

Rôle de l'hème dans la primo-colonisation de *Bacteroides thetaiotaomicron* dans le tractus digestif.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°581 ABIES
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé
Spécialité de doctorat: Microbiologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy en Josas, le 08 novembre 2017, par

David HALPERN

Composition du Jury :

Pr Claire JANOIR-JOUVESHOMME

Univ. Paris Sud – UFR Pharmacie – Bactéries Pathogènes et Santé Présidente

Pr Claire POYART

Institut Cochin – Centre National de Référence des Streptocoques Rapporteur

Dr Patricia MARTIN

INSERM – Institut de Recherche en Santé Digestive Rapporteur

Pr Claire JANOIR-JOUVESHOMME

Univ. Paris Sud – UFR Pharmacie – Bactéries Pathogènes et Santé Examinatrice

Pr Jean-Marc GHIGO

Institut Pasteur – Génétique des Biofilms Examineur

Dr Alexandra GRUSS

INRA – Institut MICALIS Directrice de thèse

*A Charlotte,
Benjamin
& Ciarán*

"I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work."
Thomas Edison

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Claire JANOIR-JOUVESHOMME, Claire POYART, Patricia MARTIN et Jean-Marc GHIGO d'avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps qu'ils ont passé à l'évaluation de mes travaux.

De même un grand merci à Marion LECLERC et à Jean-Marc GHIGO qui ont bien voulu participer à mon comité de thèse. Leurs questions et leurs remarques ont grandement fait avancer ce sujet.

Sandy, tu sais tout le bien que je pense de toi depuis toutes ces années, et pas seulement pour tes cookies... Si j'en suis là aujourd'hui c'est que tu n'as cessé de me pousser pour que je ne me complaise pas dans une petite routine tiède et confortable et que sans cesse j'essaie d'aller voir un peu plus loin s'il y n'a pas quelque chose de vraiment trop « fun » derrière une manip. Ta patience et ta mansuétude à mon égard ont été des soutiens de poids durant mes moments de doute (et ils ont été nombreux) et ta persévérance a permis de surmonter les obstacles infranchissables qui se dressaient devant moi. Depuis nos discussions à Jussieu et les sorties théâtre d'avant-garde jusqu'au dernier BBQ avec Philippe, tu as toujours accepté ce que j'étais et je t'en remercie. Alors malgré ton mauvais caractère et à condition que tu cesses de corriger mon français, j'aimerais bien qu'on continue encore un peu notre excursion scientifique tous les deux.

Tout comme Sandy, je voudrais te remercier Meriem de m'avoir aussi supporté toutes ces années. C'est avec toi que j'ai appris à regarder plus loin que ma paillasse et même si tu n'as pas eu la chance de m'avoir à mes meilleurs moments c'était quand même vraiment bien de bosser à tes côtés.

Ce travail, je ne l'ai pas fait seul et j'ai eu la chance d'avoir autour de moi des collègues et des amis qui ont accepté de prendre du temps pour m'aider, pour discuter, pour me pousser et pour faire avancer mon sujet.

Alors un grand merci à Sylvie RABOT pour la plate-forme ANAXEM, pour toutes nos discussions et tous les conseils. L'ensemble du travail sur les souris axéniques n'aurait pas pu se faire sans l'aide ô combien précieuse d'Anne, Fatima et Claire. De même un grand merci à Luis et Florian pour le modèle conventionnel.

Toute ma gratitude à Aurélie, Claire et Mélanie qui ont accepté de sacrifier leurs nuits pour prélever des crottes de souris en isolateurs et étaler des boîtes en chambre de Freter (activité palpitante s'il en est...). Je sais que sans vous je n'aurais jamais réussi à tenir le coup et toute une partie de ce travail n'existerait pas.

Merci à Thierry de la plate-forme MIMA2 pour les photos et les heures passées à faire les allers-retours entre le MEB et la cafetière...

Un grand merci à tous ceux qui ont pris du temps pour discuter de mon travail, me poser les bonnes questions et apporter une lecture critique à mes résultats. Je pense en particulier à Tatiana, Sylvie, Marion, Claire, Elise, Karine, Pascale, Francis et mon Philou, ainsi qu'à mes deux bactériologistes purs et durs Chantal et Jean-François. Et une mention spéciale à Framboise, Francis, Karine, Claire et Amit qui ont supporté ma présence, mon mauvais caractère, l'odeur de nouilles japonaises lyophilisées tous les midis et partagé leur bureau avec moi ces dernières années.

Je ne peux que rendre hommage à mon commando de choc de relecture de manuscrit, Tatiana, Claire, Karine, Sandy, Anne-Elisabeth et Patricia qui ont passé de très nombreuses heures à traquer les fautes, les coquilles, les oublis, les approximations, les incohérences, les imprécisions et les erreurs. S'il en reste, et il en reste sûrement, c'est que j'ai raté leurs remarques...

Et puis la canicule de 2003 m'a permis, grâce à la présence d'une clim dans mon labo, de lancer la section musique sur le centre. La liste de tous ceux qui sont passés par cette structure est bien longue, aussi je ne me risquerais pas de faire un décompte exhaustif de tous les musiciens que j'ai croisé depuis cette date. Mais je les remercie tous d'avoir participé à ce projet qui me tenait à cœur. Je veux juste citer tous ceux que je côtoie aujourd'hui et qui durant toute la durée de ma thèse ont grandement contribué à mon équilibre et à mon bien-être journalier. Alors merci mon petit Ragondin poilu, mon Lapaing' (parce que ça rime avec parpaing), ma Grande Poulette, Little Cee and the guy from Massachussetts, merci Waloooooo, Biquet, mon Pierrot et le petit Keith, merci ma Grenouille, merci Elisabeth et Momar. Et même s'ils ne traînent pas ici, un grand merci à mon Gillou d'amour et à nos morceaux de bois, ainsi qu'à François, le seul batteur introverti de Villebon (et sa banlieue).

Enfin, je voudrais remercier mon père pour m'avoir montré depuis mon enfance combien la science était quelque chose de merveilleux et d'exigeant et je regrette qu'il n'ait pu assister à l'accomplissement de ce travail, ma mère pour m'avoir montré que la science c'est bien beau mais il n'y a pas que ça dans la vie et ma sœur pour avoir toujours pensé que son petit frère était génial (je pense qu'elle boit en cachette...)

Je remercie également Marie et Hervé, qui, bien que biochimistes tous les deux, ont suivi mes travaux avec un enthousiasme communicatif !

Et pour finir, merci à Tatiana... pour tout...

Avant-propos

Ce manuscrit traite d'un travail portant sur l'implantation dans le tractus digestif humain de *Bacteroides thetaiotaomicron*, bactérie essentielle au sein du microbiote intestinal, et particulièrement sur un des facteurs susceptibles de moduler son implantation lors de la primo-colonisation de l'intestin du nouveau-né, l'hème.

Le microbiote intestinal, cet ensemble de micro-organismes colonisant le tractus digestif, est considéré comme un organe à part entière et son équilibre est un point devenu critique pour la santé humaine. Il y a plus de 2000 ans Hippocrate disait « *Toute maladie commence dans l'intestin* », aujourd'hui l'étude de cet organe et la compréhension de son fonctionnement sont la clé des traitements médicaux de demain. Dans cet écosystème complexe composé de 10^{13} bactéries et dont l'équilibre semble être essentiel à son bon fonctionnement, les bactéries du genre *Bacteroides* jouent un rôle primordial dans la digestion des aliments et plus particulièrement dans celle des fibres végétales. Pouvant représenter jusqu'à 40 % de la quantité totale des bactéries intestinales, leur importance numérique ainsi que fonctionnelle font des *Bacteroides* une composante majeure du microbiote intestinal. Cette prépondérance est assurée par les nombreux mécanismes qu'ils ont dû développer pour s'adapter à leur environnement, par exemple dans le domaine de l'utilisation des glucides complexes et dans celui de la résistance à l'oxygène.

Mais il est un aspect où, loin d'être auto-suffisant, *Bacteroides* s'est entièrement reposé sur son environnement, c'est celui de l'acquisition de l'hème. Cette molécule contenant un atome de fer fixé sur une porphyrine, noyau organique cyclique, est un cofacteur impliqué entre autres dans le transport de l'oxygène. L'hème intervient dans de nombreux processus enzymatiques et c'est un facteur essentiel à la croissance des *Bacteroides*. Pourtant ces derniers sont incapables de le synthétiser. Nous avons donc caractérisé les interactions entre la bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron* et l'hème présent dans son environnement et étudié comment cette molécule influait sur son implantation dans le tractus digestif.

Pour mener à bien ces travaux, nous avons utilisé un modèle de souris axéniques, animaux totalement dépourvus de micro-organismes, permettant, entre autres, de suivre de manière

contrôlée l'implantation d'espèces bactériennes dans le tractus digestif. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence la source d'hème utilisée par *Bacteroides thetaiotaomicron* durant son implantation. Nous avons également montré l'influence d'une bactérie primo-colonisatrice de l'intestin, *Escherichia coli*, sur l'implantation de *B. thetaiotaomicron*. Enfin, nous avons mis en évidence les effets engendrés par une modulation de la quantité d'hème dans le tractus digestif. Ces travaux ont aussi permis de développer un système de dosage de l'hème adapté à des échantillons complexes.

Nous allons dans l'introduction bibliographique tout d'abord définir le microbiote et ses caractéristiques, telles que sa composition, son fonctionnement, ses dysfonctionnements ainsi que son établissement au début de la vie. Puis nous présenterons les espèces du genre *Bacteroides*, et plus particulièrement les caractéristiques de l'espèce étudiée ici, *B. thetaiotaomicron*. Nous développerons enfin le rôle joué par le fer et l'hème aussi bien au niveau bactérien qu'au niveau de l'hôte.

Table des matières

Avant-propos	1
Table des matières	3
Index des figures	5
I – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
A – Le microbiote intestinal : de sa découverte à la mise en évidence de son essentialité dans la santé humaine	13
1) Les premières descriptions	13
2) La composition du microbiote	17
3) Les fonctions majeures du microbiote intestinal	20
3-1) Digestion	20
3-2) Aide au développement du tractus digestif	21
3-3) Protection contre les pathogènes, liée ou non à la fonction immunitaire	22
3-4) Autres fonctions	24
4) Pathologies associées à la dysbiose	25
4-1) Maladies inflammatoires du tractus digestif	25
4-2) Obésité	26
4-3) Diabète de type 2	28
4-4) Maladies cardio-vasculaires	28
4-5) Cancer colorectal	29
4-6) Allergies	30
4-7) Stress	31
4-8) Axe microbiote/cerveau	32
B) - Implantation du microbiote intestinal	34
1) Cinétique de l'implantation	36
2) Paramètres influant sur l'implantation	39
C) – <i>Bacteroides</i>, une référence de l'adaptation bactérienne dans le tractus intestinal	43
1) Les <i>Bacteroides</i>	43
2) Physiologie des <i>Bacteroides</i>	45
2-1) Utilisation des glucides complexes	45
2-2) Respiration et anaérobiose	49
3) Pathogénie des espèces du genre <i>Bacteroides</i>	57
3-1) Capsule bactérienne et formation d'abcès	58
3-2) Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire	58
3-3) Enzymes impliquées dans la virulence et entérotoxines	59
3-4) Co-infections	60
D) – Le fer et l'hème chez les <i>Bacteroides</i>	62
1) Rôles et structures	62
1-1) Le fer	62
1-2) L'hème	63
1-3) Mécanismes de résistances liés à la toxicité de l'hème	64
2) Biosynthèse et acquisition du fer et de l'hème	66
2-1) Biosynthèse de l'hème	66
2-2) L'acquisition du fer chez les bactéries	69
2-3) L'acquisition de l'hème chez les bactéries	74
2-4) Le système has	77
3) Besoin en porphyrines de <i>B. thetaiotaomicron</i>	79

E) - Le fer et l'hème chez l'hôte	81
1) Transit du fer et de l'hème dans le tractus digestif	81
2) Dégradation et recyclage de l'hème par l'hôte	83
3) Importance de l'homéostasie du fer	83
4) Toxicité de l'hème et cancérogénèse	85
F) – Méthodes de détection de l'hème	87
II – AUXOTROPHIE POUR L'HEME DE <i>B. THETAIOAOMICRON</i> COMME BASE D'UN TEST SENSIBLE DE DETECTION DE L'HEME EN MILIEU COMPLEXE	93
Présentation	93
Conclusions	94
III – DISPONIBILITE DE L'HEME LORS DE L'IMPLANTATION DE <i>B. THETAIOAOMICRON</i> DANS LE TRACTUS DIGESTIF EN MODELE DE SOURIS AXENIQUES	95
A - Origine de l'hème dans le tractus digestif	95
1) Observations préliminaires	96
2) Implantation de <i>B. thetaiotaomicron</i> en monoxénie	99
3) Impact d' <i>E. coli</i> sur l'implantation de <i>B. thetaiotaomicron</i>	101
4) Importance de la consommation d'oxygène et des quantités d'hème apportées par <i>E. coli</i> sur la cinétique d'implantation de <i>B. thetaiotaomicron</i>	103
Conclusions	110
B – Qu'en est-il chez l'homme ? L'hème dans les méconiums de nouveau-nés.	111
1) – Quantité d'hème dans le tractus digestif des nouveau-nés	111
2) – Peut-on corrélérer la quantité d'hème dans les fèces et la présence d'espèces bactériennes dans le tractus digestif ?	114
Conclusions	114
IV – MODULATION DU TAUX D'HEME DANS LE TRACTUS DIGESTIF.	115
A) – Hème-oxygénase	116
B) – Séquestration de l'hème par le système Has, Heme Acquisition System	119
V – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	127
VI – MATERIELS ET METHODES	133
A – Souches et conditions de culture.	133
B – Test HPS	134
C – Traitement d'image	135
D – Expérimentation animale	137
E – Microscopie électronique	137
F – Induction de l'hème oxygénase dans le système <i>L. lactis in vitro</i>	138
VII – ANNEXE.	139
VIII – BIBLIOGRAPHIE	141

Index des figures

- Figure 1 : Planche d'observation (1) d'un méconium de nouveau-né de 27 heures et (2) d'un enfant de deux mois. (Escherich, T. 1885). 13
- Figure 2 : Evolution du nombre de microorganismes caractérisés issus du microbiote et cultivable. La flèche 1 indique le premier isolement, la 2 l'introduction des techniques strictes d'anaérobiose et la 3 l'arrivée des techniques moléculaires. (Rajilic-Stojanovic, M & De Vos, W. 2014). 15
- Figure 3 : Abondance relative des six phyla principaux dans les différents microbiotes présents chez l'humain en bonne santé. (Spor, A. *et al.* 2011). 17
- Figure 4 : Abondance relative, dans une cohorte de 39 individus, et variabilité interindividuelle des trente genres les plus fréquemment retrouvés dans le microbiote intestinal humain. Les couleurs sont à rapporter au phylum respectif de chaque genre. (Arumugam, M. *et al.* 2011). 19
- Figure 5 : Exemples de métabolites produits dans le tractus digestif par le microbiote pendant la digestion et transportés vers différents organes. (Holmes, E. *et al.* 2012). 21
- Figure 6 : Coupes de côlon de souris axénique à gauche et conventionnelle à droite. (Cherbuy, C. *et al.* 2010). 22
- Figure 7 : Rareté des cellules sécrétrices d'IgA dans les animaux axéniques au niveau de l'intestin grêle. A : souris axénique, B : souris conventionnalisée. (MacPherson, A.J. *et al.* 2001). 23
- Figure 8 : Répartition d'espèces bactériennes dans le cas de maladie de Crohn (gauche), de colite (milieu) et du syndrome du côlon irritable (droite). Marquage in situ en fluorescence (FISH) avec en jaune (Cy3), *Bacteroides fragilis*, en rouge (Cy5), *Eubacterium rectale* et en vert (FITC), les autres bactéries. (Swidsinski, A. *et al.* 2005). 26
- Figure 9 : Interactions entre le régime alimentaire, le microbiote et l'hôte dans le cas du syndrome métabolique. En rouge les régimes riches en graisses et en bleu ceux riches en fibres. (SCFA : Short Chain Fatty Acids). (Woting, A & Blaut, M. 2016). 27
- Figure 10 : Mécanismes de cancérisation liés aux phénomènes inflammatoires et aux effets génotoxiques de certains métabolites bactériens (ROS : Reactive Oxygen Species, NOC : N-nitroso Compounds, IL : Interleukines, TNF Tumour Necrosis Factor). (D'après Louis, P. *et al.* 2014). 30
- Figure 11 : Evolution du taux de *B. thetaiotaomicron* chez trois astronautes en entraînement dans le laboratoire Skylab en fonction du temps. (Holdeman, LV. *et al.* 1976). 31
- Figure 12 : Modèle de translocation bactérienne du tractus digestif maternel vers le fœtus via les cellules dendritiques. Le passage entre le système circulatoire et le liquide amniotique n'est pas encore parfaitement connu. (Stinson, L.F. *et al.* 2016). 34
- Figure 13 : Prévalence et abondance relatives d'espèces représentatives de différents microbiotes chez l'humain (Aagaard *et al.*, 2014). 35
- Figure 14 : Modification de l'équilibre des populations bactériennes dans le tractus digestif humain en fonction de l'âge. (Mitsuoka, T. 1996). 36
- Figure 15 : Séquences d'apparition des principales espèces bactériennes durant les 7 premiers jours de la vie. (Mitsuoka, T. 2014). 37
- Figure 16 : Cinétique d'implantation et abondance relative des principales familles bactériennes durant la première année suivant la naissance sur une cohorte de 14 nouveau-nés. (Palmer, C. *et al.* 2007). 38
- Figure 17 : Facteurs influant sur le microbiote intestinal de l'enfant. Les flèches vertes indiquent un effet plutôt positif, les rouges, un impact plutôt négatif. (D'après Matamoros, S. *et al.* 2013, Koenig, J.E. *et al.* 2010, Adlerberth, I. *et al.* 2006) 40

Figure 18 : Classification des <i>Bacteroides</i>	43
Figure 19 : <i>B. thetaiotaomicron</i> sous microscope électronique à balayage. Grossissement x 10000. (Photo D. Halpern & T. Meylheuc – MIMA2 – INRA).	44
Figure 20 : Organisation de l'opéron <i>sus</i> (Starch Utilisation System). OMP-SB : Outer Membrane Protein - Starch Binding. (D'après Xu, J. <i>et al.</i> 2003 & Reeves, A.R. <i>et al.</i> 1996).	46
Figure 21 : Fonctionnement du système <i>sus</i> chez <i>B. thetaiotaomicron</i> (D'après Foley, M.H. <i>et al.</i> 2016).	47
Figure 22 : Modèle général de chaîne respiratoire membranaire. (D'après Palmer, M. Univ. Waterloo, Canada. http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/RespiratoryChain.html).	49
Figure 23 : Schéma simplifié de la voie de fermentation du glucose chez <i>B. thetaiotaomicron</i> . Les produits majoritairement excrétés sont encadrés. (D'après Pan, N. & Imlay J.A. 2001).	51
Figure 24 : Effet de l'expression du gène <i>frdC</i> combiné ou non à l'ajout de fumarate sur la production de ROS chez <i>B. fragilis</i> (Meehan and Malamy, 2012)	52
Figure 25 : Respiration anaérobie chez <i>Bacteroides</i> via la fumarate réductase. D'après The BioCyc database, Caspi, R. <i>et al.</i> 2014.	52
Figure 26 : Prise en charge de l'ion superoxyde dans les cellules.	53
Figure 27 : Efficacité d'étalement des souches de <i>fragilis</i> en présence de quantités croissantes d'oxygène. Wt : souche sauvage, Δ oxe : mutant, Δ oxe/oxe+ : mutant complémenté. D'après Meehan, B.M. <i>et al.</i> 2012.	55
Figure 28 : Effets des sphingolipides sur la survie en phase stationnaire de <i>B. fragilis</i> (A) et sur sa survie après un stress (B). Les souches sauvages produisant des sphingolipides (en orange) ont une survie améliorée de près de 6 log en trois jours et demi par rapport aux souches cultivées en présence de myriocine (en bleu), inhibiteur de la synthèse des sphingolipides. De même lorsque la souche est soumise à un stress, dans ce cas thermique (passage à 42°C) et oxydant (culture à l'air durant 14 heures), la synthèse de sphingolipides permet une survie améliorée de 2 log. (An, D. <i>et al.</i> 2011).	56
Figure 29 : Représentation des principaux genres bactériens retrouvés dans des bactériémies à bactéries à Gram négatif (A) (d'après (Goldstein, 1996)), et représentation des différentes familles de <i>Bacteroides</i> retrouvées dans les infections (B) (Wexler, 2007).	57
Figure 30 : Modèles d'expression différenciée de gènes par recombinaisons entre IR et inversion de fragments de chromosome portant les séquences promotrices chez <i>B. fragilis</i> . Les triangles rouges représentent les IR, les triangles avec une étoile sont les IR qui recombinent dans les fragments à trois IR. Dans les cas 1 et 2, une simple inversion de la séquence promotrice va allumer ou éteindre l'expression du ou des gènes suivants. Les cas 3 et 4 sont du même ordre mais avec en plus une petite séquence codante qui lors de l'inversion va aller modifier la partie N-terminale du gène dont l'expression va être modifiée. La position de l'IR dans le cas 5 entraîne l'apparition de protéines à la partie C-terminale modifiée. Dans la situation 6, il y a simplement modification de l'ordre des gènes d'un opéron et donc expression de l'une ou l'autre des petites protéines codées dans la région inversée. Et dans les cas 7, 8 et 9, la présence de trois IR va permettre de multiplier les possibilités en recombinant deux à deux ou les trois à la fois. (D'après Kuwahara, T. <i>et al.</i> 2004).	59
Figure 31 : Nombre de <i>B. fragilis</i> (en violet) ou de <i>E. coli</i> (en bleu) en log d'ufc, dans des abcès induits soit par les bactéries seules soit en co-infections. (Brook, I. 1985).	61
Figure 32 : Structure chimique du noyau pyrrole, de la PPIX et de l'hème.	63
Figure 33 : Mécanismes impliqués dans le maintien du redox intracellulaire et de l'homéostasie du fer chez <i>B. fragilis</i> . (D'après Rocha E.R. & Smith, C.J. 2013).	64
Figure 34 : Voie générale de la biosynthèse de l'hème. On entend par hème en fin de voie, l'hème b ou protohème. D'après KEGG – Kanehisa, M. 1997. La nomenclature est celle utilisée chez <i>E. coli</i> . Il existe également un homologue fonctionnel à <i>hemY</i> et <i>hemG</i> chez certains <i>Bacteroidetes</i> , <i>hemJ</i> (Kato <i>et al.</i> , 2010).	67
Figure 35 : Gènes de la chaîne de biosynthèse de l'hème présents chez <i>B. thetaiotaomicron</i> .	68

- Figure 36 : Principales familles et différents exemples de sidérophores. (Miethke, 2013). 69
- Figure 37 : Acquisition du fer *via* la voie porines/FeoB ou MntH chez les bactéries à Gram négatif. Les fonctions de FeoA et FeoC sont encore mal connues mais relèvent probablement pour FeoA d'une activité de cofacteur de FeoB, et pour FeoC de l'activation transcriptionnelle de l'opéron codant le système. D'après (Hantke, 2003; Lau *et al.*, 2016). 70
- Figure 38 : Schéma général d'entrée du fer dans les bactéries à Gram négatif, *via* la transferrine, les sidérophores. D'après (Lau *et al.*, 2016). 71
- Figure 39 : Systèmes d'import du fer chez *S. aureus* via des sidérophores. *S. aureus* produit 2 sidérophores, les staphyloferrin A et B. La A utilise le système d'import HtsABC et la B le système SirABC. HtsA et SirA sont les récepteurs et la translocation à travers la membrane se fait *via* les perméases HtsBC et SirBC. *S. aureus* est également capable d'utiliser des xénosidérophores qui sont alors pris en charge par le système FhuBGD. Dans tous les cas, les systèmes sont énergisés par l'ATPase FhuC. (D'après (Hammer and Skaar, 2011)). 72
- Figure 40 : Représentation schématique du système de régulation Fur. En présence de fer, les dimères de la protéine Fur se fixent sur des séquences palindromiques (Fur box, en rouge) placées généralement entre les boîtes -35 et -10 de la séquence promotrice des gènes régulés. Cette fixation réprime la transcription de ces gènes. En carence en fer, la forme apo-Fur se détache de la Fur box et la répression est levée permettant l'expression des gènes. (Andrews *et al.*, 2003). 73
- Figure 41 : Schéma général de l'import d'hème dans la cellule via un hémophore chez les bactéries à Gram négatif. D'après (Lau *et al.*, 2016). 75
- Figure 42 : Système d'import de l'hème chez *S. aureus*. Le système Isd est composé de protéines sécrétées et ancrées dans la paroi, IsdB et IsdH, qui fixent l'hémoglobine, récupèrent l'hème et le transportent *via* IsdA et IsdC jusqu'à la membrane. L'hème est alors fixé sur une lipoprotéine IsdE et transféré dans le cytoplasme *via* une perméase à hème IsdDF. Une fois internalisé, l'hème est dégradé par les protéines IsdG et IsdL libérant ainsi le fer. D'après (Ascenzi *et al.*, 2015). 76
- Figure 43 : Organisation génétique du système Has chez *Serratia marcescens*. Les triangles rouges indiquent la position des deux boîtes *fur*. D'après Ghigo, J.M. *et al.* 1997. 77
- Figure 44 : Schéma de fonctionnement du système d'import d'hème de *S. marcescens*. (D'après Ghigo, J.M. *et al.* 1997, Rossi, M.S. *et al.* 2003). 78
- Figure 45 : Effet de l'hème comme additif sur la DO finale d'une culture de *B. melaninogenicus* au bout de cinq jours (Gibbons and Macdonald, 1960). 79
- Figure 46 : Croissance de *B. fragilis* dans un milieu complet (1), dans un milieu carencé en acides gras volatiles (3), en vitamines B (5), en casitone (4) et en hème (2). (Varel, V.H. and Bryant, M.P. 1974). 80
- Figure 47 : Modèle de gestion du pool de fer et d'hème dans les entérocytes. (D'après Oates, P.S. & West, A.R. 2006). Le transporteur DMT1 et la ferroportine assurent la régulation de l'absorption du fer au niveau intestinal. L'entérocyte assurant un rôle de tampon. Le fer passant dans le plasma va permettre entre autres au transport d'oxygène (70 à 80 % du fer chez l'homme). 82
- Figure 48 : Schéma général de la dégradation de l'hème par l'hème oxygénase chez les eucaryotes. D'après The BioCyc database, (Caspi, R. *et al.* 2014). 83
- Figure 49 : Cinétique d'hémolyse induite d'hématies humaines par l'hémine à différentes concentrations (en μM). (Kirschner-Zilber *et al.*, 1982) 84
- Figure 50 : Viabilité cellulaire et dommages induits sur l'ADN par l'hémine (D'après (Glei *et al.*, 2006)). 85
- Figure 51 : Système senseur d'hème chez *L. lactis* MG1663. A : organisation de l'opéron *hrtRBA*, B : fonctionnement du système Hrt. D'après (Lechardeur *et al.*, 2012). 89
- Figure 52 : Test HPS sur les deux souches de *E. coli* utilisées pour les gavages. On notera la présence du halo de stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* autour de la souche WT et son absence autour de la souche *tolC*. 96

- Figure 53 : Comptage des ufc (unité formant colonie) de *B. thetaiotaomicron* en mélange avec différentes souches d'*E. coli* après implantation dans le tractus digestif de souris axénique. En A : médiane des valeurs en fonction du temps. En B : dispersion des valeurs d'implantation selon les souches bactériennes. Les comptages correspondent aux numérations des souches indiquées sur la première ligne de l'axe des x. 97
- Figure 54 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris axéniques. Les ufc sont déterminées à partir des fèces des souris prélevés toutes les 4 heures. En orange, lorsque le gavage se fait avec 10^3 ufc et en bleu lorsqu'il est fait avec 10^4 ufc. Chaque point représente la médiane sur 6 souris. 99
- Figure 55 : Suivi de l'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris préalablement colonisées par *E. coli* (en rouge) ou non (en orange). En A : les médianes et en B : la dispersion des valeurs d'implantation. Les valeurs correspondent aux ufc par gramme de fèces. 102
- Figure 56 : Consommation de l'oxygène dissous dans un milieu de culture par *E. coli* WT ou par le mutant *hemA*. Sans hème le mutant n'est pas capable de respirer et ne consomme pas l'oxygène présent. La courbe PBS est le témoin sans bactérie. Les mesures sont faites selon le protocole décrit par (Yamamoto et al., 2005) à l'aide d'une électrode à O_2 - Liquid-Phase Oxygen electrode unit DW1, Hansatech instruments, UK. 103
- Figure 57 : Stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* en test HPS et mesure des densités intégrées des aires de stimulation. Les échantillons sont des surnageants de culture des souches d'*E. coli* WT, *hemA* et surproductrice pA+. 104
- Figure 58 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris. En A : suivi des médianes et en B : dispersion des valeurs. En orange, *Bt* seul ne s'implante pas. En rouge *Bt* est implanté avec la souche d'*E. coli* wt, en violet avec la souche *hemA* et en vert avec la souche portant le plasmide pA+ 105
- Figure 59 : Co-colonisation du tractus digestif par *Bt* et *Ec*. En A, les comptages bactériens d'échantillons de contenu intestinal prélevés dans divers segments de l'intestin. En B, observation en microscopie à balayage de la co-localisation des deux espèces à partir des contenus intestinaux de souris bi-colonisées (Photo D. Halpern & T. Meylheuc – MIMA2 – INRA). 107
- Figure 60 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris. En A : suivi des médianes et en B : dispersion des valeurs. Avec un inoculum de 10^4 ufc, *Bt* en monoxénie, en orange, s'implante. En rouge *Bt* est implanté avec la souche d'*E. coli* wt, en violet avec la souche *hemA*. 109
- Figure 61 : Aspect des suspensions de méconium avant test HPS. Les échantillons présentent une très grande hétérogénéité tant au niveau de leur couleur qu'au niveau de leur consistance. 111
- Figure 62 : Echantillons de méconium en test HPS. Les histogrammes représentent la densité intégrée des aires (int. Dens.), pour chaque échantillon, mesurées sur les photos avec ImageJ. H = hème $1 \mu M$. 112
- Figure 63 : dégradation de l'hème en biliverdine par l'hème-oxygénase (HO) 116
- Figure 64 : Test HPS et mesure de l'intensité intégrée des aires de stimulation, sur des surnageants de culture portant ou non l'hème-oxygénase. pHO : plasmide portant l'hème oxygénase. p \emptyset : plasmide contrôle vide. Les cultures sont faites en présence d'hème à 1 ou $10 \mu M$ (H1 & H10) et le témoin est composé de $20 \mu M$ d'hème. 117
- Figure 65 : Stimulation moyenne de la croissance de *Bt* par les fèces de 8 souris portant une souche de *L. lactis* exprimant (pHO-1) ou non (p \emptyset) l'hème-oxygénase. 118
- Figure 66 : Combinaisons de plasmides utilisées dans les tests du système Has. Pour mémoire organisation de l'opéron Has. 119
- Figure 67 : Test HPS dont les puits sont chargés avec les surnageants de cultures de souches d'*E. coli hemA* portant soit *hasA* et/ou *hasR* soit un plasmide vide. Toutes les souches sont cultivées en LB supplémenté avec $10 \mu M$ hème. 120

- Figure 68 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris. En A : suivi des médianes et en B : dispersion des valeurs. En orange, *Bt* en monoxénie ne s'implante pas. En rouge *Bt* est implanté avec la souche d'*E. coli* $\Delta hemA$ portant le plasmide vide, en violet avec la souche portant le plasmide *phasA*. 122
- Figure 69 : Test HPS chargé avec 3 échantillons de fèces issus de souris portant (à droite) ou non (à gauche) la souche d'*E. coli* exprimant HasA. En bas la moyenne des densités intégrées des aires mesurées sur la plaque. 123
- Figure 70 : Test HPS après incubation. Les plaques sont écartées par un espaceur et fixées avec des pinces. La gélose est coulée entre ces plaques et après avoir chargé les échantillons, la plaque est mise à incuber durant 16 heures à 37°C. La stimulation de la croissance de *Bacteroides* liée à la présence d'hème est visualisée autours des puits. 134
- Figure 71 : Traitement des images sous ImageJ. Le principal traitement consiste en l'homogénéisation de la lumière de la photo. En petits caractères : fonctions principales utilisées. 136

Introduction

I – Introduction bibliographique

A – Le microbiote intestinal : de sa découverte à la mise en évidence de son essentialité dans la santé humaine

1) Les premières descriptions

La présence de multiples « animalicules » dans les fèces, est connue depuis 1681. Elle est décrite pour la première fois par Antoni van Leeuwenhoek dans une lettre adressée à la Royal Society de Londres (Dobell, 1932). Ses multiples observations microscopiques dans de nombreux milieux, montrent l'omniprésence de microorganismes divers. La notion de microbiote, population microbienne complexe vivant dans un environnement spécifique, est née lorsqu'il écrit : « *Il y a plus d'animaux qui vivent dans les dépôts qui s'accumulent sur les dents dans la bouche de chacun qu'il n'y a d'êtres humains dans un royaume entier, en particulier chez ceux qui ne se lavent jamais les dents* ».

C'est en 1885 que Theodor Escherich, jeune pédiatre, présente devant la Société de Morphologie et Physiologie de Munich une conférence intitulée « Les bactéries intestinales du nouveau-né et des enfants nourris au sein ». A cette occasion, il met en évidence l'importance de la connaissance de la composition du microbiote intestinal. L'article de sa lecture est publié peu après (Escherich, 1885) : « *Au moment où la recherche microbiologique nous a apporté tant de lauriers en suivant les méthodes de recherche de Koch dans les domaines de l'étiologie et de la pathologie des maladies infectieuses, il semble qu'il soit inutile et douteux d'examiner et de tenter de démêler l'apparition a priori aléatoire des bactéries dans les excréments et le tractus digestif, une situation semblant contrôlée par mille coïncidences. Si je me suis*

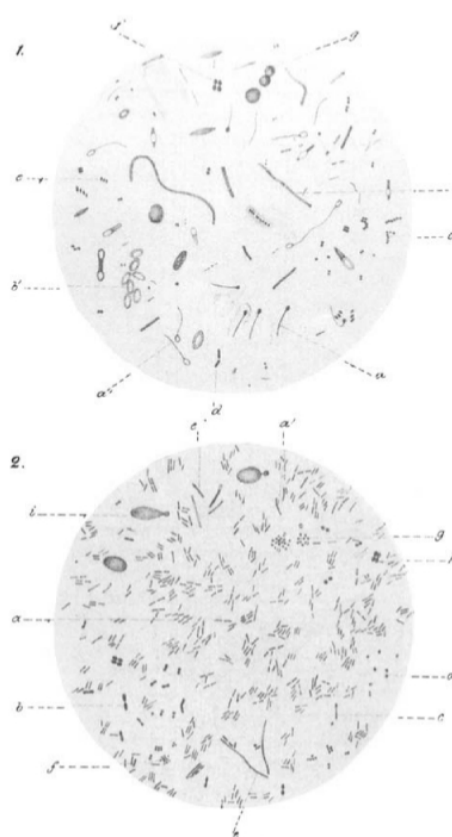


Figure 1 : Planche d'observation (1) d'un méconium de nouveau-né de 27 heures et (2) d'un enfant de deux mois. (Escherich, T. 1885).

néanmoins consacré durant un an pratiquement exclusivement à cette étude spéciale, c'est avec la conviction que la connaissance précise de ces conditions est essentielle pour comprendre non seulement la physiologie de la digestion, mais aussi la pathologie et la thérapie des maladies intestinales microbiennes. »

La notion d'établissement, à la naissance, d'une communauté bactérienne dans le tractus digestif par ingestion, est connue depuis quelques années déjà mais Escherich va exposer les liens entre la composition en espèces bactériennes et le fonctionnement aussi bien normal que pathologique de l'intestin. Il va aussi montrer que la variabilité de la flore présente lors des premières heures de la vie est liée « à la quantité de poussière, la température et la saison » mais également au mode de nutrition des nouveau-nés. Il va en particulier isoler et décrire *Bacterium coli communior*, aujourd'hui connue comme *Escherichia coli*, et va proposer un rôle positif de ces bactéries dans la digestion, grâce à l'observation de la colonisation précoce de l'intestin des jeunes enfants (Figure 1). Les bases des études ultérieures sur le microbiote sont posées.

A la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle, de nombreuses études mettant en évidence l'importance de la population bactérienne intestinale sont publiées, en particulier pour son rôle primordial dans la digestion. Mais rapidement, l'idée que cette population influence le développement des individus commence à émerger. S'appuyant sur les observations d'Escherich qui mettent en évidence la présence de ferments lactiques (*Bacillus aerogenes lactis*) dans l'intestin, et sur celles d'Henry Tissier qui décrivent *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900) dans les selles de nouveau-nés, Elie Metchnikoff va étudier les populations bactériennes et leurs influences sur la vie, la santé et la longévité de l'individu (Metchnikoff, 1903a; Metchnikoff, 1903b). A partir de ses observations, il propose la notion de bactérie probiotique. Dans le même temps, Tissier montre que la flore du nouveau-né varie selon qu'il a été nourri au lait maternel ou au lait de vache.

Parallèlement, les travaux de Veillon et Zuber (Veillon and Zuber, 1898) et plus tard, entre autres, ceux de Jungano et Distaso (Jungano and Distaso, 1910) sur les bactéries anaérobies mettent en évidence la complexité du microbiote intestinal. En 1895, Nuttall et Thierfelder utilisent des animaux axéniques pour montrer le rôle du microbiote intestinal sur la prise de poids chez le cobaye (Nuttall and Thierfelder, 1895). Schottelius met ensuite en évidence l'importance des populations bactériennes sur la digestibilité des aliments (Schottelius, 1899). Il montre, sur un modèle de poussin axénique, que le rétablissement d'une flore bactérienne, provenant d'un animal conventionnel, permet de restaurer une fonction digestive altérée par l'axénie.

De 1900 à 1930 de nombreux nouveaux microorganismes du tractus digestif sont isolés et l'importance des populations anaérobies est décrite (Eggerth and Gagnon, 1933). Au fur et à mesure des nouveaux isollements, des études montrent la richesse du microbiote et la multiplicité

de ses rôles. En 1964, Donaldson Jr. fait la synthèse de l'ensemble de ces données. Dans cette revue il met en évidence les facteurs jouant sur le développement et le maintien des populations bactériennes intestinales, les mécanismes limitant la croissance bactérienne dans le tractus digestif, les effets des antibiotiques sur le microbiote, les relations bactéries/hôte et les troubles liés aux dysfonctionnements de l'intestin et de ses populations (Donaldson, 1964a; Donaldson, 1964b; Donaldson, 1964c). Donaldson confirme que le nombre de bactéries cultivées à partir d'échantillons de fèces semble infiniment plus faible que celui dénombré par observation directe. De plus, la plupart de ces bactéries observées sont mortes (Donaldson, 1964c).

A cette période, les techniques de travail en anaérobiose évoluent fortement permettant ainsi de simplifier l'isolement et la culture des microorganismes anaérobies (Drasar, 1967). En conséquence, la liste des espèces composant le microbiote intestinal s'allonge et les mécanismes de régulation et d'action sont mieux compris (Freter and Abrams, 1972). Les techniques classiques de bactériologie limitent l'exploration des nouvelles espèces. Les techniques de séquençage des acides nucléiques et plus particulièrement du gène de l'ARN 16S présent dans la petite sous-unité ribosomique 30S (Woese and Fox, 1977) relancent cette exploration (Wilson and Blichington, 1996). A la fin des années 90, l'application du séquençage 16S sur des échantillons de fèces humains a révélé que 80 % des séquences générées ne correspondaient à aucune espèce connue (Suau *et al.*, 1999).

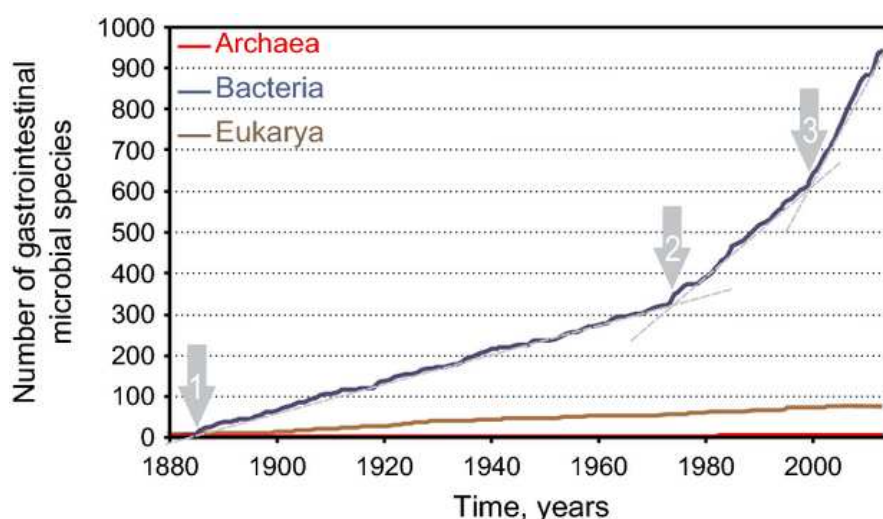


Figure 2 : Evolution du nombre de microorganismes caractérisés issus du microbiote et cultivable. La flèche 1 indique le premier isolement, la 2 l'introduction des techniques strictes d'anaérobiose et la 3 l'arrivée des techniques moléculaires. (Rajilic-Stojanovic, M & De Vos, W. 2014).

L'explosion des techniques de séquençage et la masse des séquences disponibles donnent aujourd'hui aux études sur le microbiote une nouvelle amplitude (Figure 2). Le microbiote est

analysé maintenant sous la forme de métagénome, ensemble de données génomiques obtenues par le séquençage de l'ADN des organismes présents dans une niche écologique. Cette analyse permet la constitution de catalogue de gènes qu'il est, par homologie, possible d'associer à des fonctions génétiques et métaboliques (Backhed *et al.*, 2005; Xu and Gordon, 2003). Ce catalogue, le microbiome humain, contient ainsi 100 fois plus de gènes bactériens que de gènes humains. L'homme est, pour reprendre l'expression de Stephen Gill, un «super-organisme» dont le métabolisme et le patrimoine génétique est un amalgame de caractéristiques microbiennes et humaines (Gill *et al.*, 2006).

Enfin, grâce à l'amélioration rapide des technologies de séquençage massif, à la baisse de leur coût et aux possibilités d'analyse des données, les caractéristiques du microbiote humain peuvent être étudiées en profondeur et sur des cohortes de plus en plus nombreuses. Ceci a permis de catégoriser les microbiotes des individus en trois principaux ensembles nommés entérotypes, chaque entérotype ayant une composition bactérienne possédant des caractéristiques communes. Ces trois principaux ensembles sont le groupe 1 plus riche en *Bacteroides*, le groupe 2 enrichi en *Prevotella* et le groupe 3 présentant une grande quantité de *Ruminococcus* (Arumugam *et al.*, 2011). Cette étude décrit les abondances relatives des espèces et propose un lien avec leurs fonctions moléculaires. Il semble maintenant que la séparation des entérotypes ne soit pas aussi marquée que décrit dans l'article d'Arumugam et plutôt que trois groupes parfaitement distincts, il existe entre ces trois groupes un gradient de distribution avec une grande variabilité individuelle (Knights *et al.*, 2014).

2) La composition du microbiote

Les microbiotes de l'être humain adulte en bonne santé sont composés d'un ensemble de micro-organismes, bactéries, archées, levures, virus et protistes. Leurs nombres varient fortement selon leur niche (Sender *et al.*, 2016):

Tableau 1 : Estimation des quantités de microorganismes dans différents microbiotes. (Sender, R. *et al.* 2016).

Localisation	Concentration moyenne (nombre/mL)	Volume (mL)	Estimation de la quantité totale
Colon	10^{11}	400	10^{14}
Plaque dentaire	10^{11}	< 10	10^{12}
Iléon	10^8	400	10^{11}
Salive	10^9	< 100	10^{11}
Peau	$< 10^{11} / m^2$	1.8 m ²	10^{11}
Estomac	$10^3 - 10^4$	250 - 900	10^7
Duodénum & Jéjunum	$10^3 - 10^4$	400	10^7

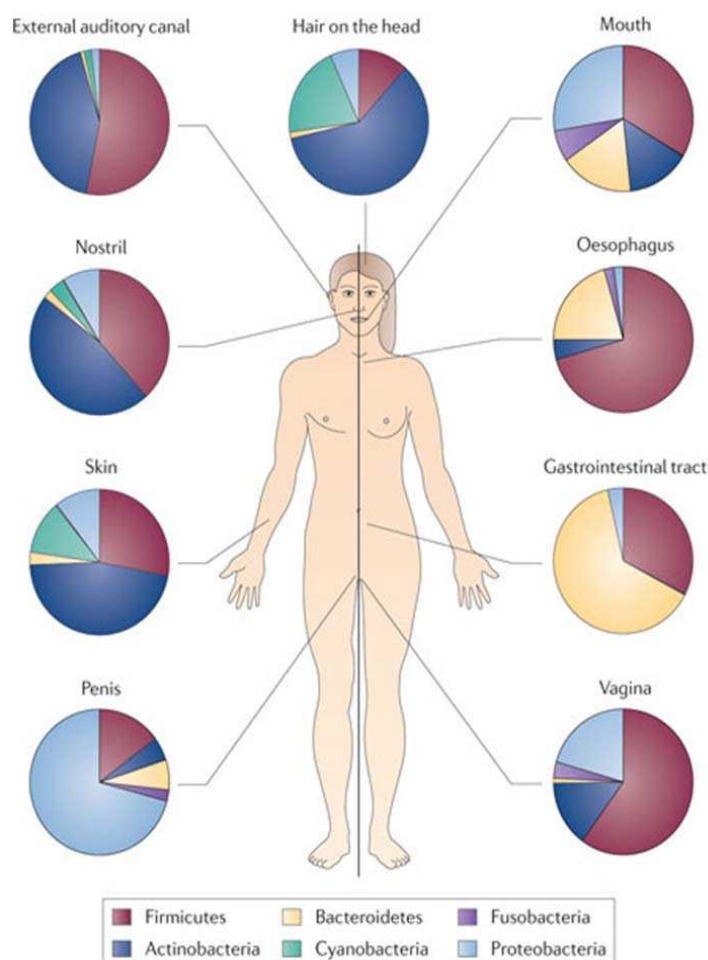


Figure 3 : Abondance relative des six phyla principaux dans les différents microbiotes présents chez l'humain en bonne santé. (Spor, A. *et al.* 2011).

La colonisation bactérienne est donc massive et l'on trouve dans chaque niche pouvant héberger une population bactérienne, un microbiote spécifique (Spor *et al.*, 2011) (Figure 3).

Le microbiote intestinal est de loin le plus important en nombre d'individus. La valeur de 10^{14} bactéries dans le colon est admise depuis longtemps, corolairement au fait que le corps humain est constitué de 10^{13} cellules (Luckey, 1972). Cependant, le nombre de bactéries intestinales a été revu à la baisse récemment ($3 \cdot 10^{13}$ cellules humaines et $4 \cdot 10^{13}$ bactéries (Sender *et al.*, 2016)). L'ensemble du système digestif est colonisé par

des microbiotes, dont la composition évolue, chaque niche écologique ayant ses particularités en terme de composition physico-chimique, pH, concentration en O₂, présence de molécules antibactériennes, richesse en nutriments (Berg, 1996). Le microbiote intestinal est composé de plusieurs centaines d'espèces différentes, de 500 à 1000 par individu (Backhed *et al.*, 2004), dont la biomasse est estimée entre 0,4 et 1 kg (Sender *et al.*, 2016; Xu and Gordon, 2003). Les bactéries représentent l'immense majorité de cet ensemble. Mais la composition virale, notamment en bactériophages, probablement aussi nombreux que les espèces bactériennes reste encore mal connue (Mokili *et al.*, 2012). Le rôle de ces virus n'est pas encore complètement défini mais ils influent sur l'équilibre des populations bactériennes, modulent la réponse immunitaire et contribuent au passage de l'information génétique (De Paepe *et al.*, 2014; Mirzaei and Maurice, 2017).

Parmi les bactéries, deux phyla prédominent dans le microbiote intestinal, les Firmicutes et les Bacteroidetes. Ils peuvent représenter à eux seuls plus de 90 % de la population bactérienne totale (Figure 4). Les trois autres phyla majoritaires sont les Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia. Les espèces se répartissent ensuite en des dizaines de genres différents (Arumugam *et al.*, 2011). Des données de séquençage massif obtenues sur une cohorte de plus de 120 individus ont permis de caractériser trois millions de gènes dont 99 % étaient d'origine bactérienne (Qin *et al.*, 2010). La richesse génétique mise en évidence, donc l'étendue de ses fonctions métaboliques potentielles, incite, parfois, à considérer le microbiote intestinal comme un organe à part entière. La coévolution de l'être humain et de son microbiote a permis un mutualisme au sein duquel de nombreux besoins physiologiques de l'Homme sont assurés par son microbiote. Cette symbiose mutualiste permet à l'Homme la synthèse ou la dégradation de métabolites contribuant à la physiologie de l'être humain pour lesquels aucun gène n'est retrouvé dans son génome propre. On peut citer entre autres, la prise en charge certains polysaccharides d'origine végétale, la biotransformation des acides biliaires conjugués ou encore la synthèse de certaines vitamines (Xu and Gordon, 2003).

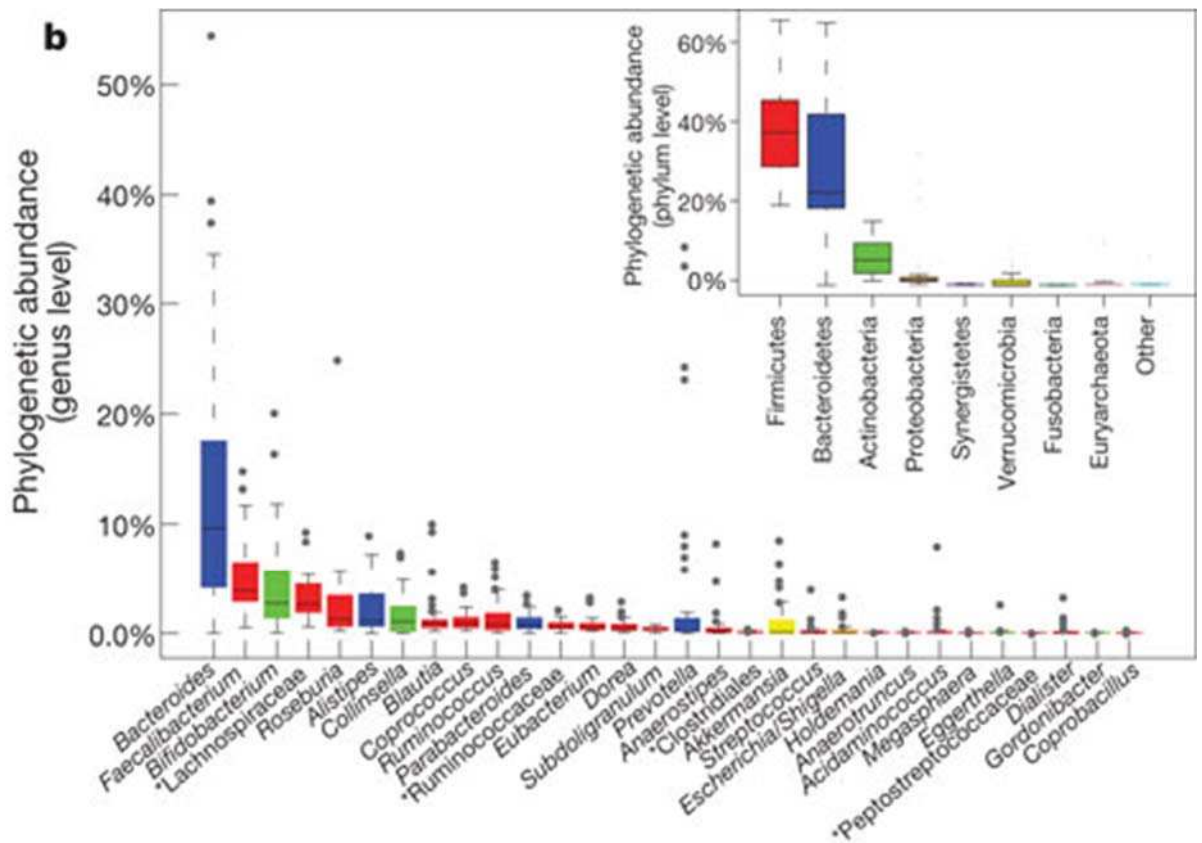


Figure 4 : Abondance relative, dans une cohorte de 39 individus, et variabilité interindividuelle des trente genres les plus fréquemment retrouvés dans le microbiote intestinal humain. Les couleurs sont à rapporter au phylum respectif de chaque genre. (Arumugam, M. *et al.* 2011).

3) Les fonctions majeures du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal a une relation symbiotique mutualiste avec son hôte. En échange d'un écosystème favorable, il remplit, une série de fonctions bénéfiques pour celui qui le porte : digestives, liées au développement du nouveau-né, protectrices contre les pathogènes et dans la réponse immunitaire.

3-1) Digestion

Cette fonction a été longtemps la seule reconnue dans le tractus intestinal. Au cours de la digestion, les nutriments, l'eau et les ions contenus dans le bol alimentaire sont absorbés, puis certains électrolytes, de l'eau ainsi que des déchets sont excrétés (Drasar and Hill, 1974). Au cours de ce processus, certains nutriments subissent une modification physico-chimique notamment lors de réactions de fermentation. Les différents substrats fermentescibles sont l'amidon et d'autres polysaccharides d'origine végétale (cellulose, hémicellulose, pectine, *etc.*), des sucres simples et des oligosaccharides. D'autres composés peuvent constituer des substrats fermentescibles comme les protéines, et leurs dérivés azotés (pour revue (Cummins and Macfarlane, 1991)) et les lipides. Les produits de dégradation, résultant de l'action séquentielle d'un ensemble d'espèces bactériennes formant une chaîne nutritionnelle (Gill *et al.*, 2006) sont ensuite utilisés par l'hôte ou les bactéries elles-mêmes comme source d'énergie. Parmi ces produits, on notera les acides gras à chaînes courtes, comme l'acétate, le propionate et le butyrate qui peuvent représenter 10 à 30 % de l'apport énergétique du métabolisme basal de l'hôte (Parker, 1976). Ces acides gras peuvent être stockés dans les adipocytes et constituent un réservoir énergétique. Ainsi, des souris conventionnelles, à microbiote conventionnel, ont une teneur en graisse corporelle de 40 % plus élevée que des souris axéniques malgré une consommation alimentaire plus faible (Backhed *et al.*, 2004). Les acides gras à chaîne courte n'étant pas les seuls métabolites produits par le microbiote et ayant un impact sur l'organisme (Figure 5), pour revue (Holmes *et al.*, 2012).

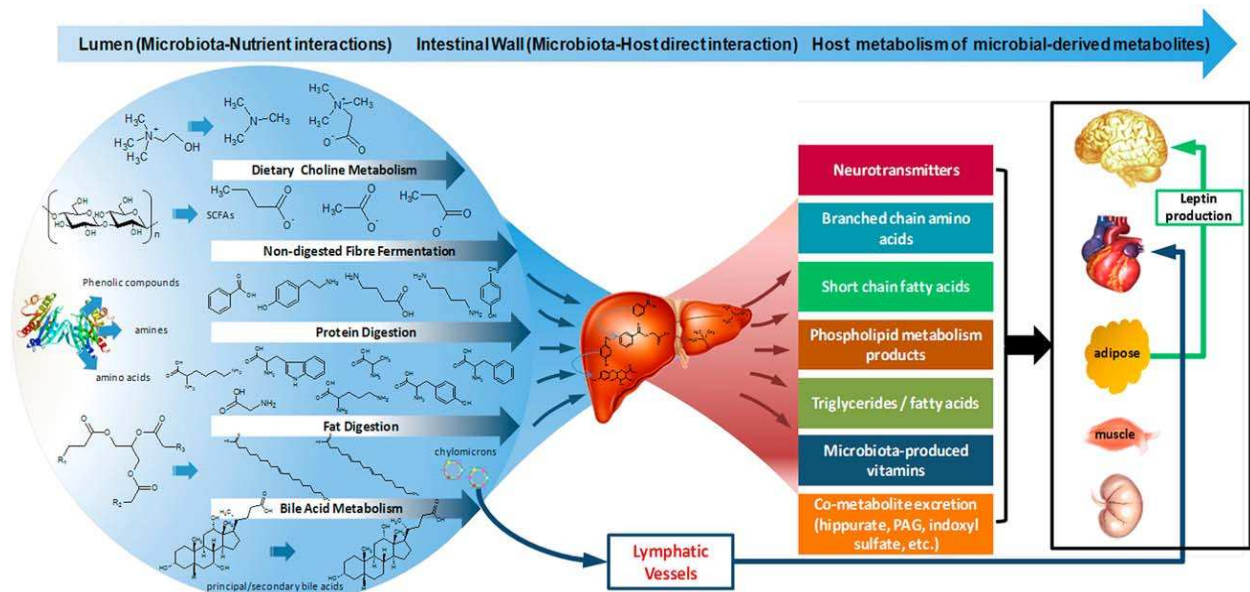


Figure 5 : Exemples de métabolites produits dans le tractus digestif par le microbiote pendant la digestion et transportés vers différents organes. (Holmes, E. *et al.* 2012).

Les cellules épithéliales de l'intestin secrètent également des glycoprotéines comme les mucines, formées d'une protéine et de chaînes de glucides, qui sont une source de carbone importante pour le microbiote intestinal. Certaines espèces, telles que *Ruminococcus* et *Bifidobacterium* entre autres, produisent des glycosidases capables de dégrader ces mucines en sucre simple. Ces derniers offrent un apport nutritionnel, non seulement à ces deux espèces, mais également à des espèces incapables d'utiliser directement ces mucines comme sources de carbone. Cette utilisation se fait particulièrement lorsque l'apport en nutriment *via* l'alimentation de l'hôte fait défaut (Hoskins *et al.*, 1985).

