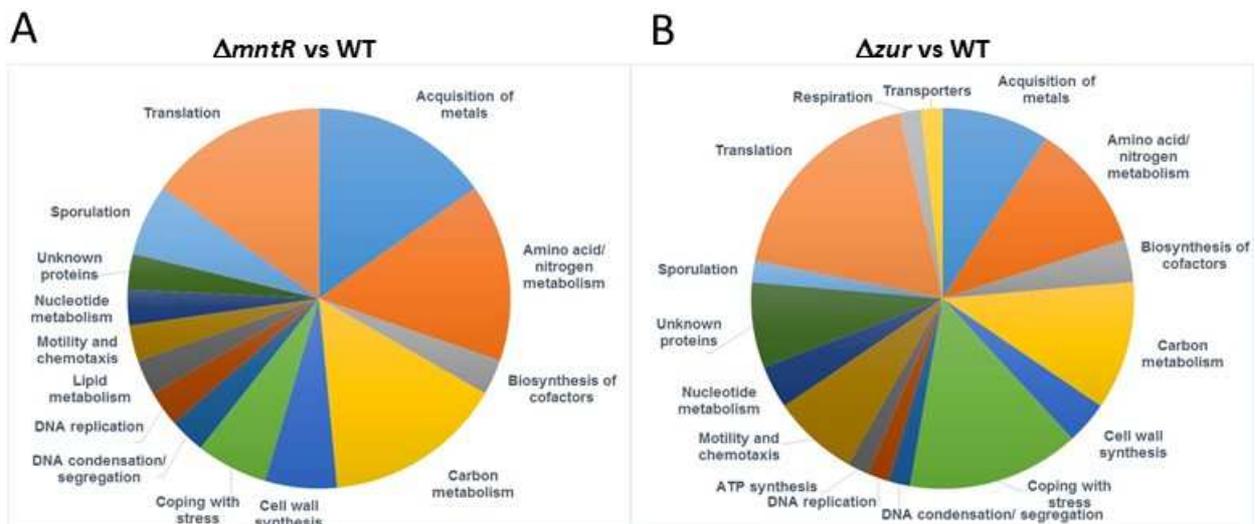
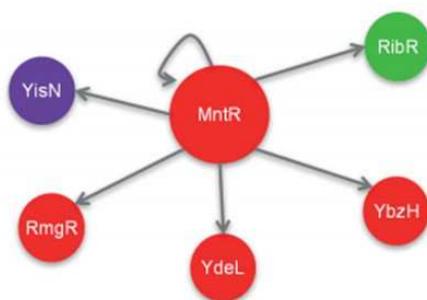


Figure 11. Classification fonctionnelle des protéines présentant une modification de l'abondance dans des mutants $\Delta mntR$ et Δzur de *B. subtilis*.

De plus, les deux mutants présentent des modifications dans les pools d'ions métalliques intracellulaires, avec une accumulation significative de Mg^{2+} dans le mutant $\Delta mntR$. Des analyses phénotypiques et morphologiques des mutants $\Delta mntR$ et Δzur ont révélé leur forte sensibilité au lysozyme, aux bêta-lactames et au stress oxydant.

Les mutants $\Delta mntR$ et Δzur ont une épaisseur de paroi cellulaire modifiée et présentent des niveaux plus bas de ROS intracellulaires par rapport à la souche sauvage. Ainsi ce travail a mis en évidence un lien étroit entre MntR, Zur, la sensibilité aux antibiotiques, le cycle des ROS et la structure de la paroi cellulaire. Il apporte de nouvelles connaissances sur l'adaptation bactérienne à une perturbation de l'homéostasie des ions essentiels Zn^{2+} et Mn^{2+} .

D'autre part, lors de sa thèse, Paola Randazzo avait cherché à identifier d'éventuels protéines interagissant directement avec MntR par la méthode de double hybride chez la levure. Il en est ressorti 5 interactants (Figure 12). L'interaction de MntR-cible avec MntR-proie est en accord avec la forme dimérique de la protéine MntR (Que and Helmann, 2000). Les protéines RmgR et YdeL avaient été montrés comme étant fortement connectés à d'autres protéines (Marchadier *et al.*, 2011). De façon intéressante YbzH est un régulateur de fonction inconnue de la famille ArsR/SmtB. Cette famille inclut des régulateurs impliqués dans la réponse au stress aux métaux lourds.



Preys ^a	Known interactions ^b	Function
MntR (30-142/142)	None	Transcriptional regulator of Mn transport
YbzH (57-100/100)	None	Uncharacterized transcriptional regulator (ArsR/SmtB family)
RibR (143-230/230)	None	RNA-binding riboflavin kinase
RmgR (618-772/772)	TatAY, YhaM, YhaP, TatAD, SwrC, TatAC, YueB, YkcC, YkoT, YixE, XhiA, RacA, PgpH, FruA, YclI, YdgH, YwqJ	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator (AraC/XylS family)
YdeL (213-265/463)	YhaP, SwrC, YueB, YkcC, CitS, DnaB, YhgE, ScpA, YabA, RacA, YqbD, PgpH, YclI, ZapA, YdgH, YwqC, YwqJ	Putative PLP-dependent MocR/GabR-like transcriptional regulator
YisN (96-195/195)	DegS, HcrA, YqeN	Conserved hypothetical protein, sporulation protein

^aInside brackets, amino acid positions of the peptides used as prey are mentioned as follows: start position – stop position / length of the protein. ^bKnown interactions were documented on the IntAct website (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>).

Figure 12. Représentation du réseau PPI (Protein Protein Interaction) de la protéine MntR d'après la méthodologie de double-hybride. Les protéines sont représentées par des cercles et les interactions par des flèches. En rouge : des régulateurs transcriptionnels; en vert : RibR ; en violet : YisN. D'après Paola Randazzo (manuscrit de thèse). Dans le tableau, la colonne « Preys » indique la région en acide aminés des protéines proies qui interagissent avec MntR en double hybride. La colonne « Known interactions » indique le nom des protéines connues pour interagir avec les protéines proies en double hybride. RmgR et YdeL interagissent avec de nombreuses protéines au sein de « hubs ».

La protéine RibR est une RNA-binding riboflavine kinase qui est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de la voie de biosynthèse de la riboflavine. En se liant à la partie 5'-UTR des ARNm *ribDEAHT* (biosynthèse de la riboflavine) et *ribU* (exporteur), elle empêche la terminaison transcriptionnelle du riboswitch FMN-dépendant. Dans le criblage par double hybride, nous avons observé que MntR interagit avec la partie C-terminale de RibR qui porte le domaine de liaison à l'ARN. Chez *Micrococcus pyogenes*, les ions Mn^{2+} et la riboflavine ont un effet inhibiteur sur la croissance (Ramsey et Wilson, 1957). La riboflavine est aussi connue pour jouer un rôle antioxydant. Nous nous sommes donc demandé si l'interaction MntR-RibR pourrait jouer un rôle fonctionnel sur l'expression de l'opéron *ribDEAHT* en réponse à la disponibilité en ions Mn^{2+} . A l'aide d'une fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur de la luciférase, nous avons observé que l'expression de *ribD* est réduite dans un milieu enrichi en ions Mn^{2+} (résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine dépend en partie de la concentration en ions Mn^{2+} chez *B. subtilis*.

3.4.3 Mise en évidence du rôle du régulateur YvmB dans la régulation de la biosynthèse d'acide pulcherriminique

Randazzo, P., Aubert-Frambourg, A., Guillot, A. and Auger, S. The MarR-like protein PchR (YvmB) regulates expression of genes involved in pulcherriminic acid biosynthesis and in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. BMC Microbiology, 2016, 16:190.

Les cyclodipeptides et leurs dérivés constituent une large classe de métabolites secondaires pouvant présenter des activités antibactériennes, antifongiques ou anti-inflammatoires. Chez certaines levures et espèces bactériennes, l'**acide pulcherriminique** dérivé du cyclo-L leucyl-L-leucyle est excrété et **chélate les ions ferriques** libres pour former la pulcherrimine. Chez *Bacillus subtilis*, les enzymes YvmC et CypX sont impliquées dans la biosynthèse de l'acide pulcherriminique (Figure 13) (Cryle *et al.*, 2010; Sauguet *et al.*, 2011).

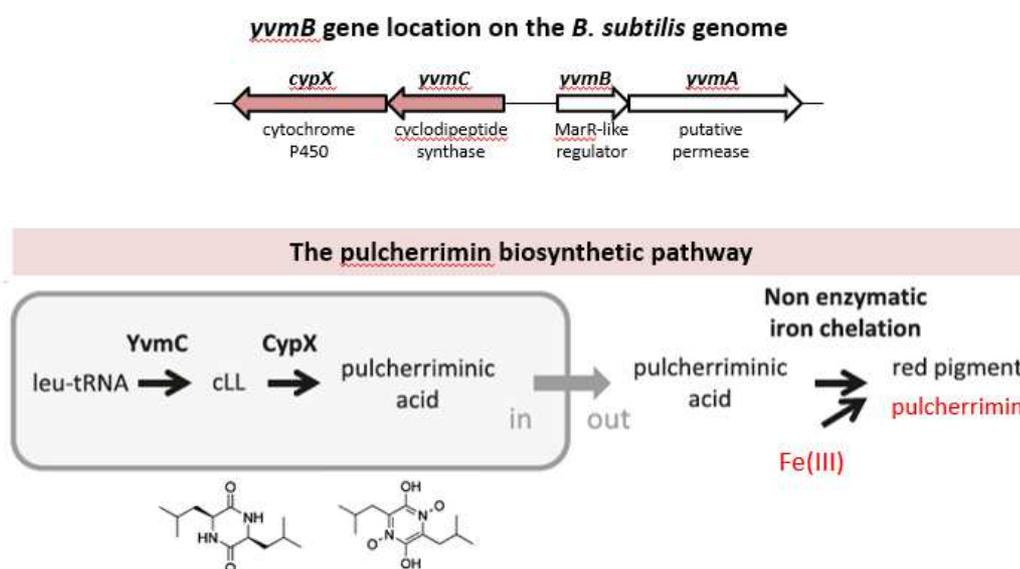


Figure 13. Organisation de l'opéron codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide pulcherriminique. L'acide pulcherriminique excrété dans le milieu réagit avec les ions Fe^{3+} libres pour former la pulcherrimine, un pigment rouge. D'après Paola Randazzo (manuscrit de thèse).

Au cours de ce travail, nous avons montré que le régulateur YvmB, jusque là de fonction inconnue, agit comme répresseur transcriptionnelle de l'opéron *yvmC-cypX* (Figure 14). Par des approches complémentaires de génétique et de biochimie, nous avons pu définir qu'YvmB se fixe au niveau d'un motif palindromique de 14 pb (Figure 15). Par ailleurs, l'expression du gène *yvmB* dépend elle-même de la disponibilité en fer dans le milieu.

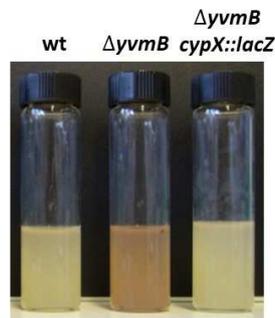


Figure 14. Illustration de la surproduction de pulcherrimine dans le milieu de culture d'un mutant $\Delta yvmB$, reflétant la dérégulation de l'opéron *yvmC-cypX*.

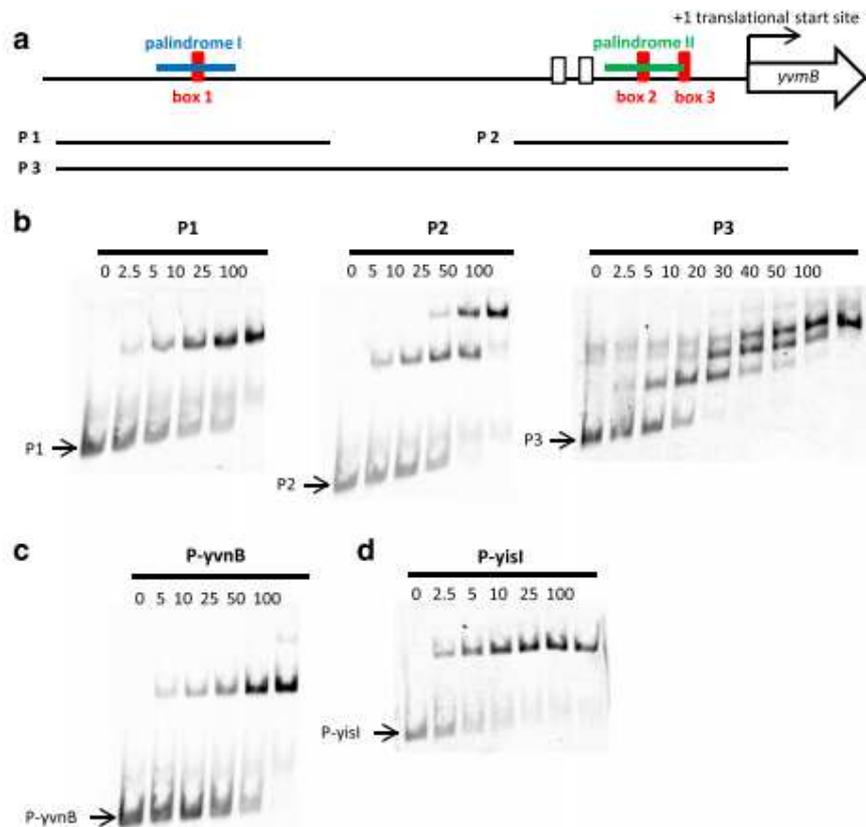


Figure 15. Liaison d'YvmB à la région intergénique *yvmB-yvmC* et aux régions promotrices d'*yvnB* et d'*yisl*. (a) Localisation des sites de liaison d'YvmB dans la région promotrice d'YvmB. Les séquences en position -10 et -35 sont similaires aux séquences consensus des promoteurs σA -dépendant (rectangles blancs). Le palindrome I est indiqué en bleu. Le palindrome II est indiqué en vert. La localisation des 3 sites de fixation d'YvmB est indiquée en rouge. Les fragments d'ADN P1, P2 et P3 ont été utilisés pour les retards sur gel (b). Retard sur gel avec un fragment correspond à la région promotrice P-*yvnB* (c) et de P-*yisl* (d). Des concentrations croissantes de protéines YvmB-Histag purifiées ont été utilisées (nM).

Une analyse globale protéomique a aussi révélé un important effet de la délétion $\Delta yvmB$ sur des protéines impliquées dans des processus cellulaires dépendant du fer. De façon inattendu, nous avons aussi trouvé qu'YvmB contrôle l'expression du gène *yisI*. Ce gène code une protéine jouant un rôle négatif dans la voie d'initiation de la sporulation.

Ainsi, notre travail a mis en évidence le rôle du régulateur YvmB dans les réseaux de régulation liés au métabolisme du fer et au contrôle de l'initiation de la sporulation.

En conclusion, les données que j'ai obtenues sur des régulateurs transcriptionnels de *B. subtilis* par différentes approches (physiologie bactérienne, génétique, biochimie, CHIP-on-Chip, transcriptomique, protéomique, double hybride chez la levure, bioinformatique) montrent clairement que les réseaux de régulation sont intrinsèquement liés, avec un niveau de complexité encore sous-estimé.

4 Projets actuels sur la bactérie commensale *Faecalibacterium*

4.1 Composition du microbiote intestinal humain

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 composé à 90% de bactéries**. Sa constitution commence dès la naissance. Le nouveau-né entre en contact avec le microbiote vaginal et fécal de la mère. Les entérobactéries et les bifidobactéries (d'origine fécale) et les lactobacilles (d'origine vaginale) sont les premières bactéries à coloniser l'intestin du nouveau-né, puis le microbiote se diversifie en fonction de son alimentation et de son environnement. Durant les premiers jours de vie, les premières bactéries colonisatrices de l'intestin sont aérobies strictes ou facultatives, elles consomment l'oxygène présent et participent à la mise en place d'un environnement favorable pour l'implantation de bactéries anaérobies strictes, comme celles des genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium*. Le microbiote va alors évoluer et se diversifier durant trois ans avant de se stabiliser et de se rapprocher du microbiote adulte.

Chaque personne adulte possède son propre microbiote, il existe donc une notion d'inter-individualité. Cependant, un tronc commun de bactéries est retrouvé dans tous les microbiotes intestinaux. **Cinq phyla bactériens dominent le microbiote intestinal : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria, les Proteobacteria et les Verrucomicrobia** (Qin *et al.*, 2010).

Le microbiote intestinal peut posséder jusqu'à 10^{14} bactéries et la concentration en bactéries varie le long du tractus digestif (Figure 16). L'environnement de chaque organe (estomac, intestin grêle, côlon) va définir quels types de bactéries vont se développer. Deux paramètres vont former cet environnement, **la concentration en oxygène et l'acidité du milieu**. L'estomac contient une forte concentration en oxygène et une importante acidité, ces paramètres vont diminuer au fur et à mesure de la progression dans le tractus digestif, jusqu'à atteindre un milieu sans oxygène et sans acidité dans le côlon (Espey, 2013; Rigottier-Gois, 2013). De ce fait, les espèces dominantes des microbiotes de chaque organe se diversifient : **aérobies pour l'estomac et anaérobies strictes pour le côlon**.

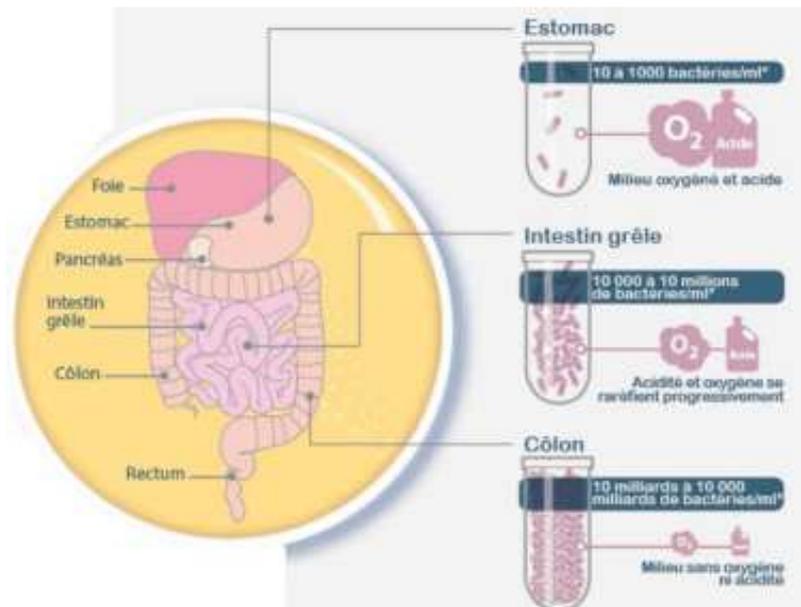


Figure 16. Hétérogénéité spatiale du microbiote intestinal dans le tractus gastro-intestinal (Source : inserm.fr/microbiote-intestinal).

4.2 Fonctions du microbiote intestinal humain

Par le biais des interactions des microorganismes entre eux, avec l'hôte et avec l'environnement, le microbiote 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.

Un grand nombre de **métabolites** sont produits par le microbiote intestinal à partir des aliments. Ces métabolites sont absorbés et utilisés par l'hôte, mais également par le microbiote lui-même et sont essentiels pour la santé. Ainsi, la fermentation des glucides et des protéines est la source des métabolites les plus importants pour l'organisme (butyrate, acides aminés, vitamines ...).

Le microbiote joue aussi un rôle important dans le maintien d'une barrière entre les éléments présents dans la lumière intestinale et l'organisme, par effet direct ou indirect.

Les effets directs du microbiote intestinal sont :

- la **compétition écologique** entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes opportunistes ou non. Les bactéries commensales utilisent les nutriments et colonisent les sites d'adhésion pour empêcher les bactéries pathogènes de s'implanter et/ou de croître.
- la production de **bactériocines** par les bactéries commensales. Ces toxines protéiques tuent ou inhibent la croissance bactérienne, permettant ainsi de réguler la population commensale ou encore de contrer les bactéries pathogènes. La Ruminococcine A par exemple, produite par la bactérie *Ruminococcus gnavus* est une bactériocine anti-clostridies pathogènes tel que *Clostridium perfringens* (Dabard *et al.*, 2001).
- la transformation des acides biliaires primaires en **acides biliaires secondaires**. Cette transformation permet à l'organisme de résister à la colonisation par des bactéries pathogènes. Grâce à cette activité, *Clostridium scindens* permet d'empêcher l'infection par *Clostridium difficile* (Buffie *et al.*, 2015).

Les effets indirects du microbiote intestinal sont :

- l'aide à la **régulation de la production de mucus**. Le mucus est composé de deux couches. La couche externe est celle en contact avec la lumière intestinale, c'est dans cette couche que l'on retrouve les bactéries. La couche interne est celle en contact avec la muqueuse, elle est très dense et empêche le contact entre les bactéries et la muqueuse. Les bactéries commensales participent au maintien d'un nombre stable de cellules à mucus et de l'épaisseur du mucus.
- la **production de peptides anti-microbiens par les cellules épithéliales**, tels que les défensines, les cathélicidines, les lysozymes et la lipocaline. Par l'action du microbiote, qui stimule les TLR (Toll-Like Receptor), les cellules épithéliales vont produire ces peptides qui participent à la régulation des populations bactériennes dans l'intestin.
- la **sécrétion d'immunoglobuline A (IgA)** par les plasmocytes intra-tissulaires. L'IgA est l'anticorps majoritairement retrouvé à la surface de la muqueuse. Sa sécrétion est induite par le microbiote afin de limiter le contact entre les bactéries et la muqueuse intestinale (Macpherson *et al.*, 2000).
- le **maintien des jonctions serrées**. Elles empêchent le passage de micro-organismes (bons ou mauvais) et ainsi bloquent la translocation bactérienne dans le tissu. Le microbiote régule l'expression des gènes codants pour les protéines des jonctions serrées et participe donc au maintien de la barrière (Ulluwishewa *et al.*, 2011).
- la participation à la **réparation tissulaire**. En absence de microbiote, le renouvellement cellulaire est ralenti. Les mécanismes sous-jacents de cet effet reposent sur la stimulation des TLR qui va entraîner la production de cytokines et de facteurs cicatrisants par le tissu (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

Le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans le **développement, la maturation et la régulation du système immunitaire** local (intestin) et systémique, ainsi que dans le développement des tissus immunitaires intestinaux. Les deux catégories de cellules immunitaires, innées et adaptatives, sont toutes deux régulées par le microbiote.

4.3 Notion de dysbiose du microbiote intestinal

Plusieurs facteurs peuvent influencer la composition et l'équilibre du microbiote. Ils peuvent être endogènes, comme le genre, l'âge, le génotype, le stress psychologique et l'état de santé général de l'individu. Les composants environnementaux engendrent également des fluctuations dans les populations du microbiote. Parmi ces composants, l'alimentation, l'habitat et le mode de vie ainsi que l'apport médicamenteux peuvent modifier le microbiote, de façon temporaire ou permanente. Or la perturbation de cet équilibre, appelée dysbiose, est associée au développement ou à l'aggravation de certaines pathologies.

Trois phénomènes définissent la dysbiose : la diminution des populations commensales/bénéfiques, l'expansion des bactéries pathogènes et la perte de diversité. Ces trois changements semblent intimement liés. En effet, la perte de la diversité microbienne est due à la disparition des bactéries commensales, qui va donc faciliter le développement des bactéries pathogènes opportunistes. Ce déséquilibre du microbiote se traduit par l'apparition de différentes anomalies, comme la diminution de la quantité de butyrate, la dégradation de la couche de mucus,

la diminution de la production d'hydrogène et de méthane, l'augmentation de la production de sulfure d'hydrogène, toxique pour l'épithélium, et la sécrétion de lipopolysaccharides, notamment par le phylum Proteobacteria, participant à l'aggravation de l'inflammation.

La dysbiose intestinale est souvent associée à de nombreuses pathologies, comme les pathologies inflammatoires intestinales (colite ulcéreuse, maladie de Crohn) (Mirsepasi-Lauridsen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020b) ainsi que certains cancers (Koliarakis *et al.*, 2019; Karpiński, 2019).

4.4 *Faecalibacterium*, un genre bactérien au fort potentiel probiotique

Le genre bactérien *Faecalibacterium* est constitué de bactéries **anaérobies strictes** non mobile appartenant aux bactéries Gram-positives d'un point de vue phylogénétique (Figure 17) mais ayant une coloration de Gram négative. L'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii* a été créée en 2002 (Duncan *et al.*, 2002) et a longtemps constitué la seule espèce dans le genre *Faecalibacterium*. Ce n'est que très récemment que la taxonomie de ce genre bactérien a été réévaluée avec la classification de certaines souches dans cinq nouvelles espèces : *F. butyricigenerans*, *F. duncaniae*, *F. gallinarium*, *F. hattori* et *F. longum* (Zou *et al.*, 2021; Sakamoto *et al.*, 2022). Ainsi la souche A2-165, qui a été la plus étudiée, n'est plus une *F. prausnitzii* mais une *F. duncaniae*, ce qui peut prêter à confusion.

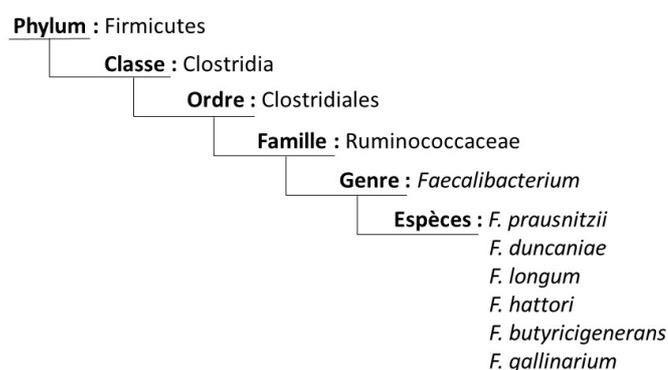


Figure 17. Arbre phylogénétique du genre bactérien *Faecalibacterium*.

Une diminution de la fréquence des phyla Bacteroidetes et Firmicutes et une augmentation des Proteobacteria et des Actinobacteria ont été observées dans le microbiote fécal des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (Frank *et al.*, 2007). En particulier, *Faecalibacterium*, membre du phylum des Firmicutes est décrit comme **sous-représenté dans le microbiote de patients atteints de maladies inflammatoires chronique de l'intestin (MICI)**, du syndrome du côlon irritable, du cancer colorectal ou de l'obésité (Sokol *et al.*, 2008; Sokol *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2013; Magne *et al.*, 2020). Cependant, les souches présentes et leur proportion varient suivant la géographie, l'âge ou la maladie. Chez les patients atteints de MICI, plus que le nombre, c'est la diversité de *Faecalibacterium* qui semble diminuée (De Filippis *et al.*, 2020).

Ce genre bactérien est retrouvé chez l'humain, majoritairement en **forte abondance dans le côlon**. Il représente approximativement 5 % du microbiote fécal total chez l'humain sain (Hold *et al.*, 2003). La population de *Faecalibacterium* atteint celle de l'âge adulte vers l'âge de 2 ans (Koga *et al.*, 2016).

Ce genre bactérien est perçu comme un **biocapteur et acteur majeur de la santé intestinale** humaine (Miquel *et al.*, 2013). En effet, les souches de *Faecalibacterium* jouent un rôle important dans la production de butyrate ainsi que dans la synthèse de molécules anti-inflammatoires (MAM) :

- le **butyrate**. L'efficacité thérapeutique des *Faecalibacterium* a, dans un premier temps, été reliée à la production de butyrate en grande quantité dans l'intestin (Arpaia *et al.*, 2013). Cependant, il faut noter que toutes les souches isolées de *Faecalibacterium* n'ont pas la même capacité de production du butyrate. La souche A2-165 produit 4 fois plus de butyrate que la souche L2-6 en conditions de culture anaérobie en tubes Hungate (Barcenilla *et al.*, 2000). De même, l'expression du gène codant l'enzyme butyrylCoA:acetate CoA-transferase est 5 fois plus efficace dans A2-165 que dans L2-6 dans un système d'expression chez *Escherichia coli* (Song *et al.*, 2016).
- la **protéine MAM**. Quévrain et al. ont identifié en 2016 une protéine anti-inflammatoire sécrétée par *Faecalibacterium* A2-165 (Quévrain *et al.*, 2016a). Cette protéine de 15 kDa, nommée MAM (Microbial Anti-inflammatory Molecule) est capable d'inhiber la voie de signalisation NF- κ B. Sa suractivation induit une forte réponse inflammatoire, illustrée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Quévrain et al., en transfectant des cellules HT29 avec la MAM, ont démontré *in vitro* la capacité de cette molécule à bloquer l'activation de la voie NF- κ B. De plus, l'administration *in vivo* dans un modèle murin de colite au TNBS d'une bactérie lactique transfectée avec la MAM induit une diminution des lésions coliques, une augmentation du poids et une diminution des cytokines IFN γ et IL-17 dans le côlon.

L'administration de la souche *Faecalibacterium* A2-165 dans des modèles murins de MICI a permis d'améliorer différentes fonctions altérées dans ces pathologies, telles que la barrière intestinale, les lésions du tissu épithélial et l'inflammation (Sokol *et al.*, 2008; Carlsson *et al.*, 2013; Laval *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). D'autre part, des résultats démontrent une capacité de *Faecalibacterium* A2-165 à rétablir un microbiote sain dans un contexte d'inflammation colique. Cet effet modulateur peut être associé à la capacité métabolique de cette souche. En effet, le cross-feeding, ou alimentation croisée, est une caractéristique importante dans un microbiote sain. Les bactéries commensales produisent des métabolites pouvant faciliter la croissance d'autres bactéries bénéfiques pour la santé, qui vont elles-mêmes pouvoir produire des molécules actives pour le maintien de l'homéostasie intestinale. *Faecalibacterium* A2-165 est capable d'interagir avec *Bifidobacterium adolescentis* (Rios-Covian *et al.*, 2015) et *Bacteroides thetaiotaomicron* (Wrzosek *et al.*, 2013) par voie métabolique pour préserver un épithélium intestinal équilibré. Une étude *in vitro* a démontré des interactions métaboliques existantes entre trois souches commensales fécales humaines : *Faecalibacterium* A2-165, *Roseburia intestinalis* et *Blautia hydrogenotrophica* (D'hoë *et al.*, 2018).

Dans ce contexte, depuis plus de 10 ans, l'équipe ProbiHôte étudie le genre bactérien *Faecalibacterium* dont certaines souches sont considérées comme **probiotiques de prochaine génération**.

4.5 Projet 1 : Etude de la diversité et de la fonction des protéines MAM

4.5.1 Contexte

La phylogénie des souches appartenant au genre *Faecalibacterium* est en constante évolution. Des analyses de génomes reconstruits à partir de métagénomes intestinaux humains ont mis en évidence la très grande diversité des souches de *Faecalibacterium* (De Filippis *et al.*, 2020). Il apparaît clairement qu'il existe de nombreuses espèces au sein du genre *Faecalibacterium*. Elles pourraient avoir des fonctions et des contributions différentes dans la santé digestive.

Les protéines MAM sont uniquement présentes dans le genre *Faecalibacterium*. La diversité importante des souches soulève de nombreuses questions : (1) **quelle est la diversité des protéines MAM et leurs liens évolutifs ?**; (2) **quelles sont la/les fonction(s) des protéines MAM dans la physiologie des souches de *Faecalibacterium* au sein de l'écosystème digestif ?** C'est ce que nous souhaitons explorer dans ce projet que j'ai intégré en apportant mes compétences en bioinformatique et en physiologie bactérienne.

4.5.2 Résultats

Analyse du contexte génétique des gènes *mam*

J'ai d'abord exploré les contextes génétiques des gènes codant pour les MAM, nommés ici *mam*, au sein de souches représentatives du genre *Faecalibacterium* (Figure 18).

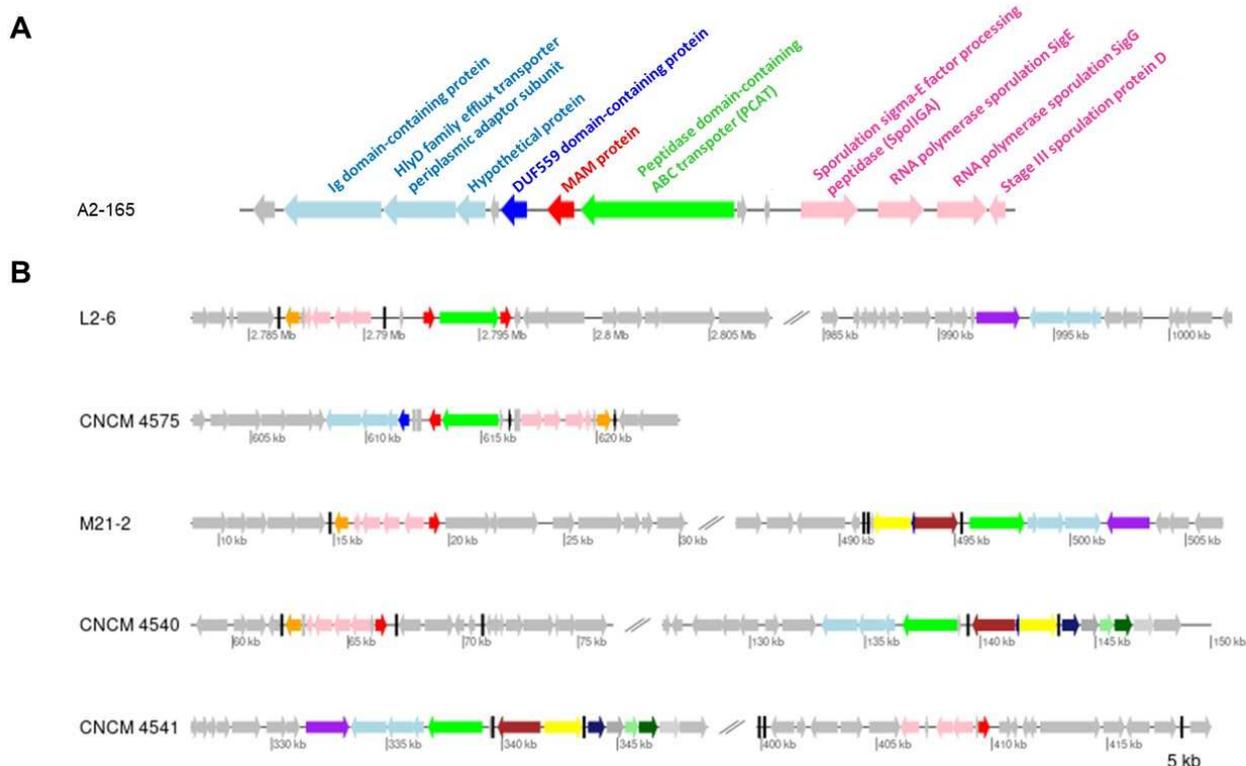


Figure 18. Organisation génétique des régions portant les gènes *mam* dans différentes souches. Les gènes sont indiqués par des flèches indiquant le sens de leur transcription. (A) Organisation dans la souche dite de référence A2-165. Les fonctions putatives des gènes sont indiquées (B) Comparaison de l'organisation génétique dans plusieurs souches.

Dans le génome de la souche A2-165, *mam* est flanqué d'un gène en amont codant une protéine contenant un domaine DUF559 et d'un gène en aval codant pour un peptidase-ABC transporteur (PCAT) (Figure 18A). La région amont comprend également un groupe de gènes codant pour 3 protéines hypothétiques présentant des similarités avec le domaine protéique Ig ou avec la famille des protéines périplasmiques HlyD. De plus, le voisinage de *mam* contient quatre gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans le processus de sporulation.

L'analyse de cette région dans plusieurs souches révèle **de nombreux réarrangements chromosomiques** (Figure 18B). Le génome L2-6 contient deux gènes *mam* qui sont peut-être issu d'un événement de duplication. Une caractéristique remarquable est le **groupe de gènes liés à la sporulation**, qui est localisé à proximité du gène *mam* dans tous les génomes de *F. prausnitzii*. Jusqu'à présent, la capacité de *F. prausnitzii* à sporuler reste une énigme. De plus, nous observons que **le gène *mam* peut être associé à un gène codant un ABC transporteur contenant un domaine caractéristique de la peptidase C39 (PCAT)**. La famille des protéases à cystéine C39 est connue pour cliver le motif « double glycine » présent dans la séquence signal de protéines à exporter. Je reviendrai sur la fonction putative de ce transporteur dans la section « perspectives ».

Classification des protéines MAM

J'ai ensuite utilisé le programme CLuster ANalysis of Sequences (CLANS) (Frickey and Lupas, 2004) sur les 108 séquences disponibles de MAM. CLANS exécute des BLAST des séquences, toutes les unes contre les autres, et les regroupe en 3 dimensions en fonction de leur similarité. Il en ressort 10 familles (ou clans) de protéines MAM (Figure 19). Certaines contiennent très peu de séquences, ce qui indique qu'elles sont sous-représentées dans les bases de données.

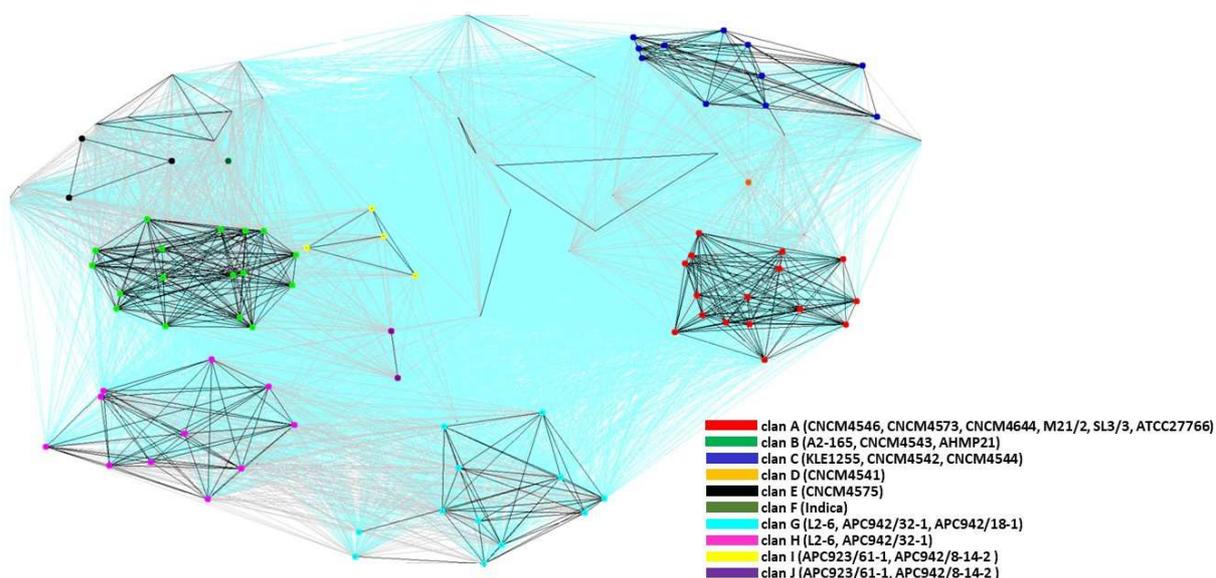


Figure 19. Représentation en 2D des différents groupes de protéines MAM.