3-2) Aide au développement du tractus digestif

Le microbiote est essentiel à la maturation complète de l'intestin. L'étude des différences entre les animaux axéniques et conventionnels permet de montrer des effets majeurs du microbiote intestinal sur la physiologie de l'épithélium de son hôte (pour revue (Adlerberth and Wold, 2009; Tomas *et al.*, 2014; Tomas *et al.*, 2012)). Chez les rongeurs axéniques, la masse de l'intestin grêle est inférieure et la taille du caecum est jusqu'à cinq fois supérieure à celles observées chez des animaux conventionnels. De même la circonférence de l'intestin grêle est modifiée selon la présence ou l'absence d'un microbiote. Cette circonférence est plus faible dans la région antérieure (côté duodénum) et plus importante dans la région postérieure (côté iléon) chez



Figure 6 : Coupes de côlon de souris axénique à gauche et conventionnelle à droite. (Cherbuy, C. *et al.* 2010).

les animaux axéniques (Meslin *et al.*, 1973; Meslin *et al.*, 1974). Lors de la colonisation, la muqueuse intestinale s'épaissit, les cryptes deviennent plus profondes (Cherbuy *et al.*, 2010) (Figure 6), les villosités changent de forme devenant plus larges et plus courtes. En termes d'expression génique, les gènes qui codent la régulation du renouvellement des cellules épithéliales et la biosynthèse du mucus sont induits. En parallèle, le péristaltisme intestinal s'amplifie et diminue la quantité de bactéries dans l'intestin grêle. Des composés antimicrobiens sont produits par les cellules de Paneth au fond des cryptes de l'intestin grêle pour lutter contre les infections par des microorganismes pathogènes.

L'ensemble de ces changements témoignent du développement de la fonction de barrière de la muqueuse intestinale (Adlerberth and Wold, 2009).

3-3) Protection contre les pathogènes, liée ou non à la fonction immunitaire

Le microbiote protège l'hôte contre la prolifération de bactéries exogènes, dont certaines potentiellement pathogènes. L'importance quantitative du microbiote intestinal est en soit une première barrière physique à l'établissement d'une nouvelle souche exogène. Le microbiote instaure de fait une compétition pour l'accès à l'espace et aux nutriments. Les espèces endogènes produisent de nombreux métabolites modifiant chimiquement l'environnement et le rendant ainsi moins favorable à l'établissement d'autres espèces (Vogt *et al.*, 2015). Ces modifications environnementales peuvent être par exemple le changement de pH (Cherrington *et al.*, 1991; Fukuda *et al.*, 2011) ou la production de bactériocines. Mais d'autres mécanismes existent, entre autres de type immunitaire.

La fonction immunitaire du microbiote est considérée comme primordiale. La coexistence au, sein d'un individu, d'une population bactérienne implique nécessairement le maintien d'un équilibre par le système immunitaire. Au niveau des muqueuses intestinales, le système immunitaire doit être capable de différencier entre bactéries commensales et pathogènes. Il doit tolérer le microbiote et ne pas induire de réponse systémique tout en étant capable de le contrôler pour empêcher une prolifération excessive et sa translocation hors du tractus digestif. Les

comparaisons entre les animaux axéniques et conventionnels ont, ici encore, permis de mettre en évidence ce rôle (pour revue (Sekirov *et al.*, 2010)). Les animaux axéniques ont plusieurs types de cellules immunitaires en nombre anormal par rapport aux animaux conventionnels, par exemple des retards de développement des lymphocytes T CD4+ (production de cytokines) (Mazmanian *et al.*, 2008), des structures lymphoïdes locales et/ou

systémiques déficitaires : les ganglions lymphatiques (production de cellules immunitaires) et la rate (stockage des cellules immunitaires) sont mal formés, les plaques de Peyer (induction de la réponse immunitaire intestinale et production de cytokines) ne sont pas totalement développées et le nombre de follicules lymphoïdes est inférieur (Figure 7). Les souris axéniques ont également un taux d'immunoglobulines sécrétées (IgA et IgG) inférieur (Macpherson *et al.*, 2001). Le microbiote intestinal exerce donc un rôle central dans le développement du système immunitaire mucosal (pour revue (Honda and Littman, 2012) et (Van Den Elsen *et al.*, 2017)).

D'autres exemples de l'action du microbiote sur le système immunitaire sont décrits. Par exemple, il existe une modulation de la sévérité des symptômes de la malaria par le microbiote. La variation de ce dernier, entre autre une diminution des populations de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium*, joue sur la charge infectieuse de *P. falciparum* non pas par l'intermédiaire de métabolites mais en modulant la réponse immunitaire de l'hôte (Villarino *et al.*, 2016). De même, chez des souris contaminées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, une antibiothérapie provoque une augmentation de la charge virale et un retard de clairance virale. Cette augmentation est, ici encore, liée à la modification de l'équilibre du microbiote et à son impact sur la réponse immunitaire (Abt *et al.*, 2012). Plus généralement, le microbiote contribue à la protection de l'hôte contre les infections par un pathogène exogène en induisant et en entretenant une réponse inflammatoire. Les mécanismes mis en jeu incluent une augmentation du stress oxydant dans le côlon (létales pour certaines bactéries) et une induction de l'expression de certains gènes de l'hôte impliqués dans le transport d'ions, afin de le protéger contre une perte trop importante d'électrolytes et contre une déshydratation lors d'une infection (Belzer *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2011). La stimulation et la modulation de la réponse immunitaire est donc un mécanisme essentiel de défense (pour revue (Buffie and Pamer, 2013; Kamada *et al.*, 2013)).

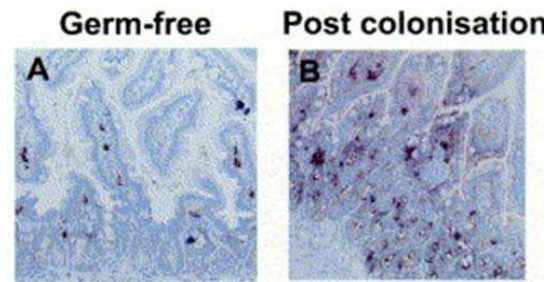


Figure 7 : Rareté des cellules sécrétrices d'IgA dans les animaux axéniques au niveau de l'intestin grêle. A : souris axénique, B : souris conventionnalisée. (MacPherson, A.J. *et al.* 2001).

3-4) *Autres fonctions*

Le microbiote a de nombreux autres rôles variés et encore parfois discutés. On peut citer la gestion du stockage des graisses dans l'organisme après les processus de digestion des polysaccharides (Backhed *et al.*, 2004). Le microbiote participe également à la détoxification des polluants comme les métaux lourds ingérés lors d'expositions continues sub-chroniques. Chez des souris contaminées par des doses faibles de plomb ou de cadmium, la concentration au niveau des organes cibles est de cinq à dix fois plus élevée chez les souris axéniques que chez les conventionnelles. Ainsi le microbiote joue un rôle important dans la biodisponibilité des métaux lourds dans l'intestin (Breton *et al.*, 2013). Il a également un rôle dans l'adaptation au froid par la modulation de l'absorption de nutriments par l'hôte. Cette modulation est accompagnée par l'augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes et la réduction drastique de la quantité d'*Akkermansia muciniphila* (Gomez de la Torre Canny and Rawls, 2015). Par ailleurs, la diminution de *A. muciniphila* a été décrite dans les cas d'obésités liés au diabète de type 2 (Everard *et al.*, 2013). Le microbiote, en dégradant l'oxalate dans le tractus digestif, prévient aussi l'apparition de calculs rénaux d'oxalate de calcium. L'absence d'une espèce bactérienne, *Oxalobacter formigenes*, et un déséquilibre microbien plus général est retrouvé chez les patients sujets aux calculs (Mehta *et al.*, 2016). Dans un tout autre domaine, le microbiote semble influencer sur le développement du cerveau et les animaux axéniques paraissent être plus sujet au stress que les animaux conventionnels (Sudo *et al.*, 2004) et pour revue (Collins *et al.*, 2012).

4) Pathologies associées à la dysbiose

Si le microbiote de l'adulte sain est relativement stable (Koenig *et al.*, 2011), de nombreux facteurs aussi bien endogènes qu'exogènes sont susceptibles d'entraîner une instabilité. L'importance des fonctions du microbiote intestinal implique que leurs dysfonctionnements peuvent induire des désordres métaboliques et pathologiques importants. En cas de dysbiose, certaines bactéries sont susceptibles de contribuer à une pathologie (Mitsuoka, 1996). Cependant, il est souvent difficile de dire si les pathologies sont les conséquences de la dysbiose ou leurs causes. Le microbiote est rarement la seule cause de toutes ces pathologies mais il semble de plus en plus établi qu'il peut être un des facteurs déclencheurs ou aggravants d'un certain nombre d'entre elles.

Des modifications du microbiote peuvent entraîner des altérations métaboliques importantes et donc l'apparition ou la disparition d'un certain nombre de composés pouvant jouer sur des fonctions physiologiques de l'hôte. Ces fonctions concernées sont le plus souvent au niveau de la digestion, l'absorption et le passage des métabolites au niveau systémique. La métabolisation de produits exogènes peut également générer des produits de dégradation plus ou moins toxiques pour l'organisme, jouer sur l'efficacité des traitements médicamenteux, et influencer sur la réponse immunitaire, notamment en modifiant la sensibilité aux infections. Elle est aussi impliquée dans la cancérogenèse et le vieillissement cellulaire (Mitsuoka, 1996).

En dehors de ces désordres métaboliques « généraux », il existe un certain nombre de pathologies plus spécifiques liées à une dysbiose dans le tractus digestif.

4-1) *Maladies inflammatoires du tractus digestif*

Le microbiote intestinal est impliqué dans des désordres du tractus digestif, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome du côlon irritable, la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn. Ces pathologies touchent en France 200 000 personnes et environ 2,5 millions en Europe. Si elles ont été longtemps l'apanage des sociétés occidentales, leur incidence est en forte augmentation au Moyen-Orient, dans la zone Pacifique et en Amérique latine (Gower-Rousseau, 2012). Ces pathologies se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif liée à une hyperactivité du système immunitaire intestinal. Ces maladies sont corrélées à des variations de composition dans les populations bactériennes associées aux muqueuses intestinales (Swidsinski *et al.*, 2005; Vasquez *et al.*, 2007). Plus généralement, il semble que le microbiote des patients atteints par ces pathologies soit caractérisé par une plus grande concentration de bactéries en contact avec la muqueuse, un déséquilibre des populations (entre

autres une augmentation du ratio Bacteroidetes/Firmicutes) et une réduction de la biodiversité (Figure 8). Les *Bacteroides* deviennent dominants dans le microbiote des patients souffrants de maladie de Crohn (Swidsinski *et al.*, 2005). La proportion de certaines γ -Proteobacteria dans la population intestinale augmente dans le cas du syndrome du côlon irritable (Stecher and Hardt, 2008). Récemment, des études de cohorte ont montré que 40 % des patients souffrant de la maladie de Crohn, sont porteurs d'une souche particulière d'*Escherichia coli* AIEC (Adherent-Invasive *E. coli*) (Gibold *et al.*, 2016). Par contre, la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*, décrite pour ses effets anti-inflammatoires, est en quantité très diminuée chez la plupart des patients (Sokol *et al.*, 2008). Ce déséquilibre du microbiote semble initier et entretenir la réponse anormale du système immunitaire responsable de l'inflammation (Seksik *et al.*, 2006).

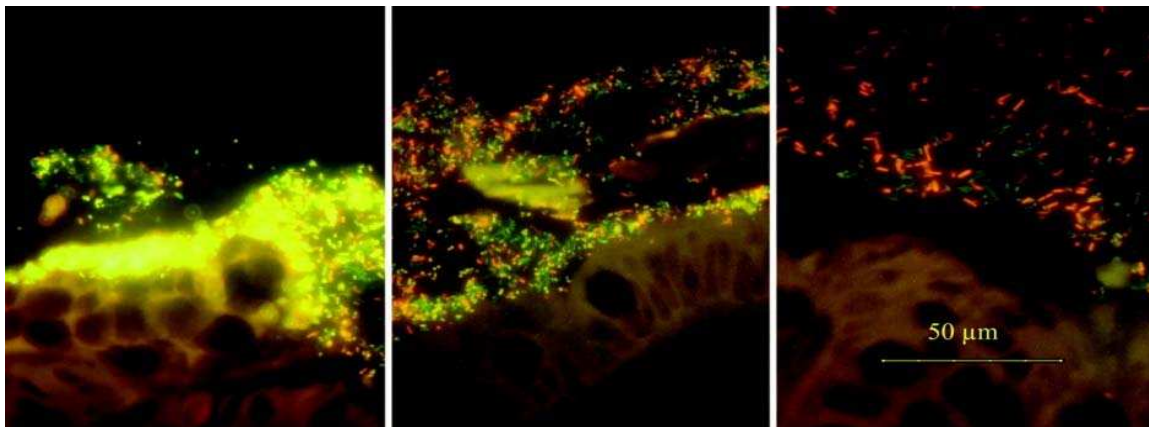


Figure 8 : Répartition d'espèces bactériennes dans le cas de maladie de Crohn (gauche), de colite (milieu) et du syndrome du côlon irritable (droite). Marquage in situ en fluorescence (FISH) avec en jaune (Cy3), *Bacteroides fragilis*, en rouge (Cy5), *Eubacterium rectale* et en vert (FITC), les autres bactéries. (Swidsinski, A. *et al.* 2005).

4-2) Obésité

Les effets des variations de la composition du microbiote sur les pathologies métaboliques comme l'obésité et la résistance à l'insuline sont bien renseignés chez l'animal et commencent également à l'être chez l'humain (pour revue (Bouter *et al.*, 2017)).

L'obésité, souvent liée à une dyslipidémie et à des troubles de l'homéostasie du glucose (syndrome métabolique) est associée à un déséquilibre des espèces présentes dans le tractus digestif (Woting and Blaut, 2016). Classiquement, on attribue l'obésité à une augmentation de l'énergie apportée *via* l'alimentation et à une diminution de l'énergie dépensée, le tout corrélé à des prédispositions génétiques. Mais, on observe chez les patients atteints d'obésité une diminution de la quantité de Bacteroidetes et une augmentation des Firmicutes (Ley *et al.*, 2006)

(Figure 9). Si les sujets obèses suivent un régime hypocalorique, qu'il soit pauvre en graisses ou en hydrates de carbones, on observe une remontée de la quantité des *Bacteroides* et une diminution équivalente des *Firmicutes*. Ce phénomène a été reproduit chez les souris à obésité induite (*ob/ob*) avec une diminution de 50 % de la quantité de *Bacteroidetes* et une augmentation corrélée des *Firmicutes* (Ley *et al.*, 2005) qui suggère une contribution importante de ce microbiote en dysbiose à la dyslipidémie. Un des mécanismes possibles est la régulation par le microbiote d'un facteur Fiaf (Fasting-Induced Adipocyte Factor) inhibiteur d'une lipase lipoprotéique (LPL) (Backhed *et al.*, 2004). Les Firmicutes semblent capables d'extraire plus de calories des glucides complexes normalement non digestibles en augmentant la quantité d'acides gras à chaîne courtes et donc, la quantité d'énergie produite chez les patients obèses. Cette modification de l'équilibre entre Firmicutes et Bacteroidetes n'est pas la seule cause de ce désordre métabolique. Au sein même des Bacteroidetes, on constate qu'un régime riche en graisse augmente la quantité de *Bacteroides* et un régime riche en fibre privilégie *Prevotella* (Arora and Backhed, 2016; Wu *et al.*, 2011).

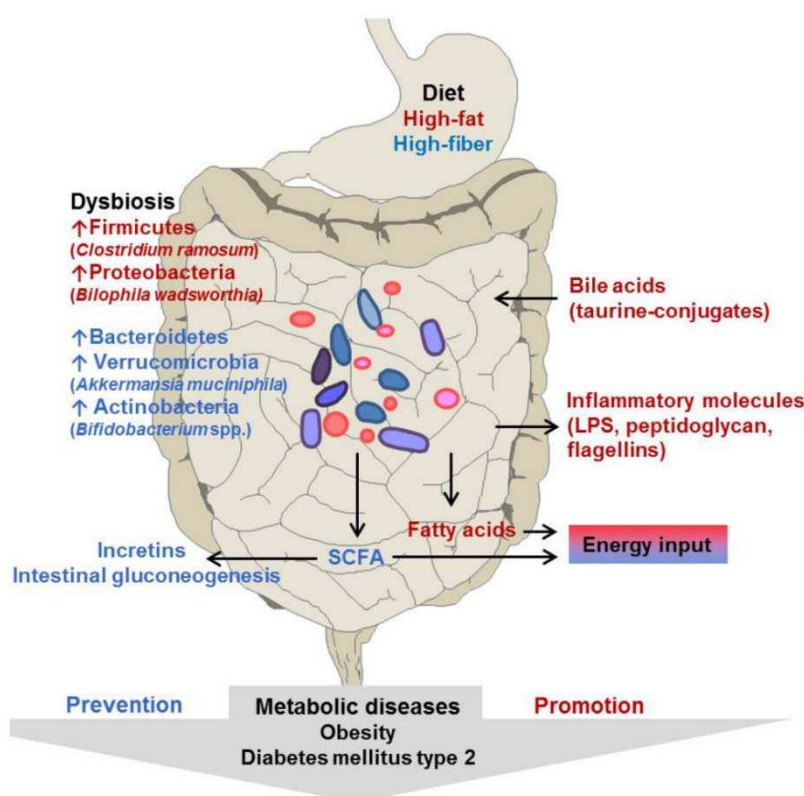


Figure 9 : Interactions entre le régime alimentaire, le microbiote et l'hôte dans le cas du syndrome métabolique. En rouge les régimes riches en graisses et en bleu ceux riches en fibres. (SCFA : Short Chain Fatty Acids). (Woting, A & Blaut, M. 2016).

Par ailleurs, une autre étude montre, qu'indépendamment de nombreux paramètres, les enfants traités par antibiothérapie durant les six premiers mois de leur vie présentent un risque accru de surpoids dès l'âge de sept ans, mettant en évidence l'impact probable d'un déséquilibre du microbiote sur l'obésité. Même si de nombreux autres paramètres peuvent influencer sur l'apparition de cette obésité (Ajslev *et al.*, 2011).

4-3) Diabète de type 2

Cette pathologie est d'origine complexe, à la fois génétique et environnementale. Récemment, une influence possible du microbiote intestinal a été décrite, même si les mécanismes ne sont pas totalement explicités. De nombreux gènes bactériens ont été détectés spécifiquement dans les métagénomés de patients atteints de diabète de type 2 (Qin *et al.*, 2012). Il semble que le microbiote et des dysfonctionnements de la barrière intestinale, contribuent à l'apparition d'une inflammation résiduelle (Geurts *et al.*, 2014). De même, la diminution des populations bactériennes productrices de butyrate qui, associée à une augmentation des Lactobacilles est corrélée au diabète de type 2 (Arora and Backhed, 2016). Un rôle du microbiote a été observé lors de transfert de microbiote à partir de donneurs sains vers des malades atteints de syndrome métabolique. Six semaines après le transfert une restauration de la sensibilité à l'insuline a été observée ce qui suggère que le microbiote serait capable de moduler directement la sensibilité à l'insuline chez l'Homme (Vrieze *et al.*, 2012).

4-4) Maladies cardio-vasculaires

Bien qu'un lien entre maladies cardio-vasculaires et microbiote intestinal ne soit pas clairement établi, un lien avec le microbiote buccal semble être plus documenté (Koren *et al.*, 2011). En effet, on retrouve de façon statistiquement corrélée l'abondance combinée de *Streptococcus* et de *Veillonella*, tant dans le microbiote buccal que dans les plaques athéroscléreuses. Ces deux espèces sont connues pour cohabiter dans le microbiote buccal, *Streptococcus* produisant de l'acide lactique utilisé comme source de carbone par *Veillonella* (Chalmers *et al.*, 2008). D'autre part, il semble que le métagénome de patients souffrant de troubles cardio-vasculaires est enrichi en gènes associés à la biosynthèse du peptidoglycane. Une production accrue de peptidoglycane pourrait contribuer à l'athérosclérose *via* des réactions inflammatoires (Karlsson *et al.*, 2012). De même, un métabolite microbien, la triméthylamine,

métabolisée par le foie en triméthylamine-N-oxyde est un marqueur et probablement un facteur de trouble cardio-vasculaire (Arora and Backhed, 2016). Le niveau de triméthylamine-N-oxyde plasmatique est augmenté chez les patients souffrant de pathologies cardiovasculaires et le métabolisme microbien de la choline et de la L-carnitine augmente le niveau de triméthylamine. Chez des patients sous antibiothérapie, la choline n'est pas convertie en triméthylamine. On observe la même absence de conversion choline/triméthylamine chez des souris traitées par antibiothérapie. Lorsque le microbiote se réinstalle, le taux remonte (Wang *et al.*, 2011).

4-5) Cancer colorectal

C'est la troisième cause de cancer dans le monde avec environ 1,4 million de nouveaux cas annuels. Bien qu'ayant des causes multiples, en particulier génétiques, essentiellement liées à des mutations dans des oncogènes et dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, les cancers colorectaux sont aussi corrélés avec des variations de la composition du microbiote intestinal. Ces variations ont, elles aussi, de multiples causes parmi lesquelles l'alimentation joue un rôle essentiel. On observe que les épisodes inflammatoires récidivants du tractus digestif sont souvent précurseurs de cancérisation (Marmol *et al.*, 2017) de même que les modifications métaboliques liées aux évolutions de la flore intestinale. Le microbiote est à même de produire des métabolites ayant un pouvoir génotoxique (Figure 10). Ces molécules peuvent provoquer des lésions ou des mutations de l'ADN des cellules épithéliales de l'hôte (Louis *et al.*, 2014), et induire une cancérisation du tractus digestif probablement dépendante de l'alimentation de l'hôte. En effet, un régime riche en graisse est corrélé positivement avec une augmentation des cancers colorectaux contrairement à un régime alimentaire riche en fibres (Burkitt *et al.*, 1974; Mitsuoka, 1996).

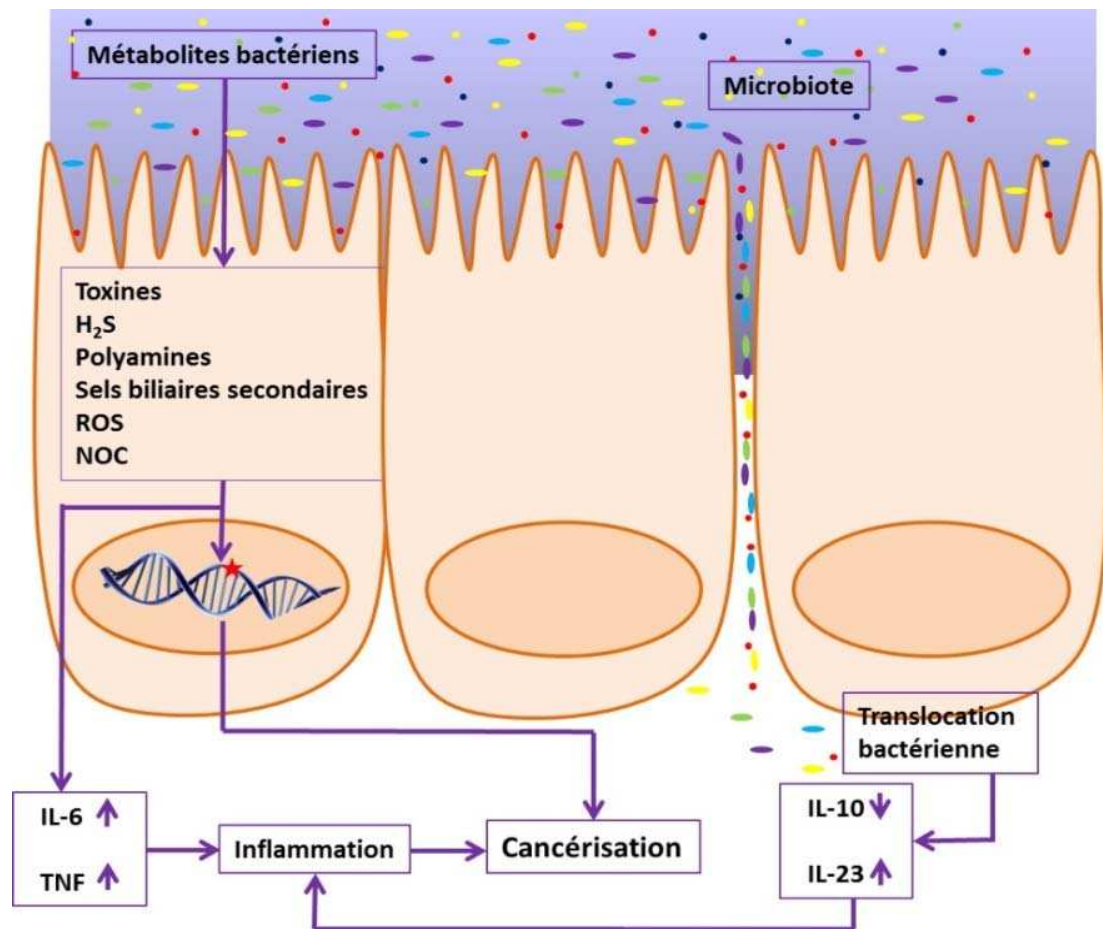


Figure 10 : Mécanismes de cancérisation liés aux phénomènes inflammatoires et aux effets génotoxiques de certains métabolites bactériens (ROS : Reactive Oxygen Species, NOC : N-nitroso Compounds, IL : Interleukines, TNF Tumour Necrosis Factor). (D'après Louis, P. *et al.* 2014).

4-6) Allergies

Un lien entre le microbiote intestinal et les phénomènes allergiques ou l'asthme a été proposé en raison de l'origine immunitaire des allergies. Effectivement, une des causes possible des allergies serait le déséquilibre entre les lymphocytes Th1 et Th2 (sécrétion de cytokines). Dans un environnement trop aseptisé, en particulier au moment de la naissance, le microbiote ne stimulerait pas suffisamment les cellules Th1 qui modulerait moins l'effet des cellules Th2, connues comme facteurs de prédisposition aux phénomènes allergiques (Riiser, 2015). D'autres explications mettant en cause des facteurs environnementaux comme la pollution de l'air ou l'utilisation trop importante d'antibiotiques sont également avancées. La réduction de la biodiversité animale ou végétale entraîne elle aussi une modification de l'environnement microbien et donc une

modification des relations entre l'Homme et son environnement. Tous ces facteurs induisent des modifications de l'équilibre du microbiote et sont associés avec une augmentation des cas d'asthme dans la population (Haahtela *et al.*, 2013).

4-7) Stress

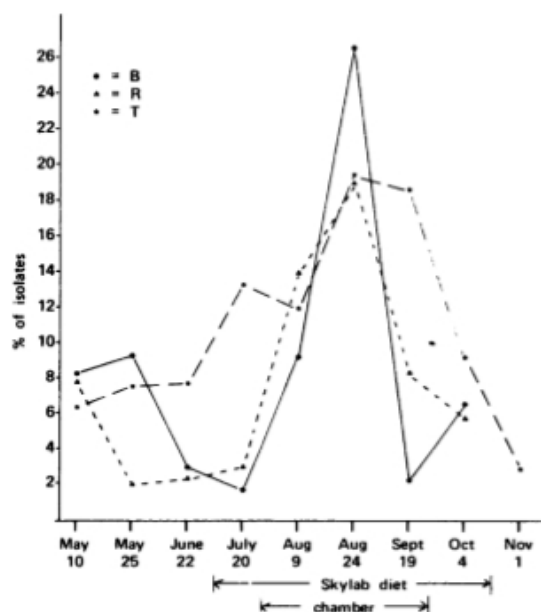


Figure 11 : Evolution du taux de *B. thetaiotaomicron* chez trois astronautes en entraînement dans le laboratoire Skylab en fonction du temps. (Holdeman, LV. *et al.* 1976).

Dès les années 70, un lien entre la composition du microbiote intestinal et le stress a été suspecté. Des mesures faites chez des astronautes enfermés dans le laboratoire test de confinement de la NASA, Skylab, ont montré lors de situations humainement tendues, une modification de leur microbiote. Néanmoins, le faible nombre d'échantillons et l'importance de nombreux paramètres (l'étude portant entre autre sur les régimes alimentaires utilisés par la NASA) ne permettent pas de démontrer clairement une corrélation entre le stress et une variation importante du taux de *Bacteroides thetaiotaomicron* observée (Holdeman *et al.*, 1976) (Figure 11). En revanche, il semble

évident qu'il existe chez l'animal un lien fort entre le microbiote et le stress. Le niveau de stress est plus important chez l'animal conventionnel que chez l'animal axénique. Ce stress est visible sur le comportement de l'animal, particulièrement au niveau de ses déplacements (évitement de la zone centrale de la cage) et dans ses interactions sociales. Au niveau biochimique, on observe une surproduction de corticostérone chez les animaux axéniques (Crumeyrolle-Arias *et al.*, 2014). Cette hormone est impliquée dans la gestion du stress au niveau de la mémoire émotionnelle, particulièrement dans la reconnaissance de la mémoire de la peur (Albrecht *et al.*, 2013).

4-8) *Axe microbiote/cerveau*

La relation entre cerveau et microbiote intestinal est décrite depuis qu'il a été observé l'efficacité d'une antibiothérapie dans le cadre de la prise en charge thérapeutique de l'encéphalopathie hépatique. Dans cette pathologie, un dysfonctionnement du foie entraîne une augmentation de la quantité d'ammonium sérique, dont la toxicité pour le cerveau induit de graves troubles neurologiques. Mais cette augmentation de l'ammonium sérique semble également liée à l'activité uréase du microbiote intestinal (Rai *et al.*, 2015; Schiano, 2010). De même, il semble que des troubles psychiatriques coexistent fréquemment avec des troubles gastro-intestinaux comme le syndrome du côlon irritable (pour revue (Collins *et al.*, 2012)). Certains troubles autistiques, sont corrélés avec une dysbiose du microbiote intestinal (Hsiao *et al.*, 2013; Louis, 2012; Vuong and Hsiao, 2017). L'équilibre entre Firmicutes et Bacteroidetes semble différent chez les patients atteints de ces troubles. Notamment, les *Clostridiaceae*, des Firmicutes, sont présents en plus grande quantité chez les enfants atteints de troubles du spectre autistique (Finegold, 2008). Or certains métabolites (phénols et p-crésol entre autres) produits par ces espèces sont toxiques pour l'Homme. L'ampleur du déséquilibre est corrélée à la sévérité des symptômes (De Angelis *et al.*, 2015). Chez des souris gestantes, un trouble du spectre autistique peut être induit par l'injection d'un ARN double brin viral, Poly(I:C) qui entraîne dans la descendance des troubles de communication et sociaux et des comportements stéréotypés mimant les troubles du spectre autistique (Maternal Immune Activation, MIA mouse). Ces souris présentent un déséquilibre en défaveur de *Bacteroides fragilis*, accompagné par des lésions de la barrière intestinale et perte de métabolites. Le seul fait d'administrer oralement aux souris un traitement à base de *Bacteroides fragilis* suffit à rééquilibrer le microbiote, à restaurer l'intégrité de la barrière digestive et à diminuer la perte des métabolites. Ces corrections permettent d'améliorer les troubles comportementaux liés aux troubles autistiques (Hsiao *et al.*, 2013). Il existerait une relation forte entre le microbiote et le fonctionnement du système nerveux central (Latalova *et al.*, 2017). Cette relation vient essentiellement des métabolites circulants produits par le microbiote qui, *via* le système circulatoire, agiraient directement sur le système nerveux central. Ces métabolites, entre autres les acides gras à chaîne courte, jouent un rôle essentiel lors du développement du système nerveux. Ils influent sur la barrière hémato-encéphalique, la neurogenèse à partir des cellules souches neurales, la maturation des cellules microgliales et la myélinisation des fibres nerveuses (Sharon *et al.*, 2016). Enfin, un déséquilibre du microbiote, et particulièrement une augmentation importante de la quantité de *Methanobrevibacter smithii* est observé de manière systématique chez les sujets atteints d'anorexie mentale, et cela avant même le stade de perte de poids morbide.

Cette bactérie est capable de recycler l'hydrogène en méthane et d'améliorer la transformation des nutriments en calories, augmentant l'efficacité énergétique de la digestion (Gorwood *et al.*, 2016).

En conclusion, s'il est encore difficile d'établir un lien de causalité strict entre un déséquilibre observé du microbiote et une pathologie, il est clair que de très fortes corrélations existent et que le microbiote intestinal tient une place centrale dans l'homéostasie du métabolisme général de l'individu. Etre capable de distinguer expérimentalement causalité, conséquence et corrélation est aujourd'hui la direction à suivre pour pouvoir envisager d'apporter des corrections aux dysbioses du microbiote.

B) - Implantation du microbiote intestinal

Dans sa revue de 1885 décrivant les bactéries intestinales de l'enfant, Theodor Escherich décrit le méconium du nouveau-né comme stérile, les bactéries n'apparaissant que 4 heures après la naissance en été et 17 heures après en hiver (Escherich, 1885). Pendant de nombreuses années cette hypothèse est acceptée par tous, mais en 1936, Snyder montre que dans les 30 premières minutes de la vie de l'enfant, il est déjà possible de voir dans 12 cas sur 29 les prémices d'une colonisation bactérienne intestinale. Il montre ensuite que dans les deux heures, 13 échantillons sur 16 sont positifs (Snyder, 1936). En émettant des réserves sur les conditions de prélèvement qui pouvaient biaiser le nombre d'échantillons positifs, Snyder conclut qu'un tiers des méconiums de la cohorte constituée de 64 nouveau-nés, est colonisé au moment de la naissance.

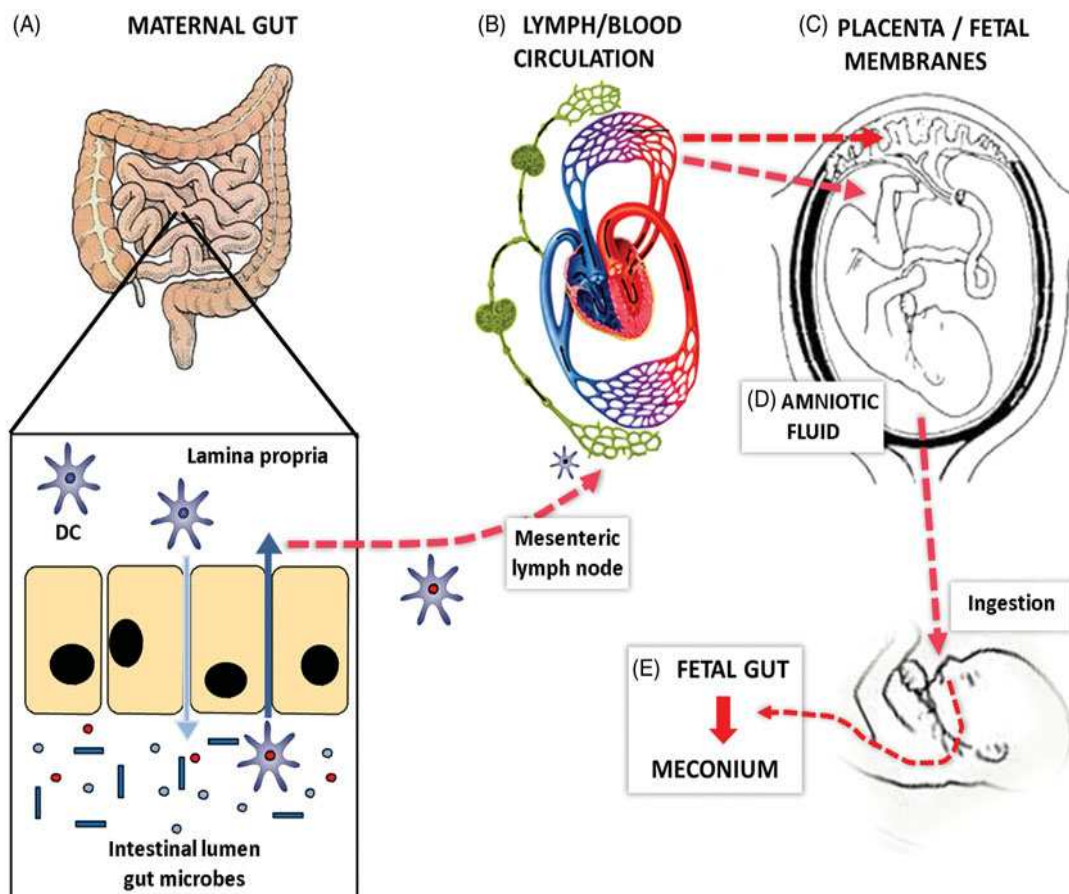


Figure 12 : Modèle de translocation bactérienne du tractus digestif maternel vers le fœtus via les cellules dendritiques. Le passage entre le système circulatoire et le liquide amniotique n'est pas encore parfaitement connu. (Stinson, L.F. *et al.* 2016).

Des études plus récentes montrent que l'installation du microbiote intestinal chez l'enfant peut dans de nombreux cas commencer *in utero*. Bien que la barrière épithéliale du tractus digestif maternel soit là pour empêcher le passage des bactéries vers le système circulatoire, certaines

cellules sont capables de franchir cette barrière. C'est le cas des cellules dendritiques qui peuvent phagocyter des bactéries dans le lumen intestinal et pénétrer ensuite l'épithélium de manière active. Certaines bactéries restent viables dans ces cellules porteuses durant plusieurs jours (Macpherson and Uhr, 2004). Les cellules dendritiques repassent ensuite l'épithélium et migrent jusqu'aux nœuds lymphatiques mésentériques. De là, elles peuvent passer dans le système lymphatique et ensuite dans le système circulatoire sanguin. Le modèle actuellement proposé pour expliquer l'implantation *in utero* repose sur ce transport *via* les cellules dendritiques. En effet, une fois dans le sang les bactéries pourraient passer dans le cordon ombilical et le liquide amniotique, qui, ingéré par le fœtus initierait la primo-colonisation (Stinson *et al.*, 2016) (Figure 12). Le stade de la grossesse où apparaissent les espèces bactériennes chez le fœtus reste mal connu. Lors d'une grossesse normale, le séquençage du gène de l'ARN 16S bactérien ne permet généralement pas de détecter, ou alors à de très rares exceptions, la présence de bactéries dans le liquide amniotique à 18-20 semaines (Stinson *et al.*, 2016). On sait également que le placenta abrite un microbiote peu nombreux mais spécifique, l'abondance relative des espèces majoritaires étant différente de ce qui est trouvé généralement dans le tractus digestif complet et vaginal (Figure 13). Ces différences concernent également les fonctions métaboliques des microbiotes (Aagaard *et al.*, 2014).

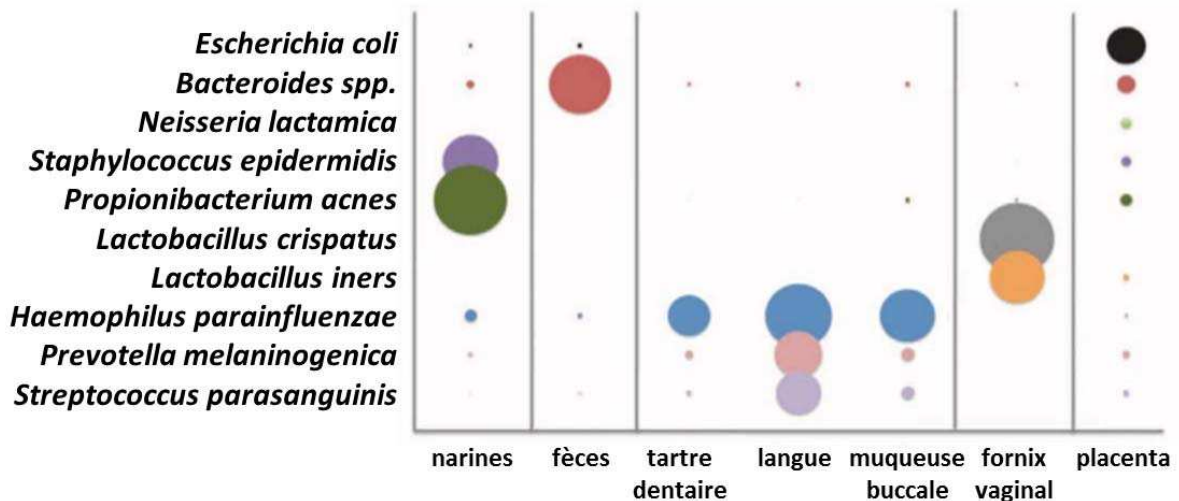


Figure 13 : Prévalence et abondance relatives d'espèces représentatives de différents microbiotes chez l'humain (Aagaard *et al.*, 2014).

1) Cinétique de l'implantation

Le microbiote intestinal est un système dynamique qui évolue tout au long de la vie de l'individu. En utilisant les résultats des méthodes basées sur les bactéries cultivables, Tomotari Mitsuoka classe en trois grandes catégories les principales espèces microbiennes, tout d'abord les bactéries lactiques, dont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, puis les bactéries anaérobies, dont *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, *Veillonella*, *Megasphaera*, *Gemmiger*, *Clostridium* et *Treponema*, enfin les bactéries aérobies dont *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* et les levures. Ces trois catégories se partagent la grande majorité des espèces et co-évoluent durant toute la vie de l'individu (Mitsuoka, 1996) (Figure 14).

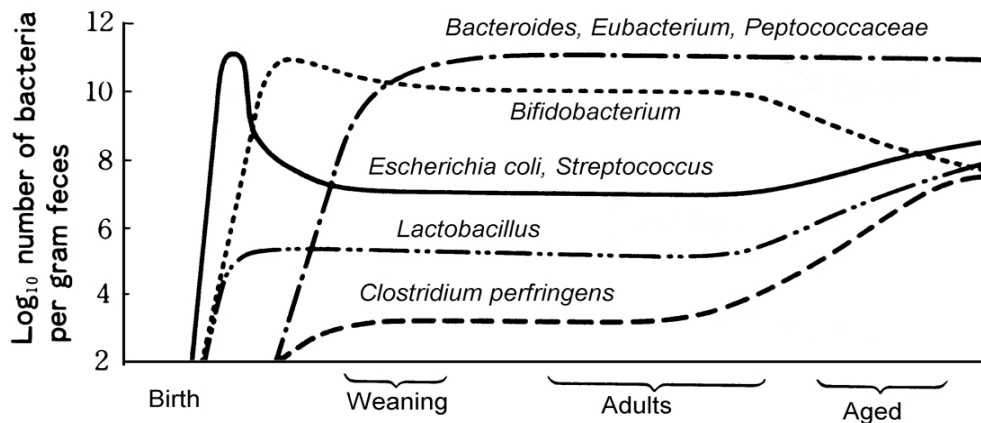


Figure 14 : Modification de l'équilibre des populations bactériennes dans le tractus digestif humain en fonction de l'âge. (Mitsuoka, T. 1996).

Les méthodes de détermination des populations bactériennes utilisant le séquençage du gène de l'ARN 16S, ne font pas apparaître de différences notables dans les grandes familles de bactéries présentes durant les premiers stades de l'implantation du microbiote intestinal. Ainsi, chez des nouveau-nés à 20 jours, les abondances relatives moyennes montrent que les *Bifidobacteriaceae* représentent environ 40 % des espèces retrouvées dans les fèces, suivi par les *Enterobacteriaceae* (15 %), les *Streptococcaceae* (14 %), les *Bacteroidaceae* (10 %), les *Staphylococcaceae* (5 %) et les *Lactobacillaceae* (5 %) (Biagi et al., 2017).

Les premiers stades du développement de la flore intestinale sont déterminants pour l'équilibre futur des espèces bactériennes. Il est généralement admis que les premières espèces s'établissant dans le tractus digestif sont les entérobactéries comme *E. coli*, les streptocoques et les staphylocoques, suivi après quelques heures par les clostridies. S'implantent ensuite, un à deux

jours après la naissance les bactéries lactiques, particulièrement les lactobacilles et les bifidobactéries (Mitsuoka, 2014) (Figure 15).

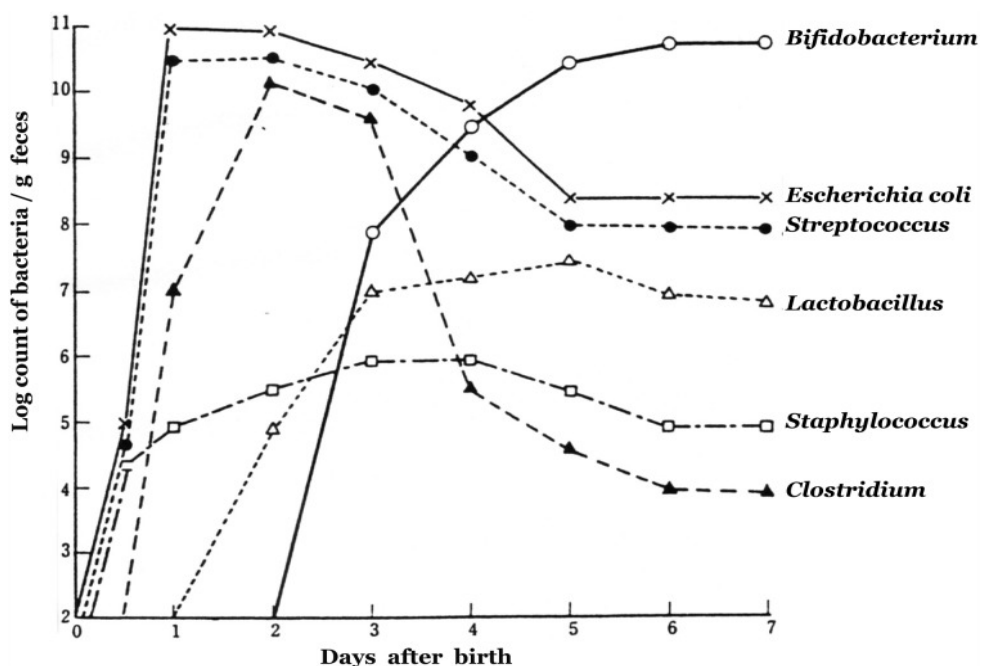


Figure 15 : Séquences d'apparition des principales espèces bactériennes durant les 7 premiers jours de la vie. (Mitsuoka, T. 2014).

Le rôle supposé des entérobactéries est d'éliminer par l'activité de leur métabolisme respiratoire les traces résiduelles d'oxygène présentes dans l'intestin et de produire un environnement réduit favorable à l'établissement des *Bacteroides* et des autres bactéries anaérobies (Adlerberth, 2008; Levitt, 1970). Cette implantation des bactéries anaérobies peut être tardive, de plusieurs jours à plusieurs semaines selon les cas. Cependant, cette cinétique d'installation n'est pas aussi systématique. La prépondérance bien documentée des bactéries lactiques et des bifidobactéries peut s'expliquer en partie par le fait que ce sont les premières espèces à avoir été recherchées et décrites dans les selles des nouveau-nés. En effet, les bactéries anaérobies strictes, techniquement plus difficiles à cultiver, ont été sous-évaluées. Pourtant elles sont également présentes dans de nombreux cas et retrouvées dans les études mettant en œuvre les techniques de séquençage 16S ou de métagénomique (Adlerberth and Wold, 2009). Palmer *et al.* ont ainsi montré que sur un échantillon de 14 nouveau-nés en bonne santé, nés à terme de mères en bonne santé également, les cinétiques d'apparition des espèces bactériennes de la naissance à un an sont beaucoup plus variables que ce qui était précédemment anticipé. La séquence d'implantation supposée, entérobactéries, bactéries lactiques puis anaérobies strictes n'est pas systématique, même si elle reste vraie dans une majorité des cas. Les équilibres relatifs

des espèces s'affinent durant la première année de vie jusqu'à donner les profils caractéristiques des microbiotes d'adultes avec la variabilité interindividuelle que cela implique (Palmer *et al.*, 2007) (Figure 16). Une fois installées, les bactéries du microbiote intestinal restent stable durant la plus grande partie de la vie de l'individu (Spor *et al.*, 2011).

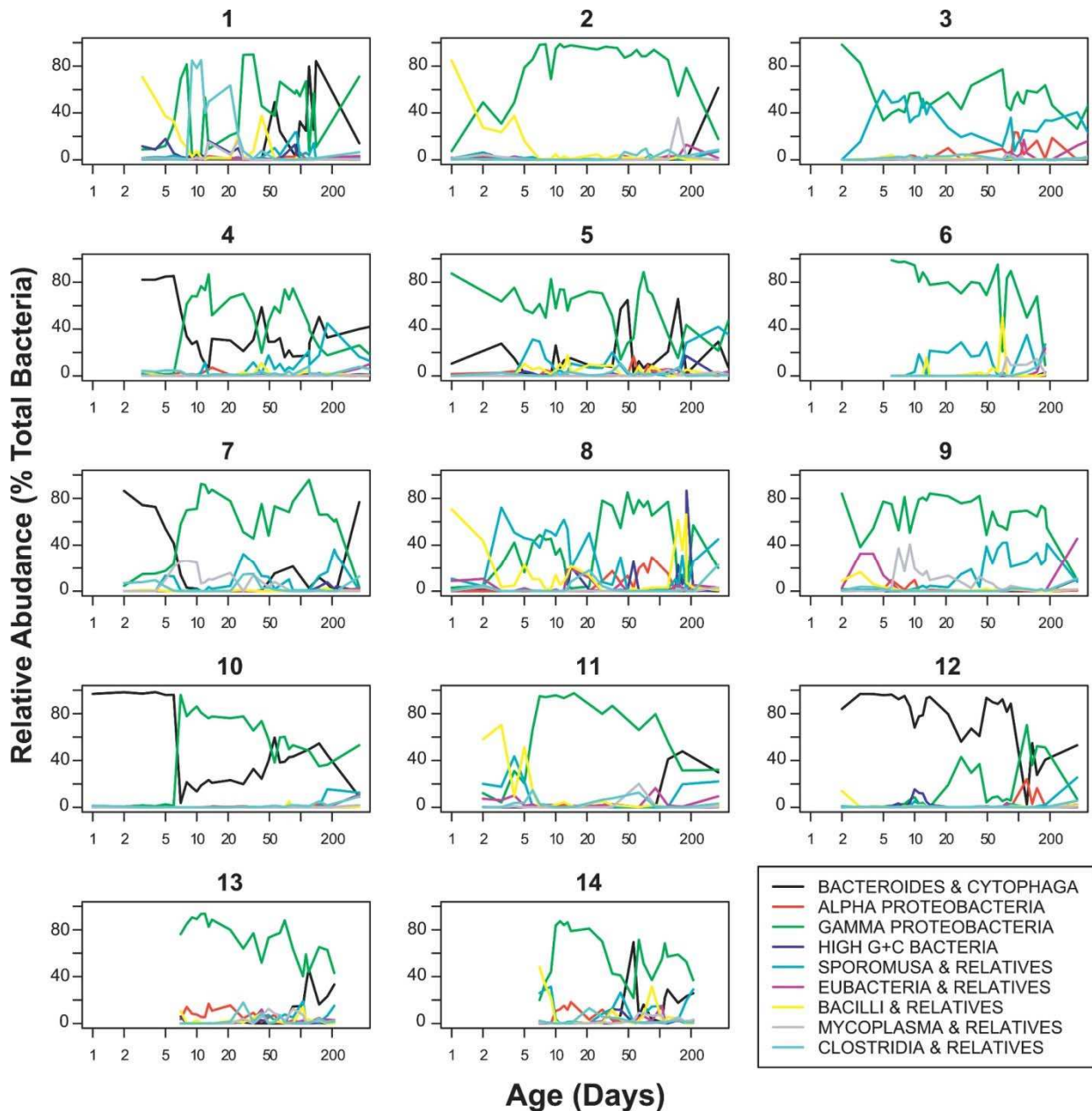


Figure 16 : Cinétique d'implantation et abondance relative des principales familles bactériennes durant la première année suivant la naissance sur une cohorte de 14 nouveau-nés. (Palmer, C. *et al.* 2007).

2) Paramètres influant sur l'implantation

C'est encore Escherich qui met en évidence l'influence de l'environnement sur l'implantation du microbiote du nouveau-né. Il cite l'allaitement naturel ou artificiel, ou encore l'environnement comme cause de la variabilité des espèces bactériennes observées dans le tractus digestif. Aujourd'hui, on sait que même s'il existe parfois une présence bactérienne *in utero*, c'est lors de l'accouchement que s'enclenche le phénomène de colonisation massive (Mackie *et al.*, 1999).

Le mode d'accouchement est le premier paramètre qui influence l'implantation. Durant les accouchements par voies naturelles, le nouveau-né est essentiellement colonisé par la flore de sa mère. Plus l'accouchement dure longtemps, plus il est facile d'isoler des bactéries dans le méconium à la naissance. On trouve ainsi des souches d'*E. coli* identiques dans la bouche du nouveau-né et dans les selles de sa mère. Le contenu gastrique de l'enfant quelques minutes après l'accouchement présente aussi les mêmes souches que celles présentes dans le col de l'utérus de la mère. De même, la plupart des nouveau-nés portent au niveau du nasopharynx la population microbienne vaginale de la mère. Cette contamination importante ne se retrouve pas chez les enfants nés par césarienne, beaucoup moins exposés au microbiote maternel et chez qui on retrouve essentiellement des bactéries présentes dans l'environnement comme l'air, sur les équipements médicaux et chez les autres enfants *via* le portage des personnels soignants (Mackie *et al.*, 1999). *Clostridium perfringens* et *C. difficile* sont beaucoup plus fréquents chez les enfants nés par césarienne, ceci étant probablement lié à la présence ubiquitaire des spores de ces espèces bactériennes (Adlerberth, 2008) et à une implantation dans un tractus digestif facilitée du fait de la moindre colonisation par rapport à celui d'un enfant né par voies normales. Les connaissances dans ce domaine sont cependant en forte évolution. Une étude récente montre ainsi que cette différence de microbiote lié au mode d'accouchement pourrait être moins importante que précédemment décrite et que les différences observées seraient plus liées à l'alimentation de la mère durant le dernier trimestre de grossesse (Chu *et al.*, 2017).

Après la naissance, les enfants sont exposés en permanence à de nouveaux microorganismes qui entrent dans le tractus digestif, principalement par voie buccale, avec la nourriture et par contact avec la peau de la mère. Le lait maternel contient une quantité de bactéries pouvant atteindre 10^4 ufc/mL (Jost *et al.*, 2014). Ce microbiote mammaire est vraisemblablement constitué de deux manières, d'une part par la remontée bactérienne à partir de l'extérieur, le long des canaux galactophores et d'autre part, relève probablement du même phénomène que celui trouvé dans le liquide amniotique avant la naissance, à savoir la translocation

bactérienne à partir du tractus digestif, via le système lymphatique en utilisant les cellules dendritiques (Rodriguez, 2014). Il y a donc une différence d'exposition aux microorganismes entre les enfants nourris au sein et ceux nourris uniquement artificiellement. Si la séquence d'implantation n'est pas fondamentalement différente à l'échelle des espèces, il y a quelques décalages temporels. Entre autre, les bifidobactéries et les bactéroïdes apparaissent plus tard chez les enfants nourris au sein, décalage peut être lié à la présence de composés anti-bactériens dans le lait maternel. La population bactérienne des enfants nourris au sein contient au final plus de

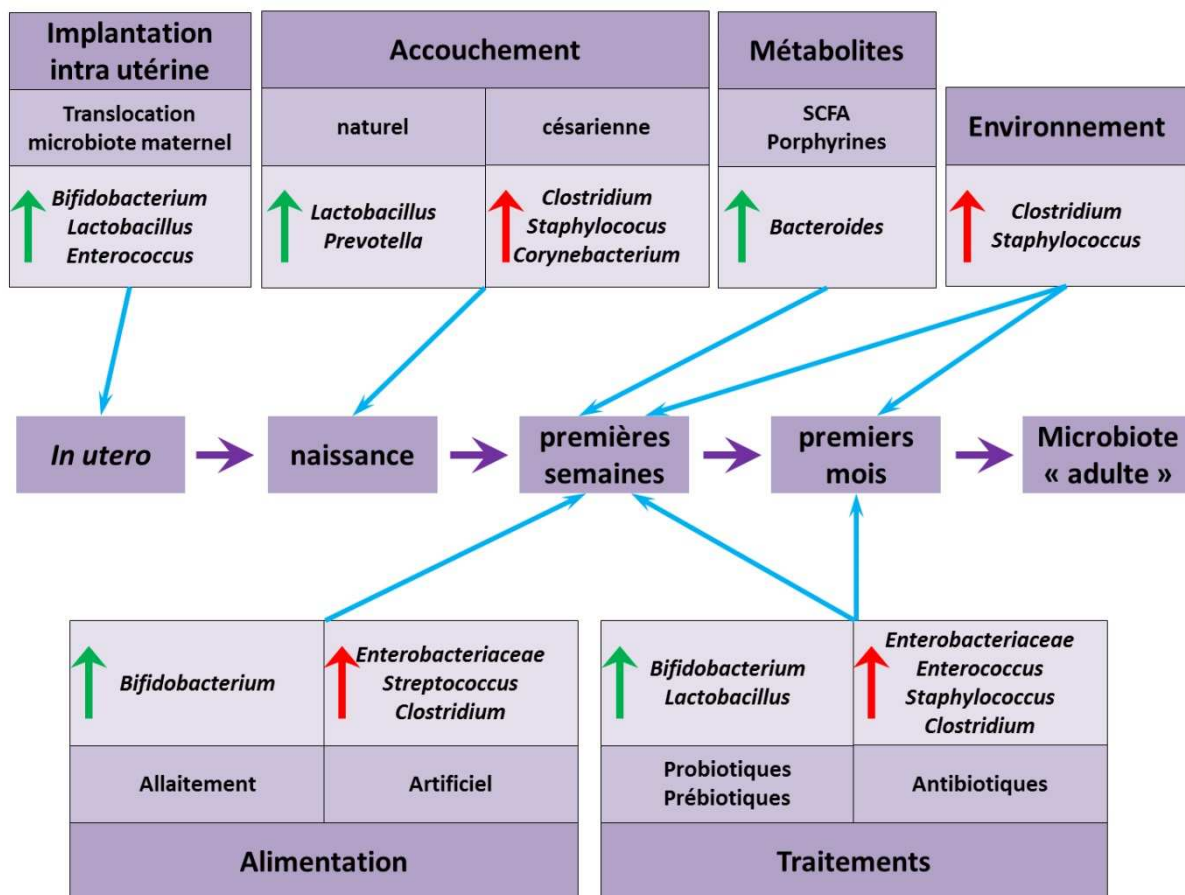


Figure 17 : Facteurs influant sur le microbiote intestinal de l'enfant. Les flèches vertes indiquent un effet plutôt positif, les rouges, un impact plutôt négatif. (D'après Matamoros, S. *et al.* 2013, Koenig, J.E. *et al.* 2010, Adlerberth, I. *et al.* 2006)

bifidobactéries et moins d'entérobactéries, de streptocoques et de clostridies. Cette différence disparaît lors de l'introduction de nourriture solide et au moment du sevrage (Benno *et al.*, 1984).

Les enfants nés prématurément et placés dans des unités de soins intensifs, fréquemment sous antibiothérapie présentent un déséquilibre dans l'implantation de leur microbiote. Ce déséquilibre commence par une diversité microbienne plus restreinte où les staphylocoques, les entérocoques et les entérobactéries deviennent majoritaires et les anaérobies, à l'exception des lactobacilles ne s'implantent que très peu (Madan *et al.*, 2012) (Figure 17).

L'environnement géographique, économique et social influe également sur la colonisation. Des différences sensibles existent entre les enfants nés dans les pays occidentaux, avec des normes d'hygiènes rigoureuses, et ceux nés dans les pays en voie de développement. Les conditions sanitaires occidentales ont permis de s'affranchir d'un grand nombre de pathologies, mais dans le cadre de l'implantation du microbiote, les conditions sanitaires des pays en voie de développement permettent une plus grande diversité des espèces colonisant l'intestin. Les différences observées entre naissance par voies naturelles et césarienne observées dans les pays occidentaux sont moins marquées dans les pays en voie de développement probablement du fait de la présence forte de bactéries dans l'environnement de leurs hôpitaux. Ainsi la colonisation est plus rapide et les espèces sont plus variées là où les conditions d'hygiène sont moins strictes. Cette colonisation rapide et massive présente l'avantage de permettre la mise en place plus rapide de la fonction de protection du microbiote. On observe d'ailleurs moins de contaminations par des pathogènes opportunistes, notamment des souches de *Staphylococcus aureus* dans le tractus digestif des enfants des pays en voie de développement les premiers mois de leur vie (Adlerberth, 2008). Cependant, cet avantage apparent de colonisation rapide du tractus digestif avec une grande diversité bactérienne est contrebalancé par une surreprésentation des septicémies chez les nouveau-nés liée à la translocation directe des microorganismes de l'intestin vers le système sanguin. Ces translocations sont particulièrement fréquentes quand les entérobactéries prennent le dessus sur les bactéries lactiques. La fréquence de translocation est encore augmentée quand les nouveau-nés ne sont pas nourris au lait maternel, perdant ainsi le bénéfice de l'immunité apportée par la mère (Van Camp *et al.*, 1994).

Enfin, dans les premières semaines suivant la naissance, le microbiote devient un important producteur de vitamines et autres cofacteurs essentiels au développement de l'enfant. Ainsi parmi l'ensemble des gènes exprimés par le microbiote du nouveau-né, on voit apparaître des transporteurs de fer, d'hème ou d'hémine qui sont liés au métabolisme du fer et à la synthèse de vitamine B12 (Backhed *et al.*, 2015).

Le microbiote intestinal a besoin d'un certain temps pour être parfaitement fonctionnel. A la naissance il est encore immature, voir absent. Durant les premiers mois de l'existence, grâce à l'environnement et notamment à l'alimentation, cet équilibre complexe se met en place. Il regroupe presque un millier d'espèces bactériennes différentes, chacune ayant sa niche écologique et son rôle au sein de cet ensemble. Vers un à deux ans de vie, le microbiote intestinal de l'enfant atteint une certaine stabilité dans sa composition qui est propre à chaque individu et qui restera remarquablement stable tout au long de sa vie d'adulte.

C) – *Bacteroides*, une référence de l'adaptation bactérienne dans le tractus intestinal

1) Les *Bacteroides*

Les *Bacteroides* appartiennent au genre le plus fréquemment retrouvé au sein du microbiote intestinal humain (Arumugam *et al.*, 2011). Si aujourd'hui les techniques moléculaires permettent de mettre facilement en évidence cette présence massive, il n'en a pas été toujours ainsi. Comme pour toutes les bactéries anaérobies, la culture de ces espèces peut être fastidieuse. L'introduction des cultures en tubes en agar glucosé profond selon la technique de Veillon et Zuber (Veillon and Zuber, 1898) a permis à Distaso de décrire la première souche de *Bacillus thetaiotaomicron* dans des prélèvements de fèces (Distaso, 1912). Cette souche a été, peu après, reclassée dans les

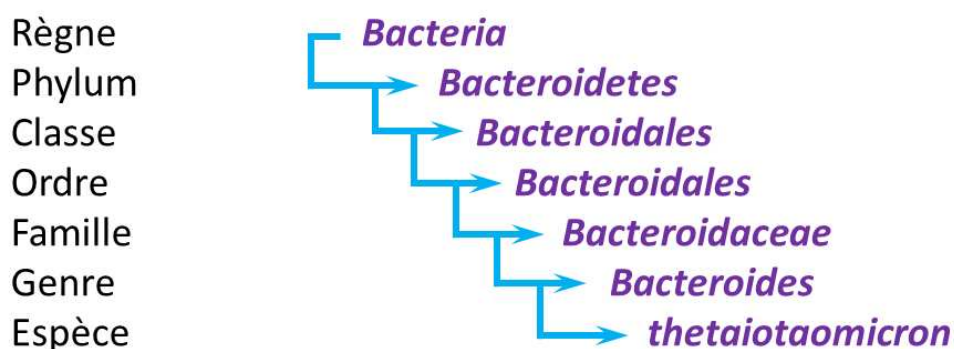


Figure 18 : Classification des *Bacteroides*

Bacteroides (Castellani and Chalmers, 1919) (Figure 18). Les difficultés techniques liées à la culture de ces espèces font que pendant longtemps elles ont été considérées comme rares et sans importance dans le tractus digestif humain. Il faut attendre 1933 pour voir l'omniprésence de ces espèces dans les échantillons isolés du tractus digestif (Eggerth and Gagnon, 1933). Des travaux sur des échantillons de fèces isolés d'une cohorte de vingt personnes, ont montré que les *Bacteroides* et particulièrement le groupe *fragilis* sont les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans le tractus digestif, avec un ordre de grandeur supérieur à $5 \cdot 10^{10}$ ufc par gramme de contenu intestinal (Moore and Holdeman, 1974). Enfin en 2003, le génome de *Bacteroides thetaiotaomicron* est séquencé permettant une approche moléculaire de l'étude de la bactérie (Xu *et al.*, 2003). Aujourd'hui on ne parle plus de groupe *fragilis*, le genre *Bacteroides* étant un ensemble d'espèces indépendantes (Hahnke *et al.*, 2016).

Bacteroides thetaiotaomicron est un bacille à Gram négatif, non sporulé, encapsulé, non mobile et anaérobie. Il est proche des espèces *B. fragilis*, *B. distans*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. uniformis* et *B. acidifaciens*. Bactérie commensale prédominante du tractus digestif, son génome de 6,26 Mb, est composé à 43 % de GC, et porte 4779 gènes codant des protéines (Xu *et al.*, 2003). Le nom de l'espèce vient de la forme des vacuoles observées dans la bactérie (θ : thêta, ι : iota, \omicron : omicron) (Krieg *et al.*, 2010). Les cellules font de 1 à 8 μm de long pour 1 μm de diamètre et on observe un pléomorphisme important (Figure 19).



Figure 19 : *B. thetaiotaomicron* sous microscope électronique à balayage. Grossissement x 10000. (Photo D. Halpern & T. Meylheuc – MIMA2 – INRA).

2) Physiologie des *Bacteroides*

La connaissance du métabolisme de *B. thetaiotaomicron* est essentielle pour pouvoir comprendre les facteurs qui permettent son implantation dans le tractus digestif. Nous allons nous concentrer sur quelques points qui font sa spécificité, à savoir sa capacité à utiliser des sucres complexes, sa diversité en termes de respiration et son auxotrophie pour l'hème.

2-1) Utilisation des glucides complexes

Les sucres sont la première source de carbone métabolisable au niveau de l'intestin, et si les sucres simples sont facilement utilisables tels quels et efficacement absorbés dès leur passage dans l'intestin grêle, il n'en est pas de même pour les polysaccharides complexes qui transitent jusqu'au côlon où ils sont pris en charge par certaines espèces du microbiote. Parmi ces espèces, les *Bacteroides* se sont tout particulièrement spécialisés et possèdent une multitude d'enzymes impliqués dans la prise en charge de ces sucres (Tableau 2) (Salysers *et al.*, 1977).

Tableau 2 : Comparaison du nombre de gènes impliqués dans le catabolisme des sucres chez *B. thetaiotaomicron* ou *E. coli*. (Xu, J. *et al.* 2003).

Enzymes impliqués dans l'utilisation des polysaccharides.	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>E. coli</i>
β -galactosidase	31	3
α -glucosidase	14	0
α -mannosidase	14	1
β -hexosaminidase	14	0
β -xylanase	11	1
β -glucosidase	10	8
α -galactosidase	8	1
β -xylosidase	8	1
α -mannanase	8	0
amylase	8	2
α -arabinosidase	7	0
β -N-acétylglucosaminidase	6	0
β -mannosidase	5	0
α -rhamnosidase	5	0
α -arabinofuranosidase	4	0
α -fucosidase	3	0
α -xylosidase	3	0
α -N-acétylglucosaminidase	3	0
chitinase	3	0
β -glucuronidase	2	1
β -fructofuranosidase	2	0
arabinase	2	0
α -glucuronidase	1	0
total	172	18

Au total, le métabolisme général des sucres occupe plus de 800 gènes sur le génome de *B. thetaiotaomicron* (<http://www.cazy.org/>) (Lombard *et al.*, 2014). Il dispose également de 163 protéines membranaires permettant la fixation des polysaccharides et de 20 transporteurs de sucres spécifiques. Au final, ces gènes impliqués dans l'utilisation des polysaccharides sont regroupés en 88 loci et représentent près de 20 % du génome total (Martens *et al.*, 2008).

Parmi les systèmes enzymatiques assurant la digestibilité des fibres végétales comme l'amidon, la pectine, le xylane ou l'hémicellulose, celui permettant la dégradation de l'amidon, *via* le système Sus, est particulièrement bien décrit.

L'amidon est le principal composé produit par les plantes permettant le stockage d'énergie. C'est un mélange de deux polysaccharides, polymères de glucoses, l'amylose et l'amylopectine. L'amylose, qui représente 15 à 30 % de l'amidon est composé d'une chaîne linéaire de molécules de glucoses liées par une liaison α -1,4-D-glucosidique. Cette chaîne se structure sous forme d'une hélice de 6 à 8 résidus de glucose par tour d'hélice stabilisé par des liaisons hydrogène. L'amylopectine, qui représente 70 à 85 % de la masse de l'amidon, est un polymère ramifié de molécules de glucose composé de chaînes linéaires dont les monomères sont liés par une liaison α -1,4-D-glucosidique sur lesquelles se branchent des chaînes latérales par liaison α -1,6-D-glucosidique tous les 24 à 30 monosaccharides. Ces chaînes sont trop complexes pour être intégrables directement dans le métabolisme bactérien, aussi, *B. thetaiotaomicron* utilise un ensemble d'enzymes codés par les gènes du système *susABCDEFGR* (Starch Utilisation System) (Figure 20) afin de permettre la dégradation totale de l'amidon, libérant les monomères de glucose assimilables par fermentation (Reeves *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 1997).

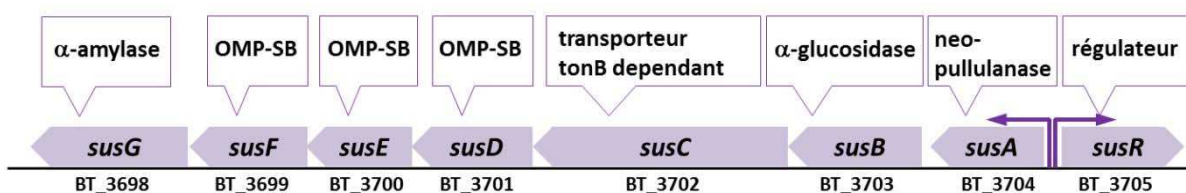


Figure 20 : Organisation de l'opéron *sus* (Starch Utilisation System). OMP-SB : Outer Membrane Protein - Starch Binding. (D'après Xu, J. *et al.* 2003 & Reeves, A.R. *et al.* 1996).

Le système Sus regroupe un ensemble de gènes organisés dans un locus composé d'un régulateur, et d'un opéron portant un transporteur TonB dépendant (le complexe TonB/ExbB/ExbB permettant d'apporter l'énergie nécessaire au transporteur, pour revue (Noinaj *et al.*, 2010)), plusieurs protéines capables de lier l'amidon dans le milieu extérieur et des glycosides hydrolases responsables de l'hydrolyse de l'amidon. L'amidon est piégé par une interaction avec un complexe membranaire SusDEF (Figure 21) et subit une première série de coupures par l' α -amylase SusG. Les

maltooligosaccharides produits sont alors suffisamment petits pour être pris en charge par SusC, transporteur TonB dépendant et passent ainsi dans le périplasma. Le maltose entrant dans le périplasma est le signal senseur de SusR, régulateur qui stimule la transcription l'opéron *susABCDEFG*. Le maltose est également pris en charge par deux autres enzymes, une néopullulanase dégradant les trioses et une α -glucosidase dégradant les dioses, qui finissent l'hydrolyse libérant du glucose. Ce glucose passe ensuite la membrane interne et entre dans le métabolisme énergétique comme substrat de fermentation (Foley *et al.*, 2016).

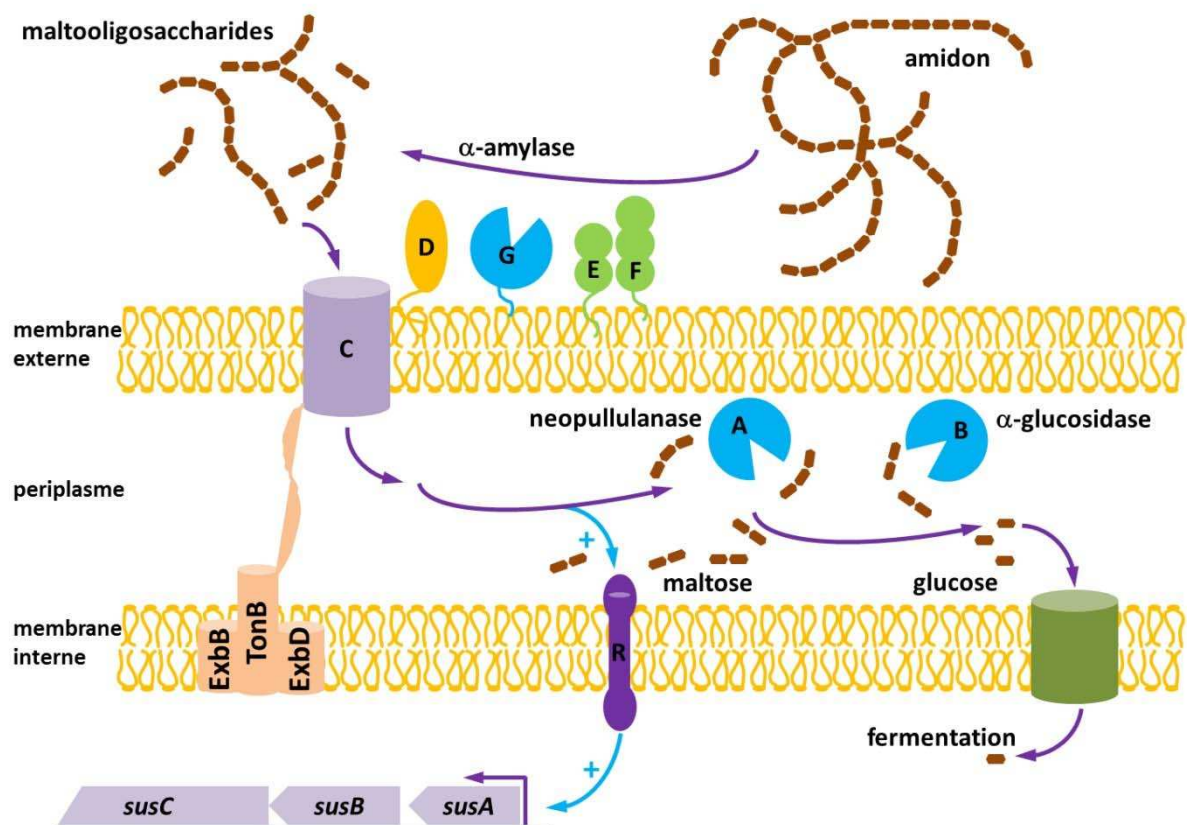


Figure 21 : Fonctionnement du système *sus* chez *B. thetaiotaomicron* (D'après Foley, M.H. *et al.* 2016).

En plus du système *sus*, *B. thetaiotaomicron* possède plusieurs systèmes redondants organisés en 12 clusters représentant plus d'une centaine de gènes, chaque cluster possédant des homologues de *susC/D* et des glycosides hydrolases, l'ensemble étant sous contrôle d'un facteur sigma de fonction extracytoplasmique (facteur σ^{ECF}) (Helmann, 2002; Xu *et al.*, 2003). Ces clusters ne sont transcrits que lorsque l'amidon est présent en surface de la bactérie. Ce signal rompt l'interaction avec l'anti- σ , le facteur σ libre se fixant alors sur les séquences promotrices permettant la transcription des gènes.

Le génome de *B. thetaiotaomicron* porte également, parmi les 88 loci spécialisés dans la prise en charge des polysaccharides, plusieurs systèmes permettant la dégradation de différentes sources de sucres. Ces gènes sont induits lorsque la cellule ne trouve plus dans le milieu extérieur les sucres préférentiels nécessaires à son métabolisme. Ces autres sources de sucres sont d'une part des glycosaminoglycanes comme l'héparine, la chondroïtine et le hyaluronate, mais aussi et surtout les composés du mucus comme les mucines (O- et N-glycanes) ou l'acide sialique, chargés, entre autre, de la protection des muqueuses (Martens *et al.*, 2008; Sonnenburg *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2003).

B. thetaiotaomicron possède donc de nombreux systèmes redondants de prise en charge des sucres complexes, souvent régulés par des facteurs σ^{ECF} . Au total, 50 facteurs σ^{ECF} sont annotés chez *B. thetaiotaomicron*, montrant l'adaptabilité de la bactérie et sa capacité de réponse rapide aux variations de son environnement (Comstock and Coyne, 2003).

2-2) Respiration et anaérobiose

Le métabolisme énergétique réunit tout un ensemble de réactions qui permet à une cellule de produire l'énergie nécessaire à son bon fonctionnement, à partir de précurseurs, nutriments, disponibles dans le milieu environnant. Pour transformer l'énergie des nutriments en ATP, énergie utilisable par la cellule, la plupart des organismes disposent d'une chaîne respiratoire (Figure 22). Elle est composée de complexes enzymatiques membranaires et de transporteurs d'électrons, tels que les cytochromes et assure la création du gradient de concentration de protons.

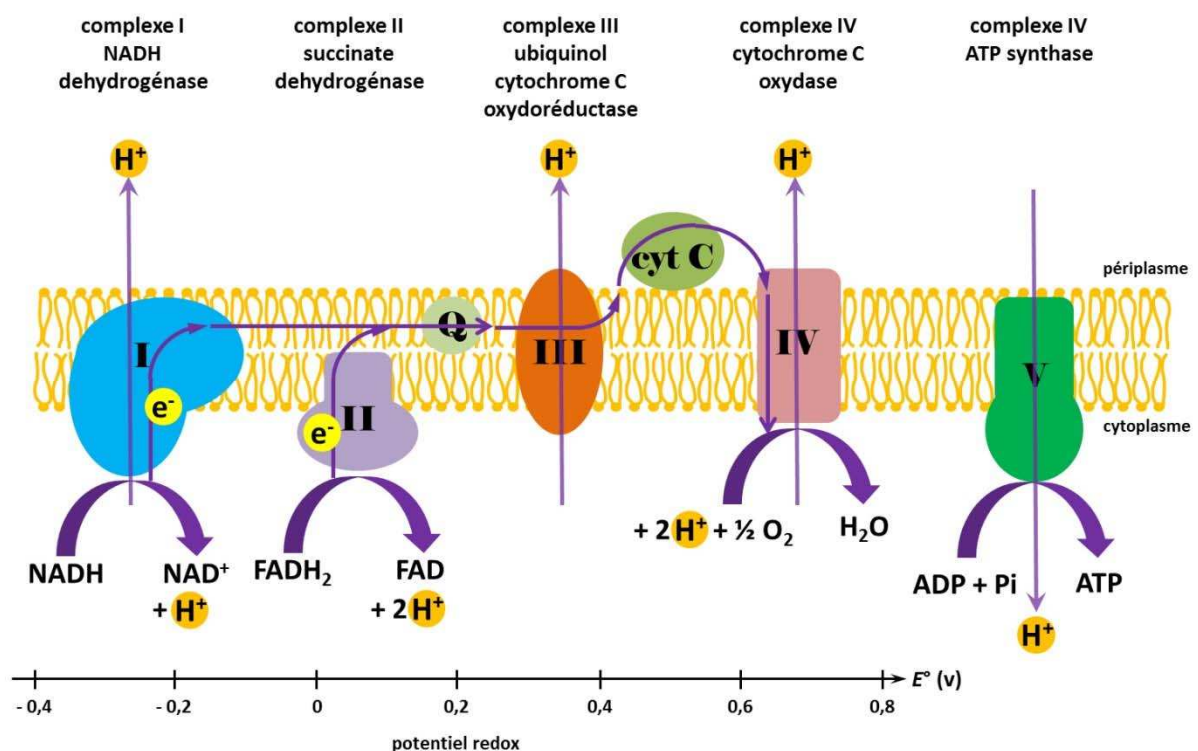


Figure 22 : Modèle général de chaîne respiratoire membranaire. (D'après Palmer, M. Univ. Waterloo, Canada. <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/RespiratoryChain.html>).

Son fonctionnement est le suivant : la liaison de NADH et $FADH_2$ aux complexes enzymatiques libère des protons exportés à travers la membrane plasmique. Des électrons sont transportés dans la membrane par une série de molécules redox présentes dans les complexes I à IV, puis sont transférés sur un accepteur d'électron comme l' O_2 . Le gradient d'électron crée une force qui permet de transférer les protons vers l'extérieur du système, l'espace périplasmique chez les bactéries. Les protons sont ré-intériorisés par l'ATP synthase et phosphorylent l'ADP en ATP. Ce schéma classique de chaîne respiratoire, caractéristique de la respiration aérobie, n'est pas complet chez toutes les bactéries et peut varier chez de nombreuses espèces qui peuvent utiliser, comme

accepteurs terminaux, des minéraux comme les nitrates ou les sulfates ou des composés organiques comme le fumarate. Dans ce cas, la respiration est dite anaérobie. Ces différents systèmes n'ont pas la même efficacité en terme de création du gradient électrochimique et donc en terme de production d'ATP. Enfin, l'absence de chaîne respiratoire fonctionnelle oblige la bactérie à basculer en métabolisme fermentaire. Dans ce cas la production d'énergie est moins efficace et la production d'ATP n'est due qu'à la phosphorylation de l'ADP sans intervention de la chaîne d'électron (Granger *et al.*, 2007). Cette efficacité énergétique de la respiration, 38 moles d'ATP produites par mole de glucose, par rapport à la fermentation, 2 moles d'ATP produites par mole de glucose, a été illustrée chez *Lactococcus lactis*, bactérie normalement fermentaire, qui, mise en présence d'hème et d'O₂, modifie son métabolisme qui devient respiratoire. Ce changement métabolique lui permet une survie à long terme augmentée de plusieurs mois et une biomasse finale multipliée par plus de 2 (Duwat *et al.*, 2001).

B. thetaiotaomicron est une bactérie anaérobie, mais elle est effectivement capable, si ce n'est de croître, au moins de résister et de survivre de nombreuses heures en présence d'oxygène. Une étude montre que chez *B. fragilis* et quelques autres *Bacteroides*, certains isolats étaient capables de résister 72 heures à 21 % d'O₂ (Tally *et al.*, 1975). *B. fragilis* peut également se développer à des concentrations en oxygène de près de 0.05 % (Meehan *et al.*, 2012). Il est généralement admis que seules les bactéries aérobies sont capables de s'établir lors de la primo-colonisation du tractus digestif du nouveau-né. Les bactéries anaérobies ne s'implantent qu'après que les aérobies aient consommé l'oxygène résiduel (Adlerberth, 2008; Levitt, 1970). Pourtant il a été montré que *B. fragilis* est capable de s'implanter même en absence de bactéries aérobies (Baughn and Malamy, 2004). De fait, les mesures d'oxygène résiduel dans le tractus digestif montrent qu'il n'existe que très peu de différence entre un intestin colonisé et axénique (Borinside *et al.*, 1976). Ainsi, plus que la quantité d'oxygène, l'état d'oxydation du milieu serait limitant pour l'établissement des bactéries anaérobies (Levitt, 1970). Cette réduction de l'environnement peut être faite par les bactéries anaérobies elles mêmes. En effet, *B. thetaiotaomicron*, comme *B. fragilis* possède une cytochrome oxydase capable de consommer l'O₂ résiduel du milieu et le transformer en H₂O, ce qui stimule également la croissance de la bactérie en conditions de faibles concentrations en O₂, ce dernier servant d'accepteur final d'une chaîne respiratoire. Cependant cette cytochrome oxydase n'est pas indispensable ni en terme de métabolisme énergétique, ni en terme de maintien du potentiel redox (Baughn and Malamy, 2004).

En plus de cette chaîne respiratoire, *B. thetaiotaomicron*, dispose d'une voie de fermentation des sucres conduisant principalement à la production de succinate, propionate et acétate (Figure 23).

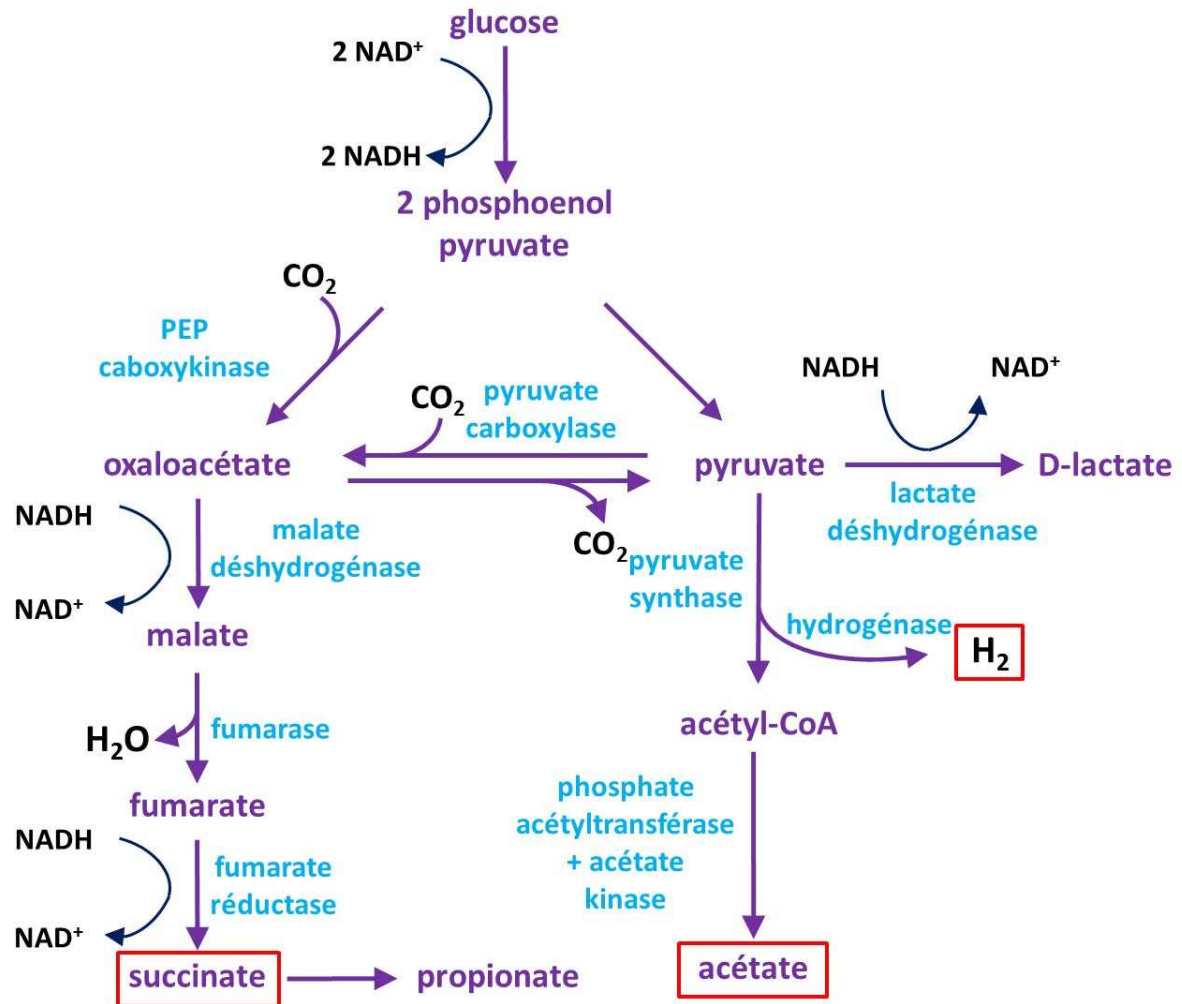


Figure 23 : Schéma simplifié de la voie de fermentation du glucose chez *B. thetaiotaomicron*. Les produits majoritairement excrétés sont encadrés. (D'après Pan, N. & Imlay J.A. 2001).

En présence d'oxygène, la fumarase de *Bacteroides*, une deshydratase à cluster Fe-S, est inactivée interrompant la voie de production du succinate/propionate (Pan and Imlay, 2001). En parallèle, la bactérie dispose d'une fumarate réductase FrdCBA (*BT_3053 - BT_3054 - BT_3055*) qui permet le fonctionnement d'une chaîne respiratoire anaérobie utilisant le fumarate comme accepteur final d'électron (Figure 25). Cette respiration anaérobie se fait en particulier grâce à la présence d'un transport d'électron à cytochrome b (FrdC). La présence d'hème nécessaire à la formation d'un cytochrome fonctionnel permet le passage de la fermentation à la respiration anaérobie. La quantité d'ATP produite par la réduction du fumarate est plus importante en respiration. Cette augmentation d'énergie disponible induit une diminution drastique du temps de

génération durant la croissance et une augmentation de la biomasse finale (Macy *et al.*, 1975). La respiration anaérobie a cependant un inconvénient car elle génère plus d'espèces oxygénées réactives (ROS). En effet, la fumarate réductase, *via* la flavine, cofacteur d'oxydoréduction, est connue

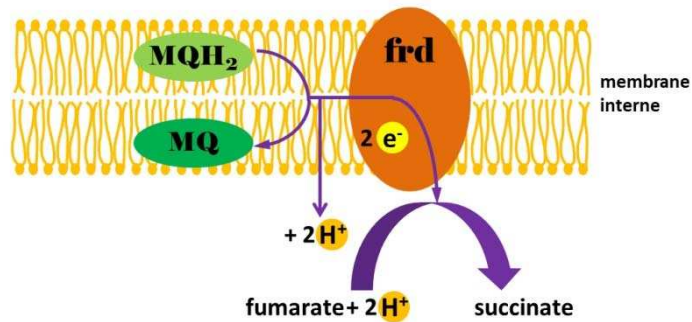


Figure 25 : Respiration anaérobie chez *Bacteroides* via la fumarate réductase. D'après The BioCyc database, Caspi, R. *et al.* 2014.

pour produire des ROS lors de la réduction de l'oxygène. *A contrario* l'addition du fumarate semble diminuer la production de ROS, le fumarate entrant en compétition avec l'oxygène pour le transport d'électron au niveau de la flavoprotéine (FrdB). Le fonctionnement de la fumarate réductase en convertissant le fumarate en succinate serait donc un facteur important de production des ROS chez *B. fragilis*, comme mis en évidence par leur dosage dans une souche $\Delta ahpC\Delta kat\Delta tpx$ dépourvue des enzymes chargés de la détoxification (Figure 25) (Meehan and Malamy, 2012).

Ces résultats sont aujourd'hui remis en question. Une étude récente montre que, chez *B. thetaiotaomicron*, ni la fumarate réductase, ni l'ajout de fumarate dans le milieu ne sont la cause de la production de ROS (Lu and Imlay, 2017). Cependant ces ROS sont bien produits en grande quantité chez *B. thetaiotaomicron* car ils permettent d'induire le régulateur transcriptionnel OxyR qui régule l'expression des gènes codant les enzymes prenant en charge le peroxyde d'hydrogène, la catalase, l'alkyl hydroperoxydase, la thiorédoxine peroxydase et les rubrerythrine (*cf* chap. D).

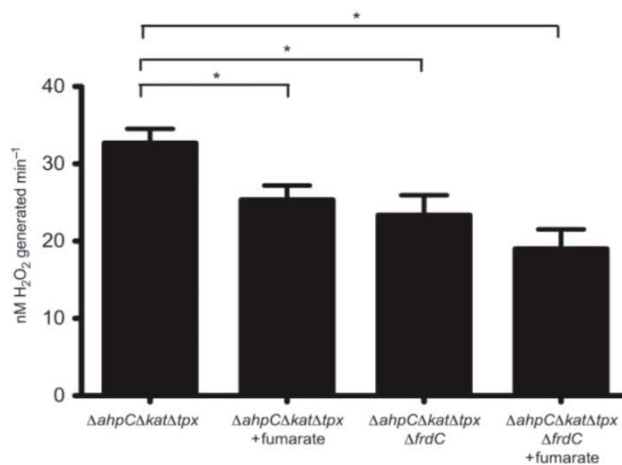


Figure 24 : Effet de l'expression du gène *frdC* combiné ou non à l'ajout de fumarate sur la production de ROS chez *B. fragilis* (Meehan and Malamy, 2012)

En revanche, la source principale de ces ROS demeure pour l'instant inconnue.

En conclusion, parmi les bactéries anaérobies, *B. thetaiotaomicron* est bien équipée en diversité de voies métaboliques, possédant plusieurs voies de glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas), la voie du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate, KDPG (Entner-Doudoroff) et celle des pentoses phosphates (Warburg-Dickens-Horecker). Elle possède un cycle des

acides tricarboxyliques complet. Elle possède une chaîne de transfert d'électrons (dépendant de l'hème exogène) et est capable de fermentation et de respiration anaérobie. Sa résistance à l'O₂ lui permet de s'adapter et cela pourrait expliquer qu'elle soit parmi les espèces bactériennes dominantes du microbiote intestinal, un habitat soumis à de nombreuses variations environnementales et très compétitif.

Les bactéries anaérobies ont au départ été définies par leur intolérance à l'oxygène et donc leur incapacité à se multiplier en présence d'air. Puis il a été proposé de classer ces microorganismes, aérobies et anaérobies, en fonction de la présence ou de l'absence d'enzymes prenant en charge les dérivés toxiques de l'oxygène moléculaire, comme les catalases, peroxydases et superoxyde dismutases (McCord *et al.*, 1971). Cette classification était fondée sur le postulat que seules les bactéries aérobies ayant à gérer en permanence un contact avec l'oxygène, possèdent ces enzymes permettant la détoxification des radicaux libres oxygénés grâce à leur transformation en peroxyde d'hydrogène puis ensuite en eau (Figure 26).

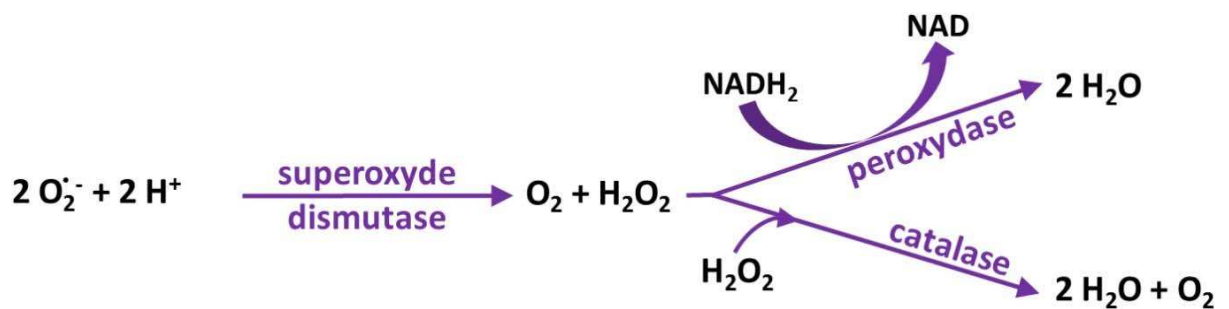


Figure 26 : Prise en charge de l'ion superoxyde dans les cellules.

Ce classement enzymatique des bactéries anaérobies est maintenant caduque, de nombreuses espèces anaérobies possédant également un ou plusieurs de ces gènes dans leur génome. C'est entre autre le cas de *B. thetaiotaomicron* qui dispose de nombreux gènes capable soit d'intervenir directement dans la détoxification des ROS, soit qui stockent le fer limitant ainsi la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$). Pour qu'elles soient actives ces différentes protéines nécessitent généralement du fer ou de l'hème (Tableau 3).

Tableau 3 : principales enzymes impliquées dans la gestion du stress oxydant chez *B. thetaiotaomicron*

Protéine	Gène		Référence
Dps	<i>dps</i>	<i>BT_4715</i>	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
DpsL	<i>dpsL</i>	<i>BT_3823</i>	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
Ferritine	<i>ftnA</i>	<i>BT_1107</i> , <i>BT_1109</i> , <i>BT_1373</i>	(Andrews, 2010)
Reverse Rubrerythrine	<i>rbr2</i>	<i>BT_0216</i>	(Mishra and Imlay, 2013)
Rubrerythrine	<i>rbr1</i>	<i>BT_3182</i>	(Mishra and Imlay, 2013)
Superoxyde dismutase	<i>sodB</i>	<i>BT_0655</i>	(Privalle and Gregory, 1979)
Alkylhydroperoxyde réductase	<i>ahpCF</i>	<i>BT_2811</i> , <i>BT_2812</i>	(Mishra and Imlay, 2013; Rocha and Smith, 1999)
Bacterioferritine	<i>bcp</i>	<i>BT_4611</i>	(Andrews, 2010; Mishra and Imlay, 2013)
Cytochrome c peroxidase	<i>ccp</i>	<i>BT_1606</i>	(Herren <i>et al.</i> , 2003; Mishra and Imlay, 2013)
Catalase	<i>katB</i>	<i>BT_1971</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2003)
Gluthation peroxidase	<i>gpx</i>	<i>BT_3971</i>	(Flohe <i>et al.</i> , 2011; Mishra and Imlay, 2013)
Thiol peroxydase	<i>tpx</i>	<i>BT_1329</i>	(Flohe <i>et al.</i> , 2011; Mishra and Imlay, 2013)

En complément de ces enzymes capables de prendre en charge les radicaux libres oxygénés et de limiter la réaction de Fenton, la bactérie dispose également d'un système *BatI* (pour **Bacteroides AeroTolerance**) codé par l'opéron *batABCDE* (*BT_0907*, *BT_0906*, *BT_0905*, *BT_0904*, *BT_0903*) qui assure la réduction des protéines prenant en charge les radicaux libres, augmentant le rendement des mécanismes de défense et améliorant ainsi la résistance au stress oxydant (Tang *et al.*, 1999). Enfin, la bactérie dispose également du système *SUF*, permettant l'assemblage des clusters Fe-S, au niveau de l'opéron *sufBCD* (*BT_3606*, *BT_3607*, *BT_3608*) (Wollers *et al.*, 2010). Au final, *B. thetaiotaomicron* dispose d'une trentaine de gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant et induits en présence d'O₂ ou de l'H₂O₂ (Rocha *et al.*, 2003). Ces données montrent que, contrairement à ce qui était proposé, les bactéries anaérobies ont développé de nombreux mécanismes pour gérer le stress oxydant en cas de changement d'environnement (pour revue (Imlay, 2008a)).

Des variants de *B. fragilis* capables de supporter des concentrations en O₂ supérieures à 2 %, bien supérieures à celles observées classiquement, ont été isolés (Figure 27). Leur haute tolérance à l'O₂ est la conséquence de l'inactivation d'un seul gène, *oxe* (pour oxygen enabled) (*BT_4126*). Ce gène, par ailleurs annoté comme anaerobic nitric oxide reductase, contient 4 cystéines et pourrait être un senseur de redox. L'hypothèse avancée par les auteurs est que le mutant Δ *oxe*

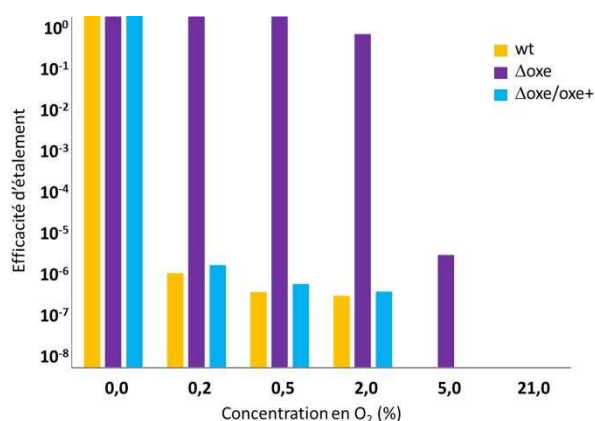


Figure 27 : Efficacité d'étalement des souches de *fragilis* en présence de quantités croissantes d'oxygène. Wt : souche sauvage, Δ oxe : mutant, Δ oxe/oxe+ : mutant complété. D'après Meehan, B.M. *et al.* 2012.

accumule un pool de réducteurs servant aux peroxydases pour prendre en charge plus efficacement le H₂O₂. L'existence de ce type de mutations dans les souches cliniques de *B. fragilis* est probablement indicatrice d'adaptation de la bactérie lors de sa translocation du tractus digestif vers les plaies ou le péritoine, environnements dans lesquels la concentration en oxygène varie de 2 à 7 % (Meehan *et al.*, 2012).

Enfin, *B. fragilis* a développé un autre moyen de lutter contre le stress, et en particulier contre le stress oxydant. Il utilise un système généralement présent chez les eucaryotes et assez rare chez les bactéries. Ce système permet par la présence de micro domaines membranaires riches en sphingolipides et en cholestérol (radeaux lipidiques) de mettre en place des cascades de signalisation autorisant une réponse au stress beaucoup plus rapide (An *et al.*, 2011). Ces radeaux lipidiques sont connus pour faciliter grâce à leurs propriétés physico-chimiques, la concentration de protéines diverses dont des récepteurs. Ces radeaux sont également des structures rendant la membrane plus résistante à certains détergents. *B. fragilis* est capable de synthétiser certains sphingolipides et est également capable de récupérer le cholestérol de son environnement, l'hôte en fournissant de grandes quantités, soit *via* la nourriture soit *via* la synthèse. A l'aide de ce système, il est en mesure de répondre beaucoup plus rapidement aux stress environnementaux augmentant ainsi sa survie (Figure 28).

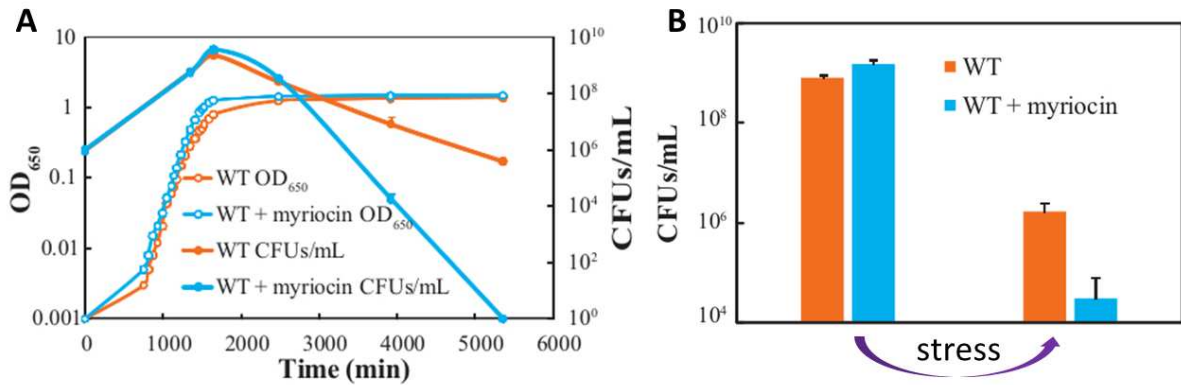


Figure 28 : Effets des sphingolipides sur la survie en phase stationnaire de *B. fragilis* (A) et sur sa survie après un stress (B). Les souches sauvages produisant des sphingolipides (en orange) ont une survie améliorée de près de 6 log en trois jours et demi par rapport aux souches cultivées en présence de myriocine (en bleu), inhibiteur de la synthèse des sphingolipides. De même lorsque la souche est soumise à un stress, dans ce cas thermique (passage à 42°C) et oxydant (culture à l'air durant 14 heures), la synthèse de sphingolipides permet une survie améliorée de 2 log. (An, D. *et al.* 2011).

Parmi les bactéries anaérobies, *B. fragilis* possède une capacité de résistance à l'oxygène, mettant en œuvre de nombreux mécanismes, qui lui permet de s'adapter à de nombreux milieux. En cas de stress oxydant, la bactérie peut rapidement moduler au niveau transcriptionnel jusqu'à 45 % de son génome afin de répondre aux changements environnementaux (Sund *et al.*, 2008). Cette adaptabilité est probablement une des raisons qui font de *B. fragilis* une espèce bactérienne dominante du microbiote intestinal, un milieu variable dans un habitat très compétitif. C'est aussi cette adaptabilité qui lui permet de changer d'environnement avec facilité et donc, chez l'humain, de migrer vers d'autres organes et de devenir pathogène.

3) Pathogénie des espèces du genre *Bacteroides*

C'est grâce au nombre de plaies, entre autre abdominales, infligées durant le conflit de 1914-1918 que l'étude de la pathogénie des bactéries anaérobies à Gram négatif s'est développée (Distaso, 1916). Ainsi, Alexander Fleming écrira : « *La bactériologie des plaies infligées durant cette guerre a permis une étude particulièrement intéressante dans la mesure où la flore de ces plaies infectées s'est révélée très différente de celle rencontrée dans la pratique civile* » (Fleming, 1915).

Les espèces du genre *Bacteroides* sont fréquemment retrouvées dans les infections chez l'Homme. En co-infection avec d'autres bactéries anaérobies strictes ou facultatives, elles sont retrouvées dans la plupart des abcès localisés dans le crâne, le thorax, l'abdomen, et les voies urogénitales. La liste des pathologies dans lesquelles on retrouve *Bacteroides* comprend des abcès cérébraux, des abcès pulmonaires, le noma, des infections intra abdominales, des endocardites et péricardites, des appendicites perforées et péritonites, des maladies inflammatoires pelviennes et des thrombophlébites purulentes. Ces infections sont généralement observées lors du passage de *Bacteroides* de son environnement habituel, le tractus digestif, vers les muqueuses suite à un traumatisme tel que morsure, brûlure ou coupure et souvent suite à des chirurgies invasives, en particulier intestinales.

Bacteroides fragilis, qui ne représente que 0,5 % de la flore intestinale humaine, est la bactérie pathogène opportuniste la plus fréquemment retrouvée dans ces infections (Figure 29) et cette "surreprésentation infectieuse" est due à des facteurs de virulence impliqués dans la capacité d'adhérence aux tissus, la protection contre la réponse immunitaire de l'hôte et la destruction des tissus (pour revue (Wexler, 2007)).

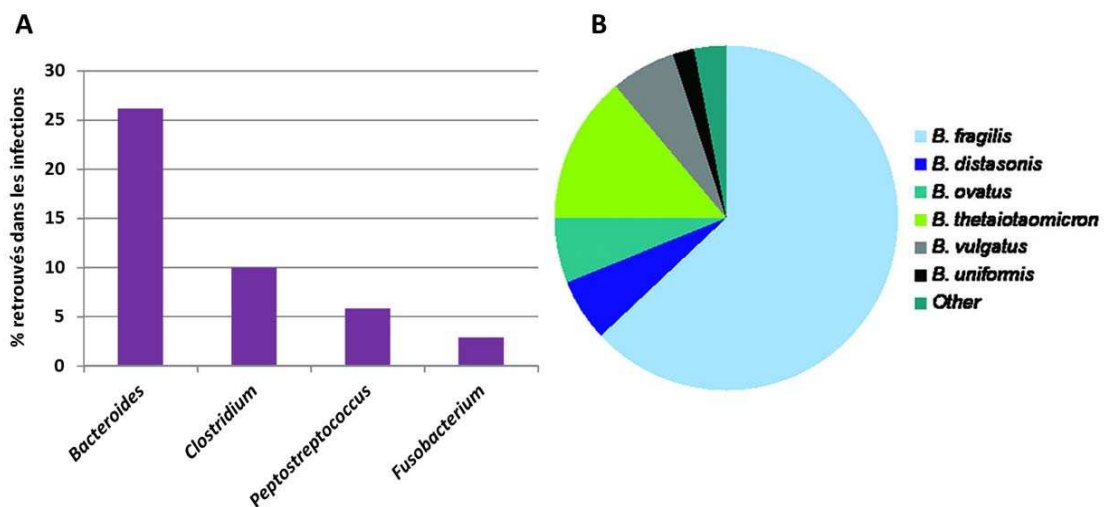


Figure 29 : Représentation des principaux genres bactériens retrouvés dans des bactériémies à bactéries à Gram négatif (A) (d'après (Goldstein, 1996)), et représentation des différentes familles de *Bacteroides* retrouvées dans les infections (B) (Wexler, 2007).

3-1) Capsule bactérienne et formation d'abcès

B. fragilis possède une capsule polysaccharidique déclenchant chez l'hôte une réponse immunitaire particulière conduisant à la formation d'un abcès. L'hôte repère l'entrée de la bactérie pathogène et l'isole en l'entourant d'une membrane fibreuse et de débris cellulaires, de globules blancs (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) et de bactéries mortes (Tzianabos *et al.*, 1993). La capsule est clairement responsable des abcès car l'injection de capsule seule suffit à déclencher leur formation (Coyne *et al.*, 2000).

3-2) Mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire

B. fragilis a développé plusieurs systèmes lui permettant de se soustraire à la réponse immunitaire de l'hôte. Lorsque la bactérie arrive dans le péritoine suite à une rupture de la paroi du tractus digestif, les macrophages péritonéaux sont la première défense que la bactérie rencontre. En présence de *B. fragilis*, la synthèse de la nitric oxide syntase inductible (iNOS) et la production de monoxyde d'azote, molécule bactéricide, produit par les macrophages sont fortement diminuées. On voit également la co-localisation de filaments d'actine et de iNOS dans le cytosquelette entraînant la formation de pores dans la membrane du macrophage (Vieira *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2005).

Un autre mécanisme de défense de la bactérie réside dans sa capacité à modifier ses polysaccharides de surface. Un système on/off d'expression de gène par inversion des fragments d'ADN portant les promoteurs permet l'expression différentielle, entre autres, des différents constituants de la capsule polysaccharidique (Figure 30). Cette inversion se fait par recombinaison de séquences répétées inversées. Avec ce système de régulation très souple, la bactérie n'exprime pas systématiquement toutes ses protéines de surface, en modifie la séquence codante et devient de ce fait, plus difficilement reconnue par le système immunitaire (Kawahara *et al.*, 2004).

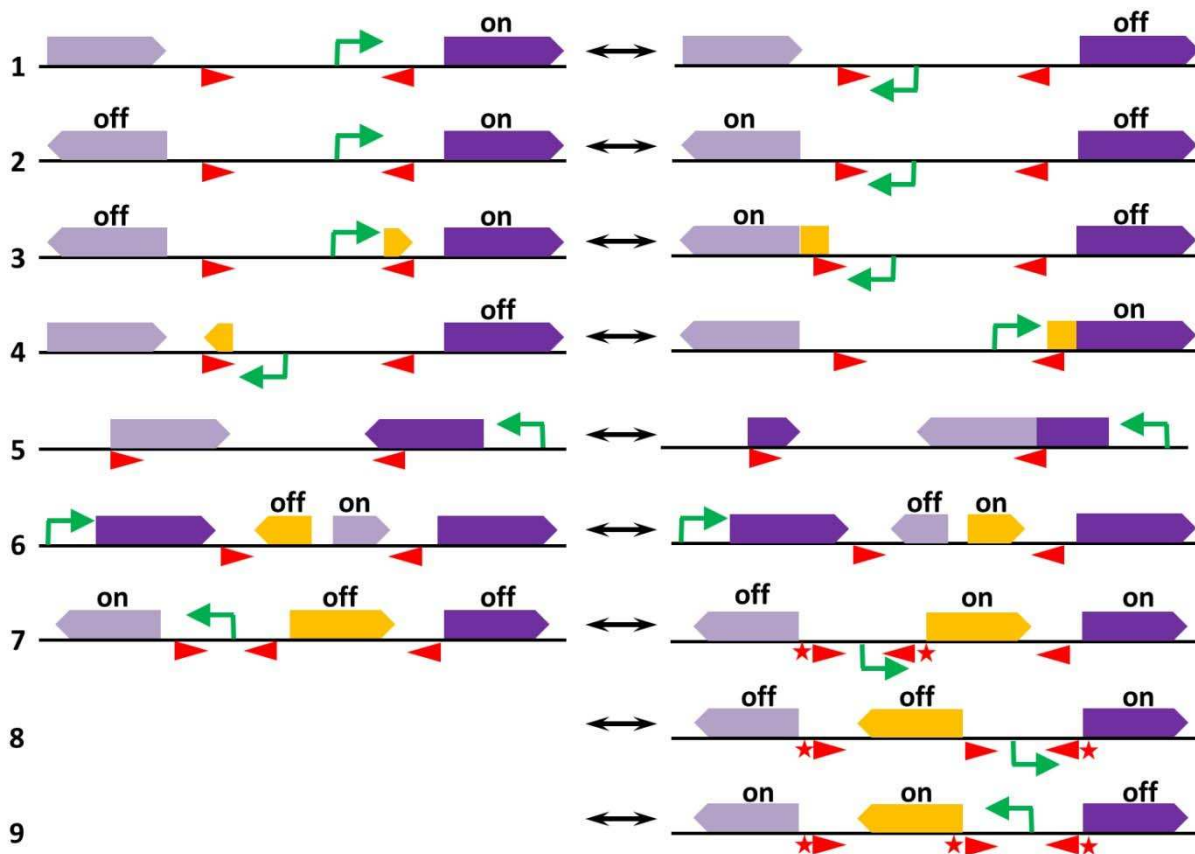


Figure 30 : Modèles d'expression différenciée de gènes par recombinaisons entre IR et inversion de fragments de chromosome portant les séquences promotrices chez *B. fragilis*. Les triangles rouges représentent les IR, les triangles avec une étoile sont les IR qui recombinent dans les fragments à trois IR. Dans les cas 1 et 2, une simple inversion de la séquence promotrice va allumer ou éteindre l'expression du ou des gènes suivants. Les cas 3 et 4 sont du même ordre mais avec en plus une petite séquence codante qui lors de l'inversion va aller modifier la partie N-terminale du gène dont l'expression va être modifiée. La position de l'IR dans le cas 5 entraîne l'apparition de protéines à la partie C-terminale modifiée. Dans la situation 6, il y a simplement modification de l'ordre des gènes d'un opéron et donc expression de l'une ou l'autre des petites protéines codées dans la région inversée. Et dans les cas 7, 8 et 9, la présence de trois IR va permettre de multiplier les possibilités en recombinant deux à deux ou les trois à la fois. (D'après Kuwahara, T. *et al.* 2004).

3-3) *Enzymes impliquées dans la virulence et entérotoxines*

Certaines protéases de *B. fragilis* sont connues pour dégrader des enzymes secrétées par l'hôte au niveau des microvillosités de l'intestin, qui jouent un rôle dans la digestion des aliments et l'absorption des nutriments (Riepe *et al.*, 1980). La bactérie, bien que n'étant pas considérée comme hémolytique, possède également 10 gènes codants pour des hémolysines (Robertson *et al.*, 2006). Enfin sont considérés comme facteurs de virulence les gènes permettant l'utilisation des sucres composant les mucines par l'avantage sélectif que leur dégradation apporte, en termes de nutrition, à la bactérie.