Les 108 protéines MAM ont été classifiées avec l'outil CLANS. CLANS utilise BLAST sur les séquences en comparant les séquences 2 à 2. Les séquences sont regroupées dans des familles (appelées clans) dans une représentation en 3 dimensions. Pour cette figure, une représentation en 2D a été effectuée de façon aléatoire. Pour chaque clan, certains noms de souches bien identifiées sont indiqués en parenthèse dans la légende. Les connexions avec une P-value > à 1E-22 sont en bleu, avec une P-value entre 1E-22 et 1E-33 sont en gris, avec une P-value < à 1E-33 sont en noir.

Trois clans A, B et C contiennent des MAM des groupes phylogéniques A, B et C, respectivement. La MAM de la souche AHMP21 a été détectée au sein du clan B alors que cette souche appartient à un phylogroupe distinct (Benevides *et al.*, 2017; Fitzgerald *et al.*, 2018). En revanche, CLANS révèle la MAM de la souche Indica comme un clan distinct, alors que cette souche appartient au groupe phylogénique B. La MAM de la souche CNCM4541 constitue un clan distinct, de même cette souche forme un phylogroupe distinct. Fait intéressant, certaines souches contiennent deux gènes *mam* (souche L2-6) (Figure 18). Les deux protéines MAM résultantes se regroupent en deux clans bien définis (clans G et H) avec un lien évolutif, comme indiqué par les positions relatives de ces clans. Le même constat est observé pour les souches APC923/61-1 et APC942/8-14-2, dont les deux MAM appartiennent respectivement aux clans I et J. Cela suggère que dans les souches contenant deux gènes *mam*, la duplication du gène *mam* est suivie d'une spéciation.

Analyse phylogénique de la famille des protéines MAM

Afin de mieux comprendre les liens évolutifs entre ces protéines, j'ai ensuite procédé à une analyse phylogénétique de la famille MAM en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) (Jones *et al.*, 1992). Les analyses ont été faites sous MEGA X avec 500 réplicats itératifs (Kumar *et al.*, 2018). L'arbre résultant illustre une diversité évolutive des protéines MAM (Figure 20). Il montre une séparation claire des protéines MAM en plusieurs lignées bien séparées (bootstrap > 95). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par CLANS (Figure 19). La séquence MAM de la souche Indica forme une lignée distincte, avec un lien évolutif avec les lignées B et E. Concernant les souches contenant deux gènes *mam*, les MAM de L2-6 et APC942/32-1 appartiennent à la même branche mais forment deux clades distants G et H (bootstrap = 92). Les protéines MAM des souches APC923/61-1 et APC942/8-14-2 forment également deux clades I et J (bootstrap = 97) de la même branche.

box » typique des promoteurs reconnus par le facteur de transcription σ^A de l'ARN polymérase pour l'initiation de la transcription.

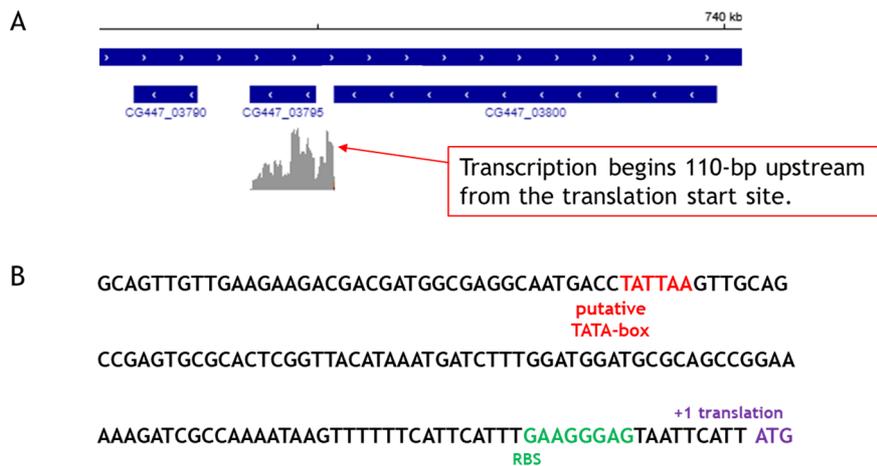


Figure 22. Identification de la région promotrice du gène *mam* dans la souche *F. praunsitzii* A2-165. (A) les séquences issues de données RNAseq (Illumina MiSeq) ont été mappées sur le génome de la souche A2-165 et visualisée avec Integrative Genomics Viewer (IGV). Cela a permis d'identifier que le +1 de transcription commence environ 110 pb en amont du +1 de traduction. (B) Séquence de la région promotrice du gène *mam* qui contient un site de fixation des ribosomes (séquence Shine-Dalgarno) et une boîte TATA de reconnaissance du facteur σ^A .

J'ai ensuite exploré l'expression du gène *mam* dans les jeux de données de RNAseq : de façon remarquable, **le gène *mam* est le gène le plus exprimé chez la souche A2-165** que ce soit en phase exponentielle ou entrée en phase stationnaire, en milieu de culture très riche (de type BHI) ou en milieu semi-défini, en culture en tubes (dans une chambre anaérobie) ou en fermenteurs. Ce résultat soulève de nombreuses questions quant à la fonction des protéines MAM.

4.5.3 Perspectives

Notre but est de comprendre le rôle putatif du transporteur PCAT dans la maturation et le transport des MAM ainsi que le/les rôle(s) fonctionnel(s) des MAM dans la physiologie des souches de *Faecalibacterium* au sein de l'écosystème digestif.

Plusieurs peptides dérivés de la MAM sans la partie N-terminale ont été détectés dans le surnageant de la souche A2-165 (Quévrain *et al.*, 2016a). De fait, toutes les protéines MAM partagent une séquence consensus dans la partie N-terminale et un site avec deux résidus glycine conservés aux positions 20 et 21 (Figure 23). Nous spéculons que cela correspond à une séquence signal d'adressage de la protéine afin d'être sécrétée.

En revanche, les séquences des MAM sont assez divergentes dans la partie C terminale, mise à part quelques acides aminés conservés.

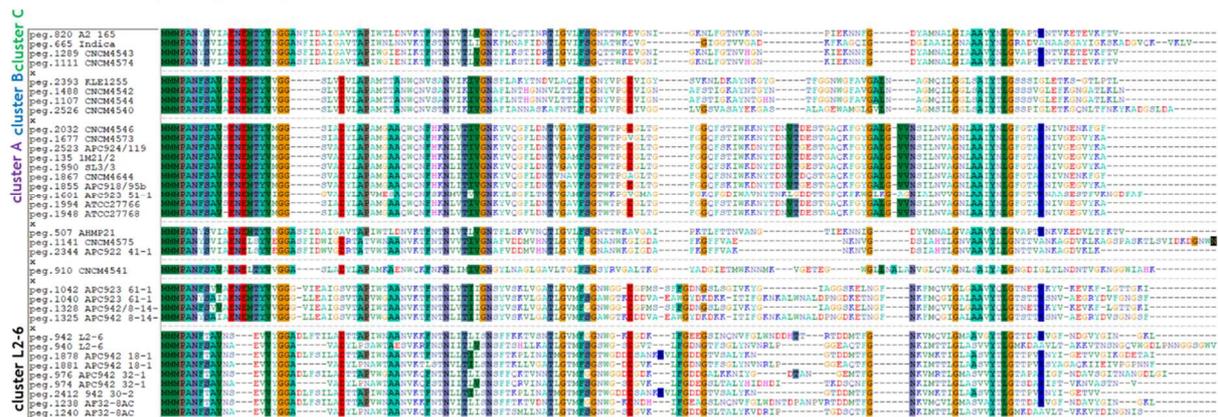


Figure 23. Alignement des séquences des protéines MAM présentes dans des souches de *F. prausnitzii* appartenant à différents phylogroupes. Les protéines MAM ont une taille entre 130 et 140 acides aminés. Elles présentent toutes une séquence de 20 acides aminés en Nt très conservée. Les résidus double glycine localisés vers la position 20 sont présents dans toutes les MAM.

Il est tentant de spéculer que le transporteur PCAT est impliqué dans le clivage et la translocation des protéines MAM à travers la membrane cytoplasmique vers l'espace extracellulaire. Dans l'équipe ProbiHôte, nous avons identifié que **des peptides issus des MAM sans la partie Nter sont retrouvés dans le surnageant d'une dizaine de souches de *Faecalibacterium*** (résultats non publiés).

Les transporteurs de type PCAT jouent un rôle clé dans les interactions des bactéries les uns avec les autres. La fonction la plus courante des PCAT est de participer à la biosynthèse de peptides antimicrobiens (bactériocines) produits par les bactéries pour tuer ou inhiber la prolifération d'autres bactéries, généralement étroitement apparentées (Håvarstein *et al.*, 1995; Chikindas *et al.*, 2018). Certains PCAT favorisent également la communication de cellule à cellule en sécrétant des phéromones peptidiques dans les systèmes de détection du quorum (« quorum sensing ») chez les Gram positifs (Wang *et al.*, 2020a).

➤ Etude du rôle du peptidase ABC transporteur

Les manipulations génétiques ne sont pas encore possibles chez *Faecalibacterium*. Notre approche sera de tester le rôle de ce transporteur dans la sécrétion de la MAM (souche A2-165) chez un hôte hétérologue tel que *Lactococcus lactis*.

➤ Etude du rôle des protéines MAM

Nous avons pour but de purifier la protéine MAM de la souche A2-165. Cela nous permettra de tester l'activité anti-inflammatoire de la protéine purifiée *in vitro* sur la voie NF-κB. Nous testerons aussi son potentiel activateur ou inhibiteur de croissance sur différentes souches *Faecalibacterium* et d'autres espèces bactériennes. Cela nous permettra de comprendre si elle est impliquée dans un mécanisme antibactérien afin d'accroître la compétitivité de la souche A2-165. D'autre part, nous pouvons espérer que la purification de la protéine MAM nous permette d'élucider sa structure tertiaire par cristallographie au rayon X.

4.6 Projet 2 : Exploration des réseaux de co-expression génique chez la souche A2-165 avec WGCNA dans R-Shiny

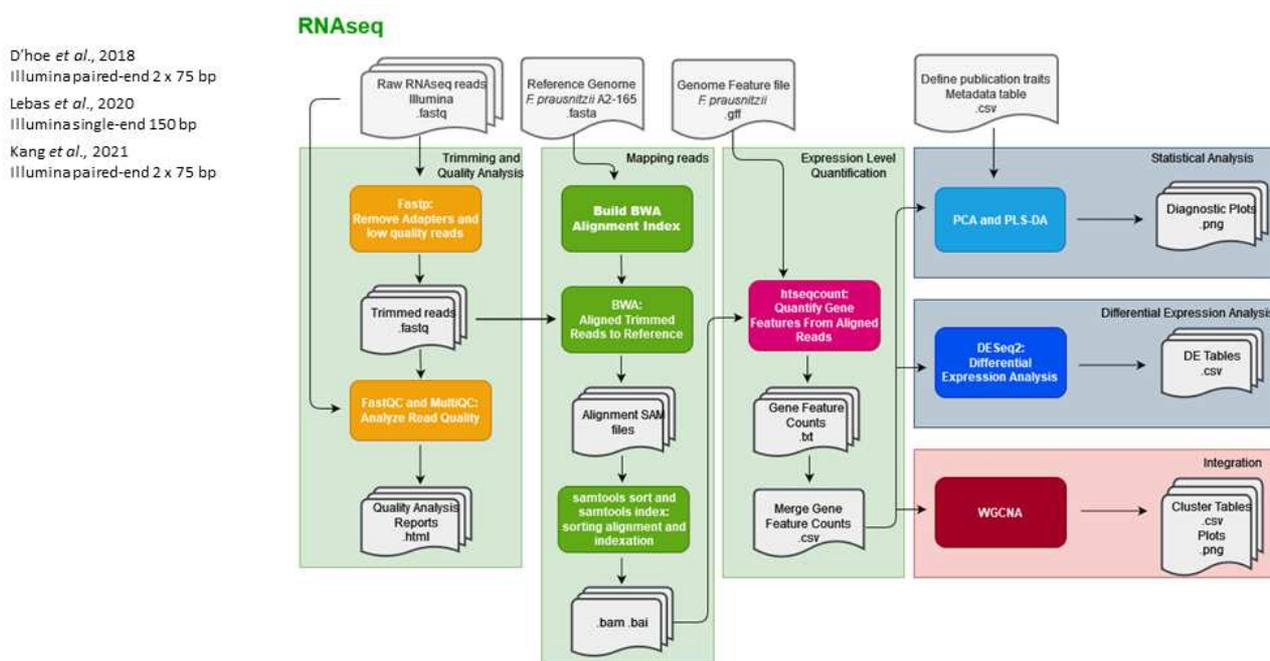
4.6.1 Contexte

Malgré l'importance des souches de *Faecalibacterium* dans l'intestin, rien n'est connu sur la régulation génétique impliquée dans d'importants processus tels que la colonisation intestinale, la détection du quorum ou les réponses aux stress (sels biliaires, pH acide, stress oxydant). Afin de comprendre les interactions et le comportement des bactéries au sein de l'intestin, il importe de considérer chaque bactérie individuelle comme un système biologique, qui répond aux perturbations environnementales à travers des réseaux complexes d'interactions géniques.

J'ai développé ce projet afin d'obtenir des premières informations sur les réseaux de régulation dans la souche A2-165 pour lesquelles quelques données de transcriptomique ont été publiées. J'ai mené ce travail en collaboration avec Virginie Mournetas (ADLIN Science, Evry) ainsi qu'avec H. Chiapello et V. Loux (Unité MaIAGE, INRAE).

4.6.2 Résultats

Les données brutes issues de trois études transcriptomiques de la souche A2-165 - publiées et disponibles - ont été pré-taillées de façon similaire (Figure 24). Ces données de RNAseq ont été obtenues dans des différentes conditions de croissance (D'hoë et al., 2018 ; Lebas et al., 2020 ; Kang et al., 2021). Nous avons utilisé une approche de biologie des systèmes, qui est l'analyse de réseau de co-expression génique pondérée (**Weighted Correlation Network Analysis, WGCNA**). Il en résulte un réseau de co-expression qui a été subdivisé en 24 modules de gènes co-exprimés (Figure 25).



Flow chart of data preparation, processing, and analysis.

Figure 24. Flux des analyses bioinformatiques afin d'analyser des données de RNAseq. Les outils utilisés sont hébergés sur la plateforme Migale (INRAE, Jouy-en-Josas).

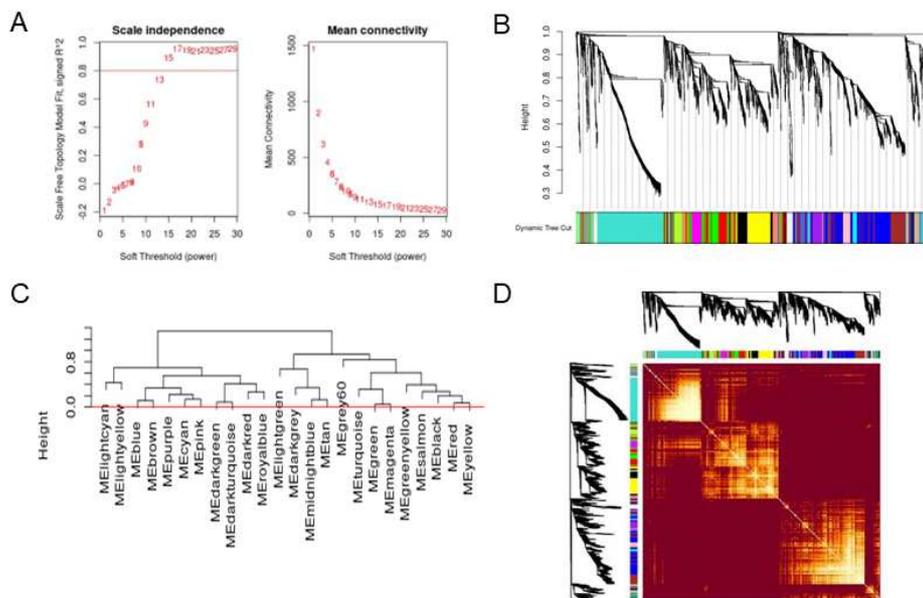


Figure 25. Construction de réseaux et détection de modules avec WGCNA. (A) Analyse de la topologie du réseau pour différentes valeurs de puissances à seuil « souple », avec l'indice sans échelle et la connectivité moyenne en fonction de la puissance du seuil « souple ». (B) Dendrogramme de tous les gènes regroupés en 24 modules. (C) Dendrogramme représentant les 24 modules identifiés par WGCNA. La coupe de hauteur (ligne rouge, coupe de hauteur = 0,0) a été utilisée pour dissocier les modules. Le module gris représente les gènes qui ne sont inclus dans aucun des autres modules. (D) « Heatmap » représentant la matrice de chevauchement topologique (TOM) parmi tous les gènes de l'analyse. L'intensité de la couleur rouge indique la force de la corrélation entre toutes les paires de gènes.

Une analyse d'enrichissement a révélé que ces modules sont associés à différents types de processus biologiques, tels que le métabolisme de l'arginine, de l'histidine, de la cobalamine ou des acides gras; les bactériophages; les chaperons moléculaires; la réponse aux stress ou la réponse SOS. Certains gènes semblent être associés à des mécanismes de protection contre le stress oxydant et pourraient être essentiels à l'adaptation et à la survie de *Faecalibacterium* A2-165 dans les conditions de culture utilisées.

Nous avons cherché à identifier des gènes « hub » et « bottleneck » : cela a mis en évidence la forte connectivité entre 25 gènes qui appartiennent à six **éléments génétiques mobiles** (MGE) et à un élément porteur de gènes de prophage. Cela soulève des questions sur l'existence d'un mode de régulation et/ou d'induction commun à ces éléments. D'autre part, ces MGE contiennent des gènes potentiellement impliqués dans la conjugaison bactérienne. A notre connaissance, aucun système de conjugaison n'a été décrit chez *Faecalibacterium* et aucun plasmide endogène n'a été isolé dans les souches séquencées. L'absence de plasmides conjuguatifs mais la présence de nombreux gènes liés à la conjugaison suggère la présence d'éléments intégratifs et conjuguatifs (ICE) chez *Faecalibacterium* A2-165.