Certaines souches de *B. fragilis*, dites ETBF (pour enterotoxigenic *B. fragilis*) codent une toxine (BFT = *B. fragilis* Toxin), métalloprotéase zinc-dépendante. Sa diffusion à travers les jonctions

étroites des cellules épithéliales (*zonula occludens*) permet d'atteindre sa cible, la cadhérine, protéine chargée d'assurer la liaison intercellulaire au sein de l'épithélium digestif (*zonula adherens*). Cette protéine est partiellement protéolysée par la BFT ce qui déclenche une cascade de réactions, dont la sécrétion d'IL-8 qui stimule une réponse inflammatoire. Cette réponse entraîne une perte d'intégrité de la barrière épithéliale et la sécrétion d'ions provoquant des diarrhées sévères (Sears, 2001; Wu *et al.*, 1998). Cette toxine aurait peut-être un rôle dans l'apparition des cancers colorectaux (Toprak *et al.*, 2006). Il y a une corrélation entre la présence des souches ETBF et le développement des différents stades des cancers. Le gène codant la protéine Bft est retrouvé chez plus de 60 % de la population indiquant que sa présence n'est pas responsable de l'apparition même des cancers, néanmoins la proportion augmente à plus de 70 % chez les patients en stade précoce de cancer colo-rectal et concerne 100 % des patients en stade avancé. Cependant, la présence de souches ETBF n'est pas limitée à la tumeur mais généralisée à l'ensemble des muqueuses intestinales (Boleij *et al.*, 2015).

3-4) Co-infections

Une des particularités des infections à *Bacteroides* est qu'on observe fréquemment des co-infections avec une autre bactérie, souvent aérobie, particulièrement *E. coli* (Lorber and Swenson, 1975). Les effets de la synergie des deux espèces sont plus importants que la somme des effets de chacune des espèces en mono-infection (Figure 31). Cette synergie s'observe au niveau de la dose létale médiane, DL_{50} , au niveau de la dose infectieuse nécessaire à la production d'abcès, ou simplement en matière de vitesse de croissance. L'apport nutritionnel combiné de chaque espèce et la capacité à résister au stress oxydant sont aussi des paramètres importants pour la synergie entre les bactéries (Brook, 1985; Brook, 1989).

Dans un modèle de péritonite induite par *E. coli*, la présence de *B. fragilis* entraîne une augmentation de la mortalité de l'hôte. Même si la présence de la capsule de *Bacteroides* est connue pour permettre d'échapper à la phagocytose, l'augmentation de la mortalité en cas de co-infection ne semble pas liée à la présence de cette capsule. En revanche, les acides gras à chaîne courte, et particulièrement l'acide succinique, métabolite produit en grande quantité par *Bacteroides*, jouent probablement un rôle dans la migration et le chimiotactisme des neutrophiles (Rotstein *et al.*, 1987a; Rotstein *et al.*, 1987b).

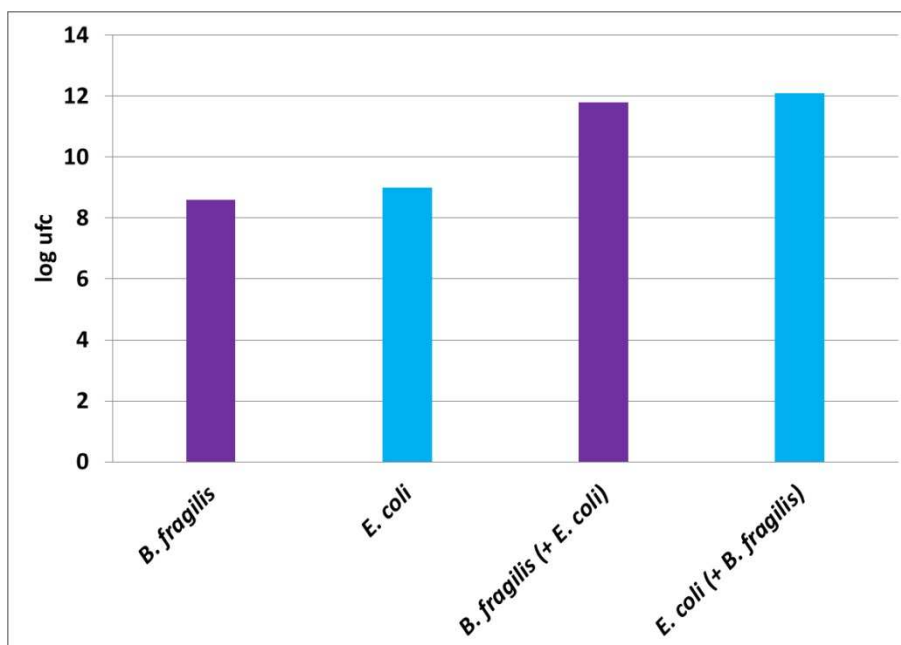


Figure 31 : Nombre de *B. fragilis* (en violet) ou de *E. coli* (en bleu) en log d'ufc, dans des abcès induits soit par les bactéries seules soit en co-infections. (Brook, I. 1985).

De même, la présence lors d'une co-infection, d'une souche d'*E. coli*, codant la protéase, Hbp (hemoglobin protease autotransporter protein), augmente la formation d'abcès par *B. fragilis* en dégradant l'hémoglobine et en libérant l'hème. Cet hème, utilisé par *B. fragilis* pour stimuler sa croissance, permet de compenser les mécanismes de restriction de l'accès au fer mis en place par l'hôte (Otto *et al.*, 2002).

D) – Le fer et l'hème chez les *Bacteroides*

L'hème grâce au fer qu'il porte, est un cofacteur essentiel pour l'activité de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme de *Bacteroides*. Ces deux molécules sont incontournables, notamment dans les processus de respiration cellulaire (cf. chap. B-2-2).

1) Rôles et structures

1-1) Le fer

Le fer est une molécule nécessaire à de nombreuses réactions biochimiques. Il intervient dans la fixation de l'azote, le transport et le stockage de l'oxygène, ou la régulation des gènes. Ses différents niveaux d'oxydation ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$) en font un catalyseur biologique important. Malgré son abondance naturelle, il n'est que peu disponible pour les bactéries, car sa forme oxydée (Fe^{3+}) est insoluble et sa forme réduite (Fe^{2+}) soluble est rare sauf dans les environnements acides ou en anaérobiose, et elle est souvent liée, sinon toxique (Wandersman and Delepelaire, 2004). Sa toxicité, en présence d'oxygène, fait suite à la formation de radicaux libres oxygénés suivant la réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ (Halliwell and Gutteridge, 1984). Le fer est donc généralement soit stocké dans une protéine (lactoferrine, transferrine, ferritine, etc.), soit complexé à des porphyrines comme l'hème, ce qui limite sa disponibilité. Les protéines fixant le fer se trouvent chez la plupart des êtres vivants : mammifères, plantes, levures et bactéries. Chez l'Homme, le fer est contenu pour deux tiers dans l'hémoglobine et pour 10 % dans la myoglobine. Le reste est majoritairement stocké dans la ferritine et une petite partie dans la transferrine et dans diverses autres enzymes (Halliwell and Gutteridge, 1984). La ferritine n'a pas pour seul rôle de titrer le fer afin de limiter sa toxicité, elle sert également de réservoir lorsque le fer n'est plus disponible dans l'environnement. On trouve chez *B. thetaiotaomicron* une ferritine codée par *ftnA* (BT_1373).

1-2) L'hème

L'autre moyen de stockage du fer en vue d'une utilisation ultérieure est sa fixation dans un cycle tetrapyrrole, la protoporphyrine IX, générant ainsi l'hème ou l'hémine (Figure 32). Lorsque la

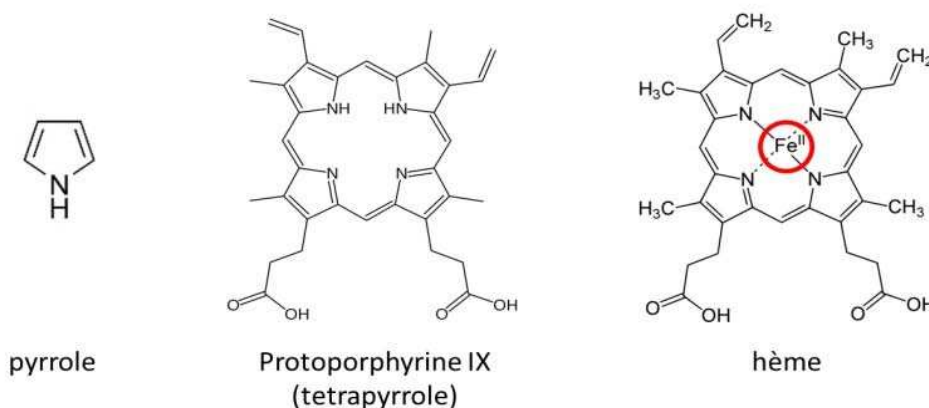


Figure 32 : Structure chimique du noyau pyrrole, de la PPIX et de l'hème.

protoporphyrine IX contient du Fe^{2+} on parle d'hème, lorsqu'elle est chargée avec du Fe^{3+} on parle d'hémine. Le terme générique d'hème se réfère en fait à l'hème *b* ou protohème, mais il en existe plusieurs sortes, selon les modifications des groupements portés par l'hème *b*. On trouve ainsi l'hème *c*, *d*, *o* et *a*, et cette polyvalence des chaînes périphériques permet la modification de leur potentiel d'oxydo-réduction et de leur capacité de liaison aux protéines (O'Brian and Thony-Meyer, 2002). Lorsque le fer est sous la forme de Fe-PPIX ses capacités catalytiques sont augmentées de 5 à 10 fois par rapport à la forme libre (Stojiljkovic *et al.*, 2001). L'hème est un cofacteur pouvant fixer par l'intermédiaire du fer, entre autre, l'oxygène. Cette particularité fait de l'hème une molécule incontournable du métabolisme respiratoire aérobie. L'hème est le groupement prosthétique des cytochromes, de l'hémoglobine, des oxygénases, des catalases et des peroxydases. Les cytochromes sont, chez les procaryotes, les plus abondantes des protéines à hème (Frankenberg *et al.*, 2003). De la bactérie à l'être humain, l'hème est utilisée dans de très nombreuses fonctions métaboliques, pas exclusivement comme cofacteur de la chaîne respiratoire mais aussi pour le transport et le stockage d'oxygène, et comme molécule signal impliquée dans la régulation, que ce soit comme activateur ou comme répresseur de facteurs de transcription (Mense and Zhang, 2006).

1-3) Mécanismes de résistances liés à la toxicité de l'hème

L'hème est donc une molécule essentielle, mais sa structure chimique induit un stress oxydant et donc une toxicité cellulaire. Chez les bactéries, les effets délétères de l'hème s'observent sur les lipides et les protéines membranaires, ainsi que sur l'ADN, et sont liés leur oxydation. La réponse bactérienne peut faire intervenir des systèmes d'efflux de l'hème (système MtrCDE de *N. gonorrhoeae* (Choby and Skaar, 2016; Hagman *et al.*, 1995), HrtBA chez *S. aureus* (Stauff *et al.*, 2007), ou chez *L. lactis* (Lechardeur *et al.*, 2012), ou PefABCD chez *Streptococcus agalactiae* (Fernandez *et al.*, 2010)). Mais aussi des systèmes de séquestration de l'hème au niveau intracellulaire, système PhuS de *Pseudomonas aeruginosa* ou HemS de *Yersinia sp.*, ou bien encore des systèmes de détoxication des ROS comme la SOD (superoxyde dismutase) à cuivre et zinc dans le périplasme de *Haemophilus ducreyi* (Choby and Skaar, 2016).

Chez *B. fragilis*, l'entrée du fer dans la cellule et son homéostasie sont étroitement liés à l'état redox du cytoplasme (Figure 33). Certaines réactions entraînent la formation d'anions superoxyde, entre autre par l'activité des oxydases membranaires lorsque *B. fragilis* est en contact

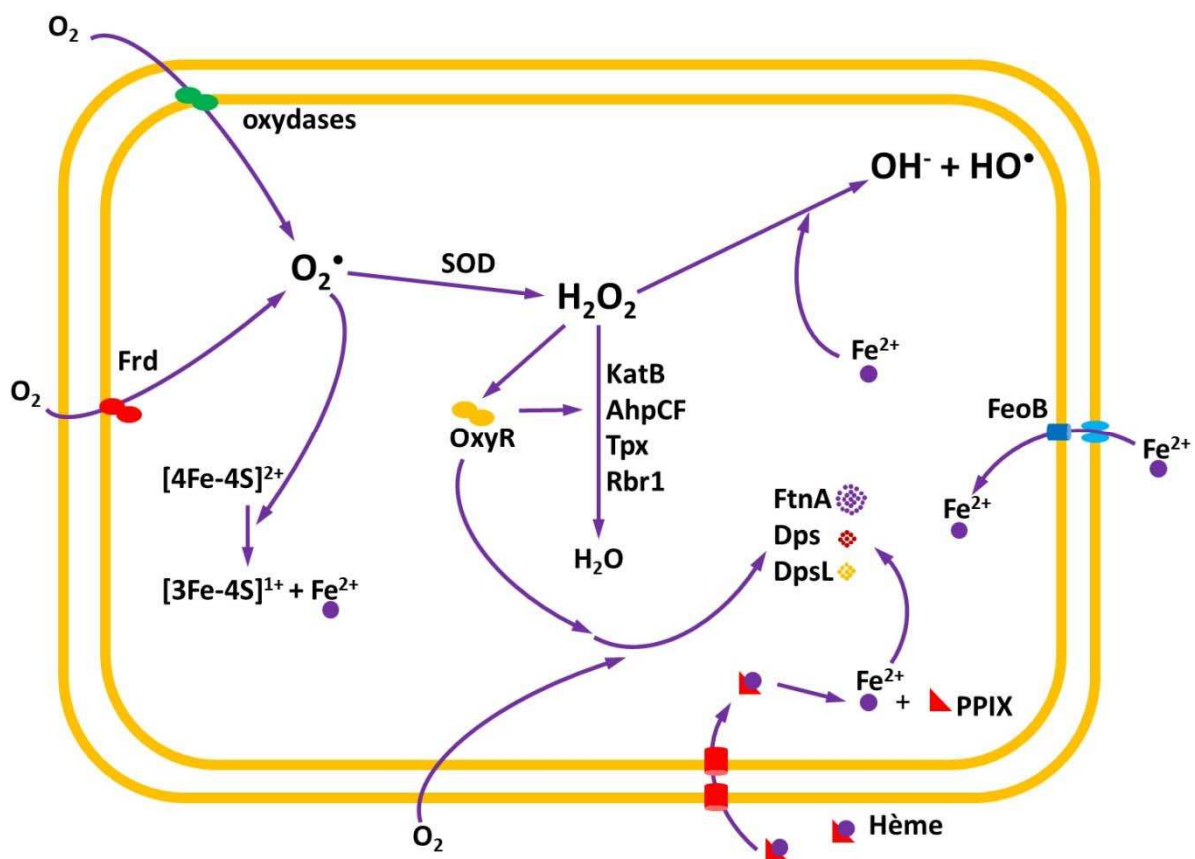


Figure 33 : Mécanismes impliqués dans le maintien du redox intracellulaire et de l'homéostasie du fer chez *B. fragilis*. (D'après Rocha E.R. & Smith, C.J. 2013).

avec de l'oxygène, mais également lors du passage en respiration anaérobie (Lu and Imlay, 2017; Meehan and Malamy, 2012). Les ions superoxydes provoquent la cassure des clusters Fe-S et la libération de Fe^{2+} . Ces ions sont ensuite pris en charge par la SOD formant du peroxyde d'hydrogène. L'augmentation de la quantité d' H_2O_2 dans la cellule induit le régulateur transcriptionnel OxyR qui induit l'expression des gènes de réponse au stress peroxyde, codant la catalase, l'alkyl hydroperoxydase, la thiorédoxine peroxydase et la rubrérythrine. En parallèle, le stockage de fer augmente, grâce à l'induction, *via* OxyR, de la synthèse de ferritine et de protéines de types Dps (DNA-binding Protein from Starved cells). Le fer extracellulaire, lorsqu'il est sous forme Fe^{2+} rentre dans la cellule *via* le système Feo. L'hème est internalisé par des transporteurs spécifiques puis pris en charge dans la cellule par une déferrochélatase, dont le gène est non encore identifié. Le fer ainsi importé augmente le pool intracellulaire disponible et stockable sous forme non toxique. Ce stockage va permettre de titrer le fer de la cellule et d'éviter l'initiation de réaction de Fenton en présence d' H_2O_2 (Rocha and Smith, 2013).

2) Biosynthèse et acquisition du fer et de l'hème

2-1) Biosynthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hème se fait par une suite de réactions enzymatiques impliquant une dizaine d'enzymes successives à partir d'un substrat, l'acide δ -aminolévulinique. Cette molécule est elle-même issue soit du glutamate (cas pour la plupart des bactéries, des archées et des plantes) soit de la réaction du succinyl-CoA et de la glycine avec élimination de CO_2 (cas des animaux, des levures, des champignons et des α -proteobactéries). Seul un organisme, *Euglena gracilis*, a été décrit comme capable d'utiliser en parallèle les deux voies initiales conduisant à l'acide δ -aminolévulinique (Frankenberg *et al.*, 2003; Heinemann *et al.*, 2008). La suite de la voie de biosynthèse permet la conversion de huit molécules d'acide δ -aminolévulinique en une molécule de protohème (Figure 34).

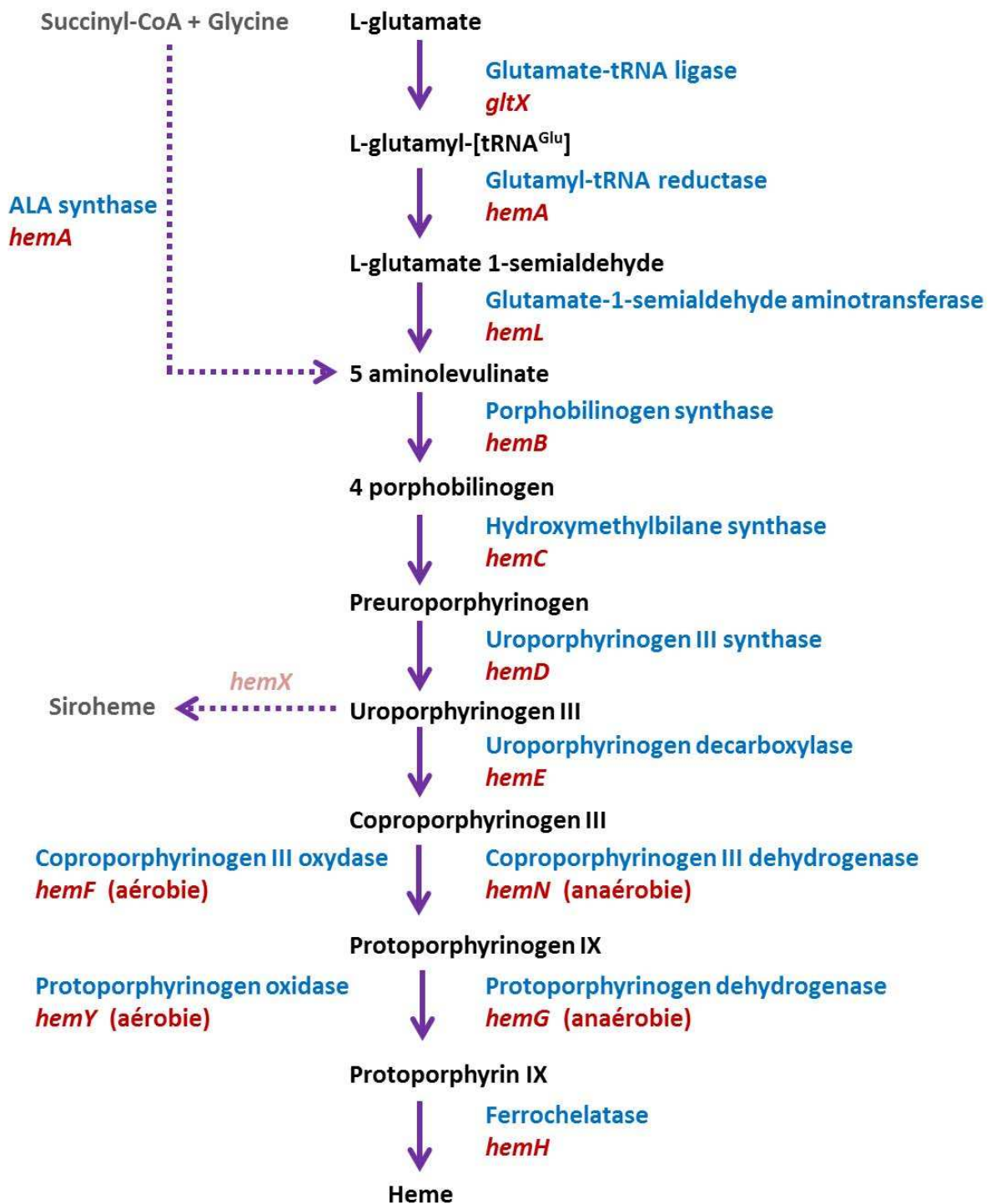


Figure 34 : Voie générale de la biosynthèse de l'hème. On entend par hème en fin de voie, l'hème b ou protohème. D'après KEGG – Kanehisa, M. 1997. La nomenclature est celle utilisée chez *E. coli*. Il existe également un homologue fonctionnel à *hemY* et *hemG* chez certains *Bacteroidetes*, *hemJ* (Kato et al., 2010).

Cependant, de nombreuses bactéries ne disposent pas de cette chaîne de biosynthèse complète et sont donc incapables de synthétiser l'hème. Pourtant, parmi ces bactéries auxotrophes pour l'hème, certaines exigent la présence d'hème pour leur croissance ou pour le fonctionnement d'un certain nombre d'enzymes, par exemple chez *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bartonella henselae* ou *Haemophilus influenzae*. D'autres espèces sont parfaitement capables de croître normalement en son absence mais en présence d'hème elles passent à un métabolisme respiratoire dont le rendement énergétique est plus avantageux. On peut citer parmi ces espèces *L. lactis*, *S. agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* ou *Buchnera aphidicola*. Enfin, d'autres espèces n'utilisent pas l'hème, voir pour certaines, elles sont capables de se dispenser du fer. Dans cette dernière catégorie on trouve *Mycoplasma pneumoniae*, *Treponema pallidum* ou *Borrelia burgdoferi*, cette dernière faisant partie des espèces ayant des enzymes à manganèse à la place des enzymes à cluster fer-souffre (Gruss *et al.*, 2012).

Chez *B. thetaiotaomicron*, la chaîne de biosynthèse est très incomplète (Figure 35). Aujourd'hui, seuls sont annotés les gènes *gltX*, *hemD* et *hemE*. Cependant, des données expérimentales montrent qu'une ferrochelatase, homologue fonctionnel de HemH, serait produite par la bactérie (Sperry *et al.*, 1977). Néanmoins, le gène codant cette activité reste à identifier.

L'absence d'une chaîne fonctionnelle de biosynthèse d'hème chez des organismes dont la croissance ou le fonctionnement nécessite toutefois de l'hème implique le développement en parallèle de systèmes efficaces de récupération de l'hème dans leur milieu naturel.

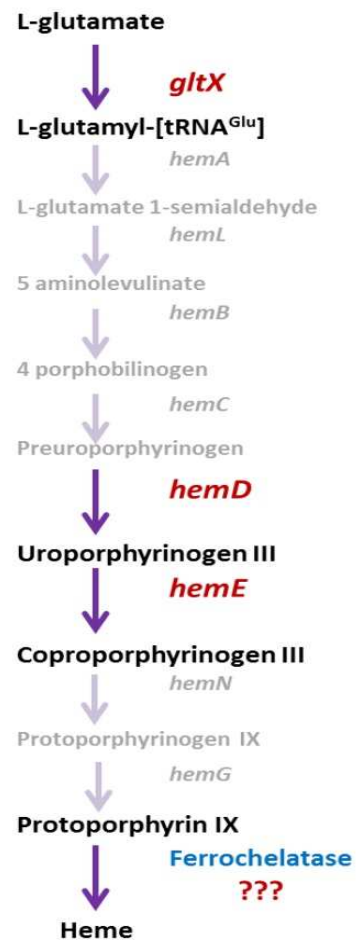


Figure 35 : Gènes de la chaîne de biosynthèse de l'hème présents chez *B. thetaiotaomicron*.

2-2) L'acquisition du fer chez les bactéries

Le fer est un facteur essentiel et parfois limitant à la croissance des bactéries. Deux modèles généraux de systèmes actifs d'acquisition du fer existent chez les bactéries. Le premier implique un contact direct entre la bactérie et la source de fer. Le second repose sur le relargage dans le milieu extérieur de composés de nature protéique (ferritine, transferrine, etc.) ou non (sidérophores), qui piègent le fer grâce à leur forte affinité et sont ré-internalisés ensuite par la bactérie. Les

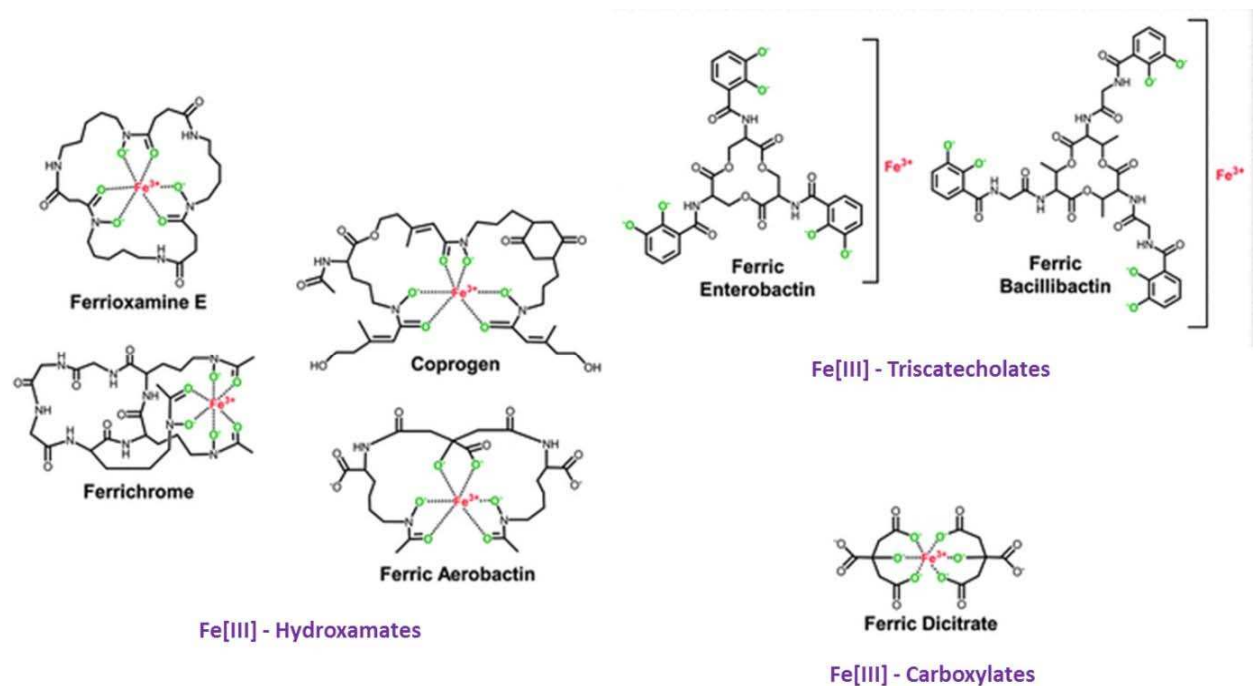


Figure 36 : Principales familles et différents exemples de sidérophores. (Miethke, 2013).

sidérophores sont souvent soit des dérivés de catéchols (1,2-dihydroxybenzène) cycliques ou linéaires, soit des acides carboxyliques, soit des dérivés de l'acide hydroxamique (Neilands, 1981) (Figure 36).

Chez les bactéries à Gram négatif, il existe plusieurs systèmes permettant l'acquisition du fer. L'internalisation du fer requiert le passage de la membrane externe, généralement *via* des porines, puis de la membrane interne. Un premier cas est le transport du Fe²⁺. Il peut diffuser passivement jusqu'au périplasma au travers des porines de la membrane externe. Mais la majeure partie du fer disponible est sous forme Fe³⁺ insoluble. La bactérie doit donc commencer par réduire le fer grâce à une réductase ferrique. Cette réduction se fait soit à l'extérieur de la cellule soit dans le périplasma (Schroder *et al.*, 2003). Un certain nombre de systèmes de transports, souvent de type ABC, prennent ensuite en charge le fer présent dans le périplasma pour la traversée de la

membrane interne. Ces systèmes, chez les bactéries à Gram négatif, sont MntH, ZupT, YfeABCD, FutABC, EfeUOB et FeoABC (Lau *et al.*, 2016). Chez *B. thetaiotaomicron* les gènes *mntH* (BT_0629) et *feoAB* (BT_1592) sont présents. MntH transporte le manganèse et le Fe^{2+} alors que FeoAB permet le transport du Fe^{2+} vers le cytoplasme (Hantke, 2003) (Figure 37). La partie du gène *feoA* code une protéine cytoplasmique qui active le domaine GTPase de FeoB stimulant la production d'énergie. Le gène *feoC*, qui ne semble pas retrouvé chez *B. thetaiotaomicron*, code une protéine qui possède un cluster riche en cystéine dans sa partie C-terminale. Ce type de protéine a été décrit comme pouvant avoir une activité de régulateur transcriptionnel métal/rédox dépendant (Cartron *et al.*, 2006). La région promotrice des gènes *feoABC* possède des boîtes reconnues par les régulateurs Fur et Fnr, indiquant que la régulation du système se fait à la fois *via* une répression en présence de fortes concentrations de fer et *via* une activation en absence d'oxygène. Les gènes sont exprimés constitutivement mais induits par l'anaérobiose (Lau *et al.*, 2016). Ce système de transport est fréquent chez les bactéries vivant dans les environnements anaérobies où le fer sous forme Fe^{2+} est plus abondant qu'en présence d'oxygène (Lau *et al.*, 2016).

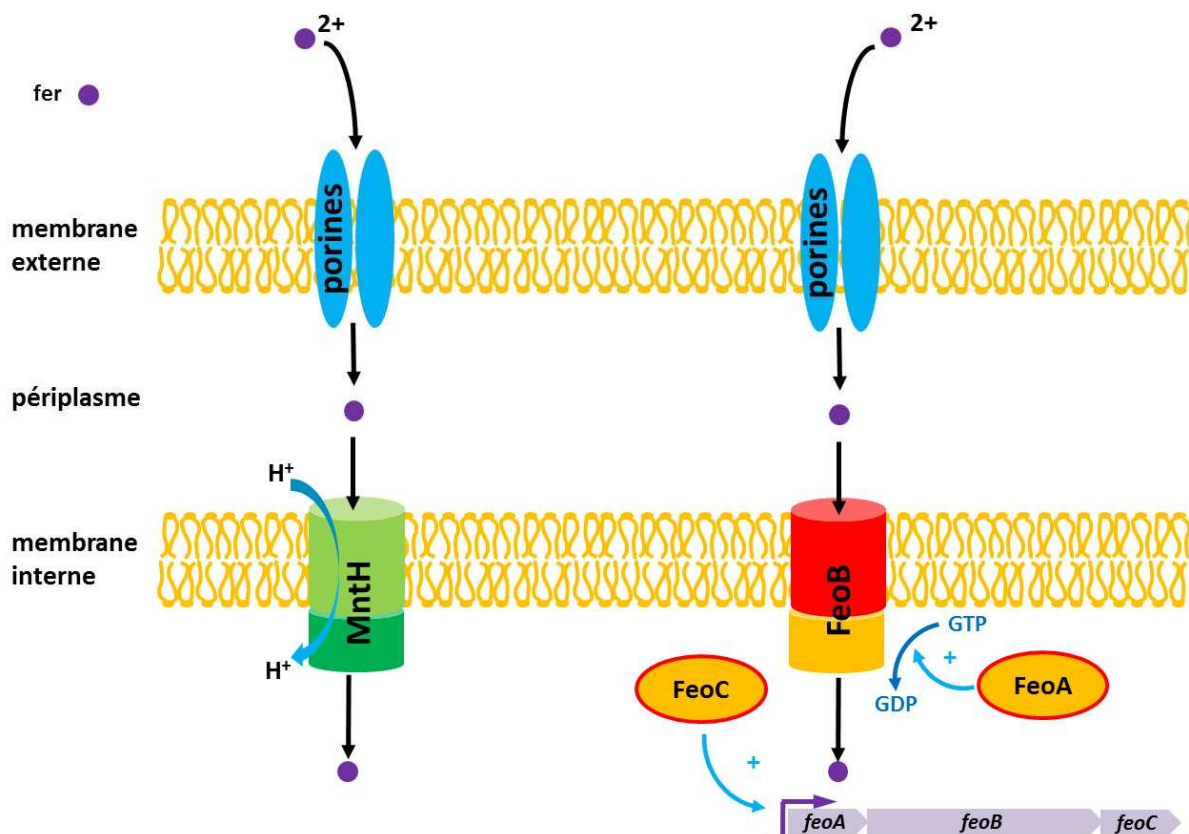


Figure 37 : Acquisition du fer *via* la voie porines/FeoB ou MntH chez les bactéries à Gram négatif. Les fonctions de FeoA et FeoC sont encore mal connues mais relèvent probablement pour FeoA d'une activité de cofacteur de FeoB, et pour FeoC de l'activation transcriptionnelle de l'opéron codant le système. D'après (Hantke, 2003; Lau *et al.*, 2016).

Dans le cas où le fer (Fe^{2+}) ne rentre pas directement dans la cellule, le fer peut être transporté jusqu'au cytoplasme en complexe à une autre molécule via à un récepteur spécifique de type TonB-dépendant situé dans la membrane externe (Figure 38). Il existe des récepteurs spécifiques des complexes Fe^{3+} -sidérophore mais aussi des récepteurs reconnaissant spécifiquement des protéines de liaison au fer (transferrine par exemple). Le transport *via* ces porines est rendu possible grâce à un apport énergétique du système TonB. Chez *B. thetaiotaomicron*, deux copies de *tonB* sont présentes (*BT_0813* et *BT_2059*), ainsi que les gènes codant les autres protéines du complexe, ExbB (*BT_0285*) et ExbD (*BT_0286*). Une fois dans le périplasma, une réductase permet le passage de Fe^{3+} à Fe^{2+} . Cette réduction peut être suffisante pour modifier l'affinité du sidérophore et libérer le fer, sinon une hydrolase vient dégrader la partie peptidique du sidérophore permettant le relargage du fer (Miethke, 2013). Le passage de la membrane interne se fait par l'intermédiaire des transporteurs de type ABC.

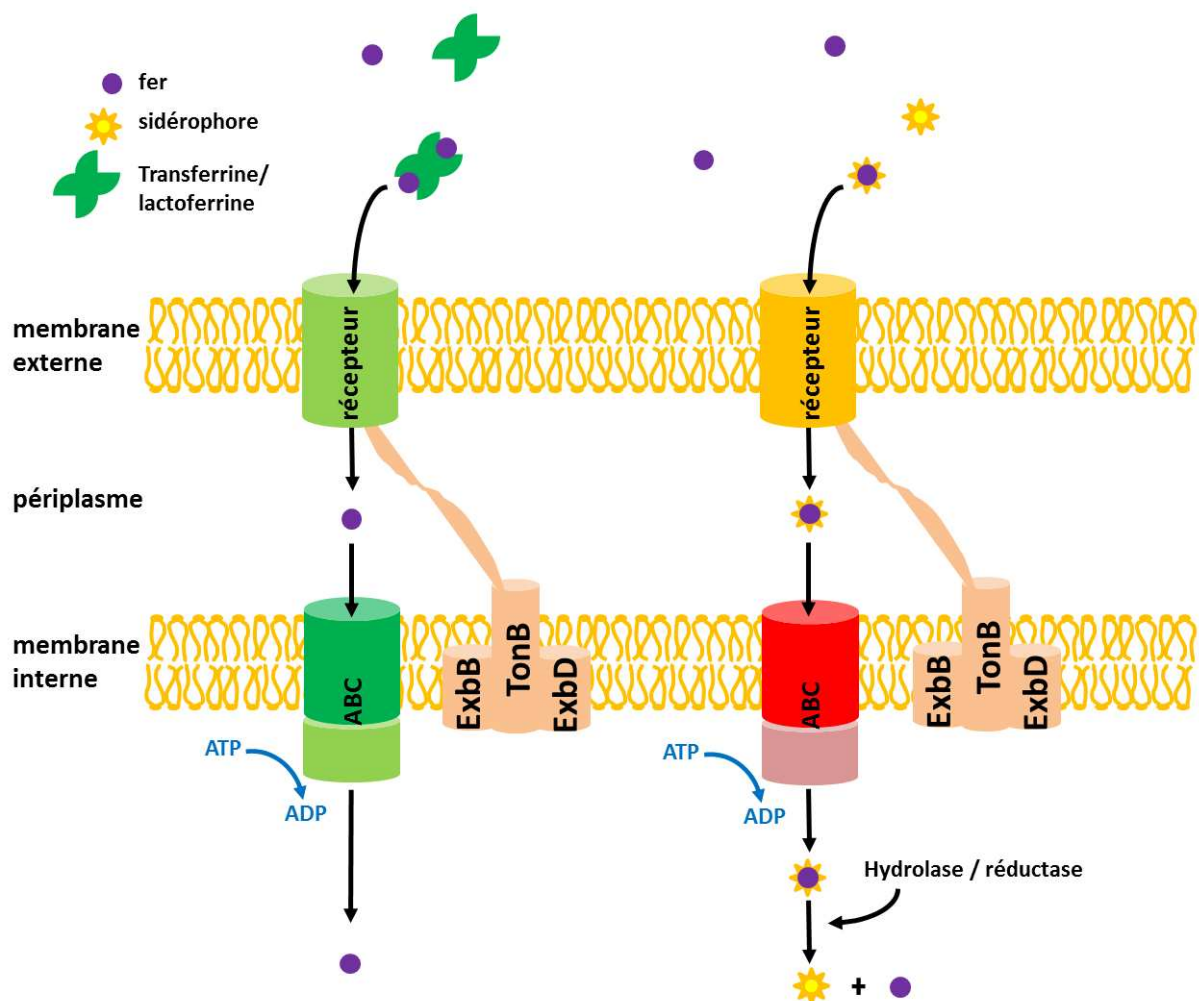


Figure 38 : Schéma général d'entrée du fer dans les bactéries à Gram négatif, *via* la transferrine, les sidérophores. D'après (Lau *et al.*, 2016).

Un autre modèle de transport du fer a été décrit chez *Capnocytophaga canimorsus*, membre du phylum des *Bacteroidetes*, un commensal de la cavité buccale du chien, pathogène pour l'homme. Certaines souches utilisent un système normalement dédié au transport des polysaccharides, PUL (Polysaccharide utilization locus), contenant un analogue de *susCD* qui est capable de récupérer le fer de la serotransferrine circulant dans le sérum. L'internalisation se fait comme dans le système *sus* avec un récepteur TonB dépendant et un ABC transporteur (Manfredi *et al.*, 2015). Une partie des quinze gènes de ce locus (*Ccan_03600* à *Ccan_03740*) sont conservés dans le génome de *B. fragilis* NCTC9343 (*BF1990* à *BF1999*).

Chez les bactéries à Gram positif, par exemple chez *S. aureus*, on retrouve des systèmes d'import de fer via les sidérophores, par exemple les systèmes HtsABC, SirABC et FhuBCDG (Figure 39), ainsi que les mécanismes d'import du fer inorganique, comme les systèmes FeoAB ou FepABC (homologue de EfeUOB), pour revue (Sheldon and Heinrichs, 2015).

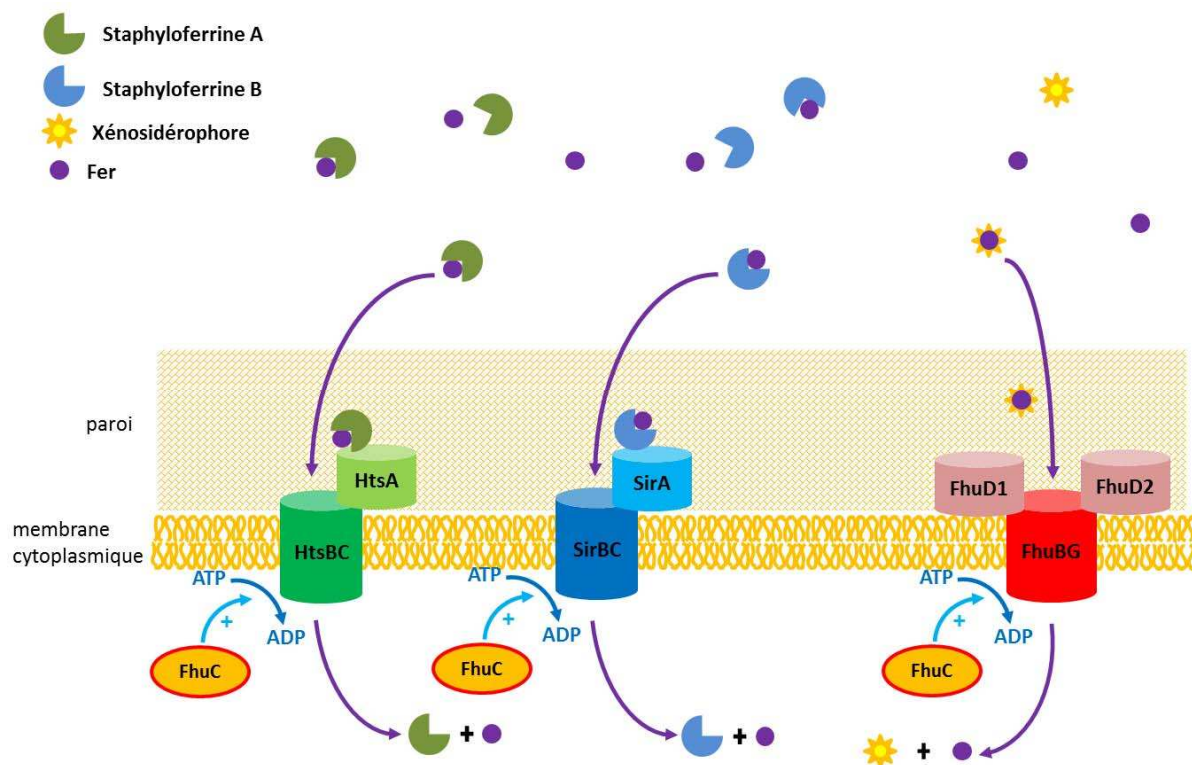


Figure 39 : Systèmes d'import du fer chez *S. aureus* via des sidérophores. *S. aureus* produit 2 sidérophores, les staphyloferrin A et B. La A utilise le système d'import HtsABC et la B le système SirABC. HtsA et SirA sont les récepteurs et la translocation à travers la membrane se fait via les perméases HtsBC et SirBC. *S. aureus* est également capable d'utiliser des xénosidérophores qui sont alors pris en charge par le système FhuBGD. Dans tous les cas, les systèmes sont énergisés par l'ATPase FhuC. (D'après (Hammer and Skaar, 2011)).

Chez la plupart des bactéries, les gènes codant les fonctions d'acquisition du fer libre ou de l'hème, sont assez généralement sous contrôle du répresseur Fur (Ferric Uptake Regulator). Fur est un répresseur dont l'activité dépend de la concentration en fer intracellulaire. En présence de fer, Fur se fixe sur les séquences promotrices cibles (boîtes Fur) des gènes et les réprime (Figure 40) (Andrews *et al.*, 2003).

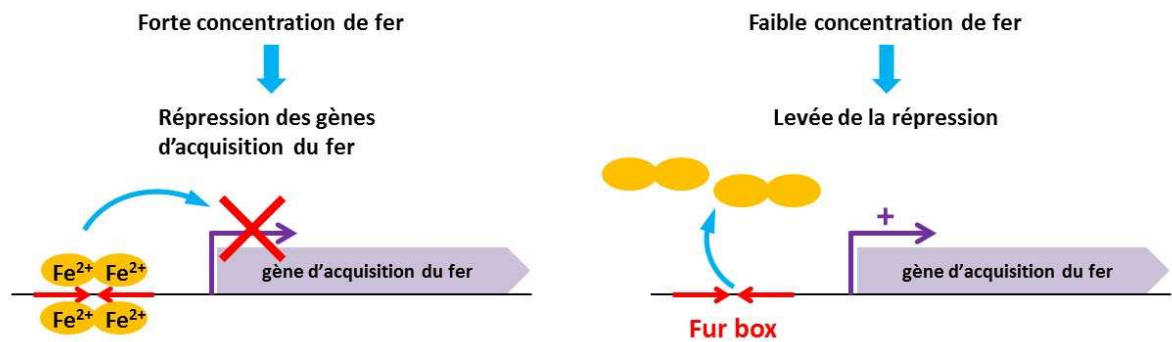


Figure 40 : Représentation schématique du système de régulation Fur. En présence de fer, les dimères de la protéine Fur se fixent sur des séquences palindromiques (Fur box, en rouge) placées généralement entre les boîtes -35 et -10 de la séquence promotrice des gènes régulés. Cette fixation réprime la transcription de ces gènes. En carence en fer, la forme apo-Fur se détache de la Fur box et la répression est levée permettant l'expression des gènes. (Andrews *et al.*, 2003).

2-3) L'acquisition de l'hème chez les bactéries

Chez l'Homme, 70 % du fer de l'organisme est sous forme héminique. Les bactéries ont donc développé des systèmes d'entrée de l'hème dans la cellule et de récupération du fer à partir de l'hème. Malgré le caractère lipophile de l'hème, la molécule ne semble pas pouvoir pénétrer la membrane externe de *B. fragilis* (Otto *et al.*, 1996). L'hypothèse proposée est que les pores de diffusion ne permettent pas le passage de molécules de plus de 500 Da et que l'hème *b* ayant un poids de 616 Da n'est pas en mesure de traverser. Cependant, la différence est minime entre le poids de l'hème et la limite de passage par les pores. On sait par ailleurs que dans certaines conditions de concentration en hème et de réduction du milieu, l'hème est capable de s'accumuler dans des membranes chez certaines bactéries à Gram positif (Joubert *et al.*, 2014). Ainsi l'imperméabilité à l'hème de la membrane de *B. fragilis* n'est peut-être pas totale.

Deux modèles de systèmes actifs d'acquisition d'hème existent, soit l'import d'hème libre, soit le captage par un hémophore. Lorsque l'hème est transporté de l'extérieur vers le cytoplasme, une hème oxygénase va provoquer la destruction de la structure tetrapyrrole et la récupération de l'atome de fer (Lau *et al.*, 2016) (Figure 41). Chez *B. thetaiotaomicron*, aucun sidérophore n'est décrit, mais la bactérie est capable de récupérer le fer à partir de certains xénosidérophores produits par d'autres espèces du microbiote. *B. thetaiotaomicron* est capable d'utiliser la Fe³⁺-entérobactine et la Fe³⁺-salmocheline S4 qui sont des complexes à forte affinité pour le fer. Ce système, outre l'apport de fer nécessaire à *Bacteroides*, serait un système permettant à la bactérie de se donner un avantage en terme de compétition pour l'accès au fer et à l'hôte de séquestrer ce métal dans le tractus digestif afin de limiter les implantations d'espèces pathogènes et l'inflammation des muqueuses (Rocha and Krykunivsky, 2017).

Il existe de nombreux autres modèles de récupération de l'hème, par exemple chez *Haemophilus influenzae*, la bactérie va directement récupérer l'hème dans l'hémopexine de l'hôte via le système Hxu (Zambolin *et al.*, 2016), chez *Neisseria meningitidis*, l'hème est récupéré sur l'hémoglobine via les systèmes HpuAB et HmbR (Perkins-Balding *et al.*, 2004), etc.

Chez *E. coli* il existe également un système de transport de l'hème utilisant un ABC transporteur de dipeptide au niveau de la membrane interne, le système DppBCDF (Letoffe *et al.*, 2006). Ce système serait utilisé par la bactérie dans le cadre de l'import de l'hème via le système Has (*cf.* ci-dessous).

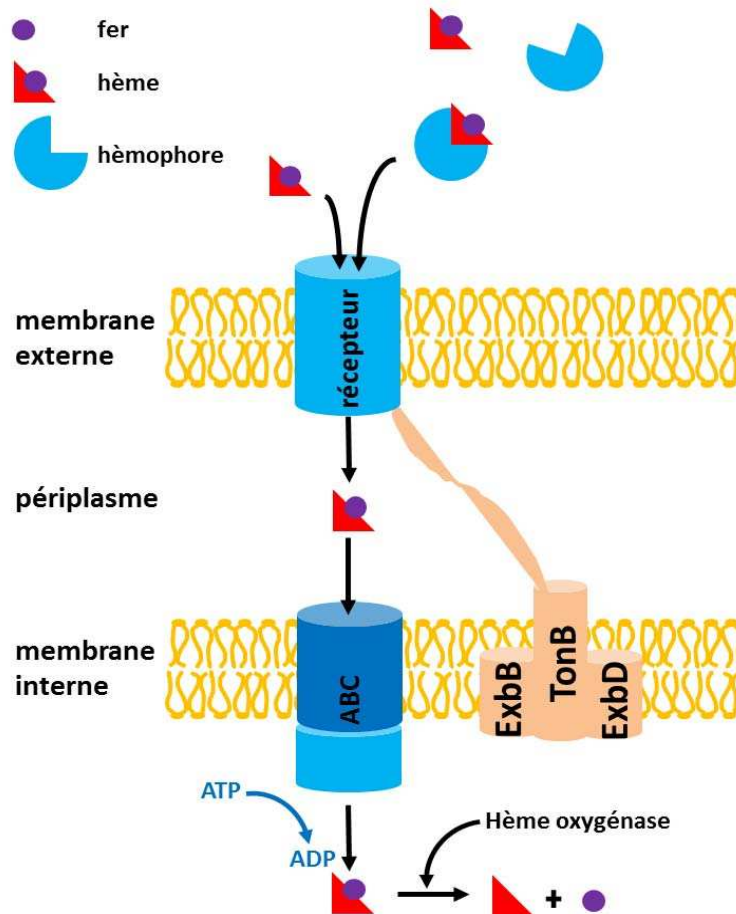


Figure 41 : Schéma général de l'import d'hème dans la cellule via un hémophore chez les bactéries à Gram négatif. D'après (Lau *et al.*, 2016).

Les bactéries à Gram positif possèdent également des systèmes de transport d'hème. Il existe par exemple chez *S. aureus* le système Isd permettant de récupérer l'hème directement à partir de l'hémoglobine piégée à la surface de la bactérie. L'hème est ensuite transporté à travers la paroi jusqu'à une perméase qui lui fait traverser la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, l'hème est oxydé permettant la libération du fer (Figure 42). Le système Isd existe aussi chez *B. anthracis*, à la différence que des hémophores sont sécrétés pour récupérer l'hème de l'hémoglobine avant sa traversée de la paroi, son internalisation et sa dégradation. Enfin, chez *L. monocytogenes*, le système Hbp combine à la fois une fixation de l'hémoglobine en surface et une sécrétion d'hémophore. Pour revue (Ascenzi *et al.*, 2015).

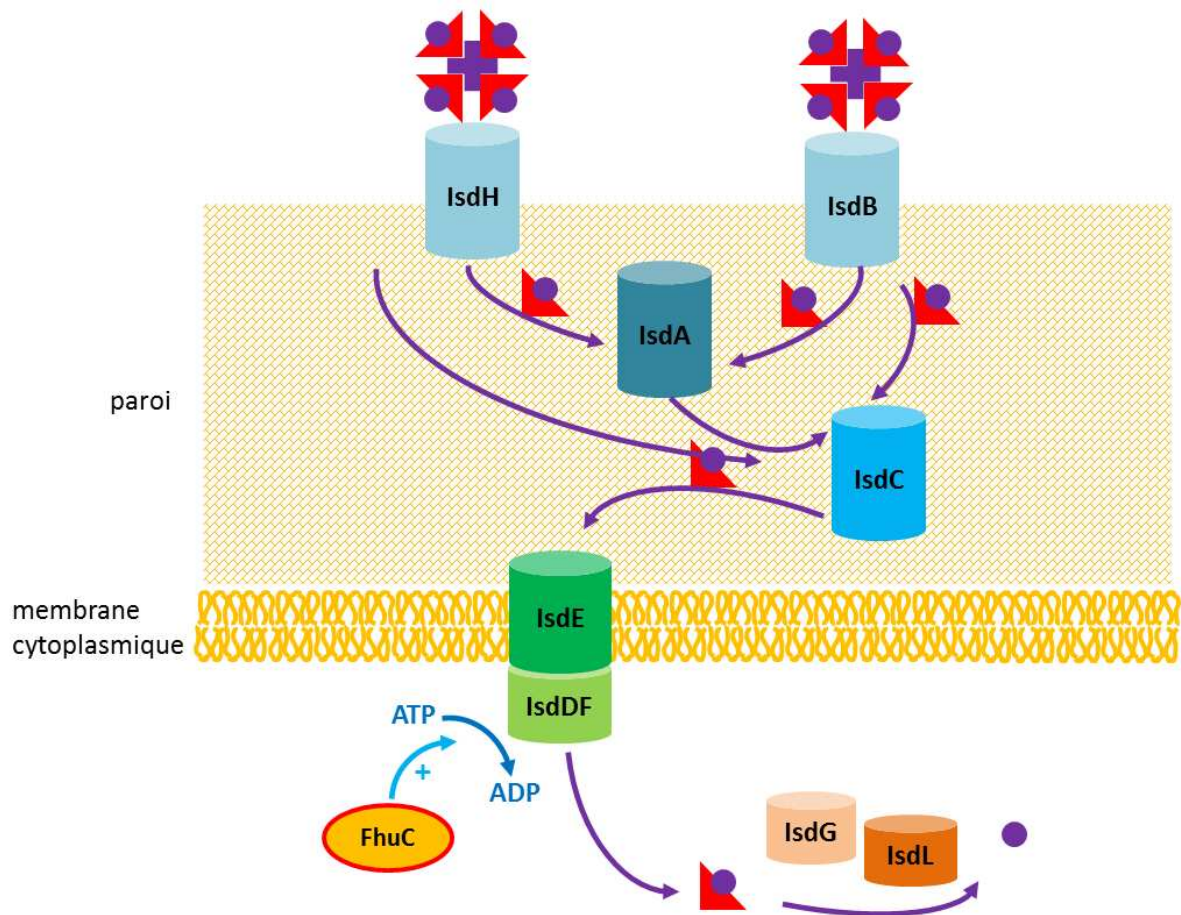


Figure 42 : Système d'import de l'hème chez *S. aureus*. Le système Isd est composé de protéines sécrétées et ancrées dans la paroi, IsdB et IsdH, qui fixent l'hémoglobine, récupèrent l'hème et le transportent *via* IsdA et IsdC jusqu'à la membrane. L'hème est alors fixé sur une lipoprotéine IsdE et transféré dans le cytoplasme *via* une perméase à hème IsdDF. Une fois internalisé, l'hème est dégradé par les protéines IsdG et IsdL libérant ainsi le fer. D'après (Ascenzi *et al.*, 2015).

2-4) Le système has

Enfin, un système d'import de l'hème, Has pour Heme Acquisition System, a été découvert chez *Serratia marcescens* (Letoffe *et al.*, 1994). Cette bactérie à Gram négatif est un pathogène opportuniste ubiquitaire de la famille des *Enterobacteriaceae*, taxonomiquement proche d'*E. coli*. Le système comprend un opéron de cinq gènes (*hasRADEB*) possédant son propre facteur sigma (*hasI*) et un homologue de TolC (*hasF*) (Figure 43).

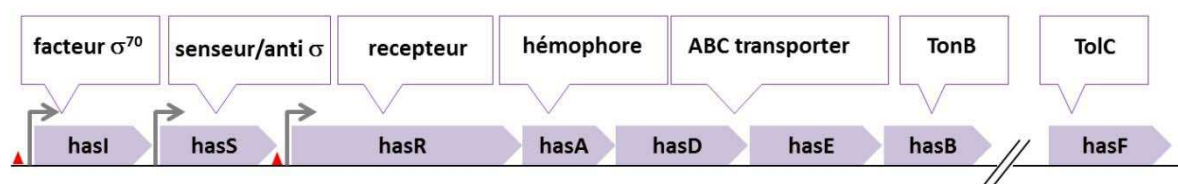


Figure 43 : Organisation génétique du système Has chez *Serratia marcescens*. Les triangles rouges indiquent la position des deux boîtes *fur*. D'après Ghigo, J.M. *et al.* 1997.

Le fonctionnement du système est présenté Figure 44, pour revue (Ghigo *et al.*, 1997; Letoffe *et al.*, 1994; Letoffe *et al.*, 2005). Un hémophore HasA, à très forte affinité pour l'hème, est sécrété *via* un ABC transporteur (HasDE) et une protéine homologue à TolC (HasF). TolC est une protéine d'efflux membranaire capable de faire passer des petites molécules à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif (pour revue (Zgurskaya *et al.*, 2011)). Lorsque le système est transféré de *S. marcescens* à *E. coli*, la protéine TolC naturelle d'*E. coli* remplace la protéine HasF. Une fois sécrétée, HasA « arrache » l'hème à l'hémoglobine. La protéine chargée en hème, holo-hémophore, rentre ensuite en compétition avec la protéine non chargée, apo-hémophore, pour l'accès au site d'interaction de HasA sur le récepteur HasR. Cette compétition joue un rôle dans la régulation du système, car seule la fixation de l'holo-HasA déclenche la cascade de signalisation entraînant la transcription de l'opéron codant les protéines du complexe. Le récepteur HasR est énérgisé par le complexe TonB/ExbBD, et permet le passage de l'hème à travers la membrane externe. La protéine TonB utilisée par le système, codé par *hasB* est spécifique au récepteur HasR (Benevides-Matos *et al.*, 2008). HasR est capable de reconnaître l'hème libre, l'apo-hémophore et l'holo-hémophore. L'hème passe la membrane externe *via* HasR et entre dans le périplasma. L'hème va ensuite traverser la membrane interne et entrer dans la cellule via un transporteur de type ABC. Ce transporteur est possiblement le système de transport de dipeptide DppBCDF (Letoffe *et al.*, 2006). L'hémophore ayant transféré son hème au récepteur est ensuite libéré et réexporté dans le milieu *via* le système HasF/TolC.