Les conditions dans l'intestin, caractérisées par des concentrations extrêmement élevées de cellules microbiennes et de phages, représentent l'une des niches écologiques les plus favorables à l'échange horizontal de gènes. Le microbiote intestinal répond à la pression sélective par la restructuration génétique des populations intestinales, principalement via l'échange horizontal de

gènes (Lerner *et al.*, 2017; Groussin *et al.*, 2021) Récemment, il a été montré que les ICE jouent un rôle important dans l'adaptation de *Streptococcus salivarius* aux environnements humains oraux, pharyngés et intestinaux (Lao *et al.*, 2020). En effet, les ICE codent pour de nombreuses fonctions telles que la résistance au stress ou aux antibiotiques et de nombreuses enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour comprendre le ou les rôles joués par les MGE dans l'évolution des génomes chez *Faecalibacterium*, leur influence sur la réponse dynamique à la pression sélective (effets des antibiotiques, de l'inflammation intestinale) et les conséquences pour la santé de l'hôte.

Cette étude fournit la première exploration des réseaux de régulation complexes chez une souche de *Faecalibacterium*. Dans un esprit de **Science Ouverte**, toutes les données omiques sont disponibles en ligne pour une **exploration via une interface graphique** à <https://faeprou.omics.ovh/>. Les codes sont déposés et partagés sur **GitHub**. Le manuscrit est soumis pour publication et disponible sur **bioRxiv** : Auger, S., Mournetas, V., Chiapello, H., Loux, V., Langella, P., Chatel, JM. Gene co-expression network analysis of the human gut commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* based on WGCNA in R-Shiny.

4.7 Projet 3 : Recherche de petites protéines impliquées dans les relations bactéries-bactéries et bactéries-hôtes.

4.7.1 Contexte

A l'heure actuelle, différentes voies de modulation du microbiote intestinal sont proposées via l'alimentation ou l'ingestion de probiotiques de façon préventive ou comme option thérapeutique. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent méconnus. Se pose alors une question essentielle : **comment modifier et contrôler l'holobionte formé par l'hôte et son microbiote intestinal si nous ne connaissons pas les mécanismes régissant son équilibre et sa stabilité ?** Il apparaît très important de comprendre l'interface entre les cellules humaines et le microbiote : **comment communiquent-ils ? comment les souches bactériennes sont-elles en compétition entre elles ? comment communiquent-elles pour s'implanter dans une niche écologique ?**

Parmi les molécules produites par les bactéries se trouvent les **petites protéines** dont la taille est inférieure à 60 acides aminés. Les petites protéines sont présentes dans tous les domaines de la vie et jouent des **rôles clés dans de nombreux processus physiologiques et adaptatifs**. Chez les bactéries, elles peuvent être impliqués dans le repliement des protéines, la régulation de l'expression des gènes, la transduction du signal, le transport, la division cellulaire, la modification des protéines, la virulence et la sporulation (Figure 26) (Hobbs *et al.*, 2011; Storz *et al.*, 2014; Kemp and Cymer, 2014; Duval and Cossart, 2017). Fait intéressant, les petites protéines sécrétées peuvent être impliqués dans la communication avec l'hôte, avoir des effets antibactériens pour éliminer les autres-organismes et accroître la compétitivité, ou constituer des signaux de coordination permettant l'action concertée d'un groupe d'individus afin de coloniser un environnement. De plus, les bactériophages produisent également de petites protéines pour influencer les décisions de lysogénie/lyse (Duval and Cossart, 2017). Ainsi les petites protéines jouent le rôle de commutateurs

biologiques pour basculer entre des états fonctionnels ou pour déclencher des réactions spécifiques dans d'autres cellules. Cependant, relativement peu de petites protéines ont déjà été caractérisées. Leurs rôles dans le maintien, l'évolution du microbiote intestinal et les interactions avec l'hôte sont encore très mal connus.

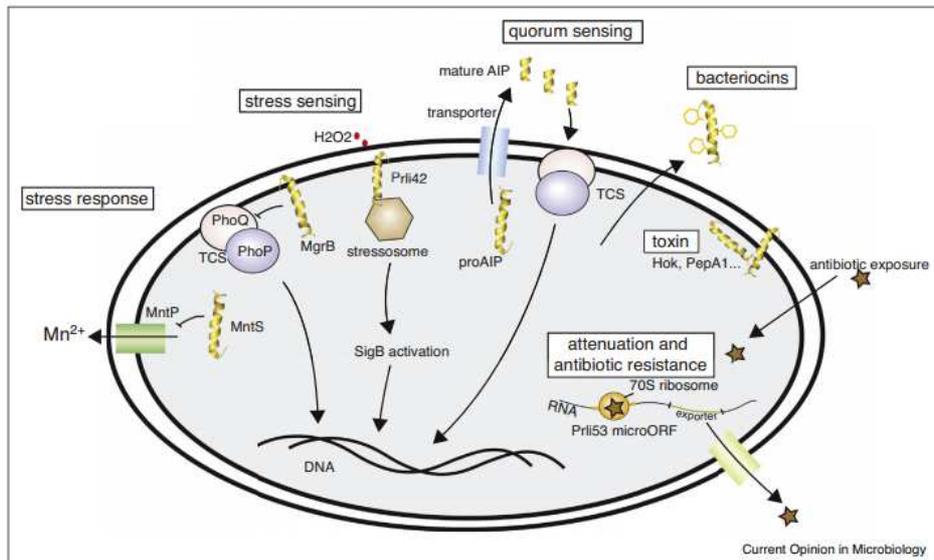


Figure 26. Rôles connus des petites protéines bactériennes. Les petites protéines qui ne sont pas sécrétées restent dans le cytoplasme ou en interaction avec la membrane bactérienne. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tel que dans la détection de stress (Prli42), la réponse au stress (MgrB, MntS), les systèmes toxine/antitoxine (PepA1), des mécanismes d'atténuation (Prli53). Les petites protéines sécrétées servent de signaux impliqués dans la détection du quorum (AutoInducer Peptides, AIP) ou de bactériocines. Les petites protéines sont indiquées en jaune. TCS: two-component system. D'après Duval et Cossart, 2017.

Les petites protéines, historiquement définies comme des protéines de 50 acides aminés ou moins, ont longtemps été négligées en raison de limitations expérimentales et bioinformatiques. En effet, les expériences biochimiques standard utilisent des méthodes qui ne détectent pas les petites protéines de taille inférieure à 5 kD. Les algorithmes d'annotation des génomes utilisent couramment une coupure arbitraire de 100 codons minimum pour les cadres de lecture ouvert (ORF). Cela permet de distinguer les ORF codant réellement pour des protéines des nombreux arrangements aléatoires dans le cadre de codons de démarrage et d'arrêt de la traduction (Tatusova *et al.*, 2016). Au cours des dernières années, diverses tentatives ont été utilisées pour résoudre ces problèmes par des approches systématiques, notamment des techniques expérimentales telles que le profilage des ribosomes et la spectrométrie de masse pour détecter les petites protéines ainsi que des approches informatiques pour une prédiction plus fiable et une annotation complète des petites ORF (Crappé *et al.*, 2013; Omasits *et al.*, 2017; Miravet-Verde *et al.*, 2019; Orr *et al.*, 2020; Petruschke *et al.*, 2020; Fuchs *et al.*, 2021).

Récemment, une vaste étude du métagénome du microbiome humain a révélé qu'il abrite plus de 4000 familles de petites protéines conservées, dont la majorité sont nouvelles, soulignant l'importance d'étudier les petites protéines pour comprendre les interactions hôte-microbiome

(Sberro *et al.*, 2019). L'étude des peptides du microbiote et le développement d'outils prédictifs basés sur le machine learning sont actuellement en plein essor (Miravet-Verde *et al.*, 2019; Sberro *et al.*, 2019; Cerqueira and Vasconcelos, 2020).

Le projet que je développe repose sur un réseau interdisciplinaire entre bioinformatique prédictive, bioinformatique structurale, microbiologie et peptidomique (Figure 27). Afin de commencer ce projet, j'ai obtenu un premier **financement de département MICA** d'INRAE (15 000 euros) en janvier 2022.

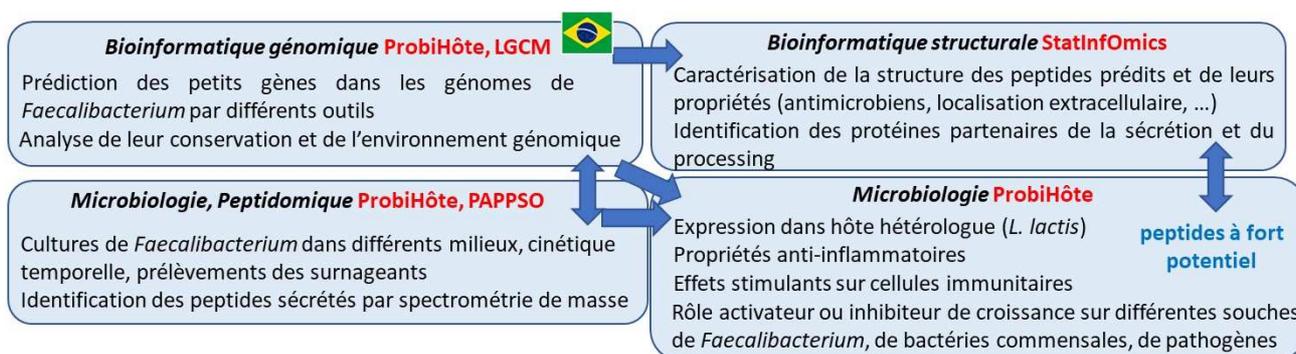


Figure 27. Démarches d'identification et de caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées par *Faecalibacterium*.

4.7.2 Résultats préliminaires

De nombreux facteurs sont connus pour affecter la composition statistique des séquences d'ADN chromosomique, tels que les contraintes liées aux propriétés de codage, les transferts de gènes et les biais statistiques liés à la réplication. Le transfert horizontal de gènes entre espèces bactériennes, souvent dû à des éléments mobiles, est connu comme jouant un rôle important dans l'acquisition de traits adaptatifs, tels que la pathogénicité et la résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds. Le transfert horizontal est considéré comme un moteur de l'évolution bactérienne. Les bactéries sont connues pour intégrer des prophages et pour avoir d'autres moyens d'intégrer des séquences d'ADN étrangers. Ces transferts peuvent correspondre à des segments d'ADN, qui ont des propriétés statistiques différentes de celles de l'hôte.

Les modèles de Markov cachés (HMM) sont des outils statistiques pour l'analyse de cette hétérogénéité. Dans ces modèles, on suppose qu'une séquence d'ADN est constituée de segments successifs, chacun appartenant à l'un d'un nombre fini q de types. Chaque type de segment est caractérisé par sa propre composition statistique en nucléotides, et la succession de types le long de la séquence est représentée par une chaîne de Markov à l'état q inobservable (la chaîne cachée). L'objectif est d'abord de reconstruire ces segments à partir de la séquence d'ADN, et de caractériser les types de segments identifiés, puis de trouver des corrélations entre les types de segments et les caractéristiques biologiques de l'ADN.

Afin de prédire la présence de gènes codant des petites protéines chez *Faecalibacterium*, j'ai tout d'abord utilisé l'outil de prédiction BactGeneSHOW qui se base sur les HMM. J'ai appliqué à 25 génomes disponibles de *Faecalibacterium* (génomes d'environ 2,9 Mb) le programme

BactGeneSHOW afin d'identifier des petits gènes codant des protéines dont la taille est inférieure à 60 acides aminés. Il en est ressorti environ 600 petits gènes prédits par génome analysé.

Dans un deuxième temps, j'ai utilisé l'outil **SmORFinder** qui combine le **profil HMM et des algorithmes d'apprentissage automatique** pour identifier les petites ORF (Sberro et al., 2019 ; Durrant and Bhatt, 2020). Ces modèles d'apprentissage profond ont notamment « appris » à identifier les séquences de Shine-Dalgarno et à déprioriser la flexibilité (ou wobble) à la position 3 dans chaque codon. Ce travail a été effectué en collaboration avec Marcus Vinicius Canário Viana (post-doctorant, LGCM, Université Fédérale du Minas Gerais, Brésil). Ainsi, nous avons identifié une trentaine de petites ORFs par génome analysé. A partir des données de RNAseq disponibles pour la souche A2-165 (Figure 24), j'ai observé que 30% des petits gènes sont localisés dans des régions transcrites, ce qui laisse supposer qu'ils pourraient aussi être traduits.

Une étude détaillée de la fonction potentielle des protéines codées par les petites ORF m'a permis de mettre en évidence des petites protéines qui seraient impliquées dans la détection du quorum ou ayant des activités antibactériennes.

4.7.3 Perspectives

L'un de mes objectifs est de **valider expérimentalement** l'existence de certaines petites protéines potentiellement sécrétées. Pour cela, nous chercherons à identifier les peptides sécrétés par plusieurs souches de *Faecalibacterium* cultivées dans différentes conditions de croissance. L'identification des petites protéines se fera par spectrométrie de masse en collaboration avec Céline Henri (plateforme PAPPSO, Micalis, INRAE). Les résultats expérimentaux permettront de valider les prédictions issues de SmORFinder. D'autre part, je me concentre sur l'étude de plusieurs **petites protéines qui ont un fort potentiel antimicrobien**. Il s'agit notamment de tester leurs activités sur d'autres bactéries commensales et des pathogènes.

Par la suite, des outils de **bioinformatique structurale** permettront de **caractériser certaines petites protéines prédites** et la présence éventuelle de signal d'export (Gwenaëlle André-Leroux, StatInfOmics INRAE).

4.8 Projet 4 : Etude de la réponse au stress oxydant chez *Faecalibacterium*

4.8.1 Contexte

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 d'oxygène (ROS), espèces réactives du nitrogène (NOS) sont modifiées ce qui pourrait conduire à cette dysbiose (Gîlcă-Blanariu *et al.*, 2018). Toutes les bactéries n'ont pas la même capacité d'adaptation. Certaines bactéries disparaîtront tandis que d'autres profiteront des nouvelles conditions de croissance. Il est important de comprendre comment les bactéries commensales intestinales s'adaptent à ces changements majeurs afin de mieux comprendre le rôle du microbiote dans la pathologie.

Peu de recherches ont été menées sur la toxicité de l'oxygène chez les bactéries commensales. Dans le cas de la souche *Faecalibacterium* A2-165, cette bactérie est extrêmement

sensible à l'oxygène mais elle peut être maintenue en vie jusqu'à 24 heures à l'air ambiant en présence d'antioxydants tels que riboflavine plus cystéine (Khan *et al.*, 2014). En effet, il a été montré qu'un **mécanisme de transfert extracellulaire d'électrons** par A2-165 permettrait sa survie dans un environnement oxygéné en présence de molécules médiatrices du potentiel redox. Ainsi en présence d'oxygène, 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'oxygène (Figure 28) (Khan *et al.*, 2012).

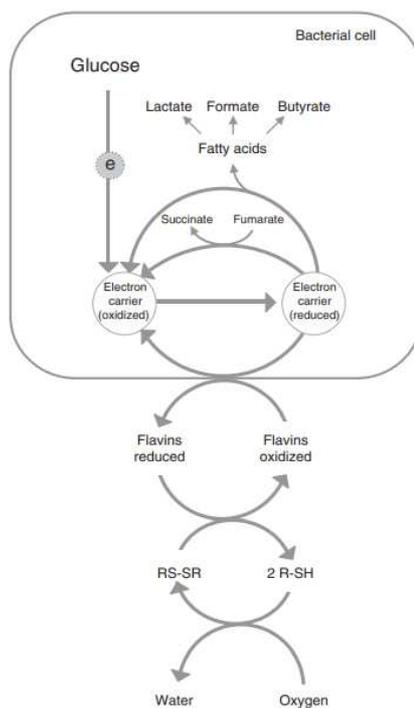


Figure 28. Illustration du transfert d'électrons extracellulaire par les flavines et les thiols chez *F. prausnitzii*. L'accepteur final d'électrons est l'oxygène présent dans le milieu. D'après Khan *et al.*, 2012.

En absence d'oxygène, le NADH réduit est utilisé dans la production de butyrate, de lactate et de formate afin de régénérer du NAD (Figure 29). Ainsi, dans la souche A2-165, une diminution de la production de butyrate est observée en conditions oxygénées. Au final cela révèle une adaptation du métabolisme. Il est proposé le modèle suivant :

- en absence totale d'oxygène : un métabolisme fermentaire. *Faecalibacterium* A2-165 métabolise le glucose en acétate, CO₂ et électrons, qui sont utilisés dans la production d'acides gras à chaîne courtes tel que le butyrate.
- en présence de traces d'oxygène : une « respiration aérobie » se met en place, impliquant un système redox flavine-cystéine.

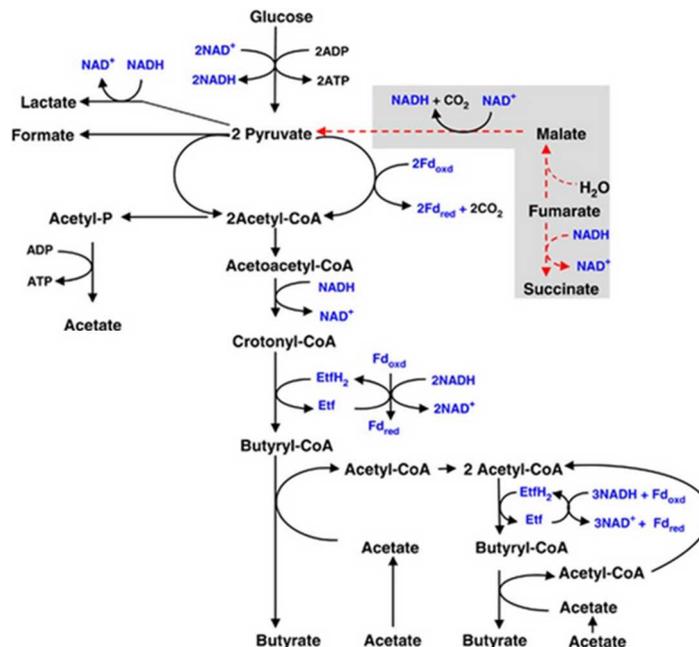


Figure 29. Voies métaboliques présumées impliquées dans la production de butyrate, d'acétate, de lactate et de formate en condition d'anaérobie chez la souche A2-165. Cette figure illustre la consommation de l'acétate et le cycle général de transfert des électrons, en bleu. Une voie alternative d'utilisation du fumarate comme accepteur final d'électrons et comme source de carbone est indiquée dans l'encadré gris. Cette voie aboutit à la production de succinate. D'après 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 de *Faecalibacterium* 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 intestinale 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 (Seril et al., 2003; Aw, 2003).

Jusqu'à présent, peu d'études ont porté sur l'effet du stress oxydant chez les bactéries anaérobies commensales. La réponse au stress oxydant a davantage été étudié 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'oxygène et à certains désinfectants comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les cellules végétatives sont aussi exposées à la faible tension en O_2 du tube digestif et aux différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS). La survie et la croissance de *C. difficile* en présence de faibles concentrations d' O_2 sont possibles grâce à des enzymes permettant la détoxification de l' O_2 et de l' H_2O_2 (Figure 30A). 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' O_2 en H_2O (Figure 30B) (Martins et al., 2019). Les rubrerythrine (Rbr) et reverse rubrerythrine (revRbr) sont une autre famille d'enzyme capable de convertir l' O_2 et le H_2O_2 en H_2O . 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 30B) (Kint *et al.*, 2022). La superoxyde reductase (SOR), permet de détoxifier des anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en H_2O_2 via leur domaine superoxyde reductase like (SORL) (Martins *et al.*, 2019).

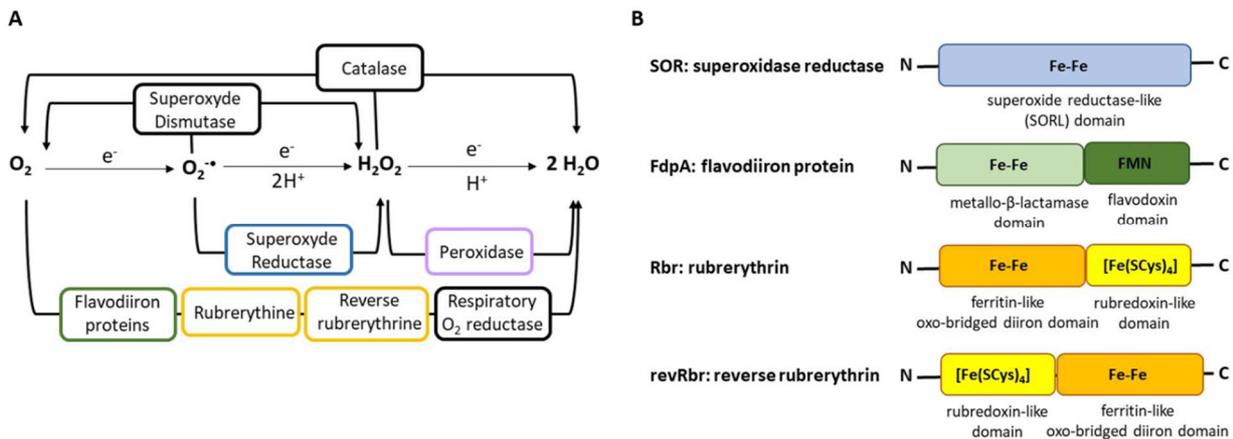


Figure 30. Voie de détoxification d' O_2 et des ROS avec les enzymes impliquées. (A) Systèmes de détoxification connus chez les bactéries aérobies et anaérobies. Les FDP et les revRbr ou Rbr sont capable de réduire l' O_2 en H_2O grâce à leur activité O_2 reductase. Les revRbr et Rbr sont aussi capable, comme les peroxydases, de réduire l' H_2O_2 en H_2O par leur activité H_2O_2 reductase. Seules les SOR et Superoxyde dismutase peuvent réduire l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . **(B)** Schéma des domaines fonctionnelles des enzymes de détoxification étudiées.

Mon but est de comprendre **l'impact du stress oxydant sur la croissance et la survie des souches de *Faecalibacterium* et de mettre en évidence des gènes impliqués dans les mécanismes de résistance au stress.** Afin de mener à bien ce projet, j'ai établi une collaboration avec le groupe Pathogénèse des Bactéries Anaérobies d'Isabelle Martin-Verstraete à l'Institut Pasteur. Ce groupe de recherche est spécialiste dans l'étude du stress oxydant sur la bactérie anaérobie pathogène *Clostridioides difficile*. De plus, j'ai encadré une **étudiante en Master 2**, Tatiana Botin, parcours Microbiologie Université de Paris de décembre 2021 à juin 2022 afin de commencer à développer ce projet

4.8.2 Résultats

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

J'ai réalisé une analyse *in silico* de 15 génomes de *Faecalibacterium* qui a permis de mettre en évidence la présence de systèmes homologues à des enzymes connues pour être capables de détoxifier l' O_2 ou les ROS. De façon intéressante, la présence de ces systèmes varie énormément d'une souche à une autre (Figure 31). Ceci est illustré par la souche CNCM4543 qui possède deux

enzymes prédites de détoxification tandis que la souche M21/2 possède au moins 8 enzymes (Figure 6). La souche L2-6 contient un système de détoxification de l'H₂O₂ de type alkyl hydroperoxide reductase (ou peroxidase) qui est majoritairement présent chez les bactéries aérobies. 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 ROS.

Strains	SOR	FdpA	Rbr	revRbr	Ahp	
<i>F. duncaniae</i>	CNCM4543	0	1	0	1	0
	CNCM4574	0	1	0	1	0
	A2-165	0	1	1	1	0
<i>F. prausnitzii</i>	SL3/3	2	3	0	1	0
	M21/2	3	3	1	1	0
	CNCM4546	3	3	1	1	0
	CNCM4542	2	1	1	1	0
	CNCM4544	2	1	1	1	0
	KLE1255	3	3	2	1	0
<i>F. hattori</i>	942/18_1	3	3	2	1	0
	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
<i>F. longum</i>	L2-6	2	1	1	1	1

Figure 31. Prédiction de systèmes enzymatiques de détoxification d'O₂ et/ou des ROS chez *Faecalibacterium*. Nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la détoxification de l'O₂ ou des ROS chez 15 souches isolées et séquencées représentatives des différentes espèces de *Faecalibacterium*. AhpCF est une potentielle alkyl peroxydase uniquement présente dans la souche L2-6.

Diversité de survie à l'air de souches de *Faecalibacterium*

Nous avons comparé la capacité de plusieurs souches de *Faecalibacterium* à survivre à l'oxygène 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 ont été cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis déposées sur boîtes avec des dilutions en série. Les boîtes ont été exposées à l'air ambiant pendant différents temps, puis réintroduites en chambre anaérobie.

Comme illustré sur la Figure 32A, les souches de *Faecalibacterium* ne peuvent supporter un temps prolongé d'exposition à l'atmosphère ambiant. 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. En revanche, 0,15 % des cellules M21/2 survivent encore après 20 min. d'exposition à l'air ambiant (Figure 32B). De façon remarquable, la sensibilité élevée de la souche CNCM4543 corrèle avec le peu de systèmes de défense prédits (Figure 31). De même, la tolérance plus élevée de la souche M21/2 est en corrélation avec la présence de nombreuses enzymes de détoxification.

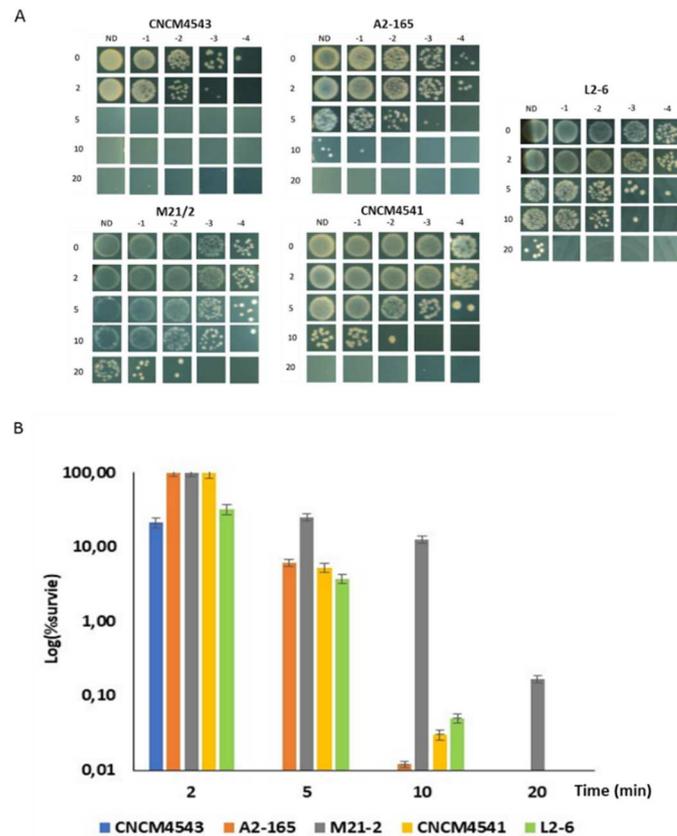


Figure 32. Test de survie à l'air ambiant de plusieurs souches de *Faecalibacterium*. (A) Photos des souches de *Faecalibacterium* exposées à l'air sur boîtes. Les cultures diluées en série ont été déposées en gouttes sur milieu gélosé et exposées à l'air ambiant 2, 5, 10 ou 20 min. La souche CNCM4543 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 calculés à partir du nombre de CFU/mL. Pour chaque souche, 4 à 5 tests indépendants ont été effectués.

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

Afin d'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 *Faecalibacterium* en milieu liquide après un stress à l'oxygène 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. Nous nous sommes concentrés sur les souches A2-165 et L2-6. Ainsi, nous avons pu suivre la biomasse et quantifier 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'O₂, la souche A2-165 reprend progressivement sa croissance 1h après son retour en chambre anaérobie (Figure 33A). Pour la souche L2-6, sa croissance reste stable 3h après restauration de l'anaérobiose (Figure 33B). Les quantifications des CFU/mL montrent que ces deux souches présentent 100% de survie après 30 min. d'exposition à l'air (Figure 33 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'O₂ 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 anaérobiose semble plus complexe.

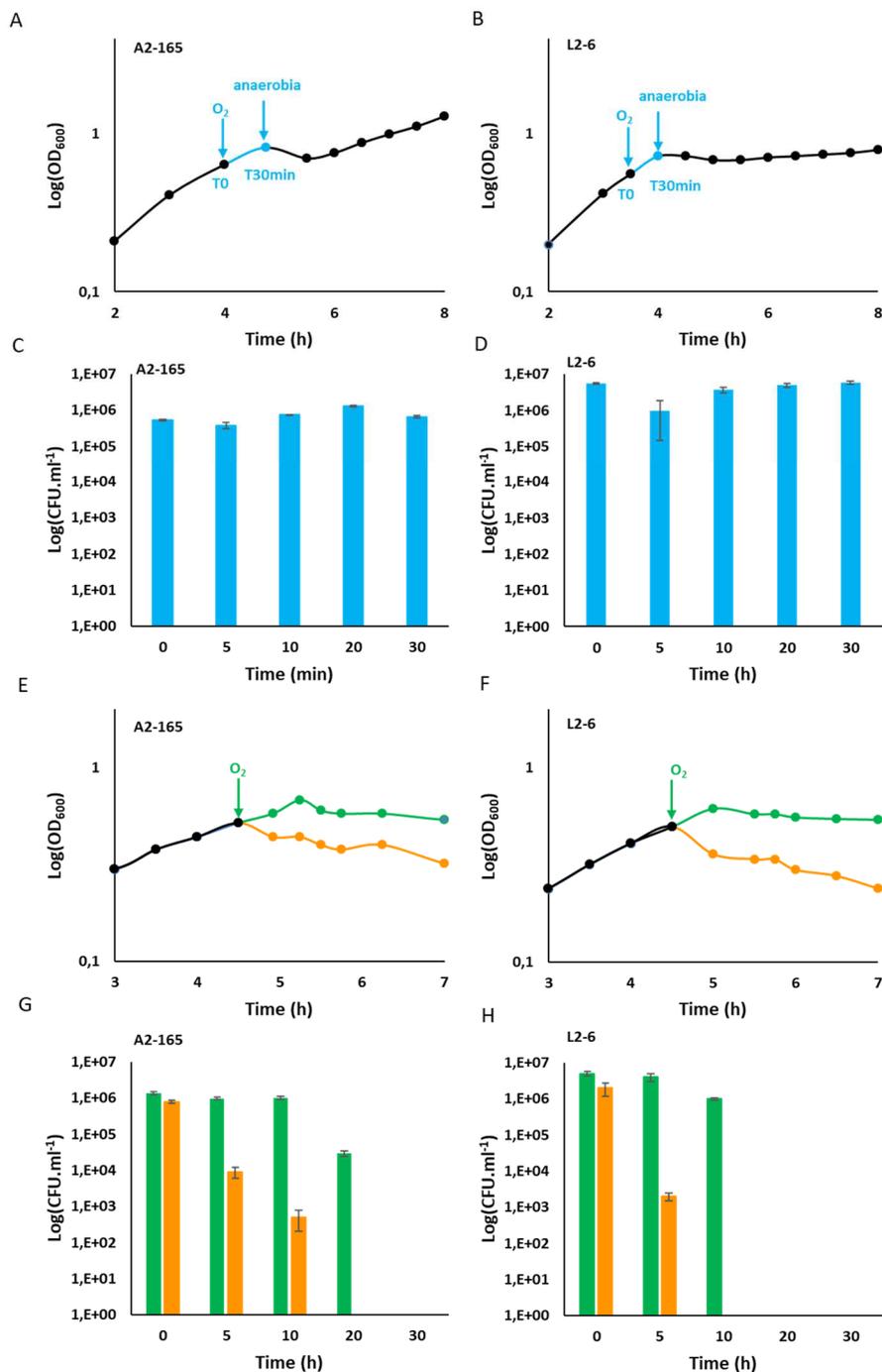


Figure 33. Effet de l'exposition à l'air ambiant sur la croissance et la survie des souches A2-165 et L2-6. (A, B) Courbes représentatives de la croissance d'A2-165 et L2-6 avant et après 30 min. d'exposition à l'air ambiant sans agitation. Les flèches indiquent la sortie et l'entrée de la chambre anaérobie. La partie bleue de la courbe correspond à la durée d'exposition à l'air ambiant. (C, D) Dénombrement sur boîtes des CFU/ml pour les souches A2-165 et L2-6 pendant 30 min. d'exposition à l'air ambiant sans agitation. (E, F) Courbes représentatives de la croissance de A2-165 et L2-6 avant et après 30 min. d'exposition à l'air ambiant sous agitation. La flèche indique la sortie de la chambre anaérobie. La partie noire de la courbe correspond à la croissance en chambre anaérobie. La partie verte correspond à l'exposition à l'air dans le milieu contenant de la cystéine. La partie orange correspond à l'exposition à l'air dans le milieu appauvri en cystéine. (G, H) Dénombrement des CFU/ml pour les souches A2-165 et L2-6 pendant 30 min. exposition à l'air ambiant sous agitation. Barres vertes, survie dans le milieu contenant de la cystéin ; barres orange, survie dans le milieu appauvri en cystéine. Pour chaque souche, trois expériences indépendantes ont été réalisées.

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 33E and F). 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'oxygène. Pour cela, les cellules ont été cultivées dans le milieu BHI + 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 alors que la souche L2-6 ne survit que jusqu'à 10 min. (courbes vertes, Figure 33 E et F). En absence de cystéine, la DO_{600nm} diminue très fortement pour ces deux souches (courbes oranges, Figure 33 E et F). Ceci est corrélé à une très faible survie, 10 min. pour A2-165 et 5 min. pour L2-6 (Figure 33 G et H). Ce résultat confirme le rôle protecteur de la cystéine dans le processus de réduction de l'O₂ exogène observé chez *Faecalibacterium* A2-165 (Khan *et al.*, 2012).

Diversité de survie à H₂O₂ de souches de *Faecalibacterium*

Nous avons poursuivi par l'étude de la sensibilité des 5 souches sélectionnées face à un stress oxydant induit par H₂O₂. Pour cela, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque souche a été déterminée après 24h d'incubation dans des plaques à 96 puits avec une gamme étendue de 10 µM à 200 µM d'H₂O₂. Comme indiqué dans le Tableau 1, les CMI varient de 75 à 200 µM. La souche A2-165 est la plus tolérante à l'H₂O₂ avec une CMI de 200 µM d'H₂O₂. La souche L2-6 tolère de manière intermédiaire l'H₂O₂ 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'O₂, nous retrouvons une hétérogénéité de la sensibilité à l'H₂O₂.

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

Tableau 1. Détermination de la CMI d'H₂O₂ chez plusieurs souches de *Faecalibacterium*. La souche A2-165 est la plus tolérante à l'H₂O₂. Les souches M21-2, CNCM4541 et CNCM4543 sont les plus sensibles avec une CMI de 50µM. L'expérience a été réalisée 3 fois pour chaque souche.

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'H₂O₂ lors de la phase exponentielle et non en début de croissance comme précédemment (Figure 34). Pour la souche A2-165, une concentration de 200 µM d'H₂O₂ inhibe la croissance de la bactérie. Avec une concentration correspondant à 0,5 fois la CMI, soit 100 µM d'H₂O₂, la croissance de A2-165 est ralentie mais pas inhibée. Les résultats obtenus dans ces conditions sont bien accord avec les résultats précédents (Tableau 1). De même pour la souche L2-6, la CMI est confirmée par une inhibition de la croissance en phase exponentielle avec 100 µM d'H₂O₂ et un ralentissement de la croissance avec l'ajout de 50 µM d'H₂O₂ (0,5 fois la CMI). La détermination de ces conditions de stress avec l'H₂O₂ nous a été utile afin d'étudier la régulation transcriptionnelle de gènes cibles.

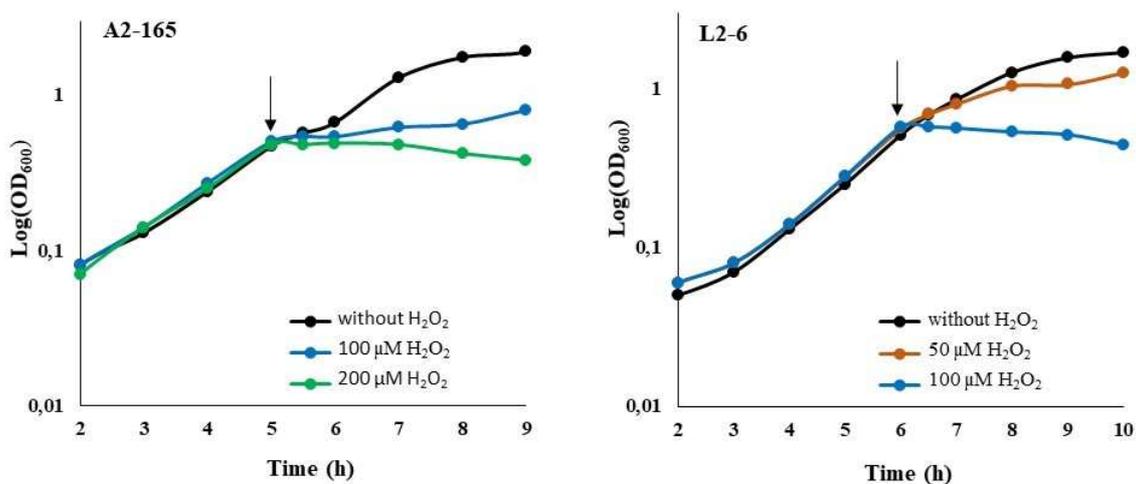


Figure 34. Effet du stress H₂O₂ sur la croissance des souches A2-165 et L2-6.