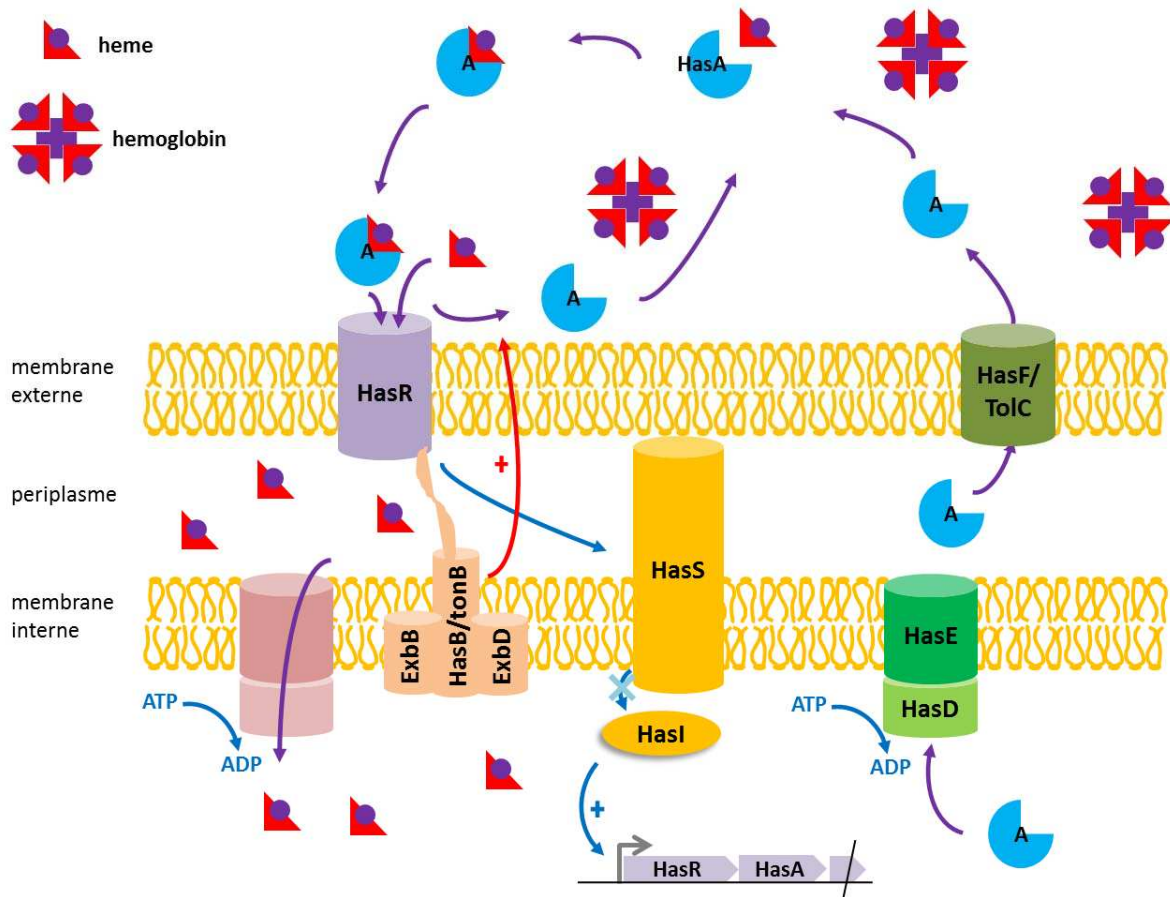


Figure 44 : Schéma de fonctionnement du système d'import d'hème de *S. marcescens*. (D'après Ghigo, J.M. et al. 1997, Rossi, M.S. et al. 2003).

Comme tous les systèmes d'acquisition d'hème, l'expression des gènes du système Has est régulée en fonction de la disponibilité en hème du milieu afin d'adapter sa synthèse en fonction des besoins de la bactérie. Il existe d'une part devant l'opéron *has* une boîte *fur* permettant de réguler son expression en fonction de la concentration en fer intracellulaire, et d'autre part il y a un facteur σ de type ECF (HasI) et son facteur anti- σ associé (HasS) permettant l'induction du système. Une seconde boîte *fur* existe devant les gènes *hasIS*, ce qui permet de réprimer l'expression de cet activateur en présence de fer.

D'autre part, l'hème joue également dans la régulation du système. Lorsqu'il y a interaction entre l'holo-HasA, chargée en hème et le récepteur HasR, un signal est envoyé à l'anti- σ qui libère le facteur σ entraînant l'activation de la transcription du reste de l'opéron (Rossi et al., 2003). Cette induction entraîne aussi l'accumulation de HasS qui est sous forme inactive. Dès qu'il n'y a plus d'hème dans le milieu, l'hémophore chargé en hème ne se fixe plus sur HasR, ou seul l'hémophore vide se fixe sur HasR, ce qui n'induit plus la cascade de signalisation, l'anti σ HasS bloque HasI ce qui arrête la transcription de l'opéron (Biville et al., 2004).

Ce système d'import de l'hème a été exprimé chez *E. coli* (Ghigo *et al.*, 1997) et utilisé dans le cadre de ce travail pour moduler la quantité d'hème d'un milieu, cf. chapitre IV.

3) Besoin en porphyrines de *B. thetaiotaomicron*

Initialement décrit dans le tractus digestif (Distaso, 1912), *B. thetaiotaomicron* a également été isolé à partir de plaies (Distaso, 1916; Fleming, 1915). Dès cette époque, l'ajout de sang dans les milieux de culture a donc été testé. C'est chez *B. melaninogenicus*, bactérie à pigmentation noire, que le rôle de l'hémine comme facteur de croissance a été le plus étudié. Contrairement à ce que laisse penser son nom, le pigment produit par *B. melaninogenicus* s'est révélé être un dérivé de l'hème et non pas de la mélanine comme initialement proposé (Schwabacher *et al.*, 1947). Cette bactérie, décrite par Oliver & Wherry (Oliver and Wherry, 1921) a été isolée dans de nombreuses niches, chez des patients sains (microbiote buccal) ou chez des malades (plaies abdominales). La bactérie pousse en anaérobiose sur milieu gélosé supplémenté en sang. De plus, lorsque l'hème est ajoutée dans le milieu de culture, la biomasse finale est multipliée par plus de deux (Figure 45) (Gibbons and Macdonald, 1960).

Le même effet est observé chez une autre espèce de *Bacteroides*, *B. ruminicola*, isolée du rumen de bovin (Caldwell *et al.*, 1965) et dans les espèces qui composaient alors le groupe des *fragilis*, même si ces derniers arrivent à croître en absence d'hème (temps de génération = 8 heures) (Figure 46) (Varel and Bryant, 1974). Chez *B. fragilis*, la supplémentation en hème permet d'une part l'augmentation de la biomasse ($\times 3$) et d'autre part la réduction du temps de génération ($1/4$). La protoporphyrine IX, précurseur dans la chaîne de biosynthèse de l'hème, a un effet identique. En revanche l'ajout aux cultures des intermédiaires précédents la protoporphyrine IX, y compris l'acide δ -aminolevulinique, ne stimule pas la croissance. *B. fragilis* ne possède pas les gènes de la chaîne de biosynthèse de l'hème nécessaire à la synthèse des porphyrines *de novo* (Sperry *et al.*, 1977). Cependant lorsqu'on fournit *in vitro* de la protoporphyrine IX et une source de fer inorganique, la bactérie synthétise de l'hème ce qui indique qu'elle possède une ferrochelatase non encore identifiée (Rocha and Smith, 2010).

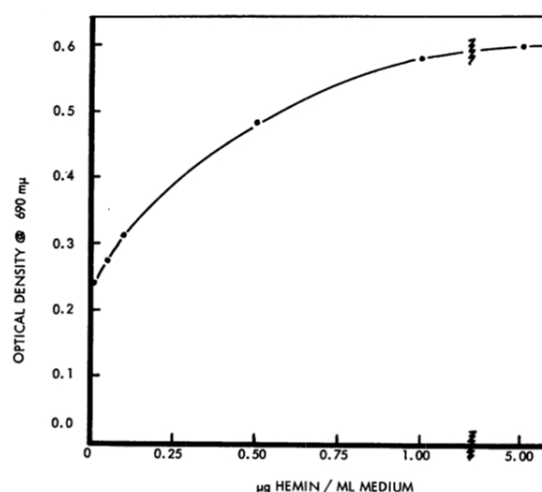


Figure 45 : Effet de l'hème comme additif sur la DO finale d'une culture de *B. melaninogenicus* au bout de cinq jours (Gibbons and Macdonald, 1960).

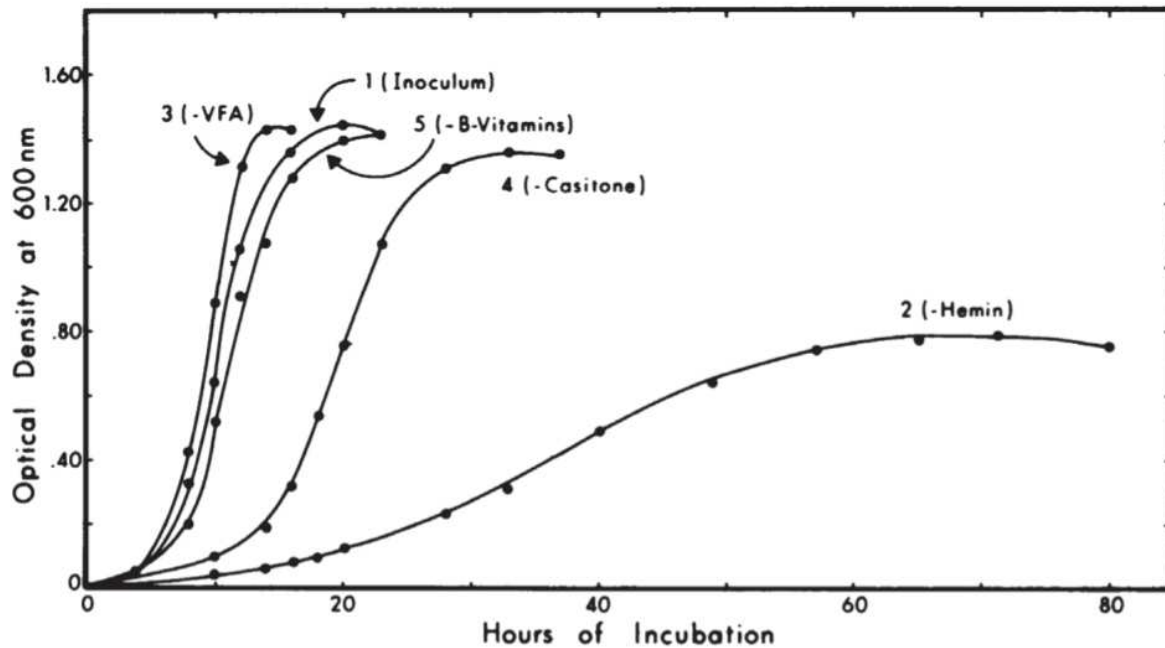


Figure 46 : Croissance de *B. fragilis* dans un milieu complet (1), dans un milieu carencé en acides gras volatiles (3), en vitamines B (5), en casitone (4) et en hème (2). (Varel, V.H. and Bryant, M.P. 1974).

Le rôle de l'hème chez les espèces du genre *Bacteroides* semble principalement lié à la respiration. Alors qu'au départ le rôle de l'hème a été associé essentiellement au transport d'électrons dans la chaîne respiratoire chez les bactéries aérobies, le besoin en hème des *Bacteroides* rappelle que la bactérie possède de nombreuses voies de production d'énergie. En absence d'hème, la fermentation du glucose produit principalement du propionate, de l'acétate et du lactate (Figure 23). En présence d'hème il y a synthèse de cytochrome, la voie du glucose s'arrête au fumarate qui sert alors de substrat à la fumarate réductase permettant ensuite une respiration anaérobie plus efficace énergétiquement que la fermentation (Macy *et al.*, 1975), en effet, *B. fragilis* en fermentation ne produit que 1,7 mole d'ATP par mole de glucose alors qu'il fournit 4,5 mole d'ATP par mole de glucose en respiration anaérobie (Rocha and Smith, 2010).

La capacité d'acquisition de porphyrines à partir de sources exogènes et l'utilisation qui en est faite sont donc des facteurs majeurs pour la croissance et le fonctionnement des espèces du genre *Bacteroides*. Comme pour les mécanismes d'adaptation à l'environnement cités précédemment telle la dégradation des carbohydrates complexes ou la tolérance à oxygène, les capacités d'utilisation des porphyrines s'avèreront particulièrement utiles lors de la primo-colonisation du tractus digestif (*cf* chap. III).

E) - Le fer et l'hème chez l'hôte

1) Transit du fer et de l'hème dans le tractus digestif

La présence d'hème dans le tractus digestif a souvent une connotation pathologique. C'est effectivement le cas lorsque la quantité de sang dans les selles est supérieure à 5 mL par jour, mais en dessous de cette valeur, la présence de sang est considérée comme normale (environ 1 mL par jour). C'est même un moyen d'assurer l'équilibre de la quantité de fer dans l'organisme. L'alimentation assure l'entrée de 5 à 15 mg de fer, sous la forme métallique et de 1 à 5 mg d'hème par jour. L'efficacité de l'absorption du fer alimentaire par l'intestin représente au maximum 10 % de la quantité de fer entrant dans l'organisme. La forme héminique représente la majorité du fer absorbé. La perte de fer *via* les saignements du tractus digestif liés à des micro-érosions de l'épithélium digestif, représente environ 1 mg de fer par jour. Lorsque la perte par les saignements devient supérieure à la capacité d'absorption au niveau de l'intestin grêle, une carence se crée. La quantité de fer stocké dans l'organisme permet de retarder fortement les effets du déséquilibre. On admet qu'il y a au total 2 à 4 g de fer dans l'organisme. Environ 0,3 g de fer sont répartis dans les différents tissus, 0,1 à 1 g sont stockés (transferrine, ferritine, etc.) et 2 à 2,5 g circulent dans les hématies. La production journalière d'hématies requiert $2 \cdot 10^{15}$ atomes de fer par seconde pour assurer une érythropoïèse efficace (Muckenthaler et al., 2017). Etant donné la quantité totale de fer, l'anémie par saignements digestifs occultes est donc l'état final d'un déséquilibre de long terme (Rockey, 1999).

L'homéostasie de l'hème dans le tractus digestif dépend entre autre de la disponibilité en fer, mais également de la balance biosynthèse/dégradation de l'hème au niveau des entérocytes, pour revue (Oates and West, 2006). Ces cellules possèdent une chaîne de biosynthèse de l'hème qui démarre dans la membrane interne des mitochondries. L'acide δ -aminolévulinique produit est ensuite transporté dans le cytosol où se poursuit la synthèse. Enfin, au stade du coproporphyrinogène III (pour rappel, Figure 34), il y a réintégration dans la mitochondrie où se finit la synthèse. La régulation de la production initiale d'acide δ -aminolévulinique se fait directement sur l'ALA-synthase par l'hème nouvellement produit. Il y a deux niveaux de rétro-contrôle négatif de la synthèse de l'hème, l'un qui agit au niveau post-translationnel, par blocage de la translocation de la pro-ALA-synthase dans la mitochondrie et l'autre au niveau post-transcriptionnel par diminution de la stabilité de l'ARNm codant l'enzyme. D'autre part, l'hème de l'alimentation peut entrer dans les entérocytes *via* un transporteur spécifique de l'hème, HCP1 (Heme Carrier Protein), incapable de transporter le fer non héminique. Dans les entérocytes, une hème oxygénase peut dégrader l'hème et libérer le fer si nécessaire. En parallèle, le fer sous forme Fe^{3+} présent dans l'intestin est

réduit en Fe^{2+} soit par une ferriréductase, DCYTB (Duodenal Cytochrome b), au niveau des microvillosités soit par la présence d'acide ascorbique. Ce dernier, en plus de son rôle sur l'entrée du fer dans les entérocytes, intervient dans l'homéostasie du fer en stimulant la synthèse de ferritine et en inhibant sa dégradation lysosomale (Lane *et al.*, 2015). L'internalisation du fer se fait *via* un transporteur membranaire, DMT1 (pour Divalent Metal Transporter), puis il est stocké sous forme de ferritine ou transporté à travers l'entérocyte. Enfin le Fe^{2+} est exporté vers le plasma *via* la ferroportine, IREG1 (Iron-Regulated transporter) (McKie *et al.*, 2000) où il est oxydé en Fe^{3+} par une ferroxidase avant d'être lié à la transferrine et de gagner le système circulatoire (Figure 47). Cette régulation fine du taux de fer dans l'organisme et particulièrement au niveau digestif permet de maintenir une homéostasie essentielle pour l'Homme. La dérégulation de la gestion du pool de fer

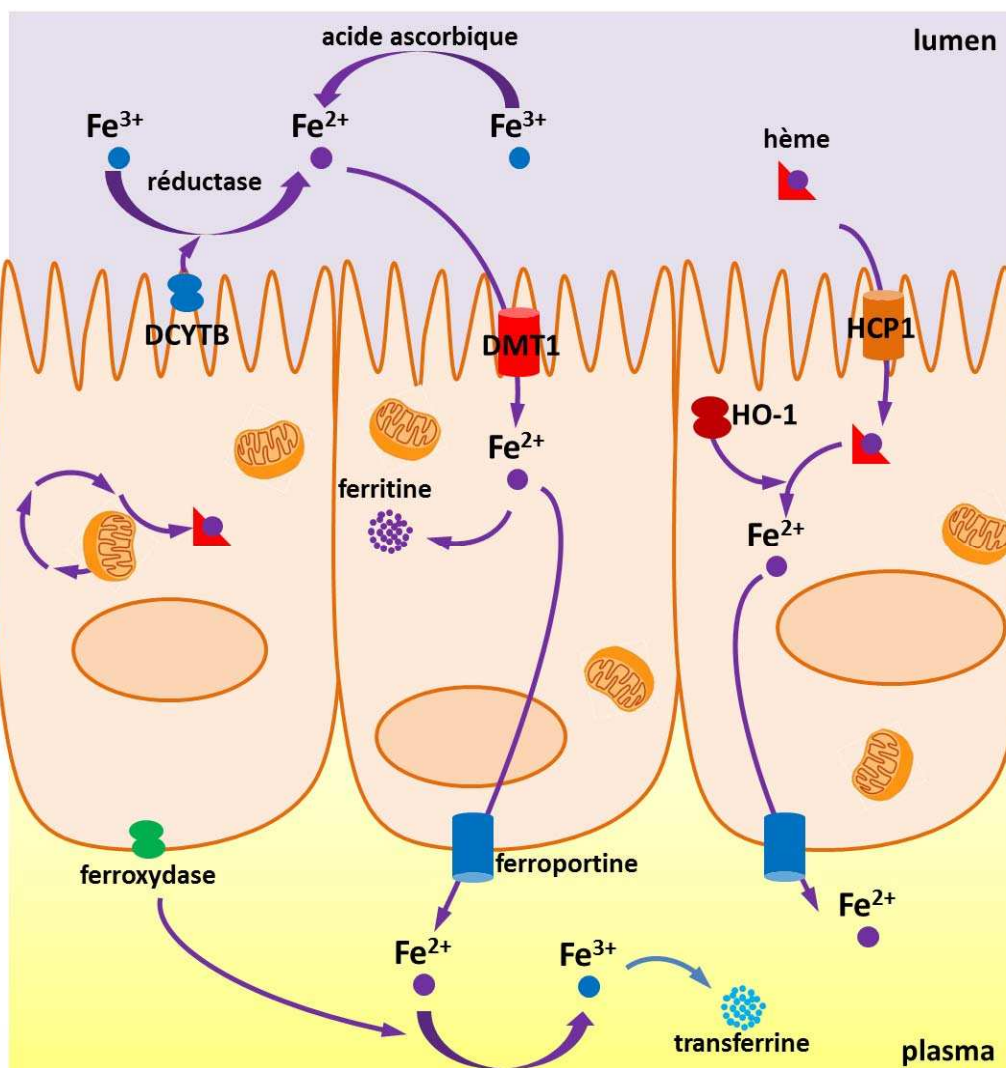


Figure 47 : Modèle de gestion du pool de fer et d'hème dans les entérocytes. (D'après Oates, P.S. & West, A.R. 2006). Le transporteur DMT1 et la ferroportine assurent la régulation de l'absorption du fer au niveau intestinal. L'entérocyte assurant un rôle de tampon. Le fer passant dans le plasma va permettre entre autres au transport d'oxygène (70 à 80 % du fer chez l'homme).

est responsable soit d'anémies en cas de carence martiale, soit de surcharges aboutissant à des défaillances organiques graves.

2) Dégradation et recyclage de l'hème par l'hôte

Chez l'Homme, un long processus amène à la dégradation finale de l'hème à partir des érythrocytes en fin de vie. Ces derniers sont phagocytés par les macrophages et au sein de ces macrophages une enzyme, l'hème oxygénase, prend en charge l'hème extraite de l'hémoglobine et détruit la partie porphyrique et libère le fer. La partie protéique de l'hémoglobine, dégradée, repart dans le pool des acides aminés et le fer, sous forme Fe^{2+} est pris en charge par la ferroportine qui le fait sortir du macrophage. Une oxydase l'oxyde ensuite en Fe^{3+} et c'est sous cette forme qu'il est pris en charge par la transferrine et est envoyé *via* le plasma vers la moelle osseuse où il sera réutilisé pour la synthèse des nouvelles hématies. La destruction du noyau porphyrique entraîne la formation de biliverdine qui sous l'action de la biliverdine réductase donne la bilirubine (Figure 48). Après un passage par le foie, la bilirubine passe par les voies biliaires jusqu'au tractus digestif où elle est métabolisée par le microbiote en urobilinogène, stercobilinogène et est excrétée sous forme de stercobiline (pour revue (Maurzerall, 1964)).

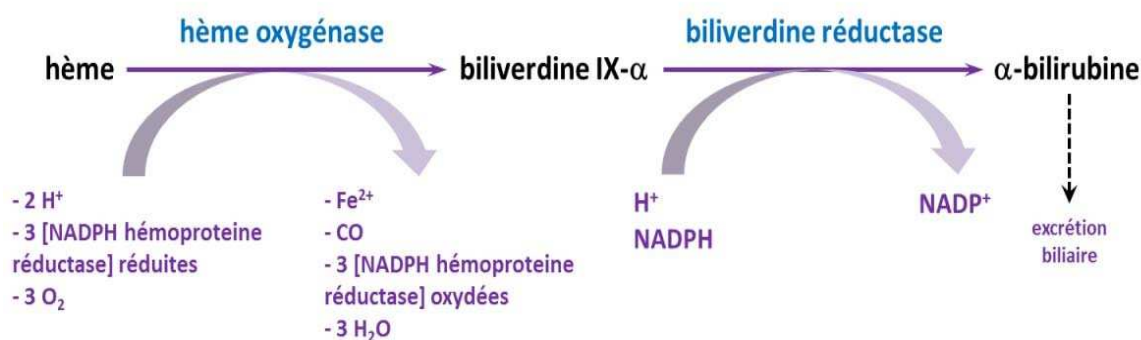


Figure 48 : Schéma général de la dégradation de l'hème par l'hème oxygénase chez les eucaryotes. D'après The BioCyc database, (Caspi, R. *et al.* 2014).

3) Importance de l'homéostasie du fer

L'importance du fer et de l'hème dans de nombreux processus biologiques implique de sérieux troubles en cas de dérégulation (pour revue (Mense and Zhang, 2006)). On connaît chez l'humain les troubles liés à la déficience de la synthèse de l'hème, comme l'anémie ou la porphyrie. Cette dernière peut avoir une cause génétique, comme pour la maladie de Günther (porphyrie

chronique congénitale liée à un déficit en uroporphyrinogène synthase), ou être liée à une intoxication aux métaux lourds, par exemple le plomb qui inhibe, entre autres, l'activité ferrochélatase. Un excès d'hème dans l'organisme se traduit par un tableau clinique très diversifié rendant difficile le diagnostic : des douleurs abdominales aiguës, des troubles de la digestion, des déséquilibres osmotiques et des troubles neurologiques pouvant aller jusqu'aux troubles bulbaire graves. Une déficience en hème peut être observée lors de la dégénérescence des mitochondries et des neurones pendant le processus de vieillissement et dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Ce processus de dégradation cellulaire se fait, entre autres, par une augmentation de l'activité de l'hème oxygénase et la diminution du complexe IV mitochondrial (Atamna and Frey, 2004). Plus généralement, la déficience en hème influe sur le système hématopoïétique, le système hépatique et le système nerveux.

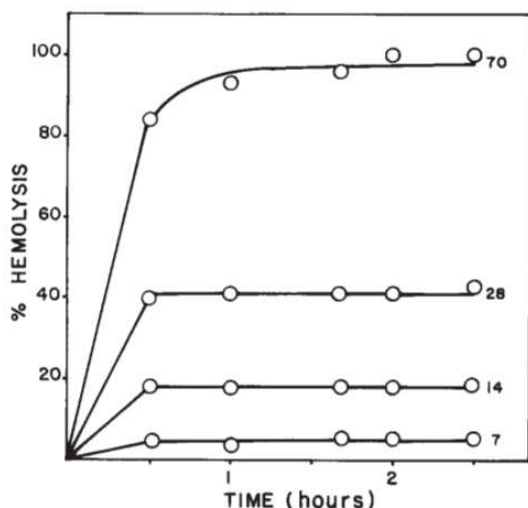


Figure 49 : Cinétique d'hémolyse induite d'hématies humaines par l'hémine à différentes concentrations (en μM). (Kirschner-Zilber *et al.*, 1982)

La présence d'hémine, la forme oxydée de l'hème (Fe^{3+} sur le noyau tetrapyrrole), induit une hémolyse des hématies (Kirschner-Zilber *et al.*, 1982). Cette hémolyse se produit par perte de potassium et gonflement des hématies entraînant la rupture des membranes (Kumar and Bandyopadhyay, 2005). De plus, la présence d'hémine entraîne un changement de conformation des protéines du cytosquelette provoquant des lésions et une instabilité des membranes des hématies. Ce phénomène est aussi un moyen non pathologique de régulation de la quantité d'hématies circulantes. L'accumulation d'hémine dans les membranes permet l'hémolyse des érythrocytes âgés.

L'hémolyse peut également être due à l'induction par l'hème ou l'hémine d'un stress oxydant par génération de ROS (Dutra and Bozza, 2014). Ces ROS endommagent les protéines, les sucres, les molécules lipidiques ou l'ADN et peuvent stimuler l'expression des molécules pro-inflammatoires *via* l'activation des voies NF- κB , AP-1 et SP-1. En effet l'hème provoque des réactions inflammatoires observées dans de nombreuses pathologies dont l'artériosclérose, les insuffisances rénales, par accumulation dans les glomérules, mais également dans les échecs de transplantation cardiaque.

4) Toxicité de l'hème et cancérogénèse

La muqueuse intestinale a une capacité d'absorption d'hème limitée. On en retrouve donc des quantités importantes dans tout le tractus digestif. L'activité pro-inflammatoire de la molécule provoque des irritations importantes des muqueuses du côlon qui peuvent s'accompagner d'une prolifération anormale des cellules de la muqueuse. Une augmentation de la quantité d'hème dans l'alimentation corrèle avec une augmentation des foyers d'anomalies au niveau des cryptes (ACF, aberrant crypt foci) et de cellules sans mucine (MDF, mucin-depleted foci) (Pierre *et al.*, 2003). L'effet toxique sur les cellules épithéliales de l'intestin provoque une hyper-prolifération des cellules souches dans les cryptes pour compenser la destruction des cellules de surface. En ajoutant à cela une diminution de l'apoptose, cette hyper-prolifération induit une hyperplasie qui peut éventuellement entraîner une cancérisation. Enfin, le microbiote joue probablement un rôle dans cette hyper-prolifération. En produisant de l'hydrogène sulfuré qui réduit les ponts disulfure présents dans la mucine, il ouvre la barrière de mucus qui protège l'épithélium et la rend plus perméable à l'hème (Ijssennagger *et al.*, 2015). Pour ces raisons, l'hème est considéré comme cancérogène et de fait il a été montré que l'hémoglobine et l'hème provoquent, à fortes concentrations, des dommages sur l'ADN d'une lignée de cellule tumorale du côlon humain (HT29 clone 19A) (Figure 50) (Glei *et al.*, 2006). Cette génotoxicité pourrait expliquer le lien entre l'augmentation des cancers colorectaux et les régimes occidentaux riches en viande. L'hème n'est probablement pas le seul initiateur de cette cancérogénèse, mais contribue à son développement (Corpet, 2011; Sawa *et al.*, 1998).

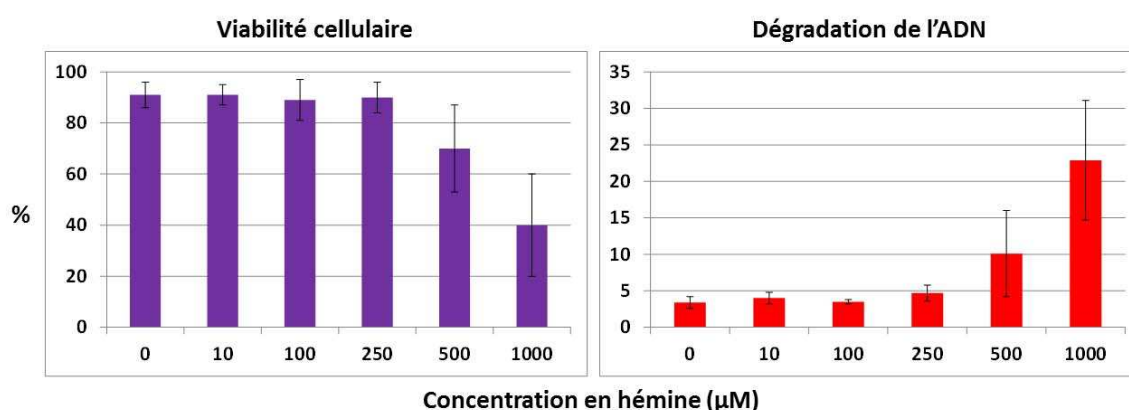


Figure 50 : Viabilité cellulaire et dommages induits sur l'ADN par l'hémine (D'après (Glei *et al.*, 2006)).

En 2015, une méta-analyse, publiée sous l'égide du Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, OMS, Lyon) et portant sur plus de 800 études épidémiologiques, a montré une association entre la consommation de viande rouge, transformée ou non, et l'apparition de cancers

colorectaux. Une corrélation est faite également entre cette consommation de viande et les cancers de l'estomac, du pancréas et de la prostate. Une partie des effets sont liés à la cuisson de la viande et à l'apparition de composés cancérigènes comme les composés nitreux (NOC, N-nitroso compounds), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons) et les amines aromatiques (HAA, heterocyclic aromatic amines). Cependant, en dehors même des risques liés à la cuisson, l'hème, seul, favorise l'apparition de NOC et de lipides oxydés dans le côlon, comme cela a été montré aussi bien chez l'Homme qu'en modèle animal. Suite à cette étude, la viande transformée a été classée en Groupe 1 (Cancérogène chez l'Homme) et la consommation de viande rouge en Groupe 2A (Probablement cancérigène chez l'Homme) (Bouvard *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter que seule la viande rouge a été classée dans le groupe 2A alors que la cuisson de la viande blanche ou du poisson conduit également à l'apparition de PAH indiquant bien que d'autres paramètres que la cuisson induisent la cancérogenèse. La consommation de poulet grillé contenant plus de HAA et moins de fer héminique que la viande de bœuf n'est pourtant pas associée à la cancérogenèse colorectale. Une étude animale a montré qu'à des doses nutritionnelles, les HAA et les NOC n'étaient pas promoteurs de la cancérogenèse alors que le fer héminique l'était dans les mêmes conditions (Bastide *et al.*, 2015).

De nouvelles études mettent en lumière la présence, dans la viande rouge, de polluants environnementaux, dont l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb), mais aussi les PAH, les pesticides, dibenzo-p-dioxines polychlorées et les dibenzofuranes (PCDD/F), les biphenyls polychlorés (PCB), les diphenyl ethers polybromés (PBDE), les diphenyl ethers polychlorés (PCDE), les naphthalenes polychlorés (PCN), et les perfluoroalkyl (PFAS). La toxicité de ces métaux lourds ou des composés polyhalogénés est bien connue et leur accumulation dans la viande rouge, matrice dont la forte teneur en graisse favorise le stockage de ces composés, peut aggraver la toxicité liée à l'hème et les risques de cancers du tractus digestif (Domingo and Nadal, 2017).

L'hème, tout en étant une molécule essentielle du métabolisme, reste donc un composé cytotoxique, capable d'induire des réactions inflammatoires et probablement impliqué dans l'induction de cancers du tractus digestif (Bastide *et al.*, 2015; Cross *et al.*, 2010). Dans ces pathologies, la corrélation étant établie entre les symptômes et une augmentation de la concentration en hème dans les selles, son dosage devient d'une importance cruciale en particulier dans le diagnostic précoce du cancer colorectal.

F) – Méthodes de détection de l'hème

Différentes méthodes ont été développées pour doser l'hème, soit en diagnostic clinique, soit en laboratoire. Pendant longtemps le principal test diagnostique mis en place à grande échelle a été le test Hemoccult, ou G-FOBT (Guaiac Faecal Occult Blood Test). Son principe repose sur l'oxydation de la liqueur de gaïac par le peroxyde d'hydrogène, réaction normalement lente mais qui devient très rapide en présence de sang, de peroxydase ou de catalase. En présence de sang dans les selles, c'est l'activité peroxydase de l'hème présent dans l'hémoglobine qui catalyse la réaction. La réaction transforme les composés phénolés (diméthylguaiacines et diéthylguaiacines) présents dans l'extrait de gaïac en bis-méthylènequinone de couleur bleue. Ce test est efficace et a permis la généralisation du dépistage des CRC chez les adultes de plus de 50 ans. Cependant, des contraintes de mise en place pour le patient et sa sensibilité à la nature de l'alimentation, entraînent de nombreux faux positifs et par conséquent, de nombreux examens supplémentaires inutiles (Gilbertsen *et al.*, 1980; Macrae *et al.*, 1982). La limite de sensibilité de ce test est environ de 1500 ng d'hème par gramme d'échantillon. Depuis quelques années, le test Hemoccult a été remplacé par un autre système, le I-FOBT (Immunochemical Faecal Occult Blood Test) qui repose sur la détection de l'hémoglobine humaine par des anticorps spécifiques de la partie globine (Väänänen and Tenhunen, 1988). Cette spécificité, outre sa simplicité de mise en œuvre, permet de s'affranchir des problèmes de spécificité liés à l'alimentation (Launoy *et al.*, 2005). La sensibilité de ces tests permet de trouver de l'hème à une concentration de l'ordre de 50 à 150 ng/g. Il existe enfin des tests moléculaires non basés sur la détection directe de l'hème permettant de mettre en évidence des marqueurs génétiques du CRC (Imperiale *et al.*, 2014; van Lanschot *et al.*, 2017).

En laboratoire, le dosage de l'hème, issu d'échantillons complexes comme les fèces se fait en routine selon des méthodes biochimiques éprouvées. On peut citer la méthode de Schwartz *et al.*, nommé test HemoQuant, basé sur l'élimination du fer de l'échantillon par un mélange acide oxalique/ FeSO_4 chaud, puis le lavage dans un mélange KOH/solvants organiques permettant d'éliminer les coproporphyrines et enfin le dosage de la PPIX au spectrophotomètre (Schwartz *et al.*, 1983). Cette méthode a été également utilisée dans les tests en routine de recherche de saignements occultes du tractus digestif (Ahlquist *et al.*, 1984). Une autre méthode très répandue est celle de Van den Berg qui est en fait une modification de la méthode HemoQuant dans laquelle les échantillons sont d'abord lavés en HCl/2-propanol avant traitement par acide acétique/ FeSO_4 (van den Berg *et al.*, 1988). Ce protocole reste une référence et a été amélioré (Pierre *et al.*, 2003). Cette méthode fonctionne très bien, elle a une bonne sensibilité mais la préparation des échantillons et le protocole en lui-même sont relativement lourds à mettre en place.

Il existe également des tests colorimétriques, comme par exemple le test Hemin Colorimetric Assay Kit (BioVision Inc.). Basés sur le même principe que le test Hemocult à l'extrait de gaïac, ils utilisent une réaction colorée induite par l'activité peroxydase sur l'hème. Ces tests sont très sensibles et simples à mettre en œuvre mais la finesse de la réaction colorimétrique ne permet pas son utilisation dans des milieux aussi complexes ou aussi riches que les fèces.

Une autre approche pour le dosage de l'hème est l'utilisation d'un système génétique senseur d'hème. Chez certaines bactéries à Gram positif il existe un système de régulation de la concentration en hème intracellulaire. Chez *Lactococcus lactis*, en cas d'augmentation de la quantité d'hème dans la cellule, l'expression des gènes de l'opéron *hrtRBA* permet l'efflux de l'hème vers l'extérieur. L'opéron est composé d'un régulateur transcriptionnel HrtR et d'un ABC transporteur HrtB-HrtA. HrtR reconnaît un motif dans la séquence promotrice de l'opéron et sa fixation réprime la transcription. Lorsque de l'hème entre dans la cellule, HrtR fixe l'hème et se détache de la région promotrice permettant ainsi la levée de la répression. La transcription entraîne l'expression de HrtB et de HrtA, le transporteur qui va permettre l'efflux d'hème à l'extérieur de la cellule (Lechardeur *et al.*, 2012) (Figure 51). Le gène codant le senseur HrtR a été cloné sur un plasmide portant une fusion transcriptionnelle composée du promoteur de *hrtR* et du gène *lacZ* ce qui permet de mesurer indirectement la quantité d'hème présente dans un milieu en dosant l'activité β -galactosidase produite suite à l'import d'hème dans la cellule et à l'induction du système rapporteur. Ce système est extrêmement sensible permet la détection de 100 ng/mL d'hème pure, mais l'activité β -galactosidase est difficilement mesurable dans un échantillon complexe comme les fèces, les produits de dégradations présents dans l'intestin et probablement aussi les sels biliaires entraînant un quenching masquant la réponse de cette l'activité. Aussi, il existe une autre version du rapporteur dans laquelle le gène *lacZ* a été remplacé par l'opéron *luxABCDE* qui code les protéines nécessaires à la bioluminescence. Ce système n'est pas sensible aux sels biliaires et permet de suivre l'induction du système rapporteur, y compris dans des milieux complexes (Joubert *et al.*, 2017).

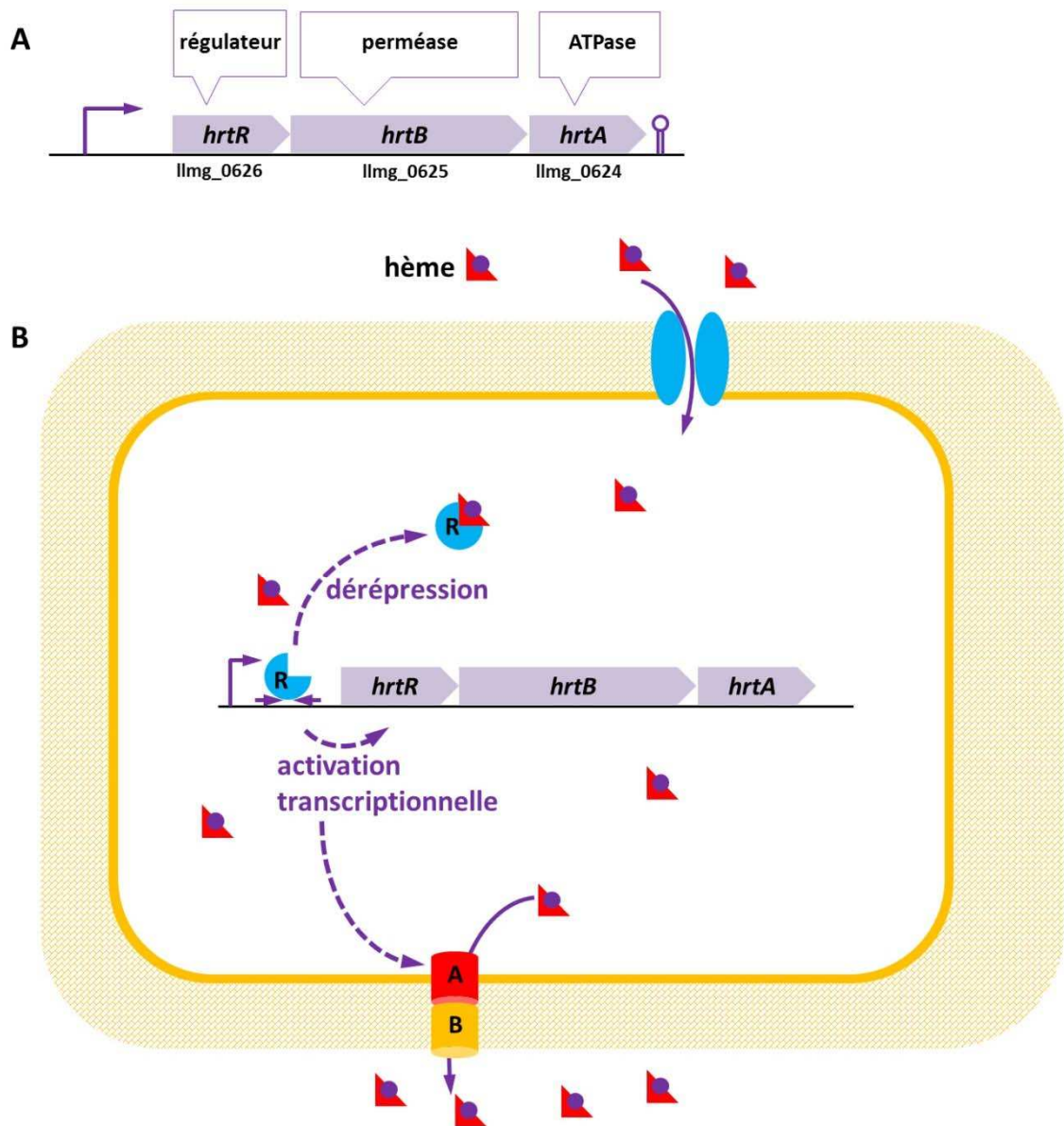


Figure 51 : Système senseur d'hème chez *L. lactis* MG1663. A : organisation de l'opéron *hrtRBA*, B : fonctionnement du système Hrt. D'après (Lechardeur *et al.*, 2012).

Enfin, ce travail décrira dans le chapitre II un autre système de dosage de l'hème reposant sur la stimulation de la croissance bactérienne de *B. thetaiotaomicron*.

Nous avons vu tout au long de cette introduction la composition, le rôle et l'implantation du microbiote intestinal humain. Une grande part de ce microbiote est composée de *Bacteroides*. Ces bactéries présentent une adaptabilité extraordinaire face à un environnement complexe, soumis à des variations importantes et à une forte compétition en termes d'accès aux nutriments. Elles sont capables de moduler leur métabolisme énergétique, passant de la fermentation à la respiration en fonction des variations du taux d'oxygène dans leur milieu. En revanche, elles ne disposent pas d'une chaîne de biosynthèse d'hème fonctionnelle malgré leur besoin absolu en hème pour croître et dépendent donc de l'hème disponible dans leur environnement. Nous discuterons ainsi tout au long de ce travail, des relations entre *B. thetaiotaomicron* et l'hème. Nous analyserons comment *B. thetaiotaomicron* s'implante dans le tractus digestif, chercherons à déterminer quelle source d'hème est utilisée lors de cette colonisation, et si les quantités d'hème sont identiques chez tous les individus. Nous testerons également s'il est possible de moduler, *in vivo*, la quantité d'hème disponible dans l'intestin afin de déterminer si l'implantation de *B. thetaiotaomicron* s'en trouve modifiée. Pour obtenir ces informations nous commencerons par montrer en quoi la croissance de *B. thetaiotaomicron* peut servir d'outil permettant de détecter la présence d'hème dans un milieu complexe grâce à la mise au point d'un système de dosage *in vitro*.

Résultats

II – Auxotrophie pour l'hème de *B. thetaiotaomicron* comme base d'un test sensible de détection de l'hème en milieu complexe

Présentation

Lors de ce travail nous avons développé un test, nommé Heme-PPIX-Screen test ou test HPS, basé sur la stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* en présence d'hème. *B. thetaiotaomicron* est une bactérie auxotrophe pour l'hème. Sa croissance est très fortement stimulée en présence d'hème ou de PPIX (Sperry *et al.*, 1977). Il existe déjà de nombreux tests permettant le dosage de l'hème, mais ces méthodes, on l'a vu chapitre C-4, sont fastidieuses du fait de la difficulté de préparation des échantillons, et la complexité des milieux à tester. Dans un milieu de culture sans hème ni PPIX, la croissance de *B. thetaiotaomicron* est lente, le temps de génération est de plusieurs heures (Varel and Bryant, 1974). L'ajout d'une porphyrine conduit à un temps de génération de l'ordre de 30 à 40 minutes. Ces observations nous ont conduit à utiliser la croissance de *B. thetaiotaomicron* comme rapporteur de la présence des porphyrines dans différents milieux. L'article suivant décrit le test HPS (voir également le chapitre VI, matériels et méthodes), son fonctionnement et sa sensibilité en comparaison aux tests commerciaux. De plus l'effet de l'hème sur la croissance de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif et les sources possibles d'hème *in vivo* ont été analysées.

Ce test HPS a par ailleurs fait l'objet d'un dépôt de brevet (*cf.* chap. VII, annexe).

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



A sensitive bacterial-growth-based test reveals how intestinal *Bacteroides* meet their porphyrin requirement

David Halpern and Alexandra Gruss*

Abstract

Background: *Bacteroides* sp. are dominant constituents of the human and animal intestinal microbiota require porphyrins (i.e., protoporphyrin IX or iron-charged heme) for normal growth. The highly stimulatory effect of porphyrins on *Bacteroides* growth lead us to propose their use as a potential determinant of bacterial colonization. However, showing a role for porphyrins would require sensitive detection methods that work in complex samples such as feces.

Results: We devised a highly sensitive semi-quantitative porphyrin detection method (detection limit 1–4 ng heme or PPIX) that can be used to assay pure or complex biological samples, based on *Bacteroides* growth stimulation. The test revealed that healthy colonized or non-colonized murine and human hosts provide porphyrins in feces, which stimulate *Bacteroides* growth. In addition, a common microbiota constituent, *Escherichia coli*, is shown to be a porphyrin donor, suggesting a novel basis for intestinal bacterial interactions.

Conclusions: A highly sensitive method to detect porphyrins based on bacterial growth is devised and is functional in complex biological samples. Host feces, independently of their microbiota, and *E. coli*, which are present in the intestine, are shown to be porphyrin donors. The role of porphyrins as key bioactive molecules can now be assessed for their impact on *Bacteroides* and other bacterial populations in the gut.

Keywords: Heme auxotroph, Protoporphyrin IX, Metabolites, Germfree, Diagnostics, Microbiota

Background

Bacteroides are dominant anaerobes of the human intestinal flora [1]. These bacteria are auxotrophic for protoporphyrin IX (PPIX, which is metal-free) or heme (Fe-charged-PPIX) (collectively called porphyrins; for review; [2, 3]). Heme is the active moiety of numerous molecules, including blood hemoglobin. Heme is also toxic due to its oxidative effects [4–6]. Intestinal heme availability may vary between individuals, for example according to diet and overall health conditions [7], and administered purified heme reportedly increases *Bacteroides* populations in the mouse gut [8]. *Bacteroides* are capable of charging PPIX with Fe, and can thus fulfill their heme requirement when supplied with PPIX [9].

Both heme and its PPIX precursor are found in human feces [10, 11]. In view of *Bacteroides*' strict porphyrin requirement, we hypothesized that fluctuations in natural porphyrin levels in the healthy host could impact *Bacteroides* intestinal colonization. However, sensitive measurements of heme and/or PPIX in healthy individuals are particularly difficult to obtain: Tests such as Hemocult, which detect heme, are widely used in primary screenings for occult blood as a sign of colorectal disease [12]. These tests have limited sensitivity due to quenching, and may not detect heme at levels present in individuals deemed as healthy. Likewise, commercially available or published biochemical tests, which measure minute amounts of heme, failed in our experience to detect heme in complex biological samples like feces. Other porphyrin detection tests require multi-step extraction procedures and/or have limited sensitivity (see for example [10, 11]). Porphyrin detection in biological samples, particularly in feces, may be important for understanding how these metabolites might impact the

* Correspondence: alexandra.gruss@jouy.inra.fr
Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France, Jouy en Josas 78352, France

microbiota balance of the host. Yet no test to date is satisfactory for estimating porphyrin levels in feces of healthy individuals.

The quasi-strict heme (and in some cases heme or PPIX) requirement of numerous bacteria (reviewed in [2]) led us to devise a porphyrin detection method, referred to as "Heme-PPIX-Screen", based on growth stimulation of *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt) and *Bacteroides fragilis*. As little as 1-4 ng porphyrins was detected in a sample, reflecting the extremely low amounts needed to stimulate *Bacteroides* growth. Our study using Heme-PPIX-Screen revealed two porphyrin sources for *Bacteroides* that may be used in the host intestine. This study provides a novel analytical tool and new results on the sources and potential impact of essential metabolites, heme and its iron-free precursor PPIX, for *Bacteroides* intestinal colonization.

Results

Heme-PPIX-screen setup to detect heme via Bt growth stimulation

A vertical gel setup was designed such that Bt was suspended in porphyrin-free medium in the gel. Samples to be tested are deposited in wells (Fig. 1a; see Methods). Heme (Fe-PPIX), PPIX (no Fe), and heme breakdown products bilirubin and biliverdin were tested (Fig. 1b). Heme and PPIX (>500 ng) both strongly stimulated Bt growth, as expected from *in vitro* studies [9, 13]. In contrast, neither heme degradation product stimulated growth, even at 5-fold higher concentrations. Iron ($\text{FeSO}_4 = 0.7 \text{ ng}$ and $\text{FeCl}_3 = 8 \text{ ng}$) had no effect on Bt growth; no stimulation was seen around empty wells (data not shown). These results indicate that Bt growth stimulation is due to heme and PPIX, but not their breakdown products or iron. Equivalent stimulation was observed when *B. fragilis* was used as the indicator strain (data not shown).

Porphyrins are detected in complex samples

Feces are highly complex samples comprising digested foods, host-produced products, and usually, a wide range of microbes. Feces were collected from germfree and conventional colonized mice, and newborn and adult humans, and tested for their porphyrin content (Fig. 2a). Remarkably, all fecal samples scored positive in gels. Ground-up and acid-hydrolyzed mouse chow both tested negative, indicating that in these mice, food could be ruled out as a major porphyrin source (data not shown). Moreover, no signal was obtained when Bt was omitted from gels (data not shown), proving that the signal was due to Bt growth, and not penetration of bacteria from the fecal test sample. These results suggested that porphyrins contained in feces stimulated Bt growth.

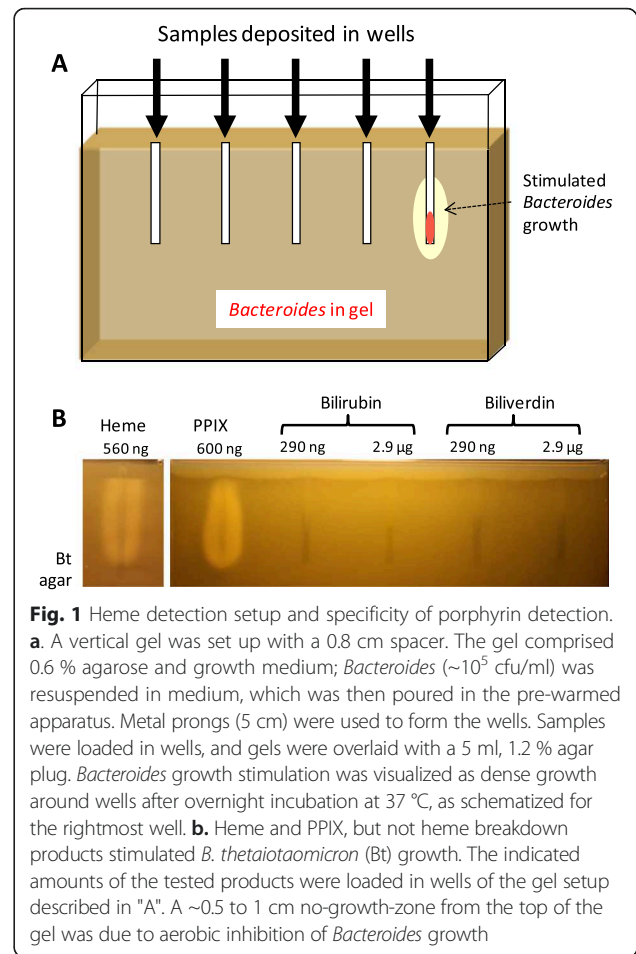
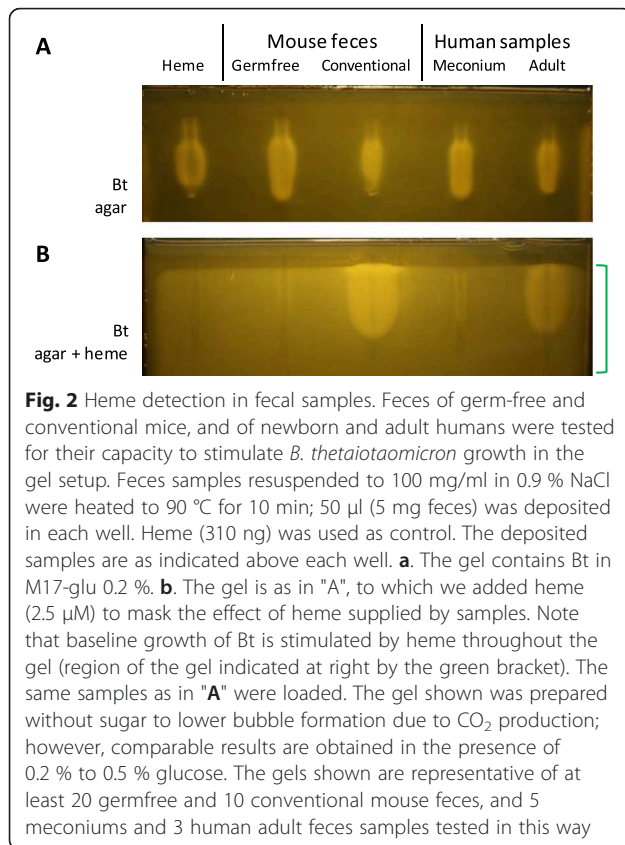


Fig. 1 Heme detection setup and specificity of porphyrin detection. **a.** A vertical gel was set up with a 0.8 cm spacer. The gel comprised 0.6 % agarose and growth medium; *Bacteroides* ($\sim 10^5$ cfu/ml) was resuspended in medium, which was then poured in the pre-warmed apparatus. Metal prongs (5 cm) were used to form the wells. Samples were loaded in wells, and gels were overlaid with a 5 ml, 1.2 % agar plug. *Bacteroides* growth stimulation was visualized as dense growth around wells after overnight incubation at 37 °C, as schematized for the rightmost well. **b.** Heme and PPIX, but not heme breakdown products stimulated *B. thetaiotaomicron* (Bt) growth. The indicated amounts of the tested products were loaded in wells of the gel setup described in "A". A ~ 0.5 to 1 cm no-growth-zone from the top of the gel was due to aerobic inhibition of *Bacteroides* growth

It was possible that *non*-porphyrin metabolites in feces samples were responsible for the observed Bt growth stimulation. However, as heme or PPIX is a growth prerequisite, we considered it likely that growth stimulation by any other metabolite would occur only if a porphyrin was available. We modified conditions to screen for *non*-porphyrin growth effectors. We reasoned that if heme was added to the gel in non-limiting supply, other factors stimulating *Bacteroides* growth might be revealed. To test this, we used the same samples and conditions as in Fig. 2a, except that 2 µM heme was added to the Bt-containing gel medium (Fig. 2b). As heme in the gel medium was in sufficient supply, no signal beyond background was observed around the heme-containing well (Fig. 2b leftmost well). Feces from germfree mice and meconium samples were negative in these tests, indicating that a porphyrin is the principal metabolite stimulating Bt growth in germfree (or quasi-germfree) individuals. In contrast, feces from colonized hosts clearly contained *non*-porphyrin metabolites that stimulated Bt growth once heme was supplied in the gel medium (Fig. 2b). Notably, the growth zone diameter surrounding feces from colonized hosts is markedly



greater when heme is freely available (compare Fig. 2b, heme in the gel, to Fig. 2a, feces sample as sole porphyrin source), showing that PPIX and/or heme is a *sine qua non* requirement for Bt stimulation by any secondary metabolites. Thus, in Fig. 2a conditions, the amounts of porphyrin in samples are growth limiting and determine the diameter of growth stimulation regardless of whether secondary metabolites are present.

These results confirm that fecal samples of healthy individuals contain porphyrins, independently of the nature of ingested food or of the microbiota. The confirmation that porphyrin is the limiting factor for normal *Bacteroides* growth validates the detection method as shown in Fig. 2a.

Feces samples contain heme

Growth of the Bt indicator strain was activated by both heme and PPIX. To determine whether heme was indeed present in feces samples we used derivatives of *Lactococcus lactis*, a heme auxotroph [2], as indicator strains, in particular a ferrochelatase mutant (*hemH*) that cannot charge PPIX with iron [14]. The *hemH* indicator is thus heme-specific. As expected, growth of wild type *L. lactis*, like Bt, was stimulated by heme or PPIX (Additional file 1: Figure S1a); however, heme, but not PPIX, stimulated growth of the *hemH* mutant

(Additional file 1: Figure S1b). Growth of a *cydA* mutant strain, which is defective for heme utilization, was not stimulated by either molecule (Additional file 1: Figure S1c). Three of the four tested feces samples stimulated growth on both wild type and *hemH* indicator strains, indicating that samples contained heme (compare Additional file 1: Figure S1e to S1d and f). Neither heme nor PPIX was detectable in the tested human adult feces sample; however *L. lactis* is a less sensitive indicator than Bt. A weaker signal on *hemH* than on the wild type *L. lactis* indicator suggests that PPIX may also be responsible for part of the detected signals. This result confirms that heme is present in the tested porphyrin-positive feces samples.