(A, B) Courbes représentatives de la croissance d'A2-165 et L2-6, avant et après ajout d'H₂O₂ dans le milieu en conditions anaérobies. Les flèches indiquent le temps auquel est ajouté l'H₂O₂. Courbes noires, pas d'H₂O₂; courbes bleues, ajout d'H₂O₂ à la concentration finale de 100 μM; courbe orange, ajout d'H₂O₂ à 50 μM final; courbe verte, ajout d'H₂O₂ à 200 μM final. Pour chaque souche, trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Expression transcriptionnelle en réponse à un stress oxydant

L'impact de l'O₂ et d'H₂O₂ sur l'expression des gènes a été étudié dans la souche L2-6, qui contient des gènes codant pour six enzymes de détoxification potentielles (Figure 31). L'étude de l'expression transcriptionnelle des six gènes correspondants a été réalisée en quantifiant les ARNm par PCR quantitative (Figures 35 et 36). L'expression des six gènes a été rationalisée par rapport à l'expression d'un gène de référence. Ce gène, nommé *peg.52*, code un facteur d'élongation de la traduction (TefG). En tant que contrôle, l'expression de *peg.52* n'est pas été modifiée suite à stress oxydant (résultat non montré). Le stress à l'oxygène ambiant a été appliqué aux bactéries lors d'un temps court (2 min.) à un temps plus long (15 min.). Les deux gènes codant pour les SOR montrent une augmentation de la transcription de 150 fois après 10 min. d'exposition à l'air (Figure 35 A et B). Le gène codant Rbr est surexprimé 30 fois après 15 min. d'exposition (Figure 35 C). Enfin, les gènes codant revRbr et AhpC sont légèrement surexprimés après 10 min. de stress (Figure 35 D et F). Le gène codant Fdp ne présente pas de surexpression évidente dans ces conditions (Figure 6E). Ceci suggère que les deux SOR sont les enzymes les plus impliquées dans la détoxification de l'O₂.

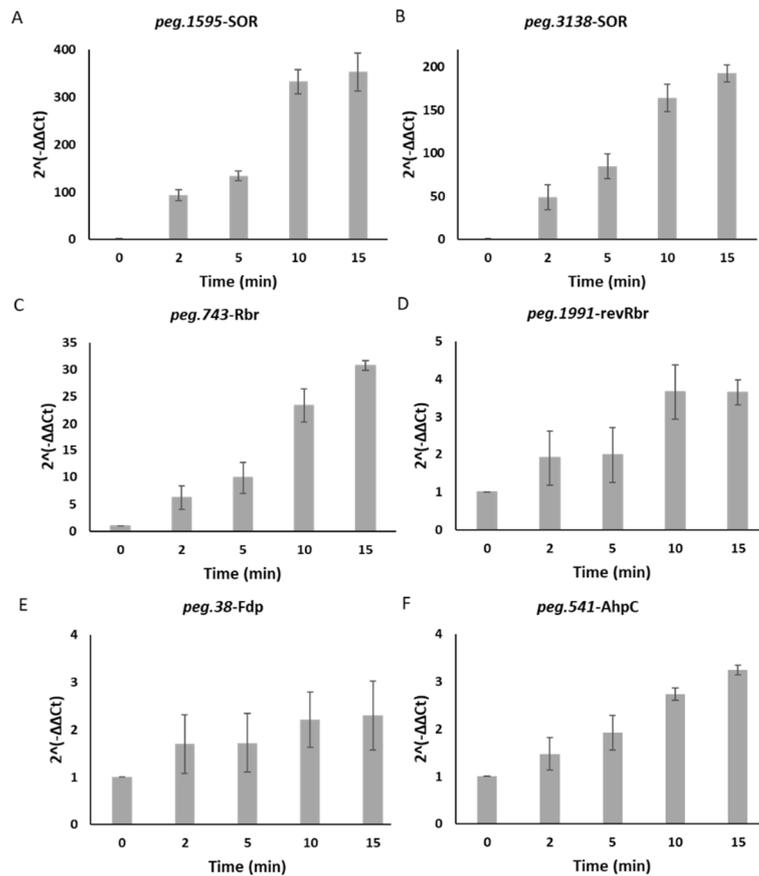


Figure 35. Analyse de l'expression génique dans la souche L2-6 par RT-qPCR lors de différents temps d'exposition à l'O₂ ambiant.

L'expression a été normalisée au gène de référence *peg.52-TefG* et par rapport au temps à 0 min. (A à F). L'expression des six gènes d'intérêt a été mesurée après 0, 2, 5, 10 ou 15 min. d'exposition à l'air ambiant sans agitation. La moyenne et l'écart type de trois expériences indépendantes sont indiqués. Notez que l'échelle des ordonnées est différente pour chaque graphique.

L'expression transcriptionnelle de ces gènes a également été étudiée après exposition de la souche L2-6 à une concentration sub létale de 50 μM d'H₂O₂. L'analyse par RT-qPCR montre deux profils d'expression. L'un concerne une surexpression transitoire des gènes codant pour les SOR, Rbr et revRbr à 5 min. après le stress, suivie d'une diminution progressive de l'expression (Figure 36 A à D). En particulier, l'expression du gène codant pour Rbr est augmentée de 25 fois à 5 min. après le stress. Le second profil concerne les gènes codant pour les enzymes AhpC et Fdp. Nous observons une augmentation progressive de l'expression jusqu'à 30 min. après le stress à H₂O₂ (Figure 36 E et F). Mais cette surexpression reste faible, de l'ordre d'un facteur 3. Globalement, ces résultats suggèrent que Rbr est l'enzyme la plus impliquée dans la détoxification d'H₂O₂.

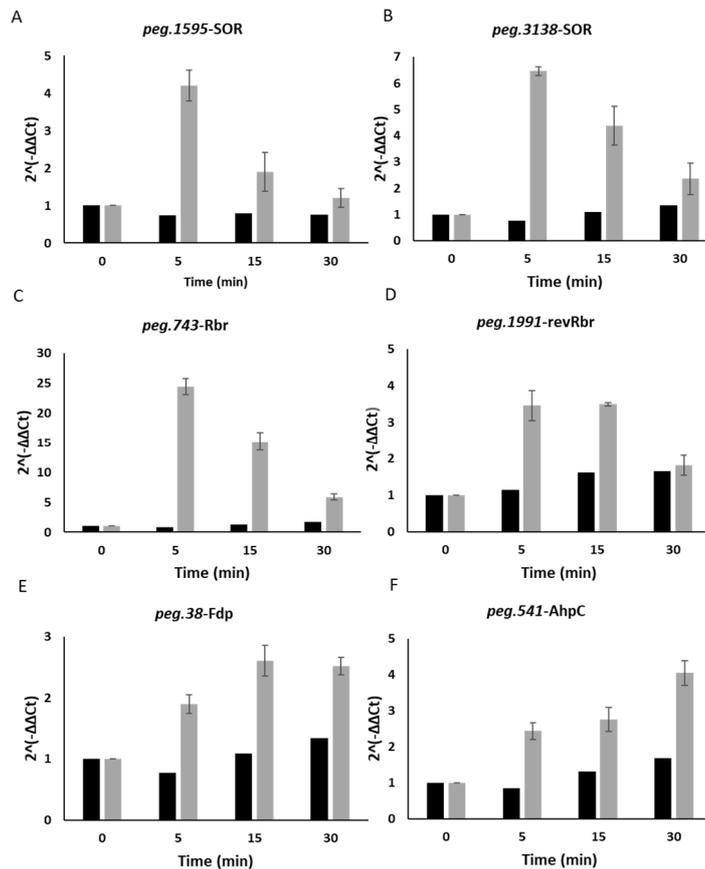


Figure 36. Analyse de l'expression génique dans la souche L2-6 par RT-qPCR en réponse au stress H₂O₂.

L'expression a été normalisée au gène de référence *peg.52-TefG* et par rapport au temps à 0 min. (A à F). L'expression des six gènes d'intérêt a été quantifiée 0, 5, 15 or 30 min. après l'ajout d'H₂O₂ dans le milieu. Barres noires : expression sans stress. Barres grises : expression en réponse à l'ajout de 50 μM d'H₂O₂. La moyenne et l'écart type de trois expériences indépendantes sont indiqués. Notez que l'échelle des ordonnées est différente pour chaque graphique.

Analyses *in silico* de séquences promotrices et proposition d'un modèle de régulation

La similarité du profil d'expression des gènes codant pour Rbr, revRbr et les deux SOR en réponse au stress H₂O₂ suggère qu'ils appartiennent au même régulon. Nous avons cherché à identifier la présence d'un motif nucléotidique commun dans les régions promotrices de ces quatre gènes à l'aide de l'outil MEME suite 5.4.1 (Bailey & Elkan, 1994). J'ai lancé la requête sur les régions de 300 pb en amont du site de début de traduction des quatre gènes. Cela a révélé un motif consensus commun de 22 pb dans les régions promotrices (Figure 37 A et B). Ce motif n'a pas été retrouvé en amont des gènes codant pour Fdp et AhpC. Nous avons ensuite recherché ce motif sur l'ensemble du génome de *F. longum* L2-6 avec l'outil FIMO de la suite MEME. Fait intéressant, ce motif est également présent en amont d'un gène codant pour une thiorédoxine, qui pourrait être impliquée dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire. Nous avons observé par analyse RT-qPCR que l'expression de ce gène est également augmentée de manière transitoire 5 min. après l'ajout d'H₂O₂ (résultat non montré), ce qui renforce l'hypothèse d'une régulation commune via le motif identifié.

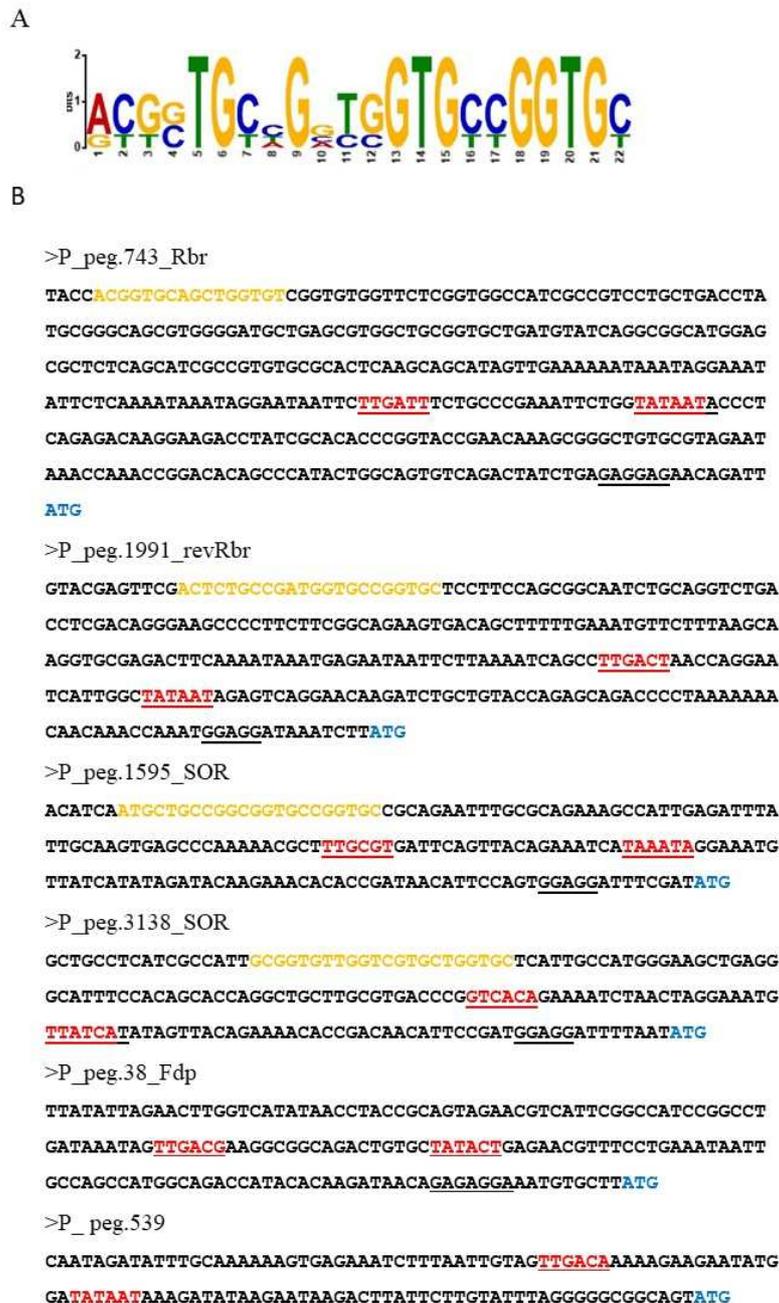


Figure 37. Analyse des séquences promotrices dans la souche L2-6.

(A) Identification d'une séquence consensus de 22 pb dans les régions promotrices des gènes *peg.743* (p -value $8,30e^{-11}$), *peg.1991* (p -value de $7,85e^{-12}$), *peg.1595* (p -value de $7,19e^{-11}$) et *peg.3138* (p -value $3,22e^{-10}$). La taille du nucléotide à chaque position est en corrélation avec sa prévalence relative dans les séquences utilisées dans l'algorithme MEME (Bailey *et al.*, 2006).

(B) Séquence promotrice des gènes d'intérêt. Séquences oranges : localisation des séquences du motif de 22 pb; séquences soulignées en rouge : sites de liaison putatifs -35 et -10 du facteur σ^A ; séquences soulignées en noir : sites potentiels de liaison ribosomique Shine-Dalgarno; lettres bleues : codons de début de traduction.

Aucun régulateur transcriptionnel n'a jusqu'à présent été mis en évidence chez *Faecalibacterium*. Sur la base de nos résultats, nous proposons un premier modèle de régulation (Figure 38).

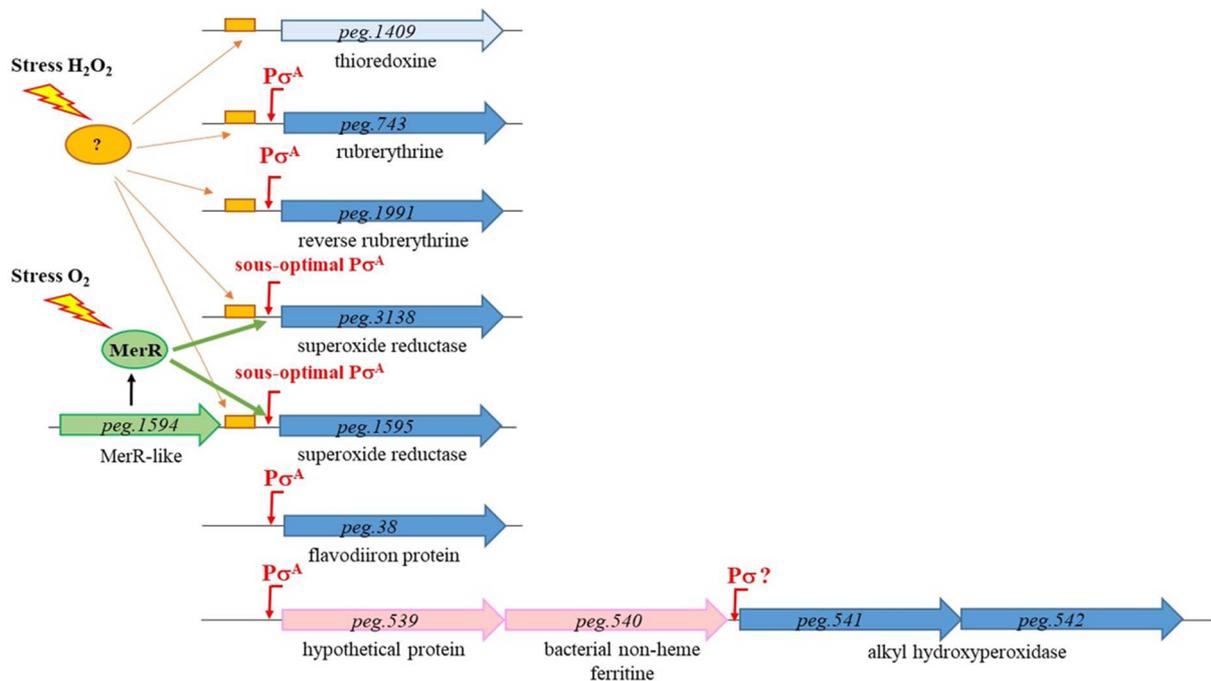


Figure 38. Construction d'un réseau putatif de régulation de gènes dans la souche L2-6.

Ce modèle présente l'hypothétique régulation transcriptionnelle des gènes codant pour des enzymes de détoxification en réponse à l' O_2 ou à H_2O_2 . Le motif de 22 pb pourrait être le site de liaison d'un régulateur, dont l'activité pourrait être modulée par la présence d' H_2O_2 . Le régulateur de type MerR pourrait être activé par l' O_2 et activer les gènes codant pour les SOR. En bleu : gènes codant pour des enzymes de détoxification putatives, qui sont étudiés dans ce travail; en bleu clair : un autre gène identifié *peg.1409*, dont l'expression répond à l' H_2O_2 ; en rose, gènes probablement en opéron avec les gènes codant pour l'alkyl hydroxyperoxydase; en orange, régulation impliquant le motif de 22 pb; en vert, régulation putative par la protéine de type MerR.

Nous supposons que le motif nucléotidique identifié serait le site de reconnaissance d'un régulateur transcriptionnel qui répondrait au stress H_2O_2 et régulerait de manière coordonnée l'expression d'au moins 5 gènes. Chez *C. difficile*, la réponse générale au stress et l'adaptation à l'entrée en phase stationnaire sont médiées par le facteur sigma 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. A titre d'exemple, le régulon σ^B chez *C. difficile* comprend de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress et en particulier la réponse au stress oxydant induit par O_2 , ROS ou NO (Kint *et al.*, 2017). Cependant, les souches de *Faecalibacterium* ne contiennent pas d'homologue potentiel de σ^B .

Nous avons ensuite recherché la présence des sites de liaison -10 et -35 du facteur σ^A dans les régions promotrices des 6 gènes d'intérêt avec l'outil BPROM (Solovyev & Salamov, s. d.). Nous n'avons pas identifié de promoteur de type σ^A dans la région promotrice de *peg.541-AhpC*, ce qui suggère que l'expression de ce gène dépend d'un facteur σ alternatif ou du promoteur σ^A localisé en amont du gène *peg.539* (Figure 38). Comme indiqué sur la Figure 37B, nous avons trouvé 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. Les gènes *peg.743-Rbr*, *peg.1991-revRbr* et *peg.38-Fdp* contiennent aussi un promoteur σ^A mais avec une distance sous-optimale de 19 ± 1 pb entre les éléments -10 et -35. De manière intéressante, un gène codant pour un régulateur transcriptionnel de type MerR (*peg.1594*) est localisé en amont du gène *peg.1595-SOR* (Figure 38). Les régulateurs de type MerR sont connus pour activer des promoteurs sous-optimaux σ^{70} ou σ^A -dépendants, dans lesquels l'espacement entre les éléments -35 et -10 reconnus par le facteur σ est supérieur à 17 ± 1 pb (Brown *et al.*, 2003). La transcription est alors activée 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 oxydant, les métaux lourds ou les antibiotiques. Pour compléter notre modèle de régulation, nous supposons que la forte activation des gènes codant les deux SOR pourrait être sous le contrôle du régulateur de type MerR en réponse au stress O_2 (Figure 38).

4.8.3 Perspectives

Les résultats obtenus lors du projet de Master 2 de T. Botin font l'objet d'un manuscrit qui a été soumis pour publication : Botin, T., Ramirez Chamollo, L. M., Langella, P., Martin-Verstraete, I., Chatel, J. M., **Auger, S.** Tolerance mechanisms and transcriptional responses to oxygen and ROS in *Faecalibacterium longum* L2-6.

J'ai déposé une demande de financement pour un projet de thèse auprès de l'Ecole Doctorale SDSV de Paris-Saclay en 2022. La candidate qui a défendu le projet à l'oral n'a pas été retenue mais je souhaite redéposer ce projet l'année prochaine.