Semi-quantitative estimation of heme and PPIX

Two-fold dilutions of heme, ranging from 256 ng to 0.5 ng per sample, were loaded in a Bt gel (Fig. 3a). Growth halos were greater with increasing amounts of heme added to wells. The lower threshold of heme-mediated stimulation of Bt growth was approximately 1–4 ng heme per sample. The proportionality between the area of heme-stimulated growth and heme concentration was plotted using ImageJ (Methods), and showed a linear-log relationship (Fig. 3b). In the tested range (1–256 ng heme), two-fold differences in heme concentrations affected the extent of *Bacteroides* growth. We also compared PPIX and heme stimulation in parallel. The same molar amounts of PPIX and heme stimulated Bt growth to similar extents, with about two-fold differences with a given porphyrin concentration (Additional file 1: Figure S2). The Heme-PPIX-Screen assay can thus provide semi-quantitative information on porphyrin availability.

The Heme-PPIX-Screen assay is highly sensitive for porphyrin detection in complex biological samples

We compared the sensitivity of the Heme-PPIX-Screen assay to that of a heme detection test used clinically to measure occult blood in stool and urine. First, preparations of feces from a healthy human adult donor were spiked with increasing amounts of heme, ranging from 4 ng to 1024 ng (Fig. 4a). Using Heme-PPIX-Screen, feces samples without added heme gave a positive signal (Fig. 4a upper, as per Fig. 2). This is expected, as feces of healthy individuals are known to contain porphyrins (usually less than 400 ng heme per 5 mg feces sample [15, 16]). An increased signal was visible starting at 64–128 ng added heme, which was still within the healthy range. Plotting the area of heme-stimulated growth *versus* heme concentration showed a linear log relationship once endogenous porphyrin levels were surpassed by the added heme (as seen on 3 repeats of such gels; Additional file 2: Table S1). We note that compared to

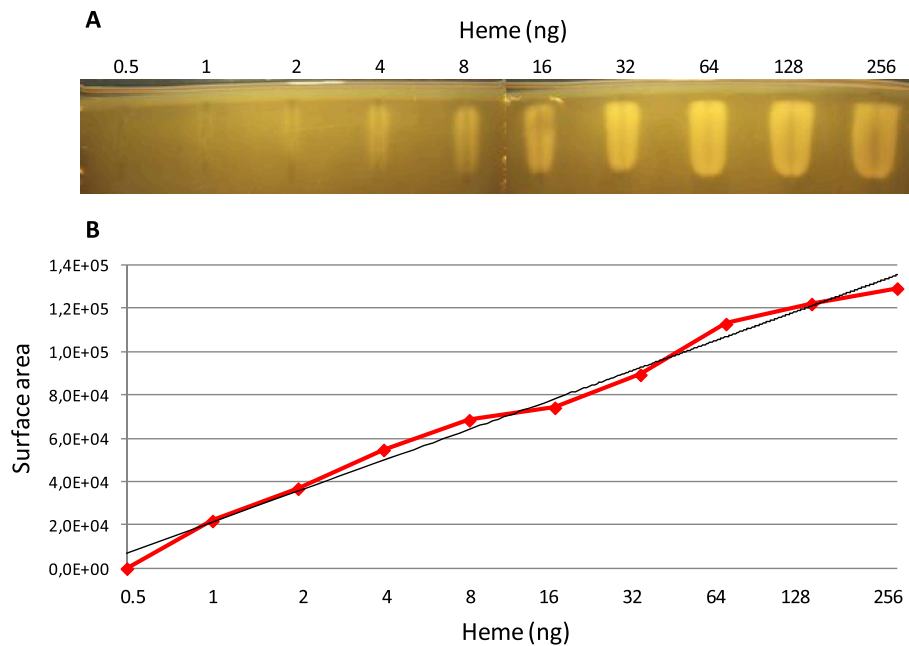


Fig. 3 Bt growth stimulation as a function of heme concentrations. **a** The amount of heme needed to stimulate Bt growth was determined by loading 2-fold dilutions of heme ranging from 256 to 0.5 ng per well. The lowest heme concentration detectably stimulating Bt growth was between 1-4 ng. **b** Area of growth stimulation was quantified using ImageJ (V1.45 s; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). In black, the logarithmic regression curve of the equation $y = 20600\ln(x) + 21091$, which describes the correlation between the amount of heme and the surface area of stimulated Bt growth, with a correlation coefficient of $R^2 = 0.99$

the standard with pure heme, the presence of feces lowered test sensitivity by 3- to 4-fold, suggesting that quenching occurs but is minor.

We then tested the same spiked samples as above using the HemocultII® test (Beckman Coulter), a biochemical heme test based on guaiac oxidation [12] that has been widely used for primary screening of gastrointestinal pathologies. Samples tested positive starting in the presence of 512-1024 ng heme, as reported (<http://www.bestcarelab.com/testsmenu/78.htm>) (Fig. 4a lower). In comparison, heme detection by the Heme-PPIX-Screen was about 100 times more sensitive than Hemocult in our hands. Other heme detection tests have been described, and include multi-step extraction protocols; however, the detection threshold is usually high (e.g., 4 μ M in reference [6]). This compares to ~ 0.1 μ M in the Heme-PPIX-Screen assay. These comparisons show that unlike known heme detection tests, only the present assay might be applicable to studies in healthy hosts.

Detection of small amounts of blood in urine may be an indication of pathology in the host, and heme detection is routinely performed in medical laboratories. We spiked urine from a healthy human volunteer with 1 to 256 ng heme per 50 μ l urine samples. Using the Heme-PPIX-Screen, heme was detected at 1 ng in a 50 μ l urine sample. Compared to the test using the Siemans Multistix 8SG™ dipstick as routinely used in clinical settings, heme was

detected at a 4-8-fold greater sensitivity (compare Fig. 4b upper and lower). The heme signal in urine was estimated to be 4 to 5 times lower than that of the standard in pure heme (Additional file 2: Table S1). As normal urine samples are totally negative for porphyrins, samples could be compared for semi-quantification against controls prepared in urine as sample diluent.

These comparisons indicate that if heme or PPIX is present in a complex biological sample, it will be detected using Heme-PPIX-Screen samples without the need for prior extraction or purification, while equivalent quantities would escape detection by other tests. However, as Heme-PPIX-Screen detects both heme and PPIX, a positive signal would more generally indicate that porphyrins are present. Detecting variations in porphyrin concentrations could prove useful in studies of Bt colonization or low-grade inflammation, for which both heme and PPIX play a role [10, 11]. This test would also detect very low amounts of porphyrins in urine, which is associated with urinary tract pathologies [17, 18]. As biological samples result in some signal quenching, heme quantification could be best estimated by preparing control samples in the same biological context as the samples to be tested.

***E. coli* cross-feeds porphyrins to stimulate Bt growth**

E. coli is a common constituent of the human microbiota, and is among the first species to transiently

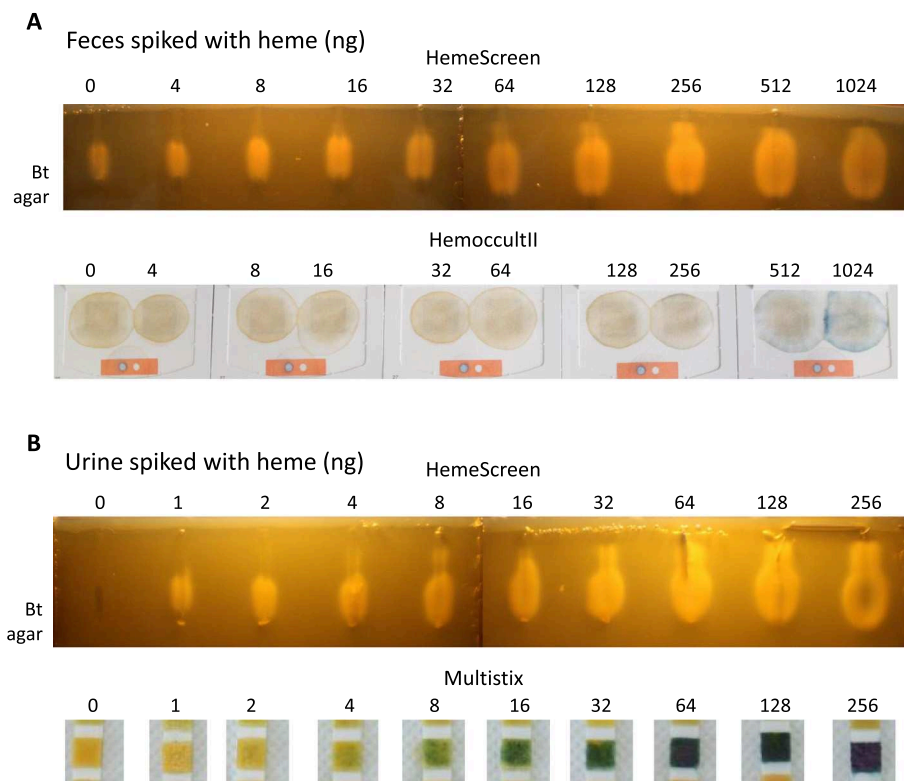


Fig. 4 Detection threshold of heme in fecal and urine samples by measuring Bt growth stimulation. **a.** Two-fold heme dilutions were prepared in a feces sample (100 mg resuspended in 1 ml 0.9 % NaCl) from a healthy human adult. Fifty microliters of a feces suspension supernatant (corresponding to 5 mg feces) were loaded per well. Upper, Heme-PPIX-Screen: heme was detected in all samples, including the feces sample without added heme (as in Fig. 2a). An increase in Bt growth stimulation is detected when 64 to 128 ng heme is added to samples, indicating that this amount is distinguishable over the background amount of heme present in a healthy individual. Lower, HemocultII® test: The same samples as in "Upper" were deposited on the HemocultII® test and processed as per manufacturer's instructions. The HemocultII® detection limit of heme in feces was in the range of 512-1024 ng. **b.** Two-fold heme dilutions were prepared in a urine sample from a healthy human donor. Upper, Heme-PPIX-Screen: Heme was detected in all spiked samples, but not in the sample lacking heme. Heme was detected at the lowest amount added, i.e., 1 ng. Lower, Siemens Multistix™ 8SG test: Urine samples as above containing the same heme concentrations were tested with the Siemens Multistix™ 8SG dipstick routinely used to test hematuria and processed as recommended by manufacturer. The lowest heme concentration detected by Siemens Multistix™ 8SG was 4-8 ng. Quantified areas of growth stimulation are shown in Additional file 2: Table S1

dominate the naïve newborn intestinal flora [19–21]. *E. coli* populations may vary in the host, e.g., after antibiotic treatments [22, 23]. The *Escherichia* synthesize heme, and *E. coli* reportedly secretes heme precursors into the medium [24], leading us to ask whether it could also donate porphyrins to stimulate Bt growth. Wild type (WT) *E. coli* MG1655, a *hemA* mutant derivative that is defective for heme biosynthesis, and MG1655 (pHemA), which overexpresses porphyrins [25], were tested on the Heme-PPIX-Screen setup. The MG1655 and MG1655 (pHemA) strains tested positive as porphyrin donors. However, the *hemA* mutant failed to stimulate Bt growth, confirming that the stimulatory factor is a porphyrin (Fig. 5). Whole cell *E. coli* cultures and filtered culture supernatants were both positive and gave comparable results. These results showed that *E. coli* stimulated Bt growth by cross-feeding porphyrins.

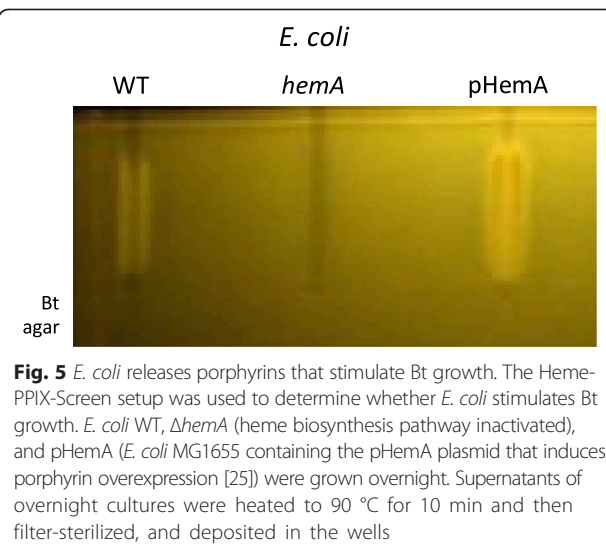


Fig. 5 *E. coli* releases porphyrins that stimulate Bt growth. The Heme-PPIX-Screen setup was used to determine whether *E. coli* stimulates Bt growth. *E. coli* WT, $\Delta hemA$ (heme biosynthesis pathway inactivated), and pHemA (*E. coli* MG1655 containing the pHemA plasmid that induces porphyrin overexpression [25]) were grown overnight. Supernatants of overnight cultures were heated to 90 °C for 10 min and then filter-sterilized, and deposited in the wells

To know about the nature of the secreted porphyrins, we tested *E. coli* supernatants on the *L. lactis* WT and *hemH* indicators. As the signal was not strong enough to be detected by either *L. lactis* strain, we added δ -aminolevulinic acid (100 $\mu\text{g/ml}$) to *E. coli* cultures, which stimulates the heme biosynthesis pathway [26]. In these conditions, stimulated growth was observed for both WT and *hemH* indicator strains but not the negative control *cydA* strain (Additional file 1: Figure S1g-i). Growth stimulation of the *hemH* indicator strain confirms that heme is among the porphyrins released by *E. coli* in these conditions.

Discussion

As porphyrins are essential for normal *Bacteroides* growth, these metabolites would expectedly have a growth-limiting role in the intestinal environment [3, 8]. To date, no reliable measure of intestinal porphyrins was available at concentrations present in the healthy host. Here we exploited *Bacteroides* heme auxotrophy to devise the Heme-PPIX-Screen. To our knowledge, bacterial growth was not previously considered as a means to detect porphyrins in samples. The method is simple and highly sensitive, and has the main advantage of functioning in complex samples of essentially any nature, as shown here using several examples. In comparison, biochemical tests measuring heme or PPIX show low sensitivity due to strong quenching, and/or may involve laborious extraction steps. We estimate the detection threshold to be 1-4 ng heme or porphyrin per test sample, based on tests with pure porphyrins, or with heme added to feces, urine, or bacteria. *Bacteroides* are thus highly sensitive indicators due to their extreme dependence on porphyrins for normal growth [27]. The test developed here will allow new questions to be addressed on the factors affecting intestinal microbial equilibrium. The Heme-PPIX-Screen test is well-suited to addressing research questions, in particular those concerning the impact of diet, inflammation, and the microbiota on porphyrin availability in the intestine. Such questions are currently under study in our laboratory using this test.

While Heme-PPIX-Screen is a highly sensitive test, it does have limitations for use. First, samples from a host being treated with antibiotics might inhibit *Bacteroides* growth, in which case the inhibitory zone could override the heme detection zone; this type of event is immediately visible on the gels. Second, the test detects both PPIX (without iron) and heme. While detection of both molecules is medically useful, a refined reporter strain, i.e., which is mutated for its ferrochelatase, could confer specificity for heme. Although *Bacteroides* does not encode a ferrochelatase homolog, it does carry a “deferrochelatase”, as identified in *E. coli* [28, 29]; its inactivation

could prove useful for limiting detection exclusively to heme.

Growth-based heme detection could potentially be further simplified: While *Bacteroides* are described as anaerobes, they do tolerate low amounts of oxygen [30], which makes handling straightforward. Use of a more oxygen-tolerant Bt strain could further simplify culture preparation: a recent study revealed the existence of naturally arising *B. fragilis* mutants with higher oxygen tolerance, which acquired mutations in a conserved flavoprotein (BF638R_0963; [31]). Addition of a fluorescence marker to *Bacteroides* [32] might also simplify semi-quantification of growth stimulation.

A main finding using the Heme-PPIX-Screen is that intestinal contents of healthy germfree and colonized mice and humans provide low amounts of heme and PPIX that we propose meet the *Bacteroides* requirement during intestinal colonization. Primocolonization of newborns is a complex process, and bacterial establishment is highly variable [21]. We speculate that variations in porphyrin concentrations among newborns may influence the efficiency of primo-colonization by *Bacteroides*, and possibly other species; this hypothesis is being tested in our laboratory.

A second main finding is that a bacterium of the intestinal microbiota, *E. coli*, is a potential porphyrin donor. Porphyrin cross-feeding may be relevant in vivo, i) in intestinal dysbiosis conditions when *E. coli* populations are high [22, 23], and ii) during primocolonization, when *E. coli* might be among the first populations to colonize the intestine [21, 33]. The test developed here opens perspectives for understanding ecological interactions based on porphyrins.

The importance of the non-heme/PPIX metabolites was uncovered in this study when porphyrins were no longer growth-limiting: feces from colonized adult humans but not newborns, and from conventional but not germfree mice, donated one or more metabolites in addition to porphyrins that stimulated *Bacteroides* growth. By adding heme in the gel (as in Fig. 2b), the *Bacteroides*-based growth stimulation test could thus have an alternative application for identifying bacterial partners that supply *Bacteroides* with metabolites other than porphyrins. Importantly, the Heme-PPIX-Screen is valid even in the presence of secondary metabolites, as porphyrin is the limiting factor that determines the area of *Bacteroides* growth stimulation.

Conclusions

Heme and PPIX are central metabolites whose presence in the gut i) may lead to shifts in microbiota populations, and ii) is associated with dysbiosis [6, 8]. Porphyrin detection in complex biological samples at normal

physiological levels as allowed by our test should be useful for obtaining an understanding of their effects on bacterial equilibrium in the gut.

Methods

Strains and growth conditions

The Bt type strain VPI-5482 was from the collection of S.Rabot (INRA, Jouy en Josas, France). *Bacteroides fragilis* ADB77 was generously provided by Michael Malamy (Tufts University, USA; [30]). *E. coli* strain MG1655 (referred to as WT) is a K-12 laboratory strain descendent of a stool culture taken in 1922 (<http://www.genome.wisc.edu/resources/strains.htm>). The *hemA* mutant is a MG1655 derivative constructed by P1 transduction from the *E. coli* C600 *hemA::km* (kanamycin resistant gene insertion) strain, kindly provided by Cécile Wandersman (Institut Pasteur, France; [34]). The *hemA* overproducer plasmid was kindly sent to us by the Schmidt-Dannert lab (U. Minnesota, USA; [25]). *L. lactis* MG1363 carrying pIL253 (carrying an erythromycin resistance determinant), and MG1363 *hemH* and *cydA* (both erythromycin resistant) strains were from our laboratory collection [14].

Bt cultures were routinely started from 50 μ l frozen aliquots prepared as follows: An overnight culture was prepared in M17-glu (glucose 0.5 %) containing heme (10 μ M) and cysteine (4 mM); the culture was washed and resuspended in fresh M17-glu containing 15 % glycerol and then aliquoted anaerobically and frozen. For all experiments, Bt cultures were prepared as follows: a frozen aliquot (10 μ l) was thawed and resuspended in 10 ml M17-glu (without heme) and grown overnight at 37 °C in an anaerobic chamber (Sheldon Manufacturing Inc., USA) or an anaerobic jar using gas packs (GENbox anaer, BioMerieux). *B. fragilis* cultures were grown as for Bt. *E. coli* strains were grown for heme donation screening in M17-Glu in static conditions at 37 °C. The *E. coli* pHemA strain was grown with 10 μ g/ml chloramphenicol. Supernatants of overnight cultures were heated to 90 °C for 10 min and then filter-sterilized, and deposited in the wells. Use of supernatants and heat treatments improved gel resolution, and in the case of the *E. coli* (pHemA) culture was used to inactivate chloramphenicol. *L. lactis* strains were cultured in M17-glu liquid or solid medium with 5 μ g/ml erythromycin. Overnight cultures were diluted 1:100 in M17-glu for porphyrin detection tests.

Additives used in growth assays

Heme, PPIX, biliverdin, and bilirubin were prepared as 20 mM stock solutions as described [35]. Delta-aminolevulinic acid (ALA: Sigma) was added to *E. coli* cultures at 100/ μ g per mL.

Commercial heme detection tests

HemocultII® for detection of heme in feces was purchased from Beckman Coulter (France), and used according to instructions provided with the kit. Multistix™ 8SG (Siemens Healthcare, Germany) for detection of heme in urine was supplied by the INRA-Jouy en Josas campus medical office.

Setup to screen for heme-containing samples that stimulate *Bacteroides* growth

A vertical gel set-up (Fig. 1a) with 0.8-cm spacers was filled with 0.6 % agar-medium (usually M17-glu unless specified) comprising $\sim 10^5$ *Bacteroides* colony forming units (cfu) per ml. The test was named "Heme-PPIX-Screen". In experiments to control for signal specificity, heme (2 μ M) was added to *Bacteroides*-containing agar so as to mask growth stimulation due to porphyrins and visualize growth stimulation due to non-porphyrin-metabolites. When heme was added to the gel matrix, sugars were omitted or amounts were reduced to 0.2 % as a means of limiting gas production; note however that residual sugars and possibly other carbon sources in rich medium were sufficient for Bt growth. We designed a "comb" comprising 5 cm-long metal prongs embedded in a hard plastic bar, which was inserted in the gel prior to setting to create deep wells into which test samples were deposited. Bacteria were added to medium just prior to pouring into a pre-warmed gel apparatus. Samples to be tested were deposited in the wells, and gels were then overlaid with a 5 ml, 1.2 % agar plug. As the gel was enclosed by glass plates, bacteria were in oxygen-depleted conditions, so that gels could be handled and incubated in ambient air. Gels were incubated at 37 °C overnight (~ 16 h), and then examined for Bt growth stimulation and photographed. To correlate growth stimulation with heme concentration, the surface area of growth stimulation was determined using ImageJ (V1.45 s; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), and then plotted against the log of the heme concentration.

Fecal and urine sample preparation for heme detection

Feces were collected from conventional and germfree mice that were routinely raised in our on-campus animal facilities. Human fecal and urine samples were collected from healthy newborns with parental consent (Professor Claire Poyart program director, Hôpital Cochin, Paris, France), or from healthy human laboratory volunteers. Procedures were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki, European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, institutional guidelines, and with permission 78-58 of the French Veterinary Services. All samples were used immediately or stored at -80 °C prior to testing.

For heme detection in feces samples, feces were resuspended (100 mg/ml) in 0.9 % NaCl and samples were heated to 90 °C for 10 min to avoid bacterial outgrowth. In some experiments, feces samples were centrifuged and supernatants were used. Similar results were obtained in the absence of heating, but sometimes resulted in bubble formation in gels. For heme detection in urine, a urine sample was used undiluted. In both cases the above-prepared samples were spiked with 2-fold dilutions of heme prior to loading 50 µl samples in wells.

Bacterial sample preparation for heme detection

Overnight cultures of *E. coli* strains were used directly after heating at 90 °C for ten minutes. Alternatively, culture supernatants were filtered and then heated to 90 °C for 10 min prior to loading 50 µl in wells.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Heme constitutes part of the porphyrin signal in feces and bacterial samples. *Lactococcus lactis* is a heme auxotroph whose growth is stimulated by heme [14]. *L. lactis* wild type (WT) and ferrochelatase-defective (*hemH*) strains, and a mutant that cannot utilize heme (*cydA*) were used as indicator strains to determine whether heme is produced by test samples. The *hemH*-minus strain lacks the capacity to charge PPIX with iron, and thus growth is not stimulated. Samples are: a-c, PPIX and heme (5 µL of 10 µM stock solutions, as indicated). Note that PPIX does not stimulate growth of the *hemH* indicator; d-f, feces from axenic and conventional (Conven) mice, and from human meconium and adult. Note that in each case, 5 mg of a same sample were deposited on the plates; g-i, filtered supernatants of a WT *E. coli* strain that was grown aerobically overnight in LB supplemented with delta-amino levulinic acid to stimulate heme synthesis [26]. In the lower panels, the weak signals obtained for *E. coli* were Photoshop-amplified by the "automatic levels" option used simultaneously for the three spots. The presence of heme in feces and *E. coli* samples is revealed by zones of stimulated growth in the *hemH* indicator strain (central panels).

Figure S2. Heme and PPIX stimulate *Bacteroides* growth. A. Identical molar amounts of heme and PPIX were tested for their capacity to stimulate *Bacteroides* growth. *Bacteroides* growth was stimulated when either heme or PPIX was added at 0.1 µM (equivalent to approximately 3 ng). The absence of detectable signal in the central well shows the background level when no sample is added. The gel was prepared in M17 containing 0.5 % glucose into which 7.10² *Bacteroides* was added per ml agar (see Methods). B. Areas of growth stimulation were quantified using ImageJ (V1.45; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). (DOCX 1157 kb)

Additional file 2: Table S1. Heme-PPIX-Screen detection of pure heme or in biological samples. (XLSX 20 kb)

Competing interests

A patent was filed (EP1430738.1) on heme detection based on growth of heme auxotrophs.

Authors' contributions

DH carried out and analyzed experiments and performed statistical analyses. DH and AG conceived, designed, and interpreted experiments. DH and AG wrote the paper. Both authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the craftsmanship of P. Regent (INRA) for the Heme-PPIX-Screen setup. We thank M. Malmay (Tufts Univ., USA) for providing *B. fragilis* strains, and C. Poyart (Hôpital Cochin, France) for meconium samples. We thank C. Morvan for and D. Lechardeur (MicrobAdapt team), M.A. Petit (Micalis, INRA), C. Wandersman (Pasteur Institute, France), P. Bouloc (Institut

Généétique et Moléculaire, Orsay), R. Briandet, S. Rabot (Micalis, INRA) and MicrobAdapt team colleagues for valuable discussion of this work. The project received funding from the French National Research Agency ANR-11-IDEX-0003-02; ALIAS project. This work is dedicated to the memory of Cécile Wandersman, whose passion for life and science has been an inspiration.

Received: 22 May 2015 Accepted: 16 December 2015

Published online: 29 December 2015

References

- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125:1401–12.
- Gruss A, Borezee-Durant E, Lechardeur D. Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv Microb Physiol.* 2012;61:69–124.
- Rocha EP, Smith CJ. Heme and Iron Metabolism in Bacteroides. In: Cornelis P, Andrews SC, editors. *Iron uptake and homeostasis in microorganisms.* 9th ed. Norfolk: Caister Academic Press; 2010. p. 155–65.
- de Vogel J, van-Eck WB, Sesink AL, Jonker-Termont DS, Kleibeuker J, van der Meer R. Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis.* 2008;29:398–403.
- IJssenagger N, Rijnierse A, de Wit NJ, Boekschoten MV, Dekker J, Schonewille A, et al. Dietary heme induces acute oxidative stress, but delayed cytotoxicity and compensatory hyperproliferation in mouse colon. *Carcinogenesis.* 2013;34:1628–35.
- Pierre F, Tache S, Petit CR, Van der Meer R, Corpet DE. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis.* 2003;24:1683–90.
- Zuckerman GR, Prakash C, Askin MP, Lewis BS. AGA technical review on the evaluation and management of occult and obscure gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology.* 2000;118:201–21.
- IJssenagger N, Derrien M, van Doorn GM, Rijnierse A, van den Bogert B, Muller M, et al. Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk. *PLoS One.* 2012;7(12):e49868.
- Sperry JF, Appleman MD, Wilkins TD. Requirement of heme for growth of *Bacteroides fragilis*. *Appl Environ Microbiol.* 1977;34:386–90.
- Silva FR, Nabeshima CT, Bellini MH, Schor N, Vieira Jr ND, Courrol LC. Study of protoporphyrin IX elimination by body excreta: a new noninvasive cancer diagnostic method? *J. Fluorescence.* 2013;23:131–5.
- van den Berg JW, Koole-Lesuis R, Edixhoven-Bosdijk A, Brouwers N. Automating the quantification of heme in feces. *Clin Chem.* 1988;34:2125–6.
- van Rossum LG, van Rijn AF, Laheij RJ, van Oijen MG, Fockens P, van Krieken HH, et al. Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterol.* 2008;135:82–90.
- Caldwell DR, White DC, Bryant MP, Doetsch RN. Specificity of the heme requirement for growth of *Bacteroides ruminicola*. *J Bacteriol.* 1965;90:1645–54.
- Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, et al. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol.* 2001;183:4509–16.
- Ahlfquist DA, McGill DB, Schwartz S, Taylor WF, Ellefson M, Owen RA. HemoQuant, a new quantitative assay for fecal hemoglobin. Comparison with Hemoccult. *Annals Int Med.* 1984;101:297–302.
- Vaananen P, Tenhunen R. Rapid immunochemical detection of fecal occult blood by use of a latex-agglutination test. *Clin Chem.* 1988;34:1763–6.
- Saraf SL, Zhang X, Kaniyas T, Lash JP, Molokie RE, Oza B, et al. Haemoglobinuria is associated with chronic kidney disease and its progression in patients with sickle cell anaemia. *Brit J Haematol.* 2014;164:729–39.
- Wang JP, Qi L, Zheng B, Liu F, Moore MR, Ng JC. Porphyrins as early biomarkers for arsenic exposure in animals and humans. *Cell Mol Biol.* 2002;48:835–43.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.* 2003;41(Supplement s441):48–55.
- Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88(430):47–57.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5(7):e177.

22. Barc MC, Bourlioux F, Rigottier-Gois L, Charrin-Sarnel C, Janoir C, Boureau H, et al. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on human fecal flora in a gnotobiotic mouse model assessed with fluorescence hybridization using group-specific 16S rRNA probes in combination with flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1365–8.
23. Barc MC, Charrin-Sarnel C, Rochet V, Bourlioux F, Sandre C, Boureau H, et al. Molecular analysis of the digestive microbiota in a gnotobiotic mouse model during antibiotic treatment: Influence of *Saccharomyces boulardii*. *Anaerobe.* 2008;14:229–33.
24. Tatsumi R, Wachi M. TolC-dependent exclusion of porphyrins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008;190:6228–33.
25. Kwon SJ, de Boer AL, Petri R, Schmidt-Dannert C. High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:4875–83.
26. Avissar YJ, Beale SI. Identification of the enzymatic basis for delta-aminolevulinic acid auxotrophy in a *hemA* mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989;171:2919–24.
27. Baughn AD, Malamy MH. The essential role of fumarate reductase in haem-dependent growth stimulation of *Bacteroides fragilis*. *Microbiol.* 2003;149(Pt 6):1551–8.
28. Letoffe S, Heuck G, Delepelaire P, Lange N, Wandersman C. Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:11719–24.
29. Turlin E, Heuck G, Simoes Brandao MI, Szili N, Mellin JR, Lange N, et al. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen.* 2014;3:849–59.
30. Baughn AD, Malamy MH. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature.* 2004;427:441–4.
31. Meehan BM, Baughn AD, Gallegos R, Malamy MH. Inactivation of a single gene enables microaerobic growth of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:12153–8.
32. Lobo LA, Smith CJ, Rocha ER. Flavin mononucleotide (FMN)-based fluorescent protein (FbFP) as reporter for gene expression in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;317:67–74.
33. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009;98:229–38.
34. Letoffe S, Debarbieux L, Izadi N, Delepelaire P, Wandersman C. Ligand delivery by haem carrier proteins: the binding of *Serratia marcescens* haemophore to its outer membrane receptor is mediated by two distinct peptide regions. *Mol Microbiol.* 2003;50:77–88.
35. Fernandez A, Lechardeur D, Derre-Bobillot A, Couve E, Gaudu P, Gruss A. Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens.* 2010;6(4):e1000860.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Conclusions

Par les travaux décrits dans cet article nous avons montré que le test HPS est un outil puissant et facile d'utilisation en laboratoires de recherche, pour détecter de très faibles quantités d'hème dans un milieu complexe.

Nous avons montré que de l'hème est présent dans le tractus digestif de la souris, qu'elle soit axénique ou conventionnelle, ainsi que dans celui de l'Homme, de la naissance et à l'âge adulte. Le test HPS est donc un outil permettant une approche simple de l'étude des porphyrines dans le tractus intestinal et au sein des communautés microbiennes complexes.

Il est fort probable que la présence d'hème dans le tractus digestif soit nécessaire à la primo-colonisation de *B. thetaiotaomicron*. Sachant que les cinétiques de colonisation microbienne à la naissance sont très variables, nous proposons que l'hème soit un des paramètres de cette variabilité.

Enfin, *E. coli* étant capable de synthétiser et d'excréter l'hème, sa présence dans l'intestin est susceptible d'être un facteur de l'équilibre des populations bactériennes du tractus digestif.

Ces hypothèses ont été évaluées dans le cadre de travaux de recherche décrits dans les chapitres suivants.

III - Disponibilité de l'hème lors de l'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif en modèle de souris axéniques

L'hème est une molécule essentielle au fonctionnement de nombreuses enzymes qui se trouve distribuée dans tous les organes. Dans le tractus digestif, cette molécule participe notamment à l'homéostasie du fer cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, la quantité d'hème présente dans le tractus digestif du nouveau-né varie selon l'individu. Sachant que l'implantation des bactéries du genre *Bacteroides* est généralement précédée par l'installation des *Enterobacteriaceae*, et que l'hème stimule fortement la croissance des *Bacteroides*, peut-on corréler la présence d'hème à l'implantation de *Bacteroides* lors de la primo-colonisation ? La variabilité de la quantité d'hème disponible joue-t-elle un rôle sur l'apparition plus ou moins tardive des *Bacteroides* dans le microbiote et sur leur quantité ? Enfin quelle est la part de l'hôte et des *Enterobacteriaceae* dans la production de l'hème utilisée par *B. thetaiotaomicron* lors de sa primo-colonisation ?

A - Origine de l'hème dans le tractus digestif

Le tractus digestif est un organe dans lequel on trouve de l'hème en grande quantité, une partie provient de l'hôte lui-même, *via* alimentation et les microlésions de l'épithélium intestinal (Rockey, 1999). Le reste est produit par un nombre restreint d'espèces du microbiote, tout particulièrement les *Enterobacteriaceae*, essentiellement *E. coli*, mais aussi les *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *etc.* qui disposent d'une chaîne de biosynthèse de l'hème complète (Gruss *et al.*, 2012; Kanehisa, 1997). La fréquence des coïnfections à *E. coli* et *B. fragilis* semble montrer l'importance d'*E. coli* dans cet apport d'hème (Brook, 1985). *B. thetaiotaomicron*, comme les autres espèces dominantes du microbiote intestinal (Gruss *et al.*, 2012), a besoin d'hème pour sa croissance mais ne dispose pas de la chaîne de biosynthèse complète (Sperry *et al.*, 1977). Nous avons voulu déterminer, quelle était la source principale d'hème utilisée par *B. thetaiotaomicron* pour sa croissance dans le tractus digestif, l'hôte et/ou son microbiote, ainsi que l'influence de la présence d'*E. coli* sur cette croissance. Pour répondre à cette question nous avons utilisé comme modèle d'implantation de *B. thetaiotaomicron*, le tractus digestif de souris axénique.

1) Observations préliminaires

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si la capacité de croissance de *B. thetaiotaomicron* variait en fonction de la quantité d'hème naturellement présente dans son environnement. Nous avons développé un modèle d'implantation en souris axénique afin de déterminer si la présence d'*E. coli* produisant ou non de l'hème modifiait la quantité de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif (cf. Matériel et méthode).

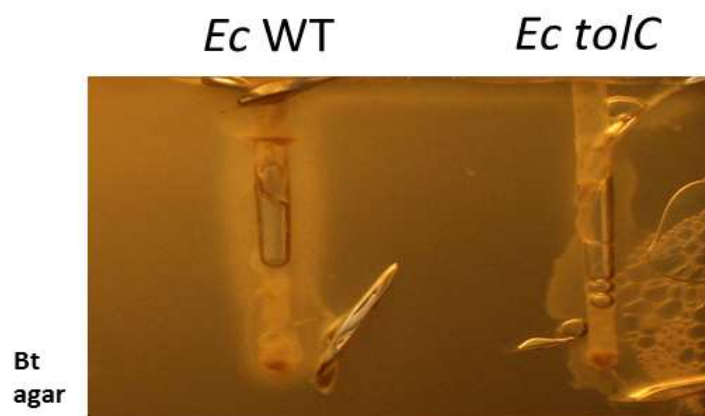


Figure 52 : Test HPS sur les deux souches de *E. coli* utilisées pour les gavages. On notera la présence du halo de stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* autour de la souche WT et son absence autour de la souche *tolC*.

Dans une première expérience, nous avons implanté dans le tractus digestif *B. thetaiotaomicron* en mélange avec soit, une souche d'*E. coli* sauvage, soit une souche mutée dans le gène *tolC* codant un transporteur (Blattner *et al.*, 1997). En plus de son rôle dans la sécrétion de nombreux composés comme des hémolysines, des peptides antimicrobiens ou des antibiotiques (Sharff *et al.*, 2001), TolC est responsable de l'efflux des porphyrines bactériennes (Turlin *et al.*, 2014). Nous avons tout d'abord vérifié par test HPS que le mutant *tolC* était effectivement incapable d'exporter de l'hème (Figure 52). Suite à cette vérification, nous avons comparé l'effet de la présence d'*E. coli* WT ou *tolC* sur le niveau de colonisation de *B. thetaiotaomicron* dans le modèle souris axénique (mâles BALB/c ; ANAXEM, INRA Jouy en Josas). Dans cette première expérience, nous avons effectué un gavage intra-gastrique des deux mélanges bactériens *Bt/WT* et *Bt/tolC* en quantité égale ($\approx 5.10^7$ ufc pour chaque espèce). Des prélèvements de fèces ont été effectués dans les jours suivants le gavage et des numérations bactériennes ont été réalisées par étalements différenciés sur milieux sélectifs pour les deux espèces (Figure 53).

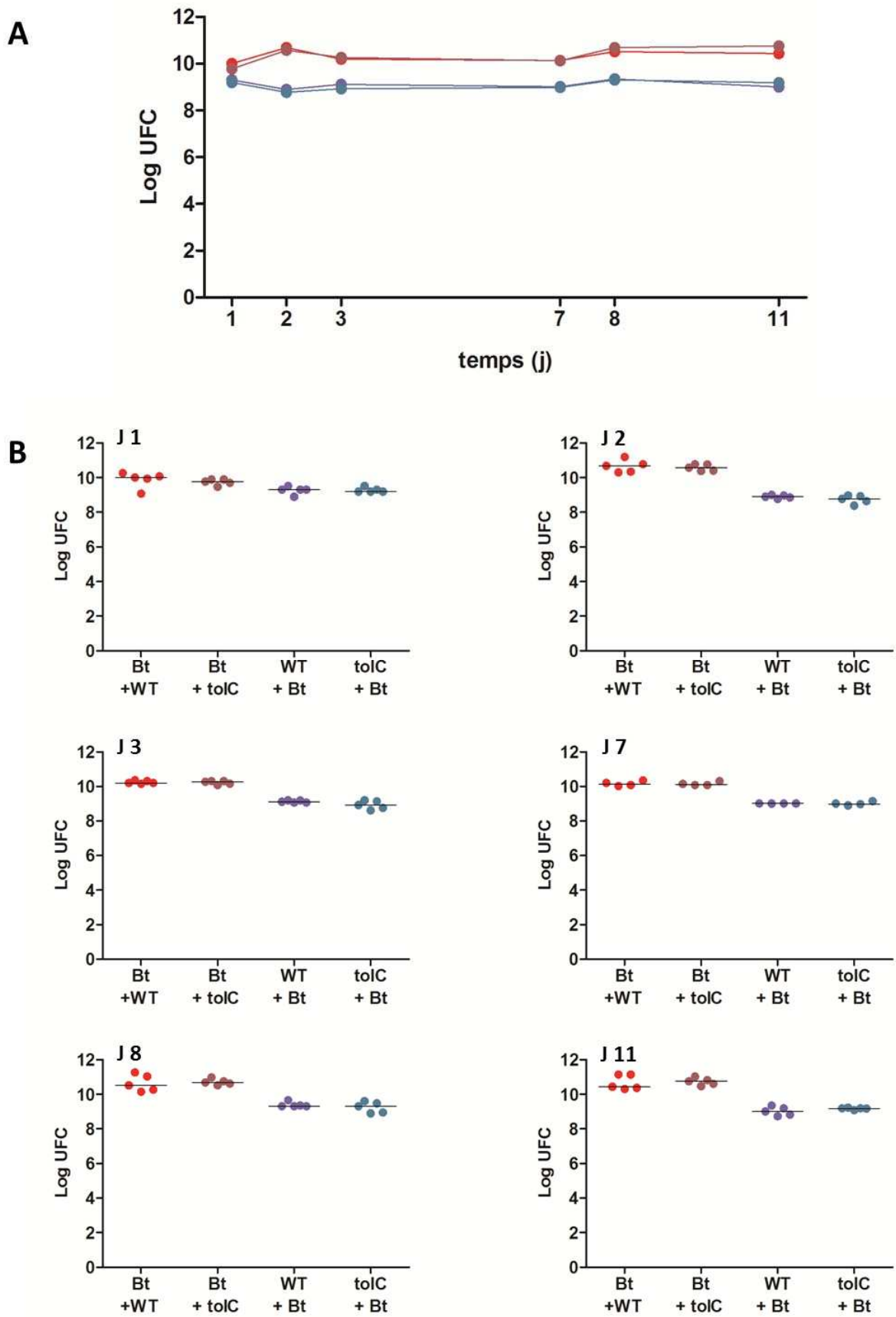


Figure 53 : Comptage des ufc (unité formant colonie) de *B. thetaiotaomicron* en mélange avec différentes souches d'*E. coli* après implantation dans le tractus digestif de souris axénique. En A : médiane des valeurs en fonction du temps. En B : dispersion des valeurs d'implantation selon les souches bactériennes. Les comptages correspondent aux numérations des souches indiquées sur la première ligne de l'axe des x.

A ces concentrations d'inoculum ($5 \cdot 10^7$ ufc pour chaque souche), les espèces n'ayant pas de compétiteurs s'implantent efficacement dans le tractus digestif. Dès 24 heures après le gavage, *B. thetaiotaomicron* est implanté à $\approx 5 \cdot 10^{10}$ et *E. coli* \approx à $1 \cdot 10^9$ ufc/g de fèces ce qui est identique à la concentration de *Bacteroides* dans le tractus digestif de l'Homme, et sensiblement supérieur à ce qui est attendu pour *E. coli*, plus généralement retrouvé entre 10^6 et 10^8 ufc/g. Cette « sur-installation » d'*E. coli* est cependant déjà connue (Schaedler *et al.*, 1965). Les populations sont restées stables durant les 11 jours où des prélèvements ont été faits. Il n'y a aucune différence significative dans la quantité de *B. thetaiotaomicron* implantée, que ce soit en présence d'une souche d'*E. coli* excréant l'hème ou avec celle ne l'excrétant pas. En fin d'expérience, nous avons voulu vérifier en utilisant le test HPS que la souche *tolC* était toujours déficiente pour l'efflux d'hème après implantation dans le tractus digestif. Nous avons alors constaté que le mutant *tolC* avait subi une réversion restaurant un phénotype sauvage permettant à nouveau l'efflux d'hème. Cette variation de la souche dans l'hôte pourrait expliquer l'absence de différence entre les deux populations de *B. thetaiotaomicron* lors de cette implantation. Au vue de cette instabilité de la souche *tolC in vivo*, nous avons choisi de ne pas poursuivre les expériences avec cette souche. Cette expérience a néanmoins permis d'émettre l'hypothèse que l'apport massif de bactéries lors du gavage pourrait effacer des différences plus subtiles dans l'implantation et dans l'équilibre final des populations. Suite à cette expérience, nous avons donc décidé de mettre au point un modèle plus adapté aux objectifs du projet et de modifier le plan d'expérience.

2) Implantation de *B. thetaiotaomicron* en monoxénie

Ainsi, nous avons caractérisé quelles étaient les quantités limites de *B. thetaiotaomicron* nécessaires à son implantation dans le tractus digestif chez la souris axénique. Dans la plupart des publications, les souris sont colonisées par *B. thetaiotaomicron* en utilisant 10^6 à 10^8 ufc dans un volume variant de 100 à 400 μL . Nous avons vu que dans ces conditions, l'implantation était rapide et massive. Nous avons donc décidé de diminuer la quantité de bactéries administrées, afin de se rapprocher des conditions naturelles de la primocolonisation. Le passage par l'estomac est critique pour la survie de la bactérie : des études faites sur différentes souches de *L. acidophilus* et *L. bulgaricus* montrent que le passage de ces bactéries lactiques dans le suc gastrique humain réduit en moyenne la quantité de bactéries viables de 1 à 3 log en une demi-heure (Conway *et al.*, 1987). De même, les *Bacteroides* présents dans la salive à hauteur de 10^3 ufc/g ne résistent au mieux que 15 minutes dans les sucs gastriques (Drasar *et al.*, 1969). Sachant également qu'il faut 5 minutes pour évacuer 40 % du contenu de l'estomac chez la souris et 55 minutes pour évacuer les 40 % suivant (Laplace, 1975), nous avons choisi d'administrer aux souris 10^3 ou 10^4 ufc de *B. thetaiotaomicron*.

Dans ces nouvelles conditions de gavage intra-gastrique, nous avons observé qu'avec un inoculum de 10^3 ufc, *B. thetaiotaomicron* ne s'implante pas dans le tractus digestif de la souris alors que l'administration de 10^4 ufc permet son implantation (Figure 54).

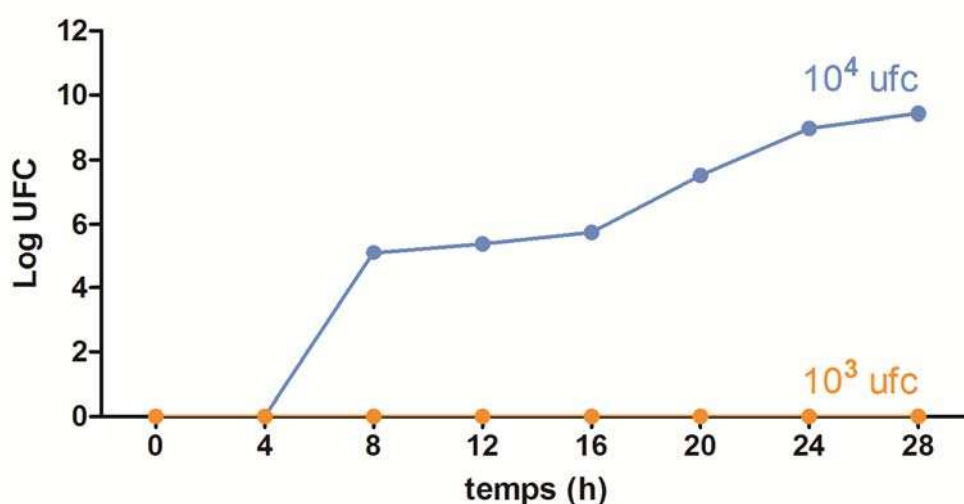


Figure 54 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris axéniques. Les ufc sont déterminées à partir des fèces des souris prélevés toutes les 4 heures. En orange, lorsque le gavage se fait avec 10^3 ufc et en bleu lorsqu'il est fait avec 10^4 ufc. Chaque point représente la médiane sur 6 souris.

Ces expériences montrent que la quantité de cellules utilisée comme inoculum lors de la colonisation par voie gastrique est un paramètre important de la cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron*. Dans nos conditions, en dessous de 10^3 ufc, la quantité de cellules est trop faible pour qu'un nombre suffisant de bactéries survive au passage de l'estomac et s'implante dans l'intestin. Au-dessus de 10^4 ufc, l'implantation est possible et la cinétique mesurable, et quand la quantité de cellules est supérieure, l'implantation est massive et immédiate.

3) Impact d'*E. coli* sur l'implantation de *B. thetaiotaomicron*

Sur la base du protocole établi en monoxénie, nous avons caractérisé l'implantation de *B. thetaiotaomicron* en dixénie. Quels sont les effets de la présence d'*E. coli*, bactérie primo colonisatrice s'implantant avant *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif ?

L'implantation séquentielle des différentes espèces bactériennes dans le tractus digestif du nouveau-né commence souvent par l'arrivée des *Enterobacteriaceae*. Le rôle généralement accepté de ces dernières est la consommation de l'oxygène résiduel du tractus digestif, ce qui permettrait une réduction du milieu favorable à l'établissement des anaérobies (Adlerberth, 2008; Levitt, 1970). Ainsi la présence d'*E. coli* préalablement à l'arrivée de *B. thetaiotaomicron* devrait donc aider à son implantation. Nous avons donc regardé l'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris colonisées par *E. coli*. Dans un premier temps, un gavage massif (10^8 ufc) est fait avec une souche d'*E. coli*, suivi au bout de 16 heures par un second gavage avec 10^3 ufc de *B. thetaiotaomicron*. La cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* est ensuite suivie par numération dans les fèces. Comme nous l'avons vu (Figure 54), à cette concentration d'inoculum, *B. thetaiotaomicron* ne s'implante pas en monoxénie. Afin de visualiser les stades précoces de l'implantation, des prélèvements sont faits toutes les 4 heures pendant 28 heures, durée suffisante pour que les espèces atteignent un niveau de colonisation stable. On observe une différence très claire : la présence d'*E. coli* permet l'implantation de *B. thetaiotaomicron* (Figure 55). Contrairement à l'administration de *B. thetaiotaomicron* sans pré-implantation d'*E. coli*, *B. thetaiotaomicron* suit une courbe de colonisation normale lorsqu'*E. coli* est le primo colonisateur : les premières bactéries apparaissent en 4 heures dans les fèces et la colonisation est complète et à son optimum en 24 heures ($\approx 5.10^{10}$ ufc/g de fèces).

Cette expérience met en évidence un second critère influant sur l'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif : après avoir vu l'importance de la quantité de bactéries initiales, ce second paramètre est la présence d'une autre espèce bactérienne, ici *E. coli*.

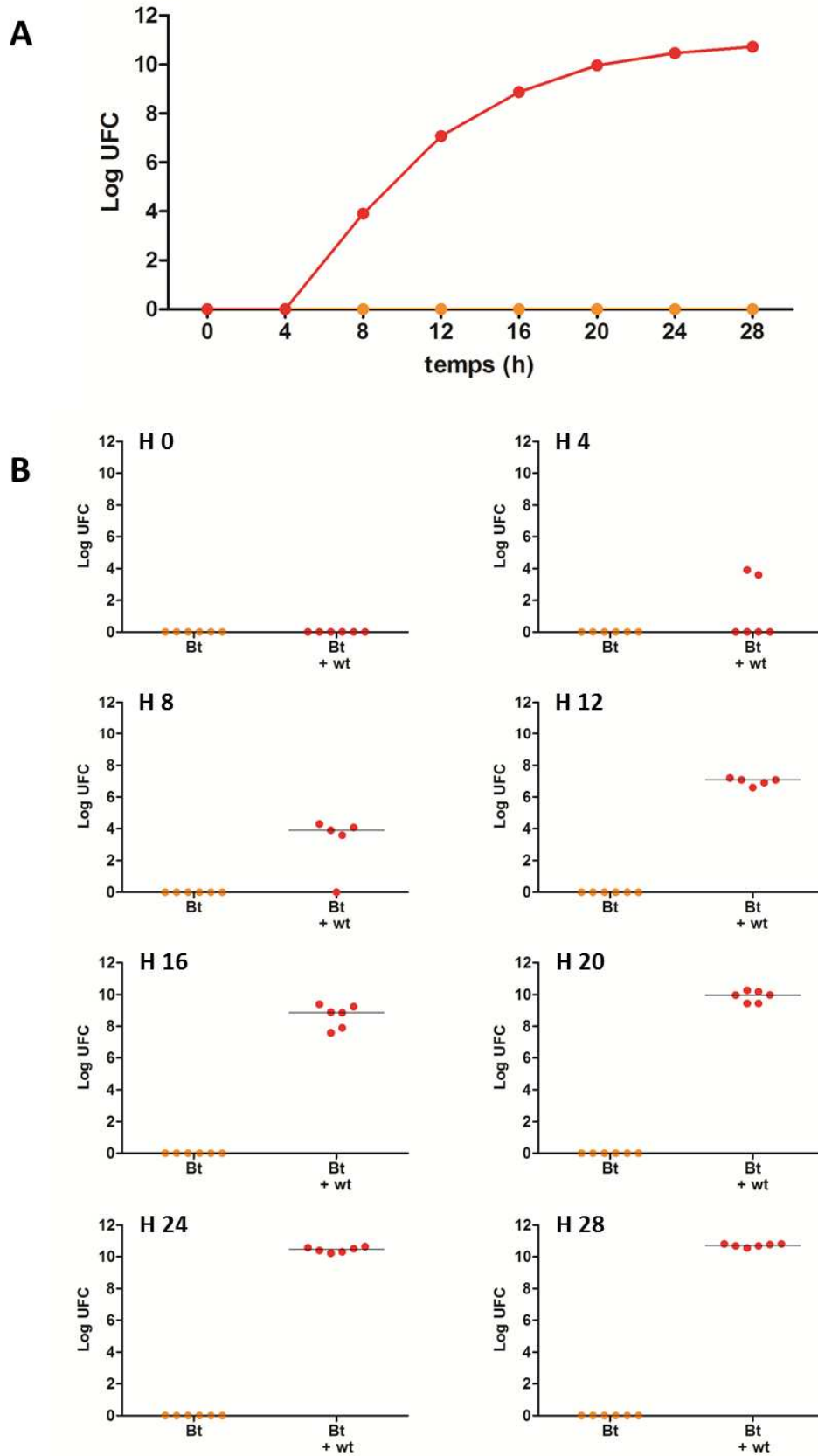


Figure 55 : Suivi de l'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris préalablement colonisées par *E. coli* (en rouge) ou non (en orange). En A : les médianes et en B : la dispersion des valeurs d'implantation. Les valeurs correspondent aux ufc par gramme de fèces.

4) Importance de la consommation d'oxygène et des quantités d'hème apportées par *E. coli* sur la cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron*

E. coli est considérée comme consommant l'oxygène résiduel de l'intestin permettant d'aider à la colonisation des anaérobies. C'est aussi l'espèce qui produit le plus d'hème parmi les espèces majoritaires du microbiote. Notre objectif est de confronter ces deux possibles contributions d'*E. coli* à l'implantation de *B. thetaiotaomicron* en utilisant le modèle d'implantation décrit précédemment.

Pour répondre à ces questions nous avons utilisé une souche d'*E. coli* déficiente dans la biosynthèse de l'hème, la souche *hemA* (Letoffe *et al.*, 2003). Dans cette souche, le gène *hemA* codant la glutamyl-tRNA réductase est inactivé. L'interruption de ce gène, situé en début de chaîne inactive totalement la biosynthèse de l'hème. La croissance de la souche *hemA* dépend d'un métabolisme fermentaire, n'ayant plus d'hème pour former les cytochromes nécessaires à sa respiration. Sa consommation d'oxygène est stoppée comme nous avons pu le vérifier par la mesure de l'oxygène dissous dans le milieu (Figure 56).

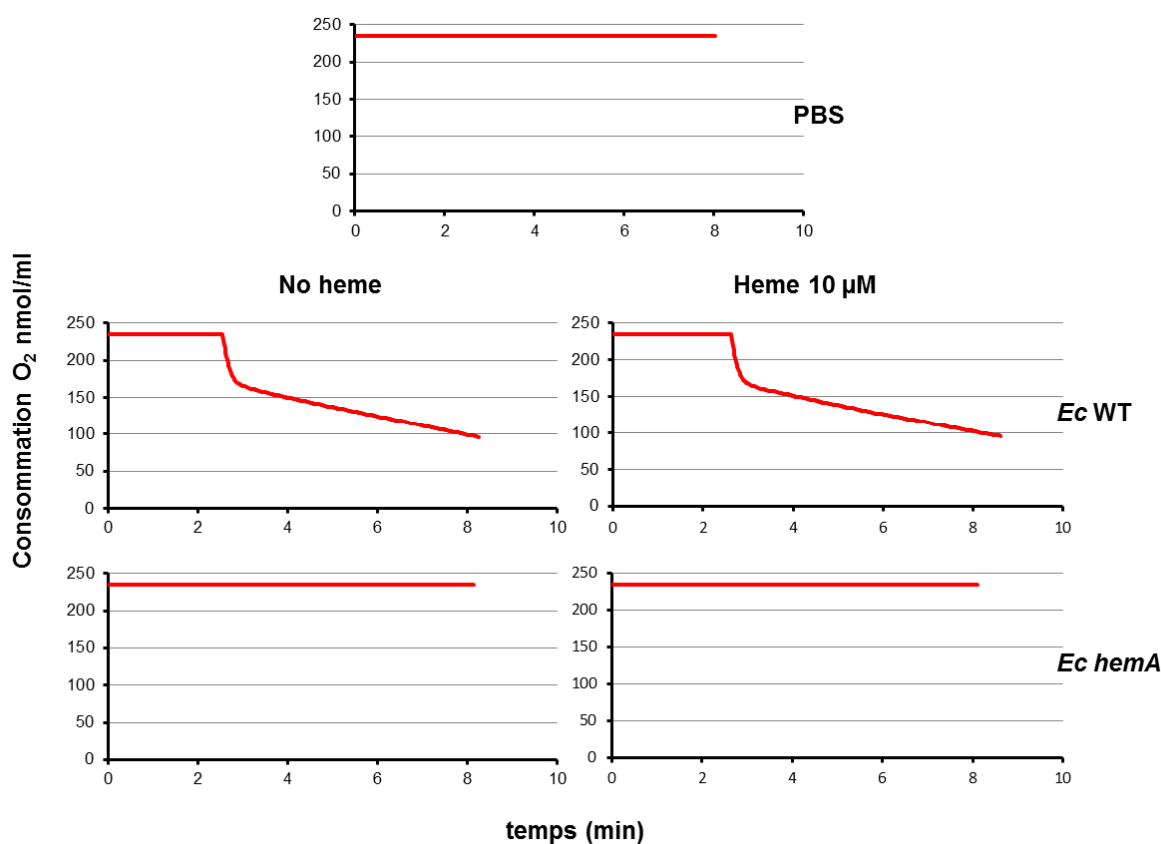


Figure 56 : Consommation de l'oxygène dissous dans un milieu de culture par *E. coli* WT ou par le mutant *hemA*. Sans hème le mutant n'est pas capable de respirer et ne consomme pas l'oxygène présent. La courbe PBS est le témoin sans bactérie. Les mesures sont faites selon le protocole décrit par (Yamamoto *et al.*, 2005) à l'aide d'une électrode à O₂ - Liquid-Phase Oxygen electrode unit DW1, Hansatech instruments, UK.