Ce projet propose à l'étudiant des **approches multidisciplinaires** de microbiologie et de bioinformatique intégrative. Il a pour but d'essayer de répondre à des questions majeures sur **la valeur sélective/adaptive des souches de *Faecalibacterium* en réponse aux conditions de stress oxydant** :

- quelles sont les capacités des différentes souches de *Faecalibacterium* à survivre dans le côlon dans un contexte de stress oxydant ?
- la souche L2-6 a-t-elle un avantage sélectif par rapport aux autres souches ?
- quelles sont les voies métaboliques de *Faecalibacterium* impactées par la tension en O_2 ?
- quels métabolites sont-ils produits par les souches de *Faecalibacterium* dans un contexte colique inflammatoire ?

Mon projet de recherche a pour but de comprendre quel est l'impact du stress oxydant sur la survie, voir la dominance intra-espèce, des différents types de souches de *Faecalibacterium*. Pour comprendre les interactions et le comportement de *Faecalibacterium* dans l'intestin sain ou inflammé, une première étape consiste à considérer la bactérie individuelle comme un système biologique qui répond aux perturbations environnementales par des interactions géniques dans des réseaux complexes. Ce projet de travaux de thèse a pour objectif de comprendre la réponse de *Faecalibacterium* au stress oxydant par des approches omiques de type protéomique et métabolomiques et d'avoir une vision intégrée à l'échelle de la cellule grâce à l'utilisation d'approches de bioinformatique intégrative. Le projet de thèse proposé comprend trois tâches (Figure 39).

Tâche 1. Effets de la tension en O₂ et des ROS sur le protéome, le métabolome et la transcription de gènes cibles chez *Faecalibacterium*.

Nous choisirons deux souches comme modèles d'étude : la souche A2-165, qui disparaît chez les individus atteints de MICI ; la souche L2-6, persistante chez des individus atteints d'inflammation de l'intestin (Sokol *et al.*, 2008 and 2009 ; Song *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018).

Le protéome sera étudié lors de croissance à faible tension en O₂ en comparaison d'une croissance en anaérobiose stricte. Il sera aussi comparé avant et après un stress à H₂O₂. Cette étude protéomique se fera en collaboration avec Céline Henry, responsable de la plateforme PAPPISO (INRAE, Jouy-en-Josas). Elle impliquera aussi l'équipe d'Isabelle Martin-Verstraete (Institut Pasteur).

En parallèle, nous ferons de la métabolomique ciblée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les équipements sont présents dans notre équipe ProbiHôte (collaboration avec Claire Cherbuy). Nous doserons des intermédiaires des voies métaboliques centrales du carbone (i.e. succinate), les métabolites secondaires (i.e. le butyrate), les flavines impliquées dans le transfert des électrons et le maintien du potentiel redox (NADP/NADPH, NAD/NADH).

De plus, nous analyserons l'expression transcriptionnelle de gènes cibles par qRT-PCR.

Les données quantitatives obtenues seront analysées et intégrées par des approches de bioinformatique dans la Tâche 2.

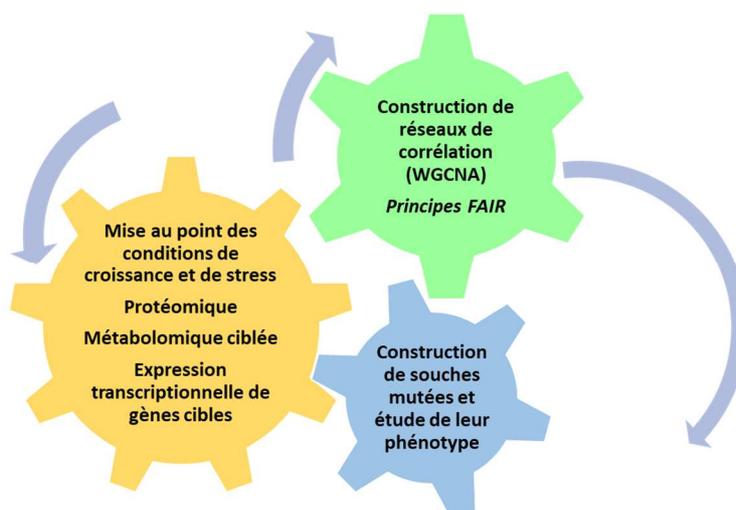


Figure 39. Principales tâches proposées pour un projet de thèse.

Tâche 2. Construction *in silico* de réseaux de corrélation

La compréhension des processus biologiques nécessite de pouvoir extraire les informations pertinentes à partir des différents jeux de données, pour ensuite les intégrer et les interpréter en utilisant des modèles intégratifs.

Les réseaux de corrélation sont de plus en plus utilisés dans les applications bioinformatiques. Ainsi, l'analyse de réseau de co-expression génique pondérée est une méthode de biologie des systèmes pour décrire les modèles de corrélation entre les gènes (ou les protéines) à travers des échantillons de transcriptomique ou de protéomique. L'analyse de réseau de corrélation pondérée (WGCNA) peut être utilisée pour trouver des clusters (modules) de

gènes/protéines hautement corrélés, et pour relier les modules les uns aux autres et aux caractéristiques des échantillons (i. e. dosages de métabolites).

En collaboration avec Virginie Mournetas (Pépinière Génopole, Evry) l'étudiant intégrera l'ensemble de ses données (protéomiques, métabolomiques, transcriptionnelles) avec la méthode WGCNA afin de construire les réseaux de corrélation. Au cours des analyses, une attention particulière sera portée sur la mise en œuvre des principes « FAIR » de la science reproductible (Facile à trouver, Accessible, Interopérable, Réutilisable).

Tâche 3. Construction et caractérisation de souches inactivées dans des gènes liés à la résistance à O₂ et aux ROS

Jusqu'à présent aucun outil génétique n'était disponible chez *Faecalibacterium*. Or, depuis un an dans l'équipe ProbiHôte, nous développons des plasmides conjugatifs entre *E. coli* et *Faecalibacterium*. Au cours de son projet de thèse, nous proposons que l'étudiant participe au développement d'outils génétiques afin de construire des souches mutées dans les gènes codant de potentiels systèmes de détoxification d'O₂ ou d'H₂O₂. Les phénotypes de ces mutants pourront être testés en présence de différentes tensions en O₂ (0 à 4 %) ainsi qu'en présence de différentes concentrations en H₂O₂.

Retombées scientifiques

L'ensemble de ces résultats permettra de mieux comprendre la capacité de survie des différentes souches de *Faecalibacterium* en réponse à un stress oxydant. Cela aidera à élucider en partie l'observation que certaines souches sont capables de persister dans un contexte colique inflammatoire. De façon plus générale, nos données permettront de mieux comprendre les interactions entre l'hôte (producteur de ROS) et son microbiote, ce qui s'avère indispensable pour envisager une intervention nutritionnelle favorisant le retour et le maintien d'un microbiote non-dysbiotique. Les résultats seront publiés dans des journaux de notoriété reconnue. Jusqu'à présent aucune donnée protéomique n'a été publiée chez *Faecalibacterium*. Aussi ce projet fournira des données originales sur cette bactérie.

Retombées attendues pour l'étudiant

La bioinformatique est devenue une compétence incontournable pour l'analyse de données de natures diverses : génomes, omiques, structures macromoléculaires, réseaux d'interactions. L'appropriation par les biologistes des méthodes et des outils de biostatistique et **bioinformatique intégrative** est **un enjeu majeur pour la montée en compétence des jeunes diplômés**, futurs acteurs de la Recherche. Le projet que nous proposons permettra à l'étudiant d'acquérir une démarche scientifique et des compétences méthodologiques qui lui seront utiles aussi bien dans le secteur académique que dans le secteur privé.

4.9 Implication dans des projets transversaux sur le microbiote

Je participe également à deux projets Carnot-Qualiment sur l'étude de l'effet de farines germées chez le rat en croissance (M. Gueugneau, INRAE, Clermont-Ferrand) et sur l'effet de l'acétate et la complémentarité nutritionnelle entre *Faecalibacterium* A2-165 et *Blautia* MB9 (E. Huillet, INRAE, Jouy-en-Josas). De plus, j'apporte mon expertise dans le domaine des analyses de la composition du microbiote intestinal dans divers projets collaboratifs avec des scientifiques de l'Université de Lorraine, de l'IRSN (une publication associée) et de l'INSERM (Figure 40). Ces collaborations sont très enrichissantes et permettent d'étendre mon réseau dans le domaine de la recherche sur les bactéries du microbiote intestinale.

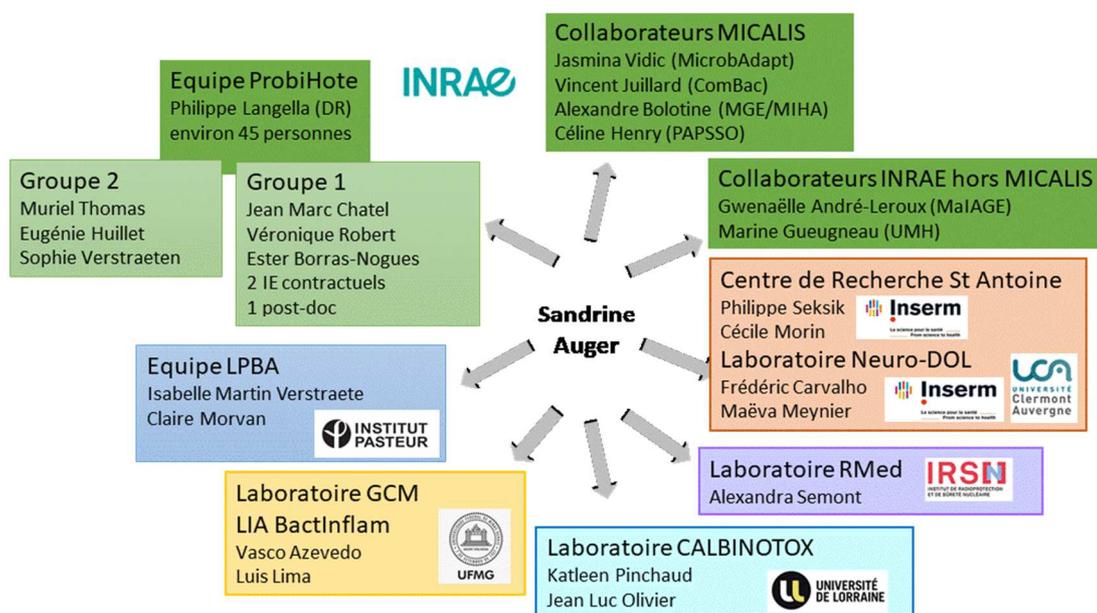


Figure 40. Réseau collaboratif au sein et en dehors d'INRAE.

4.10 Conclusion sur le rôle d'encadrant

Les recherches décrites à travers le présent rapport montrent un fil conducteur au long de mes projets qui est la compréhension des réseaux biologiques liés à l'adaptation des bactéries que ce soit dans le sol (*B. subtilis*) ou dans le microbiote intestinal humain (*Faecalibacterium*). Les projets que j'ai portés ont tous mené à des publications dont je suis dernier auteur. J'ai eu plaisir à former P. Randazzo au métier de chercheur à travers l'encadrement de sa thèse. Aujourd'hui, je porte des projets que j'ai envie de faire vivre à travers l'obtention de financements ainsi que dans la direction des recherches d'un doctorant. Cet exercice est très motivant car il permet de transmettre ses connaissances et son savoir-faire à un étudiant, de l'accompagner dans ses réflexions autour de son projet de recherche, de lui donner des opportunités (enseignement, participation à des congrès, ...) afin de lui donner des atouts pour son futur projet professionnel. Le partenariat encadrant-doctorant est enrichissement mutuel et stimulant.

5 REFERENCES

- Aguirre, J.D., and Culotta, V.C. (2012) Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *J Biol Chem* 287: 13541–13548.
- Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Nomura, N., and Kawamura, F. (2006) Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, YtiA, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 2715–2720.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quiñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27: 215–237.
- Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., Lapidus, A., and Hecker, M. (1997) Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 179: 7251–7256.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Veeken, J. van der, deRoos, P., *et al.* (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504: 451–455.
- Auger, S., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2002a) Global expression profile of *Bacillus subtilis* grown in the presence of sulfate or methionine. *J Bacteriol* 184: 5179–5186.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S.D., Lapidus, A., and Sorokin, A. (2008) The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Appl Environ Microbiol* 74: 1276–1280.
- Auger, S., Galleron, N., Séguens, B., Dossat, C., Bolotin, A., Wincker, P., and Sorokin, A. (2012) Complete genome sequence of the highly hemolytic strain *Bacillus cereus* F837/76. *J Bacteriol* 194: 1630–1630.
- Auger, S., Gomez, M.P., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2005) The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. *Biochimie*, 87:231-238.
- Auger, S., Henry, C., Péchaux, C., Lejal, N., Zanet, V., Nikolic, M.V., *et al.* (2019) Exploring the impact of Mg-doped ZnO nanoparticles on a model soil microorganism *Bacillus subtilis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 182: 109421.
- Auger, S., Henry, C., Péchoux, C., Suman, S., Lejal, N., Bertho, N., *et al.* (2018) Exploring multiple effects of Zn0.15Mg0.85O nanoparticles on *Bacillus subtilis* and macrophages. *Sci Rep* 8: 12276.
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., and Gohar, M. (2006) Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 72: 937–941.
- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., and Gohar, M. (2009) Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 75: 6616–6618.
- Auger, S., Yuen, W.H., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2002b) The metIC operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* is controlled by transcription antitermination. *Microbiology* 148: 507–518.

- Aw, T.Y. (2003) Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol Sci* 18: 201–204.
- Bagyan, I., Casillas-Martinez, L., and Setlow, P. (1998) The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by sigmaF, and KatX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J Bacteriol* 180: 2057–2062.
- Baichoo, N., Wang, T., Ye, R., and Helmann, J.D. (2002) Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* 45: 1613–1629.
- Barcenilla, A., Pryde, S.E., Martin, J.C., Duncan, S.H., Stewart, C.S., Henderson, C., and Flint, H.J. (2000) Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 66: 1654–1661.
- Benevides, L., Burman, S., Martin, R., Robert, V., Thomas, M., Miquel, S., et al. (2017) New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium*. *Front Microbiol* 8: 1790.
- Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., and Pedersen, K. (2006) Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci* 85: 1151–1164.
- Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev.* 2003 Jun;27(2-3):145-63.
- Bsat, N., Chen, L., and Helmann, J.D. (1996) Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J Bacteriol* 178: 6579–6586.
- Bsat, N., and Helmann, J.D. (1999) Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *J Bacteriol* 181: 4299–4307.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J.D. (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* 29: 189–198.
- Buffie, C.G., Bucci, V., Stein, R.R., McKenney, P.T., Ling, L., Gobourne, A., et al. (2015) Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517: 205–208.
- Burguière, P., Auger, S., Hullo, M.-F., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2004) Three different systems participate in cystine uptake in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186: 4875–4884.
- Burguière, P., Fert, J., Guillouard, I., Auger, S., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2005) Regulation of the *Bacillus subtilis* *ytml* operon, involved in sulfur metabolism. *J Bacteriol* 187: 6019–6030.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., et al. (2010) Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International* 43: 1885–1894.
- Carlsson, A.H., Yakymenko, O., Olivier, I., Håkansson, F., Postma, E., Keita, A.V., and Söderholm, J.D. (2013) *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. *Scand J Gastroenterol* 48: 1136–1144.

- Castillo, M., Skene, G., Roca, M., Anguita, M., Badiola, I., Duncan, S.H., *et al.* (2007) Application of 16S rRNA gene-targeted fluorescence in situ hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 138–146.
- Cerqueira, F., and Vasconcelos, A.T.R. (2020) OCCAM: prediction of small ORFs in bacterial genomes by means of a target-decoy database approach and machine learning techniques. *Database (Oxford)* 2020: baaa067.
- Chen, L., and Helmann, J.D. (1995) *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloreulation of an oxidative-stress gene. *Mol Microbiol* 18: 295–300.
- Chen, L., James, L.P., and Helmann, J.D. (1993a) Metalloreulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *J Bacteriol* 175: 5428–5437.
- Chen, L., Keramati, L., and Helmann, J.D. (1995a) Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8190–8194.
- Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., and Dicks, L.M. (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* 49: 23–28.
- Coassin, M., Ursini, F., and Bindoli, A. (1992) Antioxidant effect of manganese. *Arch Biochem Biophys* 299: 330–333.
- Coppée, J.-Y., Auger, S., Turlin, E., Sekowska, A., Le Caer, J.-P., Labas, V., *et al.* (2001) Sulfur-limitation-regulated proteins in *Bacillus subtilis*: a two-dimensional gel electrophoresis study. *Microbiology* 147: 1631–1640.
- Crappé, J., Van Criekinge, W., Trooskens, G., Hayakawa, E., Luyten, W., Baggerman, G., and Menschaert, G. (2013) Combining *in silico* prediction and ribosome profiling in a genome-wide search for novel putatively coding sORFs. *BMC Genomics* 14: 648.
- Cryle, M.J., Bell, S.G., and Schlichting, I. (2010) Structural and biochemical characterization of the cytochrome P450 CypX (CYP134A1) from *Bacillus subtilis*: a cyclo-L-leucyl-L-leucyl dipeptide oxidase. *Biochemistry* 49: 7282–7296.
- Dabard, J., Bridonneau, C., Phillipe, C., Anglade, P., Molle, D., Nardi, M., *et al.* (2001) Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol* 67: 4111–4118.
- Dambach, M., Sandoval, M., Updegrove, T.B., Anantharaman, V., Aravind, L., Waters, L.S., and Storz, G. (2015) The ubiquitous *yybP-ykoY* riboswitch is a manganese-responsive regulatory element. *Mol Cell* 57: 1099–1109.
- Dangour, A.D., Lock, K., Hayter, A., Aikenhead, A., Allen, E., and Uauy, R. (2010) Nutrition-related health effects of organic foods: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 92: 203–210.
- De Filippis, F., Pasolli, E., and Ercolini, D. (2020) Newly Explored *Faecalibacterium* Diversity Is Connected to Age, Lifestyle, Geography, and Disease. *Curr Biol* 30: 4932-4943.e4.
- Deuel, T.F., and Stadtman, E.R. (1970) Some kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *J Biol Chem* 245: 5206–5213.

- D'hoë, K., Vet, S., Faust, K., Moens, F., Falony, G., Gonze, D., *et al.* (2018) Integrated culturing, modeling and transcriptomics uncovers complex interactions and emergent behavior in a three-species synthetic gut community. *Elife* 7: e37090.
- Duarte, V., and Latour, J.-M. (2010) PerR vs OhrR: selective peroxide sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Biosyst* 6: 316–323.
- Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52:2141–2146.
- Duval, M., and Cossart, P. (2017) Small bacterial and phagic proteins: an updated view on a rapidly moving field. *Curr Opin Microbiol* 39: 81–88.
- Espey, M.G. (2013) Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radical Biology and Medicine* 55: 130–140.
- Even, S., Burguière, P., Auger, S., Soutourina, O., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2006) Global control of cysteine metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 2184–2197.
- Fall, R., Kearns, D.B., and Nguyen, T. (2006) A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant. *BMC Microbiol* 6: 31.
- Fang, Z., and Dos Santos, P.C. (2015) Protective role of bacillithiol in superoxide stress and Fe-S metabolism in *Bacillus subtilis*. *Microbiologyopen* 4: 616–631.
- Faulkner, M.J., and Helmann, J.D. (2011a) Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 15: 175–189.
- Fitzgerald, C.B., Shkoporov, A.N., Sutton, T.D.S., Chaplin, A.V., Velayudhan, V., Ross, R.P., and Hill, C. (2018) Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics* 19: 931.
- Foglesong, M.A., Cruden, D.L., and Markovetz, A.J. (1984) Pleomorphism of fusobacteria isolated from the cockroach hindgut. *J Bacteriol* 158: 474–480.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13780–13785.
- Frickey, T., and Lupas, A. (2004) CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity. *Bioinformatics* 20: 3702–3704.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., and Helmann, J.D. (2001) OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 4134–4141.
- Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* *fur* and *perR* genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J Bacteriol* 184: 3276–3286.

- Fuchs, S., Kucklick, M., Lehmann, E., Beckmann, A., Wilkens, M., Kolte, B., *et al.* (2021) Towards the characterization of the hidden world of small proteins in *Staphylococcus aureus*, a proteogenomics approach. *PLoS Genet* 17: e1009585.
- Gaballa, A., Antelmann, H., Aguilar, C., Khakh, S.K., Song, K.-B., Smaldone, G.T., and Helmann, J.D. (2008) The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11927–11932.
- Gaballa, A., and Helmann, J.D. (1998a) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180: 5815–5821.
- Gaballa, A., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2002) Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J Bacteriol* 184: 6508–6514.
- Gabriel, S.E., Miyagi, F., Gaballa, A., and Helmann, J.D. (2008) Regulation of the *Bacillus subtilis* *yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *J Bacteriol* 190: 3482–3488.
- Gardner, P.R., and Fridovich, I. (1993) Effect of glutathione on aconitase in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301: 98–102.
- Gîlcă-Blanariu, G.-E., Diaconescu, S., Ciocoiu, M., and Ștefănescu, G. (2018) New insights into the role of trace elements in IBD. *BioMed Research International* 2018: 1–9.
- Giordano, N., Hastie, J. L., & Carlson, P. E. (2018). Transcriptomic profiling of *Clostridium difficile* grown under microaerophilic conditions. *Pathogens and Disease*, 76(2).
- Guedon, E., Moore, C.M., Que, Q., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2003) The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and sigmaB regulons. *Mol Microbiol* 49: 1477–1491.
- Guillouard, I., Auger, S., Hullo, M.-F., Chetouani, F., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2002) Identification of *Bacillus subtilis* Cysl, a regulator of the *cysJI* operon, which encodes sulfite reductase. *J Bacteriol* 184: 4681–4689.
- Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., *et al.* (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 31–40.
- Groussin M, Poyet M, Sistiaga A, Kearney SM, Moniz K, Noel M, *et al.* Elevated rates of horizontal gene transfer in the industrialized human microbiome. *Cell*. 2021;184: 2053-2067.e18.
- Hageman, J.H., Shankweiler, G.W., Wall, P.R., Franich, K., McCowan, G.W., Cauble, S.M., *et al.* (1984) Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *J Bacteriol* 160: 438–441.
- Hartford, O.M., and Dowds, B.C. (1994) Isolation and characterization of a hydrogen peroxide resistant mutant of *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading)* 140: 297–304.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B., and Nes, I.F. (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* 16: 229–240.

- Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Gaballa, A., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Fawcett, P., and Paddon, C. (2003) The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol* 185: 243–253.
- Herbig, A.F., and Helmann, J.D. (2001) Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* 41: 849–859.
- Hider, R.C., and Kong, X.L. (2011) Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biometals* 24: 1179–1187.
- Hobbs, E.C., Fontaine, F., Yin, X., and Storz, G. (2011) An expanding universe of small proteins. *Curr Opin Microbiol* 14: 167–173.
- Hold, G.L., Schwiertz, A., Aminov, R.I., Blaut, M., and Flint, H.J. (2003) Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 69: 4320–4324.
- Huang, X., Shin, J.-H., Pinochet-Barros, A., Su, T.T., and Helmann, J.D. (2017) *Bacillus subtilis* MntR coordinates the transcriptional regulation of manganese uptake and efflux systems. *Mol Microbiol* 103: 253–268.
- Huang, X.-L., Zhang, X., Fei, X.-Y., Chen, Z.-G., Hao, Y.-P., Zhang, S., *et al.* (2016) *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. *World J Gastroenterol* 22: 5201–5210.
- Hullo, M.-F., Auger, S., Dassa, E., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2004) ThemetNPQ operon of *Bacillus subtilis* encodes an ABC permease transporting methionine sulfoxide, d- and l-methionine. *Research in Microbiology* 155: 80–86.
- Hullo, M.-F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2007) Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *J Bacteriol* 189: 187–197.
- Imlay, J.A. (2019) Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environ Microbiol* 21: 521–530.
- Inaoka, T., Matsumura, Y., and Tsuchido, T. (1999) SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181: 1939–1943.
- Jacquamet, L., Traoré, D. a. K., Ferrer, J.-L., Proux, O., Testemale, D., Hazemann, J.-L., *et al.* (2009) Structural characterization of the active form of PerR: insights into the metal-induced activation of PerR and Fur proteins for DNA binding. *Mol Microbiol* 73: 20–31.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8: 275–282.
- Kang D, Ham H, Lee S, Cho Y, Kim Y, Yoon C, *et al.* Functional dissection of the phosphotransferase system provides insight into the prevalence of *Faecalibacterium prausnitzii* in the host intestinal environment. *Environ Microbiol.* 2021;23: 4726–4740.

- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J., and Bäckhed, F. (2013) Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 62: 3341–3349.
- Karpiński, T.M. (2019) The Microbiota and Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 48: 447–464.
- Kemp, G., and Cymer, F. (2014) Small membrane proteins - elucidating the function of the needle in the haystack. *Biol Chem* 395: 1365–1377.
- Keshavarzian, A., Sedghi, S., Kanofsky, J., List, T., Robinson, C., Ibrahim, C., and Winship, D. (1992) Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 103: 177–185.
- Khan, M.T., Duncan, S.H., Stams, A.J.M., Dijk, J.M. van, Flint, H.J., and Harmsen, H.J.M. (2012) The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *ISME J* 6: 1578–1585.
- Khan MT, van Dijk JM, Harmsen HJ. (2014) Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* alive at ambient air. *PLoS One*. May 5;9(5):e96097.
- Kint, N., Alves Feliciano, C., Martins, M.C., Morvan, C., Fernandes, S.F., Folgosa, F., *et al.* (2020) How the anaerobic enteropathogen *Clostridioides difficile* tolerates low O₂ tensions. *mBio* 11: e01559-20.
- Kint, N., Morvan, C., & Martin-Verstraete, I. (2022). Oxygen response and tolerance mechanisms in *Clostridioides difficile*. *Current Opinion in Microbiology*, 65, 175-182.
- Koga, Y., Tokunaga, S., Nagano, J., Sato, F., Konishi, K., Tochio, T., *et al.* (2016) Age-associated effect of kestose on *Faecalibacterium prausnitzii* and symptoms in the atopic dermatitis infants. *Pediatr Res* 80: 844–851.
- Koliarakis, I., Messaritakis, I., Nikolouzakis, T.K., Hamilos, G., Souglakos, J., and Tsiaoussis, J. (2019) Oral bacteria and intestinal dysbiosis in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 20: E4146.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549.
- Lancaster, C.R., and Kröger, A. (2000) Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta* 1459: 422–431.
- Lao J, Guédon G, Lacroix T, Charron-Bourgoin F, Libante V, Loux V, *et al.* Abundance, Diversity and Role of ICEs and IMEs in the Adaptation of *Streptococcus salivarius* to the Environment. *Genes* (Basel). 2020;11: 999.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., *et al.* (2008) Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 171: 236–249.
- Laval, L., Martin, R., Natividad, J.N., Chain, F., Miquel, S., Desclée de Maredsous, C., *et al.* (2015) *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes* 6: 1–9.

- Lebas, M., Garault, P., Carrillo, D., Codoñer, F.M., and Derrien, M. (2020) Metabolic response of *Faecalibacterium prausnitzii* to cell-free supernatants from lactic acid bacteria. *Microorganisms* 8: E1528.
- Lee, J.-W., and Helmann, J.D. (2006a) The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440: 363–367.
- Lee, J.-W., and Helmann, J.D. (2006b) Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* 281: 23567–23578.
- Lee, J.-W., Soonsanga, S., and Helmann, J.D. (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8743–8748.
- Lerner A, Matthias T, Aminov R. Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut. *Front Immunol.* 2017;8: 1630.
- Levdikov, V.M., Blagova, E.V., Rawlings, A.E., Jameson, K., Tunaley, J., Hart, D.J., *et al.* (2012) Structure of the phosphatase domain of the cell fate determinant SpoIIE from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 415: 343–358.
- Loguercio, C., D'Argenio, G., Delle Cave, M., Cosenza, V., Della Valle, N., Mazzacca, G., and Del Vecchio Blanco, C. (2003) Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Dig Liver Dis* 35: 635–641.
- Lopez-Siles, M., Duncan, S.H., Garcia-Gil, L.J., and Martinez-Medina, M. (2017) *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J* 11: 841–852.
- Ma, Z., Chandrangsu, P., Helmann, T.C., Romsang, A., Gaballa, A., and Helmann, J.D. (2014) Bacilli-thiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 94: 756–770.
- Ma, Z., Gabriel, S.E., and Helmann, J.D. (2011) Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res* 39: 9130–9138.
- Ma, Z., Jacobsen, F.E., and Giedroc, D.P. (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev* 109: 4644–4681.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288: 2222–2226.
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., and Balamurugan, R. (2020) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* 12: E1474.
- Marchadier, E., Carballido-López, R., Brinster, S., Fabret, C., Mervelet, P., Bessières, P., *et al.* (2011) An expanded protein-protein interaction network in *Bacillus subtilis* reveals a group of hubs: Exploration by an integrative approach. *Proteomics* 11: 2981–2991.
- Markov, D., Naryshkina, T., Mustaev, A., and Severinov, K. (1999) A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev* 13: 2439–2448.

- 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.
- Mattatall, N.R., Jazairi, J., and Hill, B.C. (2000) Characterization of YpmQ, an accessory protein required for the expression of cytochrome c oxidase in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* *275*: 28802–28809.
- McCall, K.A., Huang, C., and Fierke, C.A. (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* *130*: 1437S–46S.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* *244*: 6049–6055.
- Meng, X.-L., Li, S., Qin, C.-B., Zhu, Z.-X., Hu, W.-P., Yang, L.-P., *et al.* (2018) Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* *160*: 257–264.
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., *et al.* (2015) Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *mBio* *6*: e00300-15.
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., *et al.* (2013) *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* *16*: 255–261.
- Miravet-Verde, S., Ferrar, T., Espadas-García, G., Mazzolini, R., Gharrab, A., Sabido, E., *et al.* (2019) Unraveling the hidden universe of small proteins in bacterial genomes. *Mol Syst Biol* *15*: e8290.
- Mirouze, N., Bidnenko, E., Noirod, P., and Auger, S. (2015) Genome-wide mapping of TnrA-binding sites provides new insights into the TnrA regulon in *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen* *4*: 423–435.
- Mirsepasi-Lauridsen, H.C., Vrankx, K., Engberg, J., Friis-Møller, A., Brynskov, J., Nordgaard-Lassen, I., *et al.* (2018) Disease-specific enteric microbiome dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Front Med (Lausanne)* *5*: 304.
- Mongkolsuk, S., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol Microbiol* *45*: 9–15.
- Mukhopadhyay, D., Sen, U., Zapf, J., and Varughese, K.I. (2004) Metals in the sporulation phosphorelay: manganese binding by the response regulator Spo0F. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *60*: 638–645.
- Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S., Kudo, T., *et al.* (2004) Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Mol Microbiol* *52*: 273–283.
- Newton, G.L., Rawat, M., La Clair, J.J., Jothivasan, V.K., Budiarto, T., Hamilton, C.J., *et al.* (2009) Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* *5*: 625–627.
- Nikolic, M.V., Vasiljevic, Z.Z., Auger, S., and Vidic, J. (2021) Metal oxide nanoparticles for safe active and intelligent food packaging. *Trends in Food Science & Technology* *116*: 655–668.

- Ogura, M. (2011) ZnuABC and ZosA zinc transporters are differently involved in competence development in *Bacillus subtilis*. *J Biochem* 150: 615–625.
- Oikonomou, G., Teixeira, A.G.V., Foditsch, C., Bicalho, M.L., Machado, V.S., and Bicalho, R.C. (2013) Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. *PLoS One* 8: e63157.
- Ollinger, J., Song, K.-B., Antelmann, H., Hecker, M., and Helmann, J.D. (2006) Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 3664–3673.
- Omasits, U., Varadarajan, A.R., Schmid, M., Goetze, S., Melidis, D., Bourqui, M., *et al.* (2017) An integrative strategy to identify the entire protein coding potential of prokaryotic genomes by proteogenomics. *Genome Res* 27: 2083–2095.
- Orr, M.W., Mao, Y., Storz, G., and Qian, S.-B. (2020) Alternative ORFs and small ORFs: shedding light on the dark proteome. *Nucleic Acids Res* 48: 1029–1042.
- Panina, E.M., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2003) Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9912–9917.
- Paruthiyil, S., Pinochet-Barros, A., Huang, X., and Helmann, J.D. (2020) *Bacillus subtilis* TerC family proteins help prevent manganese intoxication. *J Bacteriol* 202: e00624-19.
- Pelchovich, G., Omer-Bendori, S., and Gophna, U. (2013) Menaquinone and iron are essential for complex colony development in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 8: e79488.
- Petruschke, H., Anders, J., Stadler, P.F., Jehmlich, N., and Bergen, M. von (2020) Enrichment and identification of small proteins in a simplified human gut microbiome. *J Proteomics* 213: 103604.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Que, Q., and Helmann, J.D. (2000) Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* 35: 1454–1468.
- Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., *et al.* (2016a) Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65: 415–425.
- Quévrain, E., Maubert, M.-A., Sokol, H., Devreese, B., and Seksik, P. (2016b) The presence of the anti-inflammatory protein MAM, from *Faecalibacterium prausnitzii*, in the intestinal ecosystem. *Gut* 65: 882.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229–241.

Randazzo, P., Anba-Mondoloni, J., Aubert-Frambourg, A., Guillot, A., Pechoux, C., Vidic, J., and Auger, S. (2020) *Bacillus subtilis* regulators MntR and Zur participate in redox cycling, antibiotic sensitivity, and cell wall plasticity. *J Bacteriol* 202: e00547-19.

Randazzo, P., Aubert-Frambourg, A., Guillot, A., and Auger, S. (2016) The MarR-like protein PchR (YvmB) regulates expression of genes involved in pulcherriminic acid biosynthesis and in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol* 16: 190.

Randazzo, P., Aucouturier, A., Delumeau, O., and Auger, S. (2017) Revisiting the in vivo GlnR-binding sites at the genome scale in *Bacillus subtilis*. *BMC Res Notes* 10: 422.

Rigottier-Gois, L. (2013) Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J* 7: 1256–1261.

Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S.H., Flint, H.J., and Reyes-Gavilan, C.G. de los (2015) Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiol Lett* 362: fnv176.

Sadabad, M.S., Khan, M.T., Diji, J.M. van, and 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 *In* Sadaghian, M. Interaction between the gut and its microbiota in inflammatory bowel disease. University of Groningen.

Sakamoto M, Sakurai N, Tanno H, Iino T, Ohkuma M, Endo A. 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. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2022 Apr;72(4).

Sankaran, B., Bonnett, S.A., Shah, K., Gabriel, S., Reddy, R., Schimmel, P., *et al.* (2009) Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. *J Bacteriol* 191: 6936–6949.

Sauguet, L., Moutiez, M., Li, Y., Belin, P., Seguin, J., Le Du, M.-H., *et al.* (2011) Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Nucleic Acids Res* 39: 4475–4489.

Sberro, H., Fremin, B.J., Zlitni, S., Edfors, F., Greenfield, N., Snyder, M.P., *et al.* (2019) Large-scale analyses of human microbiomes reveal thousands of small, novel genes. *Cell* 178: 1245-1259.e14.

Seril, D.N., Liao, J., Yang, G.-Y., and Yang, C.S. (2003) Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 24: 353–362.

Shemesh, M., and Chai, Y. (2013) A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *J Bacteriol* 195: 2747–2754.

Smaldone, G.T., Antelmann, H., Gaballa, A., and Helmann, J.D. (2012a) The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* *lutABC* iron-sulfur-containing oxidases. *J Bacteriol* 194: 2586–2593.

Smaldone, G.T., Revelles, O., Gaballa, A., Sauer, U., Antelmann, H., and Helmann, J.D. (2012b) A global investigation of the *Bacillus subtilis* iron-sparing response identifies major changes in metabolism. *J Bacteriol* 194: 2594–2605.

- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., *et al.* (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16731–16736.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., *et al.* (2009) Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15: 1183–1189.
- Song, H., Yoo, Y., Hwang, J., Na, Y.-C., and Kim, H.S. (2016) *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 137: 852–860.
- Stadtman, E.R., and Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207–218.
- Storz, G., Wolf, Y.I., and Ramamurthi, K.S. (2014) Small proteins can no longer be ignored. *Annu Rev Biochem* 83: 753–777.
- Suarez (2006) The small regulatory RNA S313 of *Bacillus subtilis* is a positive regulator of the EfeUOB iron transport. Bacell Meeting.
- Suzuki, A., and Knaff, D.B. (2005) Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynth Res* 83: 191–217.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., *et al.* (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 44: 6614–6624.
- Teh, A.H., Makino, M., Hoshino, T., Baba, S., Shimizu, N., Yamamoto, M., and Kumasaka, T. (2015) Structure of the RsbX phosphatase involved in the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71: 1392–1399.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., and Roy, N.C. (2011) Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr* 141: 769–776.
- Vasiljevic, Z.Z., Dojcinovic, M.P., Krstic, J.B., Ribic, V., Tadic, N.B., Ognjanovic, M., *et al.* (2020) Synthesis and antibacterial activity of iron manganite (FeMnO₃) particles against the environmental bacterium *Bacillus subtilis*. *RSC Adv* 10: 13879–13888.
- Wang, C.Y., Medlin, J.S., Nguyen, D.R., Disbennett, W.M., and Dawid, S. (2020a) Molecular determinants of substrate selectivity of a Pneumococcal Rgg-regulated peptidase-containing ABC transporter. *mBio* 11: e02502-19.
- Wang, L., Alammari, N., Singh, R., Nanavati, J., Song, Y., Chaudhary, R., and Mullin, G.E. (2020b) Gut-microbial dysbiosis in the irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *J Acad Nutr Diet* 120: 565–586.
- Watabe, K., and Freese, E. (1979) Purification and properties of the manganese-dependent phosphoglycerate mutase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 137: 773–778.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., *et al.* (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 Biol* 11: 61.

Zhang, X., Deeke, S.A., Ning, Z., Starr, A.E., Butcher, J., Li, J., *et al.* (2018) Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 9: 2873.

Zou, Y., Lin, X., Xue, W., Tuo, L., Chen, M.-S., Chen, X.-H., *et al.* (2021) Characterization and description of *Faecalibacterium butyricigenerans* sp. nov. and *F. longum* sp. nov., isolated from human faeces. *Sci Rep* 11: 11340.