En parallèle, nous avons utilisé une souche d'*E. coli* portant un plasmide codant le gène *hemA* permettant la surproduction de la glutamyl-tRNA réductase stimulant la production d'hème (Kwon *et al.*, 2003).

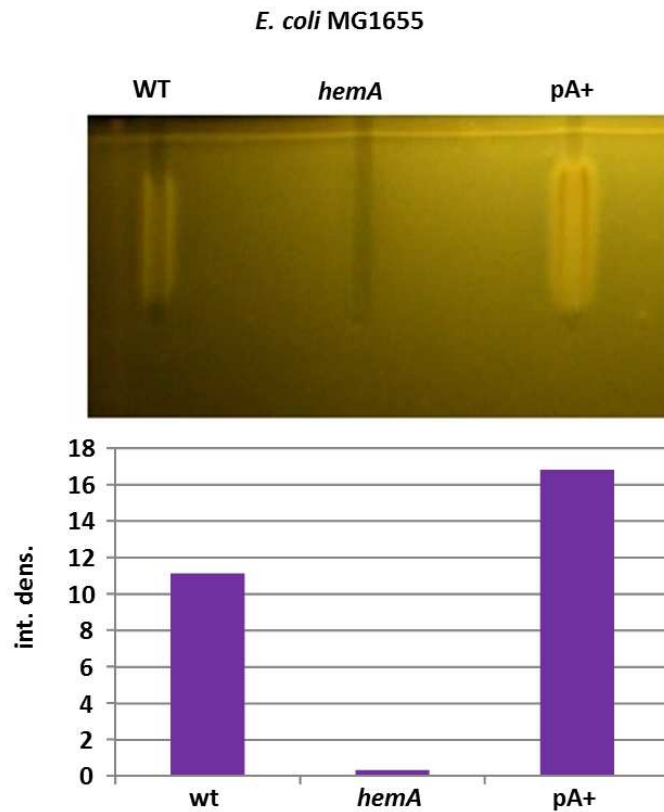


Figure 57 : Stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* en test HPS et mesure des densités intégrées des aires de stimulation. Les échantillons sont des surnageants de culture des souches d'*E. coli* WT, *hemA* et surproductrice pA+.

Un premier test HPS a été effectué pour visualiser les quantités d'hème présentes dans chaque surnageant de culture (Figure 57). Les différences étant clairement visibles en test HPS, une nouvelle expérience d'implantation a été menée en utilisant *B. thetaiotaomicron* en monoxénie, ou en dixénie avec *E. coli* WT, le mutant *hemA* ou le surproducteur pA+. Les souches d'*E. coli* ont été préimplantées (10^8 ufc) par gavage intra-gastrique 16 heures avant *B. thetaiotaomicron* (10^3 ufc) de manière à ce qu'elles soient installées en début de cinétique. Comme précédemment, la population bactérienne est dénombrée toutes les 4 heures sur milieux sélectifs à partir des prélèvements de fèces (Figure 58).

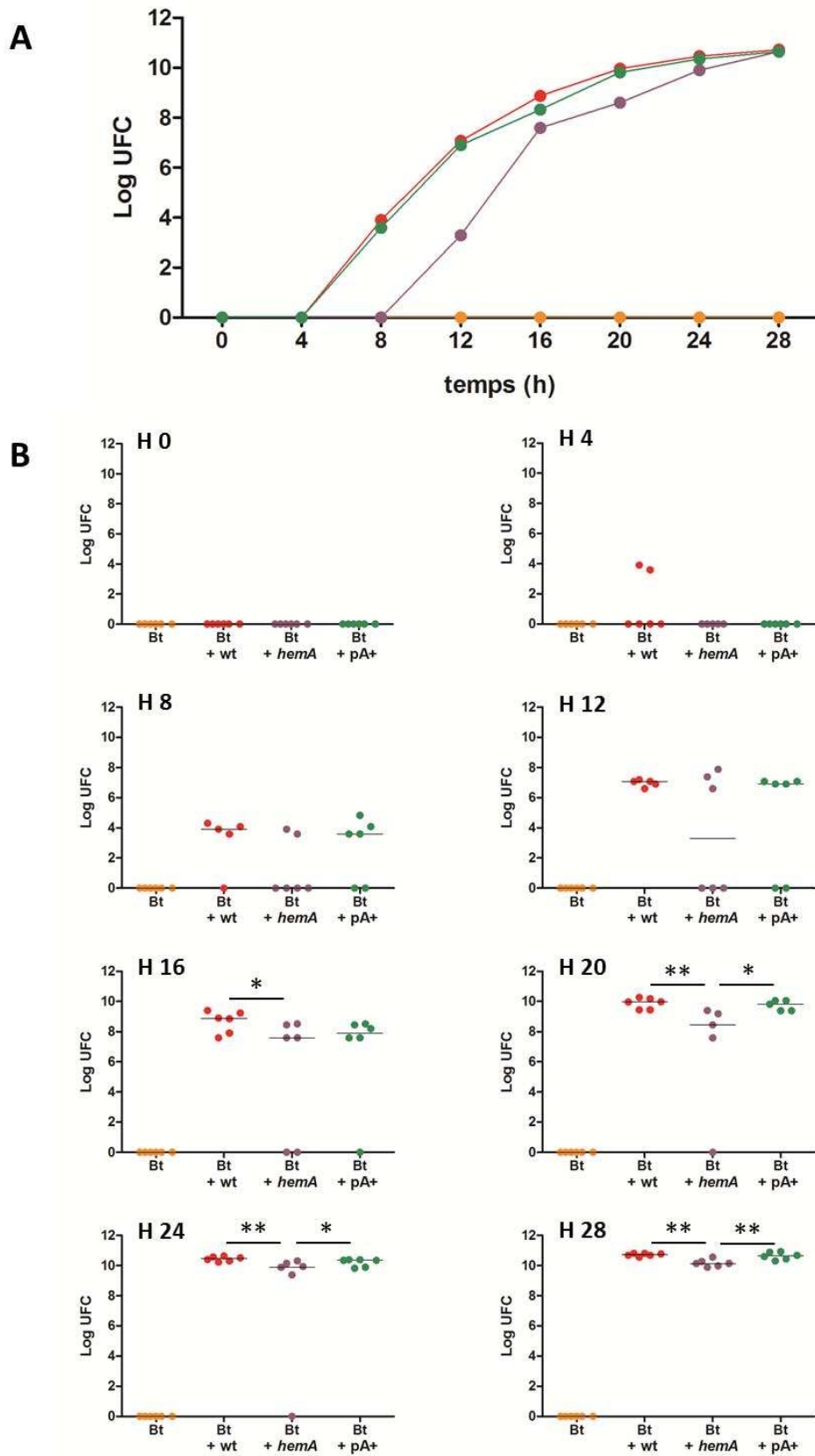


Figure 58 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris. En A : suivi des médianes et en B : dispersion des valeurs. En orange, *Bt* seul ne s'implante pas. En rouge *Bt* est implanté avec la souche d'*E. coli* wt, en violet avec la souche *hemA* et en vert avec la souche portant le plasmide pA+

Lorsque *B. thetaiotaomicron* est administré seul à 10^3 ufc, il ne s'implante pas. Dans les trois autres cas, il s'implante. Cette observation, reproduite dans 4 expériences différentes confirme qu'à cette concentration d'inoculum, *E. coli* est nécessaire à l'implantation. Cependant, on a vu précédemment que le mutant *hemA*, incapable de synthétiser l'hème n'était pas capable de respirer et donc était incapable de consommer l'oxygène résiduel du tractus digestif. Or, malgré un retard d'environ 4 heures, *B. thetaiotaomicron* s'implante chez les souris ayant été pré-colonisées avec la souche d'*E. coli hemA*, comparé aux animaux pré-colonisés par *E. coli* WT, produisant de l'hème ou la souche d'*E. coli* portant le plasmide surproducteur d'*hemA*.

En conclusion, nous avons montré d'une part une implantation plus rapide de *B. thetaiotaomicron* en présence de la souche d'*E. coli* synthétisant l'hème, ce qui suggère une contribution soit de l'hème, soit de l'élimination de l'oxygène, dans la primo-colonisation de *B. thetaiotaomicron*. Mais d'autre part, malgré un retard de 4 heures, *B. thetaiotaomicron* s'implante dans les animaux pré-colonisés par la souche *hemA*, ce qui suggère que ni la fourniture d'hème, ni la réduction du milieu par consommation de l'oxygène par *E. coli* ne semblent être des conditions essentielles pour l'implantation de *B. thetaiotaomicron*. Nos résultats tendent donc à exclure un rôle central d'*E. coli* d'une part dans l'élimination d'oxygène résiduel et d'autre part dans la quantité d'hème disponible dans le tractus digestif lors de la primo-colonisation.

Nous avons également déterminé si les deux espèces bactériennes étaient susceptibles de cohabiter et d'échanger l'hème, ou si elles ne colonisaient pas les mêmes niches. Pour cela nous avons euthanasié les souris en fin d'expérience afin de prélever le contenu du tractus digestif en différents points, duodénum, jéjunum, iléon, caecum et côlon. Une numération des espèces présentes dans les différents segments a été faite sur milieux sélectifs. D'autre part un échantillon de fèces a été observé en microscopie électronique à balayage (Figure 59). Que ce soit par comptage ou par observation microscopique, on voit que les deux espèces cohabitent tout au long du tractus digestif. Il peut donc y avoir échange d'hème ou d'autres produits entre les deux espèces.

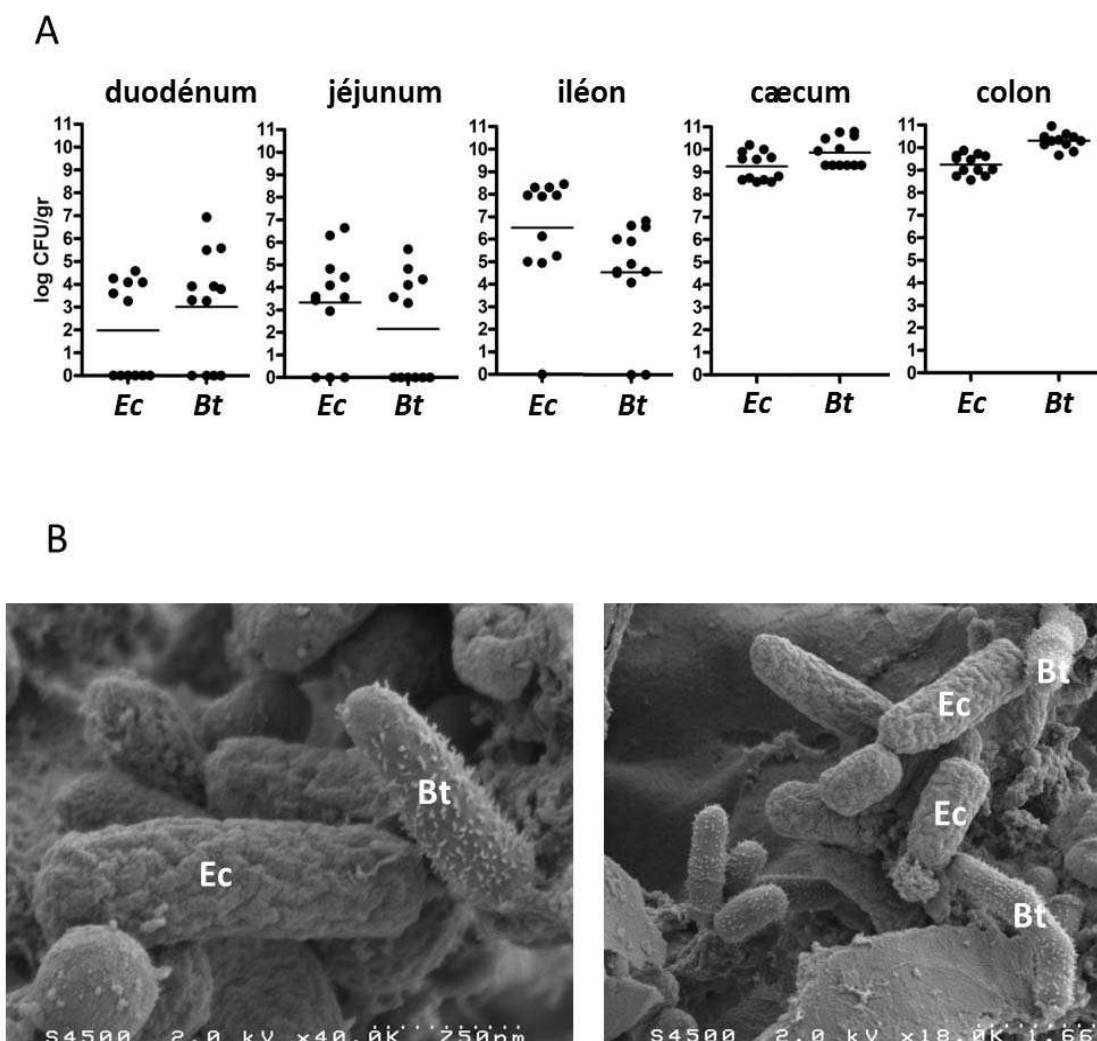


Figure 59 : Co-colonisation du tractus digestif par *Bt* et *Ec*. En A, les comptages bactériens d'échantillons de contenu intestinal prélevés dans divers segments de l'intestin. En B, observation en microscopie à balayage de la co-localisation des deux espèces à partir des contenus intestinaux de souris bi-colonisées (Photo D. Halpern & T. Meylheuc – MIMA2 – INRA).

Il est intéressant de noter que si *B. thetaiotaomicron* atteint son niveau d'implantation généralement décrit, à savoir $\approx 10^{10}$ ufc/g, celui d'*E. coli* est beaucoup plus élevé, ici à $\approx 10^9$ ufc/g au lieu de 10^6 à 10^8 ufc/g généralement observés. Cette différence est probablement due au fait qu'en modèle dixénique comme celui-ci, la compétition entre espèces est beaucoup moins forte. Par exemple les bactéries lactiques, connues pour inhiber la croissance d'*E. coli* dans le tractus digestif, sont absentes (Fang *et al.*, 1996). Le tractus digestif subissant de grandes variations de populations microbiennes lors de la primo-colonisation, il est ainsi possible que les deux espèces soient dominantes pour une période transitoire.

Enfin, le choix de la quantité de *B. thetaiotaomicron* administrée, fixée à 10^3 ufc, a été fait afin de représenter au mieux des conditions se rapprochant de la réalité d'une première exposition du nouveau-né préalable à la colonisation de son tractus digestif. Si cette quantité est inférieure il y a un risque qu'aucune bactérie ne soit en mesure de survivre jusqu'à l'intestin. En revanche, lorsqu'on augmente la quantité de *B. thetaiotaomicron* de l'inoculum (*i.e.* $\approx 10^4$ ufc) les différences s'effacent entre les courbes d'implantation en fonction de la présence de la souche d'*E. coli* produisant ou non de l'hème. De plus, comme on l'a vu précédemment, dans ces conditions, *B. thetaiotaomicron* finit par s'implanter seul même en absence d'*E. coli* (Figure 60).

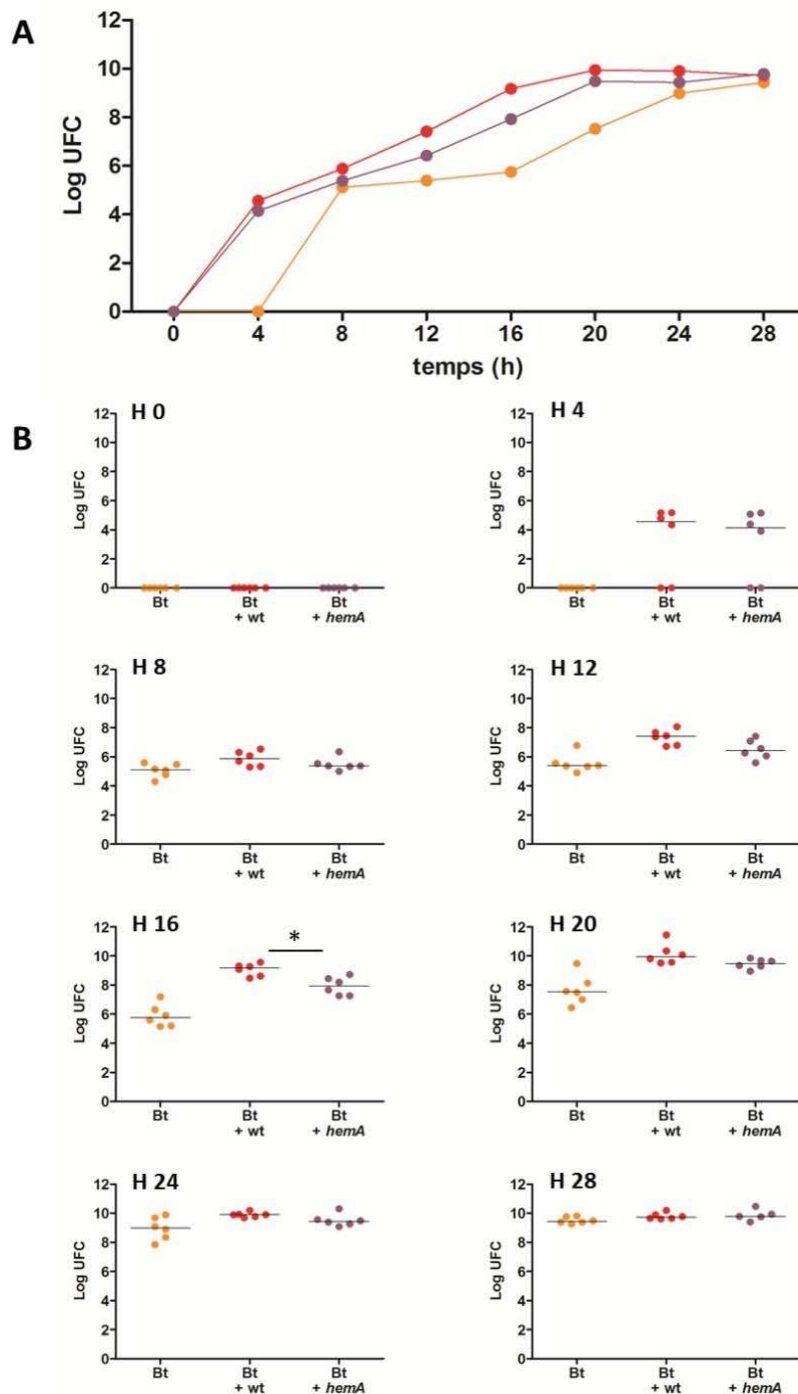


Figure 60 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris. En A : suivi des médianes et en B : dispersion des valeurs. Avec un inoculum de 10^4 ufc, *Bt* en monoxénie, en orange, s'implante. En rouge *Bt* est implanté avec la souche d'*E. coli* wt, en violet avec la souche *hemA*.

B. thetaiotaomicron est donc en mesure, sous certaines conditions, de s'implanter seul dans le tractus digestif même en l'absence d'une entérobactérie primo-colonisatrice, montrant que la source d'hème utilisée par *B. thetaiotaomicron* n'est probablement pas apportée par les bactéries co-colonisatrices mais plutôt par l'hôte. De même, il semble que la réduction du milieu, par consommation de l'oxygène résiduel, normalement nécessaire à l'établissement de *B. thetaiotaomicron* ne soit pas non plus une condition essentielle lors du processus de colonisation. La capacité de *B. thetaiotaomicron* à supporter transitoirement la présence d'oxygène dans son milieu (Baughn and Malamy, 2004) lui permet de s'implanter.

Conclusions

Le processus d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif est multifactoriel :

- *B. thetaiotaomicron* peut s'implanter seul, à condition que la masse bactérienne soit suffisante. Dans ce cas la bactérie n'a besoin de rien d'autre que ce qui est fourni par l'hôte.
- Si *B. thetaiotaomicron* arrive dans le tractus digestif en quantité inférieure à la masse critique, il ne s'installe qu'en présence d'une autre bactérie, comme montré ici avec la bactérie commensale *E. coli*. L'hôte fournissant de l'hème, *E. coli* peut alors augmenter la quantité d'hème et/ou d'autres métabolites, stimulant ainsi l'implantation.
- En complément à l'apport d'hème, *E. coli* peut également, grâce à son métabolisme respiratoire, diminuer la teneur en oxygène de l'environnement et faciliter l'implantation d'espèces anaérobies.
- Mais, comme nous l'avons vu précédemment, même lorsqu'elles n'apportent pas d'hème et qu'elles ne consomment pas l'oxygène, cas du mutant *hemA*, les bactéries primo-colonisatrices aident à l'établissement de *B. thetaiotaomicron*, par un mécanisme inconnu. Il est possible que les primocolonisateurs induisent une réponse de maturation par l'hôte qui favoriserait l'arrivée d'autres bactéries dans l'intestin.

Ces résultats soulignent la multiplicité des facteurs qui peuvent influencer sur la primocolonisation et posent la question de l'importance de l'élimination de l'oxygène par des bactéries dans ce processus. Cependant, nous ne pouvons pas dire, aux vues de ces expériences, si l'hème est, comme nous le pensons, un élément central à l'établissement de *B. thetaiotaomicron*.

B – Qu'en est-il chez l'homme ? L'hème dans les méconiums de nouveau-nés.

L'implantation séquentielle des espèces bactériennes dans le tractus digestif est généralement supposé suivre une cinétique reproductible (Mitsuoka, 2014). Les entérobactéries arrivent les premières, consomment l'oxygène résiduel de l'intestin, permettant l'implantation des anaérobies plus strictes (Adlerberth, 2008; Levitt, 1970). Or, des études de la colonisation du tractus digestif par le microbiote chez le nouveau-né révèlent une variabilité dans l'ordre d'implantation des bactéries primo-colonisatrices (Palmer *et al.*, 2007). Cette variabilité se traduit parfois par l'apparition des *Bacteroides* avant les entérobactéries. Ceci pourrait refléter des variations dans la densité des *Bacteroides* au moment de l'implantation comme suggéré par nos résultats. Puisque ces bactéries sont auxotrophes pour l'hème, nous proposons que la quantité d'hème dans le tractus digestif des nouveau-nés soit un second paramètre responsable de ces variations de la séquence d'implantation.

Pour tester cette hypothèse nous avons dans un premier temps regardé la variabilité de la quantité d'hème présente dans des échantillons de méconium prélevés chez des nouveau-nés.

1) – Quantité d'hème dans le tractus digestif des nouveau-nés

Comme nous l'avons dit précédemment, l'hème fait partie des molécules naturellement présentes dans le tractus digestif de l'être humain (Rockey, 1999). Plusieurs origines sont possibles, l'alimentation, l'hôte lui-même ou le microbiote intestinal. Chez le nouveau-né, l'apport de l'hème *via* la nourriture et le microbiote sont encore absent, c'est donc l'hôte qui est le seul fournisseur. En absence de ces facteurs, nous pouvons nous attendre à une certaine homogénéité dans la quantité d'hème. Nous avons donc testé à l'aide du test HPS la présence d'hème dans 24 échantillons de méconium (Fournis par Pr Claire Poyart – Institut Cochin – Paris).



Figure 61 : Aspect des suspensions de méconium avant test HPS. Les échantillons présentent une très grande hétérogénéité tant au niveau de leur couleur qu'au niveau de leur consistance.

Les échantillons sont repris en PBS à 200 mg/mL, chauffés et centrifugés avant d'être chargés sur plaque HPS. Contrairement à notre prévision, une grande hétérogénéité dans l'aspect des échantillons est observée. Certains méconiums sont solides, d'autres non, légèrement colorés

ou noirs (Figure 61). Après dépôt des échantillons sur le test HPS, les plaques sont photographiées et l'intensité des aires mesurées (Figure 62) (*cf.* matériels & méthodes).

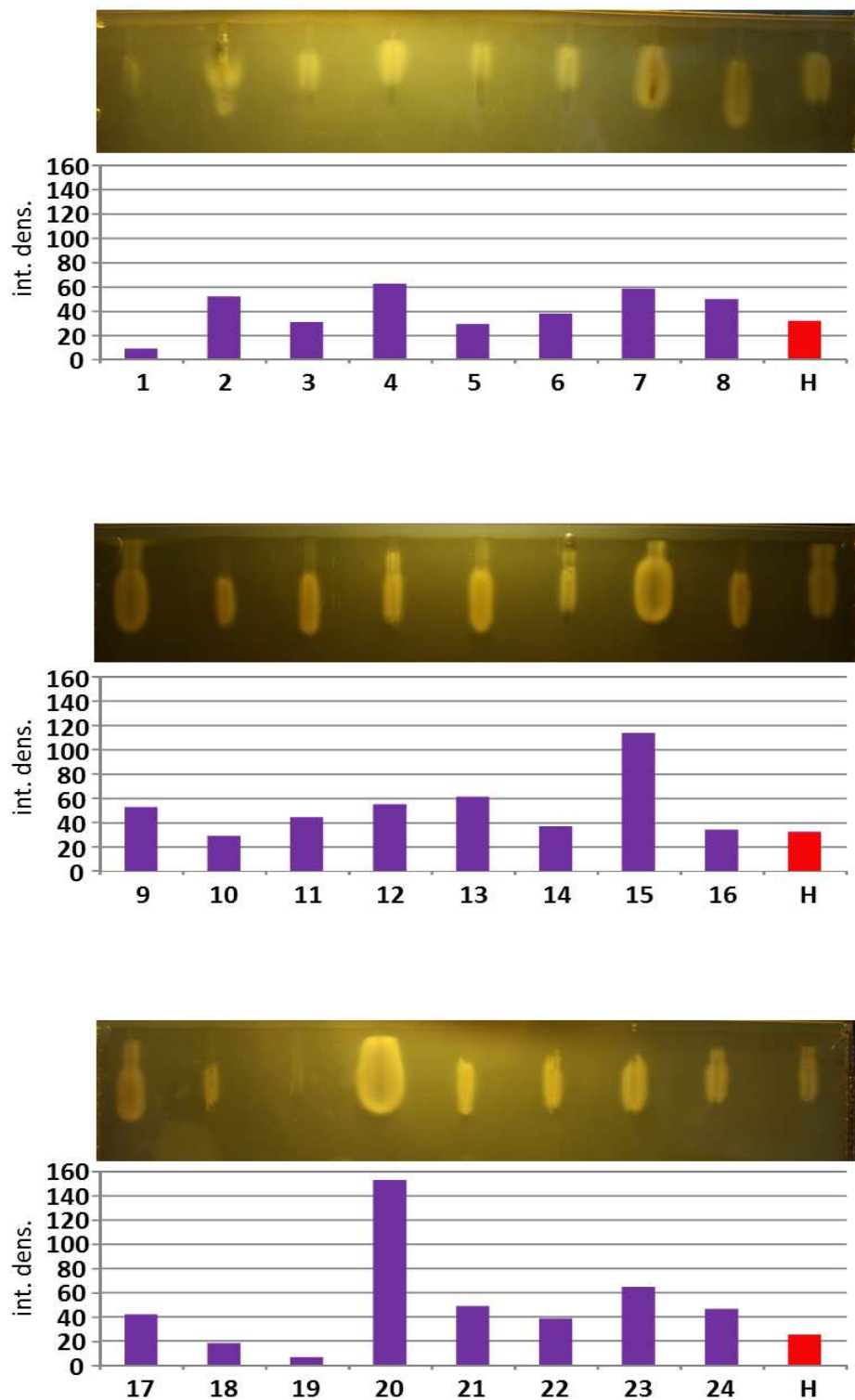


Figure 62 : Echantillons de méconium en test HPS. Les histogrammes représentent la densité intégrée des aires (int. Dens.), pour chaque échantillon, mesurées sur les photos avec ImageJ. H = hème 1 μ M.

Les résultats sont hétérogènes, sans qu'il puisse être fait de corrélation entre l'état physique ou la couleur des échantillons et la réponse du test HPS. La quantité d'hème est extrêmement variable d'un échantillon à l'autre ce qui est cohérent avec la variabilité publiée de l'implantation de *Bacteroides* dans le tractus digestif durant les premières semaines suivant la naissance (Palmer *et al.*, 2007).

2) - Peut-on corrélérer la quantité d'hème dans les fèces et la présence d'espèces bactériennes dans le tractus digestif ?

Le test HPS nous donne une indication sur la quantité d'hème présente dans le tractus digestif, mais existe-t-il une corrélation entre cette quantité d'hème et la présence de *Bacteroides* dans les fèces ? S'il y a plus d'hème dans le TD, la quantité de *Bacteroides* devrait être plus importante car les conditions de son implantation s'en trouvent favorisées. Cependant, la présence d'une plus grande quantité d'hème peut également être le marqueur d'une absence de *Bacteroides* qui, s'il avait été présent l'aurait consommé. Pour répondre à cette question nous avons extrait l'ADN total présent dans les fèces et amplifié la séquence codant l'ARN 16S.

Le séquençage de ces fragments est actuellement en cours (Marion LECLERC – INRA MICALIS).

Conclusions

Nous avons montré que la quantité d'hème dans le tractus digestif d'un nouveau-né était variable selon l'individu. Ces variations naturelles de la quantité d'hème dans l'intestin de l'homme sont peut-être un nouveau paramètre dans les cinétiques d'implantation précédemment décrites.

IV – Modulation du taux d'hème dans le tractus digestif.

L'hème est une molécule essentielle, groupement prosthétique de nombreuses enzymes, c'est aussi une molécule signal contrôlant divers processus cellulaires (Mense and Zhang, 2006). Cette molécule est également indispensable à la croissance de *Bacteroides*. Toute essentielle que soit cette molécule, elle n'en présente pas moins une toxicité sur l'épithélium intestinal associé à un déséquilibre des populations bactériennes dans le microbiote, au bénéfice des bactéries à Gram négatif (Ijssennagger *et al.*, 2012; Sesink *et al.*, 1999).

Est-il alors possible de diminuer la quantité d'hème dans le tractus digestif, et de limiter ses effets délétères ? En contrepartie, cela ne risque-t-il pas retarder l'implantation de *Bacteroides* ? Nous avons développé le concept d' « éponge à hème », système permettant soit de dégrader, soit de titrer partiellement l'hème naturellement présente dans l'intestin.

Trois systèmes ont été pressentis, les deux premiers fonctionnent sur le principe de la dégradation de l'hème par une hème-oxygénase, le troisième sur sa titration en piégeant l'hème grâce au système Has (*heme acquisition system*) de *Serratia marcescens*. Dans les deux cas, dégradation ou titration, le système utilisé doit être apporté dans le tractus digestif, via un vecteur bactérien, s'exprimer dans l'intestin et moduler la quantité d'hème environnante. Dans un premier temps nous regarderons en test en plaque s'il est possible de voir une différence entre la présence et l'absence du système. Ensuite, nous regarderons s'il est possible d'observer une différence dans la cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif en fonction de l'expression du système de modulation.

A) – Hème-oxygénase

L'hème-oxygénase est l'enzyme qui dans le processus de dégradation des hématies, va prendre en charge l'hème, libérer le fer et dégrader la structure protéique (Maurzerall, 1964) (Figure 63). Cette enzyme est également impliquée dans la gestion du pool de fer cellulaire (cf. chap I-E-1).

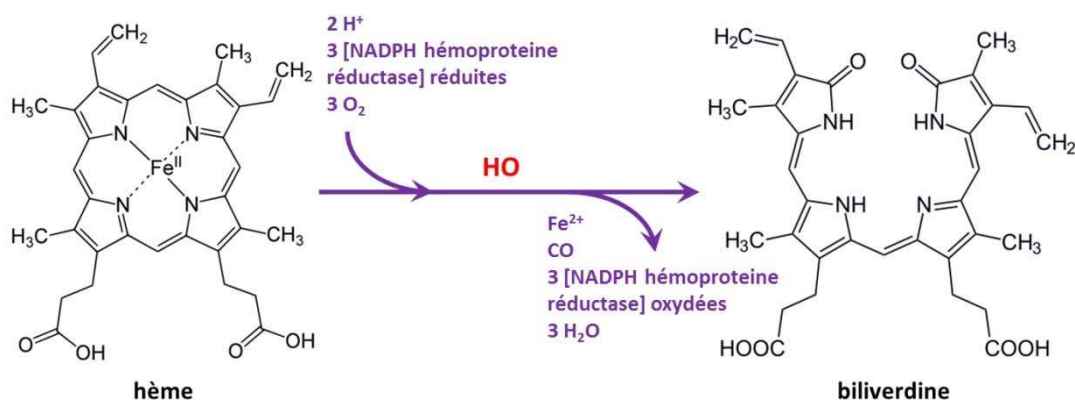


Figure 63 : dégradation de l'hème en biliverdine par l'hème-oxygénase (HO)

Le premier système « éponge à hème » pressenti utilise une souche recombinante d'*E. coli* exprimant sur un plasmide le gène de l'hème oxygénase d'une cyanobactérie, *Synechocystis sp.* (Chen *et al.*, 2012). Ce système n'a pas été retenu, le système d'expression ne permettant pas la sécrétion de l'enzyme, son activité se limitant à la dégradation de l'hème intracellulaire.

Le second système repose sur l'utilisation d'une souche de *Lactococcus lactis* portant un plasmide exprimant l'hème-oxygénase murine HO-1 (Wu *et al.*, 2015). Par rapport à l'article de référence, le plasmide utilisé est légèrement modifié par Luis BERMUDEZ-HUMARAN – INRA - MICALIS. Le promoteur d'origine permettant l'expression de HO-1, inductible à la nisine P_{nis} a été remplacé par un le promoteur P_{groESL} inductible au stress. L'avantage de ce système est qu'en modèle animal, le passage à 37°C en présence de sels biliaires dans le tractus digestif induit l'expression du gène en aval du promoteur.

Dans un premier temps, nous avons testé *in vitro* l'efficacité de l'hème-oxygénase en test HPS. A partir des constructions, nous avons déterminé à l'aide du test HPS la capacité des cultures exprimant l'hème-oxygénase à éliminer l'hème. Nous avons pu constater la diminution de la stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron*, qui indique une quantité d'hème moindre (Figure 64). Dans le puits contenant la culture de *L. lactis* portant le plasmide vide, pØ, on observe une stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* indiquant la présence d'hème résiduelle

dans le milieu. En revanche, dans le puits chargé avec la culture de *L. lactis* portant le plasmide exprimant l'hème-oxygénase, pHO-1, on observe une diminution de la taille du halo de stimulation de croissance indiquant que la quantité d'hème disponible dans le milieu a diminué. Le système s'exprime bien *in vitro* et la dégradation de l'hème a bien lieu lorsqu'on met 1 μM d'hème dans le milieu. Cependant lorsqu'on augmente la quantité d'hème dans la culture, le système, dans ces conditions, semble être aux limites de ses capacités de dégradation. Avec 10 μM au départ, il reste de l'hème en quantité importante en fin d'expérience.

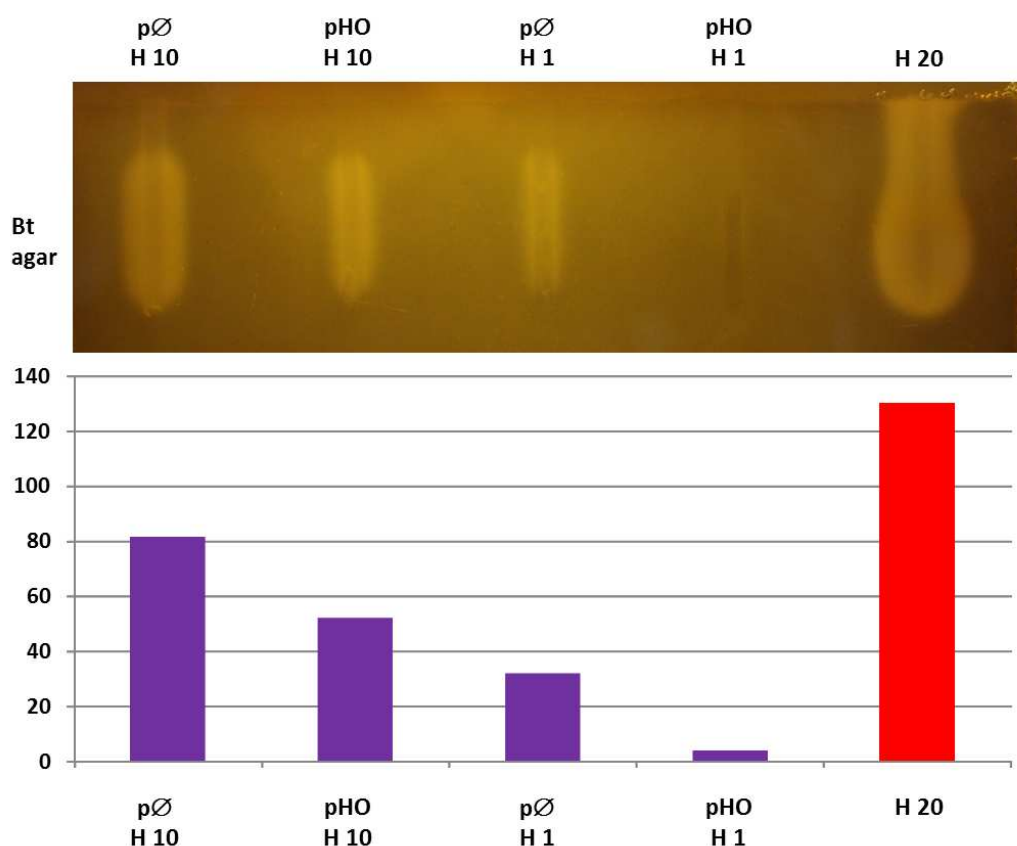


Figure 64 : Test HPS et mesure de l'intensité intégrée des aires de stimulation, sur des surnageants de culture portant ou non l'hème-oxygénase. pHO : plasmide portant l'hème oxygénase. p∅ : plasmide contrôle vide. Les cultures sont faites en présence d'hème à 1 ou 10 μM (H1 & H10) et le témoin est composé de 20 μM d'hème.

Nous avons effectué un test préliminaire en modèle animal afin de s'assurer de la faisabilité du système. Nous avons choisi de procéder à deux gavages de 2 lots de 8 souris conventionnelles à 17 heures d'intervalle avec $1,5 \times 10^9$ ufc des souches de *L. lactis* porteuses du plasmide exprimant ou non l'hème-oxygénase. Des prélèvements de fèces sont faits à T0, avant le premier gavage et 6 heures après le second à T23. Les prélèvements sont ensuite mis sur plaque pour visualiser la stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* et les aires liées à la croissance sont mesurées. Le choix des souris conventionnelles est lié d'une part à ce que ce modèle est bien maîtrisé dans

l'équipe de Luis BERMUDEZ-HUMARAN avec qui ces expériences ont été faites et d'autre part à la disponibilité des animaux. Dans des souris conventionnelles, *L. lactis* ne s'implante pas dans un tractus digestif déjà colonisé (Klijn *et al.*, 1995) mais transite en 3 à 6 heures. En revanche, on sait que cette espèce a un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) qui en fait un vecteur de choix pour le développement des vaccins oraux par exemple (Bermudez-Humaran *et al.*, 2008; de Vos, 1999). D'après la dispersion des valeurs observées (Figure 65), nous concluons que l'inoculation avec la souche de *L. lactis* exprimant une hème oxygénase n'a pas d'effet sur la quantité d'hème présente dans l'intestin.

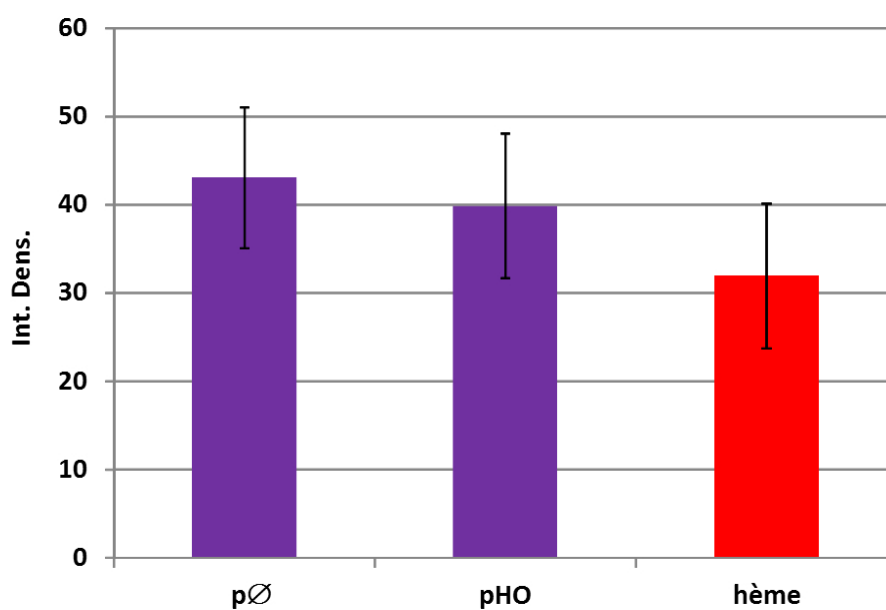


Figure 65 : Stimulation moyenne de la croissance de Bt par les fèces de 8 souris portant une souche de *L. lactis* exprimant (pHO-1) ou non (pØ) l'hème-oxygénase.

Les raisons peuvent en être les suivantes : d'une part la résilience du microbiote dans les conditions testées peut rendre difficile la visualisation de changements dans la concentration en hème. Ensuite, la non-implantation de *L. lactis* dans un intestin déjà colonisé ne permet peut-être pas un niveau d'expression de l'hème oxygénase suffisant pour détecter un effet. De plus, *L. lactis* est lui-même un consommateur d'hème et même dans un modèle axénique, une implantation avec *L. lactis* risque de créer un biais dans les observations. Enfin, les expériences précédentes ayant été faites avec *E. coli*, la comparaison des cinétiques d'implantation est compliquée par l'utilisation des espèces différentes. Au vue de ces difficultés et de l'activité parcellaire de l'hème oxygénase produite chez *L. lactis*, nous avons choisi de ne pas poursuivre cette stratégie d'élimination d'hème intestinal, et plutôt que de modifier le système d'expression créé pour *L. lactis*, nous avons décidé de tester une autre approche.

B) – Séquestration de l'hème par le système Has, Heme Acquisition System

Un autre système d'« éponge à hème » retenu utilise le principe de la capture d'hème par un hémophore. Le système Has (Heme Acquisition System), naturellement présent chez *Serratia marcescens* a déjà été transposé chez *E. coli* (Ghigo *et al.*, 1997; Letoffe *et al.*, 1994). Ce système a été décrit en introduction dans le chapitre I-D-2-2-4. Brièvement, un hémophore, HasA est exporté dans le milieu extérieur, fixe l'hème avec une très forte affinité et vient se poser sur un récepteur HasR qui libère l'hème et permet son internalisation.

Pour s'affranchir de la production d'hème par *E. coli*, le système est transféré dans la souche *hemA::Km* ne produisant pas d'hème. Quatre plasmides ont été utilisés. Le premier, pR10PAM, est un dérivé de pGB2 et porte *hasS* et *hasR*. Le second, pSYCAC1, est un dérivé de pACYC184 et porte *hasA*, *hasD* et *hasE*. Les deux autres plasmides sont les plasmides vides correspondant aux constructions précédentes. Nous avons donc 4 couples de plasmides permettant de tester différentes possibilités (Figure 66).

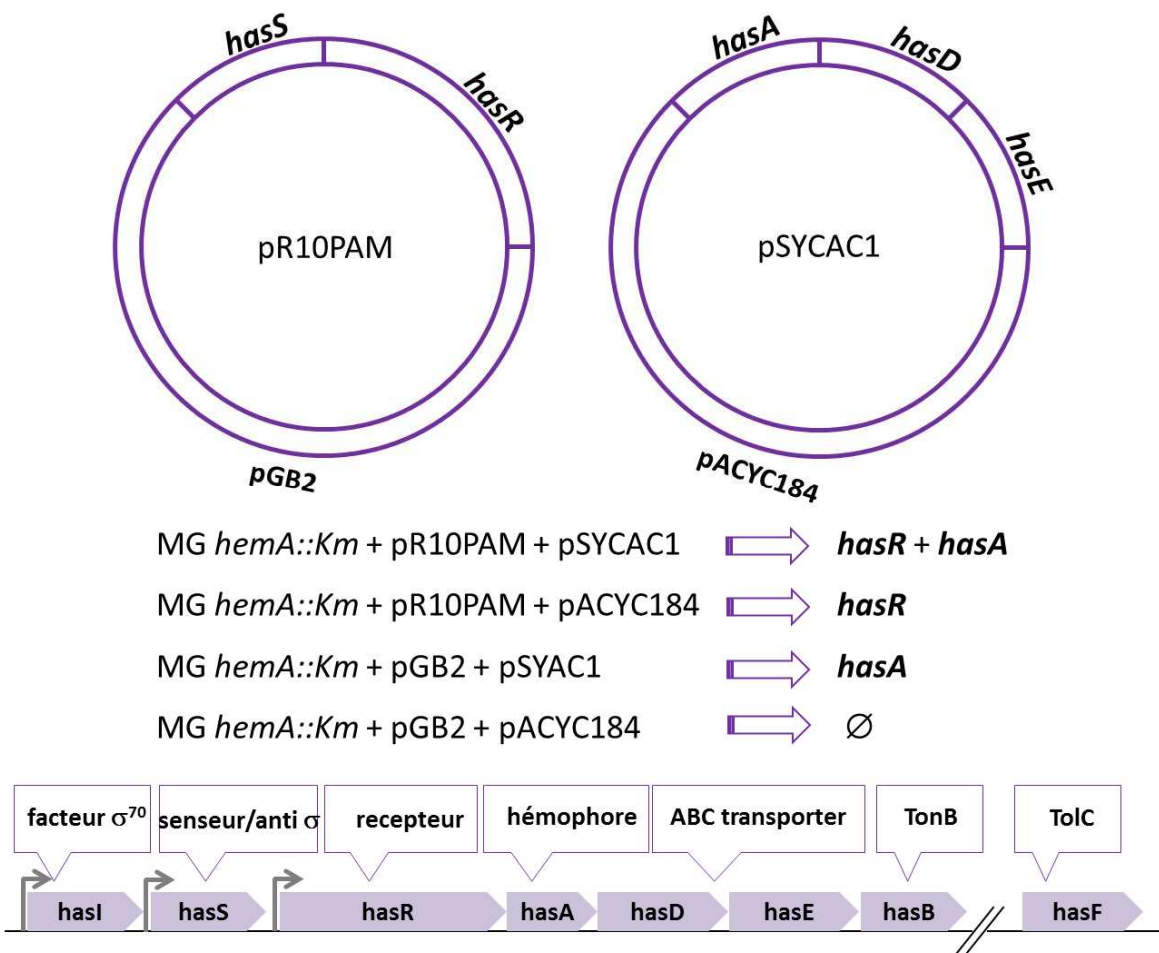


Figure 66 : Combinaisons de plasmides utilisées dans les tests du système Has. Pour mémoire organisation de l'opéron Has.

Dans un premier temps des tests *in vitro* sont conduits pour évaluer l'efficacité du piégeage de l'hème au niveau de l'hémophore HasA. Pour cela les souches d'*E. coli* MG1655 *hemA::Km* portant les différentes combinaisons de plasmides exprimant soit HasA soit HasR soit les deux soit les plasmides vides sont cultivées en présence d'hème à 10 μ M. Au bout de 20 heures de culture un échantillon est prélevé, stérilisé par chauffage et centrifugé pour récupérer le surnageant. Le surnageant est ensuite chargé sur test HPS (Figure 67). De manière très claire, les surnageants des cultures d'*E. coli* portant le plasmide exprimant HasA, soit seul, soit en co-expression avec HasR, ne stimulent plus la croissance de *B. thetaiotaomicron*, indiquant que l'hème présent dans la culture n'est plus disponible. En revanche, lorsque seul HasR est exprimé, il n'y a pas de titration de l'hème et la croissance de *B. thetaiotaomicron* est stimulée. La seule présence de l'hémophore dans le milieu de culture suffit, grâce à sa très forte affinité à titrer l'hème. La présence du récepteur permettant l'internalisation de l'hème dans la cellule ne semble pas influencer sur la quantité d'hème libre restant dans le milieu de culture. Ces résultats *in vitro* montrent la possibilité de moduler la quantité d'hème présente dans un milieu donné et la possibilité, contrairement au modèle précédent, de prendre en charge des concentrations en hème d'au moins 10 μ M.

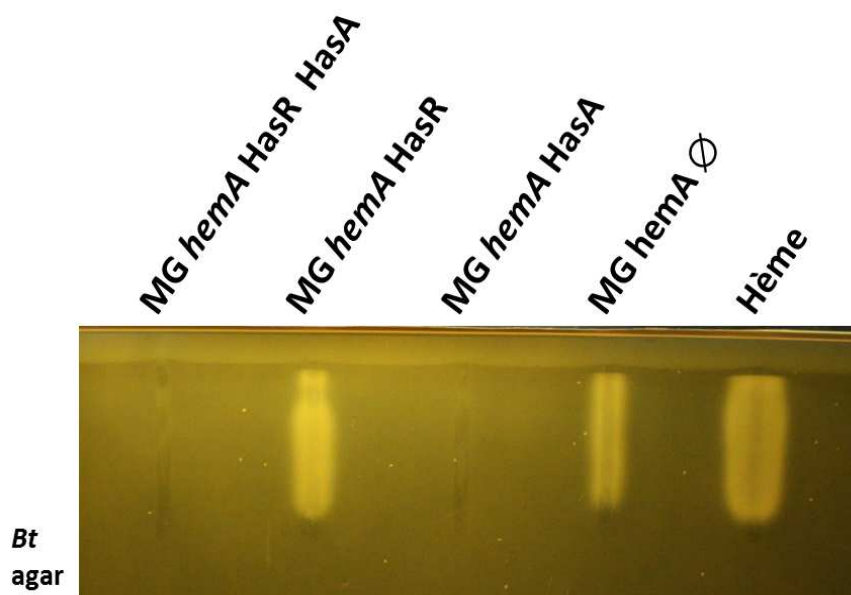


Figure 67 : Test HPS dont les puits sont chargés avec les surnageants de cultures de souches d'*E. coli hemA* portant soit *hasA* et/ou *hasR* soit un plasmide vide. Toutes les souches sont cultivées en LB supplémenté avec 10 μ M hème.

Peut-on étendre cette observation au tractus digestif ? Pour répondre à cette question nous testons le système Has dans notre modèle de souris dixéniques. Dans un premier temps, nous testons l'effet d'une souche exprimant HasA permettant de piéger l'hème *in vitro*. Trois lots de

souris sont utilisés pour observer l'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif, selon les conditions précédemment décrites (cf matériels & méthodes, chap. VI-D). Un premier lot ne reçoit que *B. thetaiotaomicron*, un second lot est pré-implanté avec *E. coli* portant le plasmide pACYC184 (pØ) et le troisième portant le plasmide pSYCAC1 portant *hasA* (pHasA). L'inoculum se fait à 10^8 ufc pour les deux souches d'*E. coli* et à 10^3 ufc pour *B. thetaiotaomicron*. Des prélèvements de fèces sont effectués toutes les 4 heures et les étalements différenciés permettent de suivre les populations d'*E. coli* et de *B. thetaiotaomicron*. Comme précédemment (cf. chap. III), les populations d'*E. coli* s'établissent aux environs de 10^9 ufc/gr de fèces et *B. thetaiotaomicron* en monoxénie, ne s'implante pas dans le tractus digestif. Dans les souris pré-colonisées par la souche d'*E. coli* exprimant HasA, l'installation de *B. thetaiotaomicron* est décalée de 4 heures par rapport aux souris qui n'ont reçu que la souche d'*E. coli* portant le plasmide vide (Figure 68).

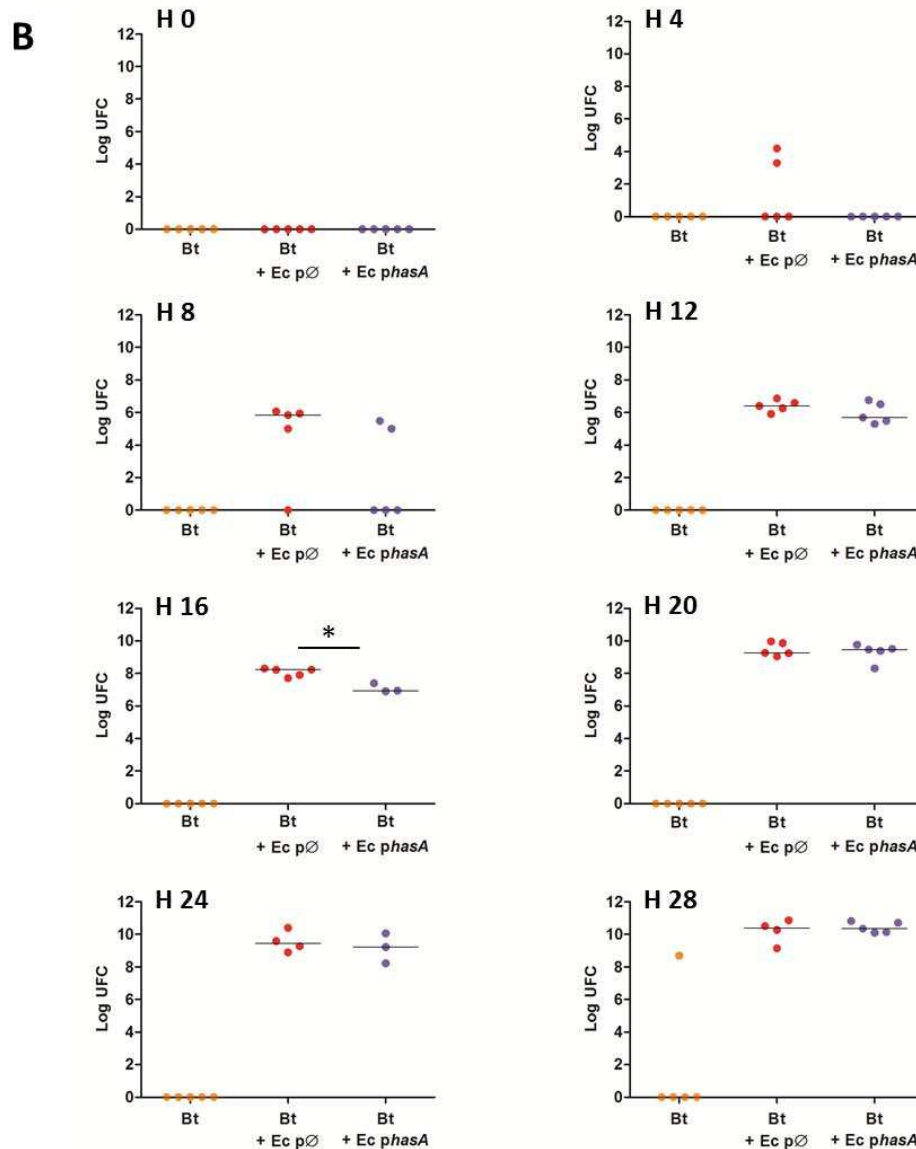
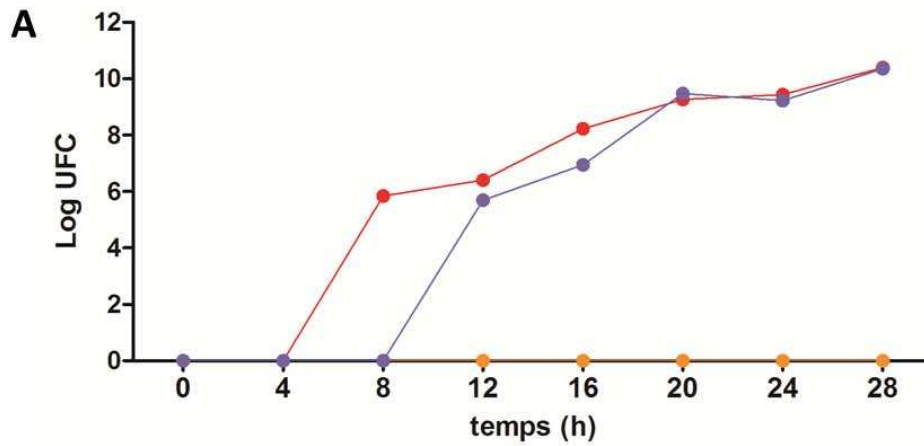


Figure 68 : Cinétique d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris. En A : suivi des médianes et en B : dispersion des valeurs. En orange, *Bt* en monoxénie ne s'implante pas. En rouge *Bt* est implanté avec la souche d'*E. coli* Δ *hemA* portant le plasmide vide, en violet avec la souche portant le plasmide *phasA*.

L'efficacité de la souche exprimant HasA à éliminer l'hème des fèces a été directement évaluée. Trois échantillons de fèces d'animaux colonisés par l'*E. coli* p \emptyset ou par pHasA sont passés en test HPS (Figure 69). Malgré une grande variabilité dans la réponse donnant un écart type important, on observe une différence globale dans la quantité d'hème restant dans les fèces après implantation d'*E. coli* exprimant HasA. Ces résultats sont cohérents avec le retard d'implantation intestinale de *B. thetaiotaomicron* observé en présence d'*E. coli* pHasA.

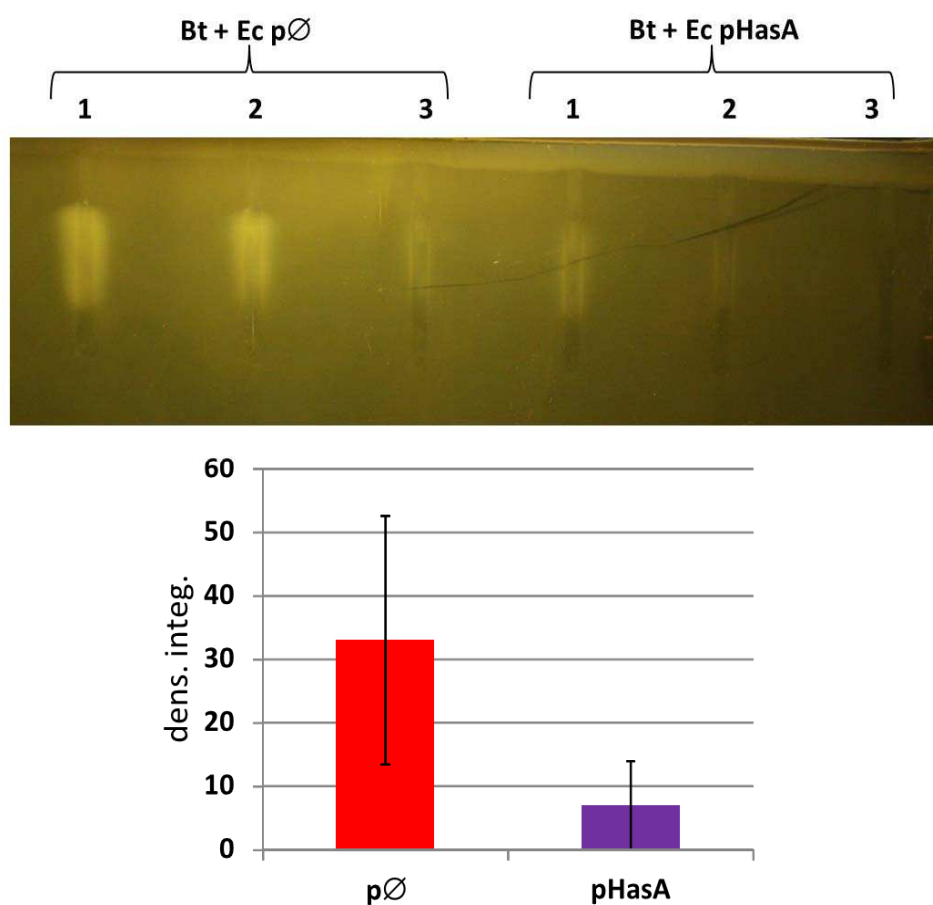


Figure 69 : Test HPS chargé avec 3 échantillons de fèces issus de souris portant (à droite) ou non (à gauche) la souche d'*E. coli* exprimant HasA. En bas la moyenne des densités intégrées des aires mesurées sur la plaque.

Ces résultats prometteurs montrent que le système Has permet de moduler, *in vitro*, la quantité d'hème présente dans un milieu de culture. Seule la présence de l'hémophore semble nécessaire pour titrer de manière efficace l'hème présent dans le milieu, même en absence d'internalisation ultérieure par la bactérie. Cet hémophore, apporté par *E. coli* jusqu'à l'intestin permet également de diminuer la quantité d'hème dans le tractus digestif et de retarder ainsi

l'implantation de *B. thetaiotaomicron*. Cette étude pourrait ouvrir des perspectives dans l'optique des traitements des maladies inflammatoires chroniques ou aiguës de l'intestin.

Conclusions

V – Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'importance de l'hème sur la croissance de *B. thetaiotaomicron* ainsi que sur son implantation dans le tractus digestif, grâce à des systèmes *in vitro* et un modèle animal.

Les Bacteroidetes et les Firmicutes sont les principales familles bactériennes du microbiote intestinal humain (Arumugam *et al.*, 2011). Dans le phylum des Bacteroidetes, le genre *Bacteroides* comprend les principales bactéries anaérobies à Gram négatif. Ce sont des bactéries majoritaires et essentielles du tractus digestif (Eggerth and Gagnon, 1933) mais également les pathogènes opportunistes ayant l'impact le plus important en pathologie infectieuse parmi les anaérobies non sporulées (Brook, 1989; Dunn and Simmons, 1984), pour revue (Wexler, 2007). Nous avons vu à quel point les bactéries du genre *Bacteroides* était adaptables aux changements de leur environnement, tant en terme de métabolisme respiratoire (Baughn and Malamy, 2003; Imlay, 2008b) et de tolérance à l'oxygène (Baughn and Malamy, 2004; Meehan *et al.*, 2012; Mishra and Imlay, 2013; Sund *et al.*, 2008) qu'en terme d'utilisation des nutriments (Martens *et al.*, 2008; Salyers *et al.*, 1977; Sonnenburg *et al.*, 2005) particulièrement *via* leur système performant de prise en charge des sucres complexes.

Une caractéristique qui semble être le point faible des *Bacteroides* est leur auxotrophie pour l'hème. En effet, les *Bacteroides* ont besoin d'hème pour leur croissance mais ne disposent pas d'une chaîne complète de biosynthèse (pour rappel, Figure 28) (Sperry *et al.*, 1977). La bactérie a développé divers systèmes de récupération de l'hème dans l'environnement mais son implantation, sa croissance et son degré de colonisation dans le tractus digestif restent dépendants de l'hème exogène. Notre objectif principal était d'identifier les sources principales d'hème permettant à *B. thetaiotaomicron* de s'implanter chez l'hôte. La première étape était de développer un test permettant de détecter simplement la présence d'hème dans un échantillon complexe de type fèces. La deuxième était de suivre des cinétiques d'implantation de *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif de souris en monoxénie, et la troisième étape et objectif final, était de pouvoir manipuler la quantité d'hème dans l'intestin des souris afin d'observer si la disponibilité en hème induisait des fluctuations de la cinétique d'implantation.

Notre conclusion principale est que l'hème provient essentiellement de l'hôte. *E. coli* synthétise et sécrète l'hème, et sa contribution dans l'apport d'hème n'est néanmoins pas exclue. Nos résultats vont à l'encontre de ce qui est généralement admis concernant la primo-colonisation par les *Enterobacteriaceae* et leur capacité à éliminer l'oxygène du tractus digestif permettant

ensuite l'installation des bactéries anaérobies plus strictes (Adlerberth, 2008). Nous avons vu que *B. thetaiotaomicron* est capable de s'implanter dans un tractus digestif stérile et non encore réduit à la condition d'arriver dans le tractus digestif en nombre suffisant. Enfin, nous avons montré dans un modèle de souris axénique qu'en diminuant la quantité d'hème dans le tractus digestif par sa titration *via* un hémophore, la vitesse d'implantation de *B. thetaiotaomicron* était ralentie. En transposant le modèle de souris axéniques à l'état généralement axénique à la naissance, nous proposons que la quantité d'hème disponible puisse influencer sur la vitesse, et peut-être sur les différences et le succès de colonisation par les bactéries dominantes du genre *Bacteroides*.

Des études complémentaires sont nécessaires pour nous permettre d'établir un lien entre la disponibilité de l'hème dans le tractus digestif humain et l'apparition des *Bacteroides*. Pour répondre à cette question, il faudrait faire une cinétique de prélèvements de fèces chez des nouveau-nés durant quelques semaines et déterminer pour chaque individu et à chaque temps, la quantité d'hème présente et le nombre des *Bacteroides* de l'échantillon. Du fait des difficultés liées aux prélèvements des échantillons et aux limites de détection des bactéries dans les fèces, leur quantité lors de la primo-colonisation pouvant être inférieures aux seuils de détection des méthodes d'analyses (Palmer *et al.*, 2007), une cinétique devra être faite sur une cohorte de nouveau-nés suffisamment large et pendant suffisamment longtemps.

Existence d'autres facteurs stimulateurs de la croissance de *B. thetaiotaomicron*.

On sait que certains composés facilitent la croissance de *Bacteroides*. La cystéine, acide aminé réducteur, est fréquemment utilisée dans des milieux spécifiques aux *Bacteroides* (Pittman and Bryant, 1964; Sperry *et al.*, 1977). On trouve également comme additifs de milieux de croissance des composés soufrés comme le thioglycolate (Quinto, 1962). La présence de cystéine augmente fortement la biomasse finale lors de croissance de *B. thetaiotaomicron* dès lors que l'on complète le milieu en hème. Mais plus généralement, nous avons montré dans le cadre de ce travail, qu'un certain nombre de produits ayant des capacités anti-oxydantes (cystéine, glutathion, DTT, vitamine C, citrate de sodium, tartrate de sodium-potassium ou sulfate de magnésium) permettent d'améliorer la croissance de la bactérie. Cette stimulation de croissance obtenue en présence d'hème semble indiquer que le passage du métabolisme fermentaire à la respiration, quel que soit l'apport énergétique bénéfique qu'il représente, n'en n'est pas moins source de stress oxydant pour la bactérie provoquant une limitation de sa croissance. La présence de ces composés permettrait alors de limiter l'effet de ce stress.

Nous avons par ailleurs mis en évidence grâce au test HPS, qu'en présence d'hème en quantité non limitante, certains échantillons de fèces entraînent une sur-stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* (Halpern and Gruss, 2015). Cette stimulation supplémentaire apparaît avec des échantillons prélevés sur des animaux ayant une flore conventionnelle, ou des volontaires humains adultes, dont le microbiote intestinal est établi, stable et fonctionnel. En revanche, pour des échantillons provenant d'animaux axéniques ou des méconiums de nouveau-nés humains où le microbiote est encore absent ou très immature, ce signal secondaire n'apparaît pas (Figure 2 de l'article). Aux vues de l'importance du microbiote dans les phénomènes de maturation du tractus digestif, il y a clairement dans les échantillons issus d'intestins maturés un ou plusieurs composés stimulant fortement la croissance de *B. thetaiotaomicron* en présence d'hème en quantité non limitante. On sait que la conventionnalisation de souris axéniques entraîne d'importantes modifications en termes de métabolites dans l'intestin. Ainsi Mitsuharu Matsumoto a montré que sur 180 métabolites dosés dans le colon de souris axéniques puis re-dosés dans ces mêmes souris conventionnalisées, 48 étaient significativement retrouvés en quantités supérieures, et 77 en quantités inférieures (Matsumoto *et al.*, 2012).

Plusieurs questions peuvent être posées :

- Lequel ou lesquels de ces métabolites agissent en synergie avec l'hème pour stimuler la croissance de *B. thetaiotaomicron* ?
- Quelles sont les espèces bactériennes qui induisent cette réponse secondaire ?
- A quel moment de la cinétique d'implantation ces métabolites apparaissent ?

Pour répondre à ces questions, différentes pistes expérimentales sont envisageables. Dans un premier temps, une expérience relativement simple, fondée sur une approche métabolomique réalisée *in vitro*, peut être mise en œuvre. Elle consiste à identifier les métabolites présents dans un milieu de culture composé de contenu intestinal de souris axénique avant ou après croissance de *B. thetaiotaomicron*. Cette méthode pourrait permettre d'identifier parmi les principaux métabolites présents dans le contenu intestinal de l'adulte ceux assimilés et/ou produits durant la croissance de *B. thetaiotaomicron*.

Un autre test consisterait à implanter soit *B. thetaiotaomicron*, soit *E. coli* en monoxénie et suivre, en test HPS, l'apparition du signal secondaire. Si ce signal apparaît, des expériences de métabolome pourraient être réalisées avant et après cette apparition. Si on n'observe pas ce second signal de stimulation, il faudrait tester ce protocole en dixénie, puis rajouter d'autres souches bactériennes ou des mélanges de souches composant le microbiote jusqu'à l'apparition du signal.

Ce système est probablement plus efficace que la conventionnalisation immédiate lors de laquelle on a vu que de nombreuses molécules variaient. Néanmoins, cette approche est difficile à mettre en œuvre techniquement et le risque de faire fluctuer un grand nombre de métabolites est important.

En dehors de ces approches sans *a priori*, certains composés pourraient être testés. Par exemple, on sait que *B. fragilis* est résistant aux sels biliaires (Wexler, 2007). Sachant que les sels biliaires stimulent l'agrégation bactérienne, l'adhésion et la formation de biofilms chez *B. fragilis* (Pumbwe *et al.*, 2007) et que la production de bile chez le nouveau-né est beaucoup moins efficace que chez l'adulte (Lindquist and Hernell, 2010), il serait intéressant de tester ce composé comme candidat potentiel contribuant à l'implantation des *Bacteroides*.

Métabolisme de l'hème chez *B. thetaiotaomicron* encore partiellement connu

Un aspect de ce travail plus ponctuel mais qui mériterait d'être approfondi, concerne la chaîne de biosynthèse de l'hème tronquée de *B. thetaiotaomicron*, et particulièrement l'étape finale, la fixation du fer sur la protoporphyrine IX. La ferrochélatase (*hemH*) qui effectue cette étape n'est pas annotée dans le génome de *B. thetaiotaomicron* et aucun homologue à d'autres ferrochélatases n'a été mis en évidence. Pourtant, chez *B. ruminicola* et *B. fragilis*, la PPIX peut remplacer l'hème pour la croissance (Caldwell *et al.*, 1965; Sperry *et al.*, 1977). Nous avons également montré que cette observation était valide chez *B. thetaiotaomicron*. Il existe donc très probablement une ferrochélatase chez *B. thetaiotaomicron*, mais elle reste à identifier. Son activité pourrait être recherchée par une mutagenèse aléatoire couplée à un test HPS adapté au criblage afin de sélectionner des mutants déficients pour la stimulation de croissance en présence de PPIX. Néanmoins, le criblage de plusieurs milliers de clones par ce test ne semble pas réaliste. En revanche, une analyse bio-informatique des domaines protéiques spécifiques permettrait de sélectionner des gènes candidats potentiels. Ainsi, il existe dans le génome de *B. thetaiotaomicron* un gène codant une PPIX magnésium chélatase (*BT_0494*) qui pourrait avoir cette fonction. La construction d'un mutant permettrait de tester cette hypothèse en analysant l'effet de la PPIX sur sa croissance. Une absence de stimulation dans le mutant et sa restauration dans la souche complémentée montrerait que cette magnésium chélatase joue le rôle de ferrochélatase chez *B. thetaiotaomicron*.

Des protéines de surface capables de lier l'hème à partir de l'hémoglobine et permettant la stimulation de la croissance de *B. fragilis* ont été décrites (Otto *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1994) mais

le mécanisme d'entrée de l'hème dans la cellule reste encore aujourd'hui mal connu. En revanche, chez *Porphyromonas gingivalis*, bactérie pathogène de la cavité buccale responsable des parodontites, membre du phylum des Bacteroidetes et auxotrophe pour l'hème, il existe un système d'import d'hème bien caractérisé, le système Hmu, dont les constituants sont codés en un opéron de 6 gènes (Lewis *et al.*, 2006; Olczak *et al.*, 2008; Smalley and Olczak, 2017). On retrouve par analyse bio-informatique dans le génome de *B. thetaiotaomicron* des homologues pour l'ensemble des gènes de l'opéron *hmuYRSTUV* de *P. gingivalis* avec une synténie conservée :

Protéines		<i>P. gingivalis</i> W83	<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	Identité
HmuY	Lipoprotéine	PG1551	BT_0497	25 %
HmuR	TonB dep récepteur	PG1552	BT_0496	41 %
HmuS	CobN	PG1553	BT_0495	35 %
	Mg chélatase		BT_0494	51 %
HmuT	Perméase putative	PG1554	BT_0493	26 %
HmuU	Perméase putative	PG1555	BT_0492	41 %
HmuV	Protéine hypothétique	PG1556	BT_0491	69 %

Néanmoins, chez *P. gingivalis*, la structure de l'hémophore HmuY a été résolue et montre que sa forme active est composée d'un tétramère piégeant l'hème entre deux « doigts » grâce à des liaisons avec les histidines H134 et H166 (Wojtowicz *et al.*, 2009). Or, si une modélisation de la structure protéique de l'homologue d'HmuY chez *B. thetaiotaomicron* présente bien les deux « doigts » les deux histidines ne se retrouvent pas à leur extrémité.

Sachant que le gène codant la magnésium chélatase putative citée précédemment se trouve dans cet opéron, il semble particulièrement intéressant de caractériser le fonctionnement de ce système Hmu-like chez *B. thetaiotaomicron* et de déterminer son implication dans la stimulation de croissance observée en présence d'hème.

Effet de la modulation de la quantité d'hème dans le tractus digestif

Enfin, nous avons montré qu'il était possible de moduler la quantité d'hème disponible dans le tractus digestif en utilisant le système Has de *Serratia marcescens* (Ghigo *et al.*, 1997). Nous

avons mis en évidence que la diminution de la disponibilité en hème retardait l'implantation de *B. thetaiotaomicron*, fournissant ainsi une preuve du rôle de l'hème dans la primo-colonisation de la bactérie. Il serait intéressant de déterminer si la diminution d'hème dans la lumière intestinale *via* l'expression de HasA pouvait moduler son effet inflammatoire dans le tractus digestif. Pour cela, l'effet de l'administration de HasA sur l'inflammation pourrait être testé chez des souris conventionnelles dans un modèle d'inflammation du tractus digestif, de gravité variable et maîtrisée, induite à l'aide de composés chimiques (DSS (Rochat *et al.*, 2007) ou DNBS, (Martin *et al.*, 2014)). Pour observer l'efficacité de la titration de l'hème, une inflammation légère du côlon pourrait être induite après traitement antibiotique suivi d'une implantation de *E. coli* portant ou non le système Has (Freter *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 2011). Dans un premier temps, la quantité d'hème présent dans le tractus digestif pourrait être comparée grâce au test HPS dans les différents groupes. Ces mesures pourraient être complétées par des études histologiques du tractus digestif.

En cas de succès, ce système de détoxification de l'hème pourrait être considéré pour des applications à des fins thérapeutiques dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, afin de limiter l'effet pro-inflammatoire de l'hème et ainsi diminuer les symptômes liés à ces maladies. De même, la quantité d'hème dans le tractus digestif étant un des éléments clés dans l'apparition de cancers colorectaux du fait de son effet cytotoxique sur l'épithélium intestinal et de l'hyper-prolifération cellulaire compensatoire pouvant aboutir à une hyperplasie (Ijssennagger *et al.*, 2015), titrer l'hème en excès dans le tractus digestif pourrait être bénéfique y compris à long terme. Nous pourrions envisager l'utilisation de la protéine HasA, légèrement modifiée afin de ne pas donner d'avantage sélectif à la bactérie d'origine, *Serratia marcescens*, sécrétée par une bactérie de statut GRAS, pouvant être administrée oralement et susceptible de transiter suffisamment lentement dans l'intestin. Ce système permettrait de diminuer la quantité d'hème libre dans le tractus digestif et ainsi de limiter son effet cytotoxique dans le cas des maladies inflammatoires chroniques ou aiguës de l'intestin.

VI – Matériels et méthodes

A – Souches et conditions de culture.

Tableau 4 : Principales souches bactériennes utilisées lors de ce travail.

Espèce	Souche	Origine	Référence
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	VPI-5482 (ATCC 29148)	Sylvie RABOT Anaxem - INRA	(Cato and Johnson, 1976)
<i>Escherichia coli</i>	MG1655	Marianne DE PAEPE Micalis - INRA	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
	MG1655 <i>hemA::Km</i>	Cécile WANDERSMAN Institut Pasteur	(Letoffe <i>et al.</i> , 2003)
	MG1655 <i>tolC::Km</i>	Philippe BOULOC I2BC – CNRS	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
	JM109 pACmod-hemA (pA+)	Claudia SCHMIDT-DANNERT Univ of Minnesota, USA	(Kwon <i>et al.</i> , 2003)
	C600 pSYCAC1 (<i>hasADE</i>)	Jean-Marc GHIGO Institut Pasteur	(Ghigo <i>et al.</i> , 1997)
	C600 pR10PAM (<i>hasRS</i>)		
<i>Lactococcus lactis</i>	MG1363	Alexandra GRUSS Micalis – INRA	(Gasson, 1983)
	MG1363 <i>hemH</i>		(Duwat <i>et al.</i> , 2001)
	MG1363 <i>cydA</i>		
	MG1363 pSICE :mHO1	Luis BERMUDEZ Micalis - INRA	(Wu <i>et al.</i> , 2015)

Les souches de *L. lactis* sont cultivées en condition statique en M17 + glucose 0,5 % à 30°C. Les souches d'*E. coli* sont cultivées sous aération en LB à 37°C. La souche *hemA*, déficiente pour la synthèse d'hème est cultivée soit en statique en LB + glucose 0,5 %, soit en aération en LB complétement avec de l'acide δ -aminolévulinique 100 μ M. Les souches de *B. thetaiotaomicron* et *B. fragilis* sont cultivées en conditions statique en M17 + glucose 0,5 % en jarre d'anaérobiose (GENbox Anaer ; BioMerieux) ou en chambre d'anaérobiose (Sheldon Manufacturing Inc., USA).

Afin de garder une reproductibilité de comportement des cultures de *B. thetaiotaomicron*, et particulièrement dans le cas de l'expérimentation animale, une première culture est préparée en M17 + glucose 0,5 % + hémine 10 μ M. Cette culture est ensuite centrifugée, lavée et concentrée dix fois en M17 + glycérol 12 %, puis aliquotée par 50 μ L et stockée à -80°C.

Pour cultiver des bactéries en milieu solide (préculture, numération des ufc), les souches d'*E. coli* sont incubées sur LB agar et mises en croissance en aérobie à 37°C, avec une complémentation en acide δ -aminolévulinique pour les mutant *hemA*. *Bacteroides* est étalé sur BBE

(*Bacteroides* Bile Esculine) agar avec amikacine (Becton-Dickinson) et incubé à 37°C en chambre d'anaérobiose.

B – Test HPS

Le test HPS permet la détection de l'hème utilisant l'auxotrophie, pour cette molécule, de *B. thetaiotaomicron*. En présence d'hème ou de protoporphyrine IX, la croissance de *B. thetaiotaomicron* est clairement stimulée et le test permet de visualiser cette stimulation.

Principe : une gélose molle (M17 + glucose 0,5 % + agar 0,6 %) contenant une suspension homogène de *Bacteroides* à environ 5.10^5 ufc/mL est coulée entre deux plaques de verre séparées

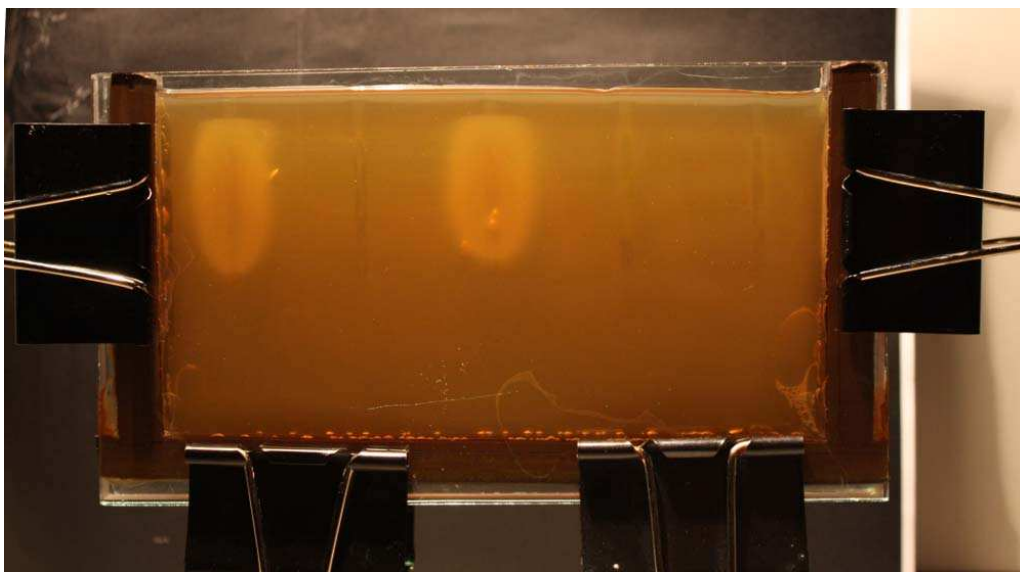


Figure 70 : Test HPS après incubation. Les plaques sont écartées par un espaceur et fixées avec des pinces. La gélose est coulée entre ces plaques et après avoir chargé les échantillons, la plaque est mise à incuber durant 16 heures à 37°C. La stimulation de la croissance de *Bacteroides* liée à la présence d'hème est visualisée autour des puits.

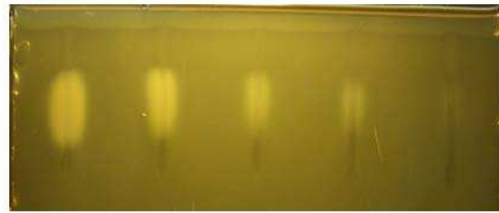
par un espaceur de 8 mm. Un peigne avec des dents de 4 cm de profondeur sur 2 mm de diamètre est placé dans la gélose permettant de former des puits lorsque la gélose prend en masse. Les échantillons à tester (50 à 100 µL), sont chargés dans les puits. Les puits sont ensuite bouchés avec de l'agar et l'appareil est mis à incuber à 37°C durant 16 heures. La stimulation de la croissance de *B. thetaiotaomicron* est visualisée autour des puits contenant de l'hème (Figure 70).

Après incubation la plaque est prise en photo avec un rétroéclairage zénithal sur fond noir.

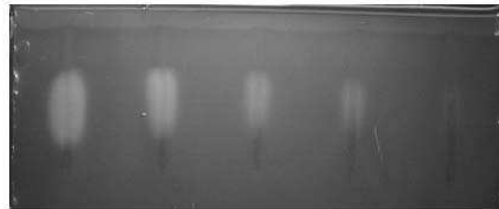
C - Traitement d'image

Les images sont traitées sous ImageJ (V1.50d, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) selon le principe résumé Figure 71. Brièvement il s'agit de mesurer l'aire et sa densité (en pixel) de la zone de stimulation de croissance. La photo est tout d'abord mise à l'échelle afin de pouvoir comparer les valeurs de différentes photos entre elles. Ensuite, le mode de prise de vue photographique apportant un biais en termes d'éclairage, la photo est plus lumineuse au milieu que sur les bords. Il faut donc avant toute analyse, modifier la photo de manière à obtenir un éclairage artificiellement homogène. La lumière dans la photo étant composée d'une somme d'ondes, l'éclairage plus intense au milieu que sur les bords peut être considéré comme une partie d'onde de grande longueur. On va utiliser une transformée de Fourier afin de représenter chaque onde de l'image en données numériques représentant sa longueur et son intensité. Une fois la numérisation faite, les données numériques représentant les longueurs d'ondes les plus grandes sont supprimées. Une transformée inverse va ensuite reconstituer l'image nettoyée des plus grandes longueurs d'ondes, dont celle de l'onde représentant l'éclairage central de la photo. Le logiciel va ensuite reconnaître les aires de stimulation de croissance, calculer leur surface et calculer l'intensité du signal pour chaque aire. Les valeurs mesurées sont ensuite traitées sous excel.

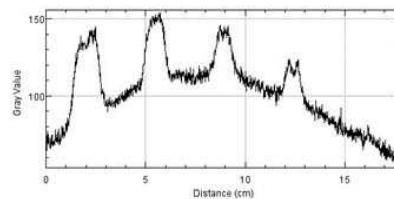
**Image d'origine (RGB)
mise à l'échelle**
(> Analyze > Set scale)



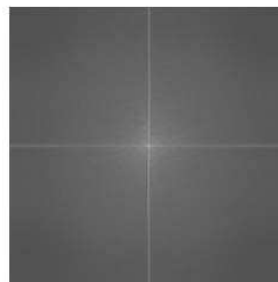
Passage en NB 32 bits
(> Image > Type > 32-bit)



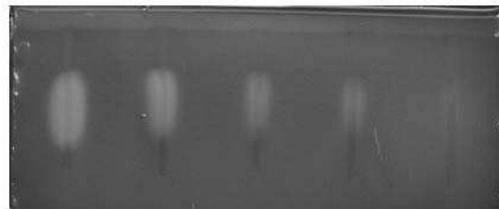
Scan des intensités
(> Analyze > Plot profile)



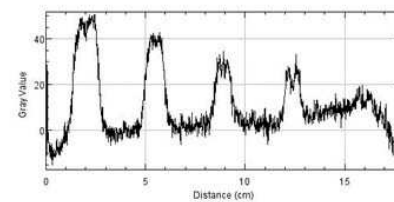
**Transformée de Fourier et
suppression des fréquences
centrales**
(> Process > FFT > FFT)



Transformée inverse
(> Process > FFT > Inverse FFT)



**Scan des intensités
(après transformée)**



**Mesure de la
densité des aires**

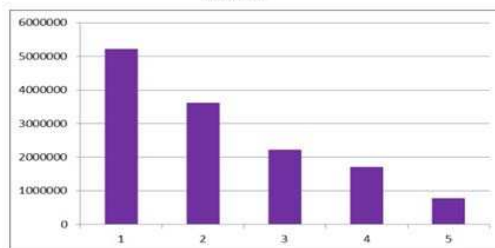


Figure 71: Traitement des images sous ImageJ. Le principal traitement consiste en l'homogénéisation de la lumière de la photo. En petits caractères : fonctions principales utilisées.

D – Expérimentation animale

Toutes les expériences impliquant des souris ont été réalisées sur la plate-forme technique ANAXEM, animalerie axénique de Micalis. Les animaux utilisés sont des souris axéniques BALB/c mâles âgés de 7 à 10 semaines issus de l'élevage ANAXEM. Les animaux, 5 à 6 par cage, sont hébergés en isolateurs pour la durée de l'expérience. Chaque configuration de souches bactériennes utilisée nécessite un isolateur particulier pour éviter les contaminations croisées d'une cage à l'autre. Les gavages des lots de souris (200 µL de suspension bactérienne en NaCl 0.9 %) sont réalisés à l'aide de sondes souples. Après gavage les fèces sont prélevés toutes les 4 heures durant 28 heures et transférés immédiatement en chambre de Freter. Des dilutions successives des échantillons sont déposées en gouttes sur milieux sélectifs, BBE Amikacin pour *B. thetaiotaomicron* et LB + acide δ-aminolévulinique pour *E. coli*. Les boîtes sont incubées en chambre de Freter pour *Bacteroides* et en aérobie pour *E. coli*. Les comptages des ufc sont visualisés sur GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA). L'analyse statistique, faite avec ce même logiciel, utilise un test de Mann Whitney pour comparer les séries 2 à 2.

Je suis titulaire du diplôme de Formation à l'Expérimentation Animale de niveau 1 – Conception et réalisation de procédures. Rongeurs et Lagomorphes. N° agrément R-94ENVA-F1-12, septembre 2015.

E – Microscopie électronique

La cohabitation entre *E. coli* et *B. thetaiotaomicron* dans le tractus digestif a été visualisée par observation en microscopie électronique en collaboration avec Thierry Meylheuc sur la plate-forme MIMA2 (Microscopie et Imagerie des Micro-organismes, Animaux et Aliments, INRA – Jouy en Josas). Les fèces de souris sont récupérées 48 heures après implantation de *B. thetaiotaomicron* et immédiatement préparées. Les échantillons sont fixés au glutaraldehyde/cacodylate de sodium et déposés sur disques de verre. Après fixation ils sont rincés et déshydratés par bains successifs d'éthanol puis la déshydratation est complétée par la méthode du point critique sous CO₂. Les échantillons sont ensuite recouverts d'un mélange or-palladium et observés sous un microscope Hitachi S4500.

F - Induction de l'hème oxygénase dans le système *L. lactis in vitro*

A partir d'une préculture de nuit diluée au 1/100, une culture de *L. lactis* portant le plasmide exprimant l'hème oxygénase murine (HO-1) est cultivée à 30°C. Lorsque la DO atteint 0,8, la culture est mise à 37°C de manière à provoquer un stress permettant l'induction du promoteur P_{groESL}. Au bout d'une heure et demie à 37°C, l'hème est ajouté à une concentration finale de 10 ou 1 µM et la culture est remise à incuber à 37°C durant deux heures supplémentaires. La culture est alors centrifugée et le surnageant est chauffé à 90°C afin d'éliminer les éventuelles bactéries restantes. Ce surnageant est ensuite chargé sur une plaque de test HPS.

VII - Annexe.



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact



HALPERN, David
17 résid Peupleraie
91160 LONGJUMEAU
FRANCE

Date	06.02.15
------	----------

Reference	Application No./Patent No. 14307038.1 - 1408
Applicant/Proprietor INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 15.12.14
PRIORITY : //
TITLE : Sensitive bacterial-growth-based protoporphyrin detection test
DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/GRUSS, Alexandra/25 rue Louis Scocard/91400 ORSAY/FR
1/HALPERN, David/17 résid Peupleraie/91160 LONGJUMEAU/FR

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:
The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).

Receiving Section



FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to a method and to a device for detecting the presence of protoporphyrin (heme and/or protoporphyrin IX, PPIX) in a sample. More particularly, the present invention relates to a highly sensitive and specific method and device for detecting heme in a complex sample, based on a bacteriological growth assay. The principles of the present invention may be used for detecting occult blood, hemoglobin, heme or in some embodiments, if present, PPIX, in various complex samples.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Heme detection in complex biological samples, in particular in feces or other intestinal samples including gastro-intestinal fluids, and in urine, is a primary tool in medicine where it is a widely used indicator of occult (hidden) blood and underlying diseases.

Indeed, occult blood in feces, often present in minute amounts undetectable to the naked eye, is an early sign of intestinal inflammation, colorectal cancer, adenomas and polyps. As colorectal cancers are ranked second among cancer-related deaths in both women and men, reliable detection methods are of particular importance. Moreover, unlike other forms of cancer, its early diagnosis and treatment favors a high cure rate of over 90% of patients; if the disease is not detected until later stages, the cure rate drops drastically to 25% or less (Marbet U, 2006, Forum Med Suisse, 6:291–8).

Colonoscopy is an effective method for detecting colorectal cancer, but this procedure is costly and is not convenient as an initial screening test; furthermore, it is invasive and acceptance by patients is poor. A recently developed method is based on a DNA screening approach; however, the method is costly, and involves collection of about 300 grams of fecal samples, which may receive limited patient cooperation. Fecal occult blood testing is therefore the screening method of choice because it allows large-scale detection of risk of colorectal cancer at an early stage.

Several tests and procedures for detecting occult blood in fecal matter have been developed. The most widely used test, which relies on a biochemical assay, is offered by Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, California) under the trademark Hemoccult® (disclosed in U.S. Patent No. 3,996,006). Hemoccult-type tests are used worldwide (cohorts in efficacy tests usually involve 10,000 or more individuals per group) and have been recommended to essentially the population over the age of 50 as an indicator of colorectal cancer, which can cause occult bleeding. Briefly, a thin smear of fecal material is applied to one side of guaiac paper by the patient and sent to a medical laboratory for analysis. A developing solution, such as hydrogen peroxide, is then applied to the opposite side of the guaiac paper. If blood is present in the fecal material, the guaiac reaction will color the paper blue. Testing a fecal specimen for occult blood is based on the principle that heme originating from blood hemoglobin will function as a catalyst and cause oxygen to be liberated from an oxygen donor, with the

liberated oxygen thus causing a color change in the chromogenic substance (guaiac). For example, the most commonly used heme detection test is Hemocult II® (Beckman Coulter Inc.), which reportedly detects around 300 µg hemoglobin per gram feces, which is equivalent to about 12 µg heme/gram feces. This appears to be the lowest possible signal giving a positive response.

Guaiac-based "Hemocult" tests are rapid, simple and disposable. However sensitivity and specificity are main limitations of these tests, which may lead to a relatively high number of false negative or positive test results. These pitfalls may be inherent to the use of biochemical tests, where activities can be affected by other feces components, including bile. Procedures were developed to overcome these problems, but current heme detection methods are time-consuming, and detection thresholds may be limited. Another problem associated with these guaiac tests is instability of the test results. Indeed, test paper must be examined within about one minute after addition of the developer to prevent inaccurate interpretation of test results due to color fading. Lastly, this test requires the patient to limit consumption of commonly consumed foods and drugs, including red meat, vitamin C, and aspirin several days prior to testing (see product instructions for Hemocult II® as published in 2009 by Beckman Coulter Inc. and available at https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/rapid-diagnostics/hemocult-sensa/index.htm#2/10//0/25/1/0/asc/2/64115//C_TECHNICALDOCS/0/0//1/).

A similar screening test, Gastrocult® (Beckman Coulter Inc.), which is used to monitor heme in gastric fluids, further requires avoidance of low pH, high drug concentrations, metal ions, or plant peroxidases as may be found in food, and could lead to false positive results (see product instructions for Gastrocult® by Beckman Coulter Inc. as published in 2011 and available at http://www.cliawaived.com/web/items/pdf/BKM-SK-66040_Gastrocult_Test_Kit_insert~1251file1.pdf).

Immunochemical tests to detect occult blood have also been reported. These more recent tests (for example OC-SENSOR®, Eiken) rely on immunological detection of human hemoglobin. Their sensitivity appears to be higher than biochemical tests (with a reported range of 10-200 µg hemoglobin per gram feces). However, while these tests are specific for human hemoglobin, a possible drawback is hemoglobin degradation, which might lead to false negatives. Finally, interference due to fecal matter in signal detection was previously reported (Väänänen and Tenhunen, *Clin Chem.*, 1988, 34:1763-6), but to our knowledge has not been considered in reports on OC-SENSOR® efficacy. Lastly, immunological tests are more expensive than the more commonly used guaiac-based tests.

Hematuria (presence of red blood cells in urine) may be a primary symptom of underlying disease, and heme detection is routinely used as a primary diagnostic (as mentioned in the article "Hematuria" from Sanjeev Gulati, Sanjay Gandhi and Deogracias Pena, published in May 2014 on the Medscape website, at the following internet address

<http://emedicine.medscape.com/article/981898->

overview?src=wg_edit_news_lsm&lc=int_mb_1001). While the currently used test referred to as Multistix® 8SG (Siemens Healthcare Diagnostic Inc. Tarrytown, NY) is sensitive, the exceedingly low amounts of heme that are clinically relevant still leave the possibility that red blood cells are present below the level of detection.

PPIX, like heme, has been the target of development as an indicator of underlying diseases, including cancers, but the cost of detection is high (Silva et al., 2013, J Fluorescence 23(1):131-5).

We considered the need for a reliable, easy to use method of detecting heme, even in complex samples, that would combine a high sensitivity with a high specificity. Preferentially the method should allow either automated or human reading, depending on implementation conditions.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a technical solution to the above-mentioned problems and relates to a method for detecting the presence of protoporphyrin, in a sample.

In the present application, the following definitions will be used:

By "heme", it is intended the association of a Fe^{2+} ferrous ion in the center of the protoporphyrin IX ring (Fe-PPIX). Heme is formed by enzymatic insertion of the Fe^{2+} ion in the PPIX ring. Hematin, in which Fe^{3+} ions are present, rather than Fe^{2+} ions, is also referred to here as heme for simplicity.

By "protoporphyrin IX" (PPIX), it is thus intended the immediate biological precursor of heme, consisting of the porphyrin ring without the iron ion.

In this invention, heme and/or PPIX, which differ by an iron ion, are collectively referred to as protoporphyrins.

The method for detecting the presence of protoporphyrin (heme and/or PPIX) according to the invention is based on the fact that heme-requiring bacteria (referred to as heme auxotroph bacteria or HAB) are unable to grow unless heme is present in the growth medium. Importantly, heme (or PPIX for some HAB subtypes) is the growth-limiting factor. Other growth-stimulating factors of HAB will have no visible effect unless heme, or in some case heme or PPIX is present. As such, the extent of bacterial growth in the present detection system depends upon the amount of heme and/or PPIX present in the sample.

The said method comprises the following steps:

a) cultivating HAB in a protoporphyrin-lacking culture medium, in the presence of a sample to be analyzed, for a determined time period,

b) estimating the extent of HAB growth issued after step a), referred to here as the sample signal, and

c) identifying the presence of protoporphyrin in said sample, typically by comparing the sample signal obtained at step b) with at least one reference signal.

To the authors' knowledge this method is, for the first time, based on bacterial growth, rather than on a biochemical or immunochemical assay. Indeed the authors have identified, as demonstrated in the examples detailed in the present application, that bacteria that need exogenous heme and/or PPIX for growth can be used in a method to detect said molecules in a sample, with high specificity and excellent sensitivity.

In all embodiments of the invention, the amount of protoporphyrin in a sample is correlated to the extent of HAB growth ("sample signal").

In one embodiment, the protoporphyrin to be detected in the sample is heme. Consequently, heme-specific HAB are used and cultured at step a) in a heme-lacking medium. In this embodiment, growth of the heme-specific HAB is stimulated by heme but not by PPIX. Heme-specific HAB are preferentially chosen among native or recombinant strains that are deficient in enzymes that catalyze iron insertion into protoporphyrin IX.

In some embodiments, at step c) of the method, at least one negative reference signal and/or at least one positive reference signal are used.

The invention can also comprise a further step of semi-quantitative estimation of the amount of heme in the sample, by comparing the sample signal obtained at step b) with at least one benchmark reference signal. Said at least one benchmark reference signal is obtained by cultivating HAB in the protoporphyrin-lacking culture medium, for a determined time period, in the presence of a predetermined protoporphyrin concentration.

According to the invention, HAB can be chosen among the following genera or their recombinant HAB derivatives: *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, or heme auxotrophic mutants of heme prototrophs *Escherichia* and *Bacillus*.

The present invention also provides a method for detecting the presence of blood in a sample, said method comprising:

- steps of the method as specified here-above, and
- a further step of identifying the presence of blood in said sample, in regard to step c) of identifying protoporphyrin in the sample.

In some embodiments of the invention the sample is typically a complex sample, such as preferentially a food product (for example milk), fecal material, a gastro-intestinal fluid, or urine.

Typically, the sample is heat-inactivated prior to step a) of the detection method of the invention.

The present invention also relates to a device for detecting the presence of protoporphyrin in a sample, and suitable for implementing the method as previously mentioned.

In one embodiment, the device according to the invention contains HAB suspended in a protoporphyrin-lacking culture medium and at least one well intended to receive a sample,

wherein said HAB can access to said sample. Typically, the protoporphyrin-lacking culture medium is in the form of a gel.

In some embodiments, the device can further contain at least one other well, which is intended to receive a reference sample such as a benchmark reference sample.

5 The present invention also describes a kit comprising:

- a device according to the invention,
- at least one benchmark reference sample having a predetermined protoporphyrin concentration, and
- a strain of HAB to be mixed with the protoporphyrin-lacking medium.

10 The present invention also relates to the use of a device or a kit according to the invention for preliminary screening for potential inflammation or disease.

The present invention also relates to the use of a device or a kit as previously described for detection of mastitis in farm animals, especially those used for milk production.

15 In some other embodiments, the invention also relates to the use of a device or a kit as previously described for detecting the presence of meat-derived ingredients in food products.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 –Schematic depiction of heme or heme/PPIX detection devices.

1A: Prototype **Gel** device setup for protoporphyrin detection by HAB growth stimulation (1- Indicator HAB embedded in gel. The gel, which contains nutrients for bacterial growth, but without protoporphyrin, is mixed with a HAB strain according to the invention (such as the *Bacteroides* strain *B. thetaiotaomicron*: referred to as Bt), 2- wells to deposit samples, 3- sample, 4- “halo” corresponding to stimulated HAB growth.

1B: Prototype **Plate** device setup for protoporphyrin detection by HAB growth stimulation. Left: 25 1- Petri plate containing appropriate HAB solid medium but without protoporphyrin. 2- A HAB overlay, containing a HAB strain according to the invention (such as *Bacteroides* strains *B. thetaiotaomicron*, or *Lactococcus lactis*) and growth medium devoid of protoporphyrin, is poured over “1” and then allowed to solidify 3- heme-positive control sample, 4- Feces sample deposited upon the overlay, 5- “halo” developing during growth corresponding to stimulated 30 HAB growth, 6- no stimulation is obtained if the sample is devoid of protoporphyrin. Right: 1 bis: Petri plate containing a negative control reference strain whose growth is not stimulated by heme. 2bis Overlay as in “2” except that the HAB strain does not respond to heme.

Figure 2: Threshold of Bt responses to (A) purified heme (upper panel), hemoglobin (middle 35 panel), or blood (lower panel), (B) heme breakdown products, or (C) heme within a complex feces sample. – 2A The amount of purified heme needed to stimulate Bt growth was determined by loading 2-fold dilutions of pure heme ranging from 256 to 0.5 nanograms (ng) per well (from left to right: 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; and 0.5).; pure hemoglobin ranging from 500 to 1

microgram (μg) per well (from left to right: 500; 250; 125; 62; 31; 16; 8; 4; 2; 1), or blood, ranging from 6000 to 12 nanoliters (nl) per well (from left to right: 6000; 3000; 1500; 750; 375; 188; 94; 47; 23; and 12). The lowest amount of heme to clearly stimulate Bt growth was around 1 ng. The lowest amount of hemoglobin to clearly stimulate Bt growth was around 2 μg . The lowest amount of blood to clearly stimulate Bt growth was around 12 nl. 2B- Heme (560 ng) (1), PPIX (600 ng) (2), bilirubin (3-4) (290 to 2900 ng/sample), and biliverdin (5-6) (290 to 2900 ng/sample) were deposited in the test wells. Heme and PPIX, but not the heme breakdown products, were detected. - 2C: Feces from mice and humans stimulate Bt growth. The stimulatory effects are observed with feces from germfree animals and newborns, and also with feces from conventionally colonized mice and adult humans. The gel contained Bt in M17-0.5 % glucose (M17-glu) medium. The deposited sample (about 5 mg sample of feces per well) are as follows from left to right (wells 2-5): feces from healthy germfree and conventional mice (GF and CONV respectively), and from human meconium and adult (M and AD respectively). 120 ng of heme was loaded in well 1 and used as reference sample.

15
Figure 3. Detection threshold of heme in urine samples using the "HemeScreen" test of the invention and the commercially available Multistix® 8SG test. The urine sample was spiked with specified amounts of heme (from 0 to 256 ng) as indicated in the figure.

3 UPPER: "HemeScreen" test of the invention, the amount of heme present in urine needed to stimulate growth of Bt was done as described in Figure 2A. The lowest heme concentration detected as stimulating Bt growth was about 1 ng.

3 LOWER: Multistix® 8SG test: urine containing heme at the same concentrations as above tested with the Multistix® 8SG dipstick routinely used to test hematuria and processed as recommended by manufacturer. The lowest heme concentration detected by Multistix® 8SG was 8 ng. "HemeScreen" therefore shows about 8-fold greater sensitivity compared to Multistix® 8SG.

Figure 4. Using FECES as the complex sample. The samples were tested for heme using the "HemeScreen" test according to the invention and the Hemocult II® test.

30 4 UPPER: "HemeScreen" test: Dilutions of heme were prepared in feces, such that each heme concentration (from 0 to 1024 ng) was prepared in 5 mg feces that were suspended in 50 microliters (μl) of 0.9 % NaCl. Heme was detected in all samples, including the sample to which heme was added, indicating that the feces sample already contains low levels of heme. A progressive increase in heme levels is detected when 128 ng or more heme are added to samples. This would indicate that amounts present in the healthy individual are less than 128 ng heme per 5 mg feces sample, which would allow detection of an incremental increase.

4 LOWER: Hemocult II® test: The same samples were deposited on the Hemocult II® test and processed as recommended by manufacturer. The lowest heme-containing feces

suspension to be detected by Hemocult II® was in the range of 512-1024 ng heme. Unlike the “HemeScreen” test of the invention, Hemocult II® does not detect heme starting in the range present in normal individuals. Moreover, feces quenches the positive signal when Hemocult II® is used (compare Figure 2 and 3B, threshold LOWER panels), whereas quenching does not occur using “HemeScreen” (compare Figure 2 and 4, threshold UPPER panels).

Note that while heme detected by Hemocult II® is at around 1000 ng/ per sample, lower amounts of heme constitute a potential risk (see <http://www.bestcarelab.com/testsmenu/78.htm>, and Wong et al., 2012, Int. J. Colorectal Dis. 27:1657–64). The “HemeScreen” test thus detects heme at the lower risk level.

Figure 5: Heme detection using the plate set-up described in Figure 1B. Heme detection in complex samples with the “HemeScreen” plate set-up of the invention. The test uses *L. lactis* WT as indicator (upper panel), and *L. lactis cydA*-minus as negative control indicator (lower panel). Plates were prepared using M17-glu 0.5 %. They were overlaid with 10 ml soft agar (0.75 % agar and M17-glu 0.5 %) containing $\sim 10^7$ CFU/ml of *L. lactis*, and allowed to solidify. Reference heme sample (120 ng) (1) and test samples were then deposited on top of the plates, and plates were then incubated aerobically overnight at 30°C. Plates were then photographed. Shown here are the areas containing heme-positive reference samples (1), mouse feces (germfree (2); conventional: (3) and human feces, newborn: (4), adult: (5)).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides a bacteriological-based technology, in particular a method (or a test) and a device, for detecting the presence of protoporphyrin in a sample.

The properties of heme iron as a transition metal that cycles between redox states make it the central factor in various biological processes. Heme is most commonly recognized as a component of hemoglobin, the red pigment in blood, but is also found in a number of other biologically important hemoproteins, such as myoglobin, cytochrome, catalase, and endothelial nitric oxide synthase. In the hemoglobin protein, heme is responsible for its oxygen-carrying properties and therefore constitutes the bioactive component of blood. In mammals, hemoglobin makes up about 96% (by weight) of the dry content of red blood cells.

The present invention is intended for detecting the presence of protoporphyrin (*i.e.*, heme and PPIX). Heme can be in its isolated form (free heme) or in complexed form, for example bound to a protein, such as in hemoglobin and other hemoproteins as mentioned above. Therefore hemoglobin can also be detected according to the method of the invention.

In a particular embodiment, the present invention is therefore intended to detect specifically the presence of heme, which can also be isolated (free heme), or in complexed form.

By “detecting the presence of protoporphyrin”, it is intended notably a qualitative test for protoporphyrin detection in a sample, *i.e.* to determine the presence or the absence of protoporphyrin in said sample.

Similarly, by “detecting the presence of heme”, it is also intended a semi-quantitative means of heme detection in a sample, *i.e.*, the detection of the amount of protoporphyrin in a sample. Indeed, the performances of the method, or of the device according to the invention, also allow embodiments for achieving semi-quantitative heme measurement in a sample.

Detection of protoporphyrin, and notably detection of heme, can be advantageously directly correlated to detection of blood, such that the method and the device of the invention can be used for detecting blood in a sample.

As mentioned above, the invention is based on the use of HAB, cultured in a protoporphyrin-lacking medium.

The sample to be analyzed is deposited into such HAB cultured in such protoporphyrin-lacking medium.

If the said sample contains protoporphyrin, HAB growth is stimulated. The authors have found that the extent of bacterial growth can directly, and in a sensitive way, be correlated to the presence of protoporphyrin in the sample. Indeed, the authors determined that the invention allows detection of 100 ng of heme per gram of sample. This invention is therefore about 60 times more sensitive than classical biochemical Hemocult® tests for testing feces samples.

The present invention is highly specific for the detection of heme and PPIX. In particular, heme breakdown products, such as bilirubin or biliverdin that are commonly present in feces are not detected by the method of the invention, therefore avoiding false positive results. Furthermore, contrary to immunochemical tests, the method of the invention is insensitive to hemoglobin degradation, thereby decreasing false negative results.

It is noted that several samples can be tested in parallel. As such, gels containing HAB in a protoporphyrin-lacking culture medium can be prepared in parallel to detect the presence of protoporphyrin in independent samples (such as feces samples), together with standardized heme controls (reference samples).

Heme auxotroph bacteria (HAB):

HAB are bacteria that lack some or all of the enzymes necessary to synthesize their own heme.

Among them, three categories of HAB are distinguished, having:

- (i) a quasi-absolute heme requirement and therefore depending on exogenous heme (or PPIX) acquisition, *i.e.* requiring heme (or PPIX) for bacterial growth,
- (ii) an optional heme requirement, *i.e.* restricted bacterial growth in the absence of exogenous heme (or PPIX), and
- (iii) no heme requirement.

According to the invention, HAB implemented in the method of the invention are chosen among categories (i) and (ii) here-above, *i.e.* (i) a quasi-absolute heme requirement or (ii) an optional heme requirement. According to the invention, by “heme requirement”, it is intended heme requirement to obtain growth or at least significant bacterial growth, as already known by the literature (see notably Varel VH & Bryant MP, 1974, *Appl Microbiol.*, 28:251-7).

Some HAB encode enzymes that catalyze iron insertion into PPIX to form heme. In such HAB, exogenous PPIX may, like heme, stimulate HAB growth (see for example Sperry JF et al., 1977, *Appl Environ Microbiol.*, 34:386-90). Therefore, such HAB strains can be used in the method of the invention to detect, without differentiation, the presence of heme or PPIX in a sample. It is noted that PPIX detection can be of particular interest for the detection of particular diseases, such as blood loss in the upper gastrointestinal (GI) tract, as well as various porphyria.

Alternatively, using a HAB strain that has no ability to catalyze iron insertion into PPIX to form heme, renders the test totally heme-specific. Therefore, in a particular embodiment of the present invention, heme-specific HAB strains lacking (either naturally or through genetic manipulation) the ability to catalyze iron insertion into PPIX, can be used for the specific detection of heme in a sample. More preferentially such HAB strains lack the enzymatic activity needed for PPIX utilization by HAB. Typically such enzymatic activity converts protoporphyrin IX into heme by catalyzing the reaction: [protoporphyrin + (Fe²⁺) ↔ protoheme + 2 H⁺]. Recent studies in *Escherichia coli* (*E. coli*) (Letoffe S et al., 2009, *PNAS*, 106:11719-24) revealed a novel enzyme that is needed to remove iron from heme, for which a homolog having potential reversible activity is also present in *Bacteroides*. Therefore inactivation of this putative enzyme, if present in the selected HAB, could be performed to restrict detection of protoporphyrin to heme.

HAB (including heme-specific HAB) are found in different ecosystems, and comprise Gram-positive or Gram-negative bacteria. HAB (including heme-specific HAB) may be aerobic, anaerobic or anaerobic aero-tolerant organisms (see Gruss A. et al., 2012, *Adv Microb Physiol.*, 61:69-124).

By “genetic manipulation”, it is intended notably genetic manipulation of heme producing bacteria (*e.g.*: *Escherichia coli* or *Bacillus subtilis*), to generate recombinant bacteria having a quasi-absolute heme requirement or an optional heme requirement, or of HAB (*e.g.* *Bacteroides fragilis* or *B. thetaiotaomicron*) to generate derivatives having deficiency in the ability to catalyze iron insertion into PPIX (for example ferrochelatase deficiency) and that are stimulated only by heme, and not by PPIX. Such genetic manipulations, to obtain heme-requiring or fully heme-specific isolates, are well known in the art. Heme auxotrophy and heme specificity, according to the invention, can therefore be native or due to genetic manipulation.

In some embodiments of the method, HAB (including heme-specific HAB) are luminescent or express a fluorescent protein. Preferentially, said HAB have been genetically

modified to express a fluorescent protein. Such HAB could be used to facilitate signal detection directly by eye visualization, or by using typically a fluorimeter.

According to the invention, appropriate HAB (including heme-specific HAB) can be selected among HAB (including heme-specific HAB, native or resulting from genetic manipulation) of the following genera: *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, or their recombinant derivatives. More preferentially HAB are chosen from the group of HAB from a genus selected from *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, or their recombinant derivatives, or recombinant *Bacillus* or *Escherichia coli*.

For example, HAB (including heme-specific HAB, native or resulting from genetic manipulation) can be selected from among the following genera or species: *Streptococcus*, for example *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus suis*, and *Streptococcus uberis*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus faecalis*; *Lactobacillus*, for example, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus gasseri*; *Bacteroides*, for example *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Preferentially, HAB (including heme-specific HAB, native or resulting from genetic manipulation) can be selected from the group consisting of *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Haemophilus influenzae*, *Lactococcus lactis*, recombinant *Bacillus subtilis* or recombinant *Escherichia coli*. In particular, it can be selected from the group consisting of native or recombinant *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, or *Lactococcus lactis*.

In a preferred embodiment of the method, anaerobic HAB (including heme-specific HAB) are chosen from the genus *Bacteroides*; in particular *Bacteroides fragilis* and/or *Bacteroides thetaiotaomicron* are used according to the invention. These bacteria are particularly interesting, because they grow rapidly and because low concentrations of heme are sufficient to stimulate their growth.

Method of the invention

The method according to the invention, for detecting the presence of protoporphyrin in a sample comprises steps of:

- a) cultivating heme auxotroph bacteria (HAB) in a protoporphyrin-lacking culture medium, in the presence of said sample for a determined lapse of time,
 - b) estimating the extent of HAB growth issued at step a), to obtain a sample signal, and
 - c) comparing said sample signal obtained at step b), with at least one reference signal,
- to identify the presence, and in some cases, the amount of protoporphyrin in said sample.

Step a) of the method

By “cultivating”, it is intended conditions and culture parameters suitable for HAB growth, in case protoporphyrin is supplied *via* the sample to culture medium. The sample is deposited within a defined and limited space, which may be a well, or a spot deposited on solid medium.

5 Typically HAB are re-suspended in a protoporphyrin-lacking culture medium, before being cultivated according to step a).

“By protoporphyrin-lacking medium” it is intended that the medium does not contain protoporphyrin (heme and/or PPIX), which is to be detected in the sample. When “heme-specific” HAB as described above are used, the culture medium should be devoid of heme.

10 Alternatively, when HAB encode enzymes that catalyze iron insertion into PPIX to form heme, the culture medium should be devoid of both heme and PPIX.

The incubation period for the HAB culture should be theoretically sufficient for detecting stimulation of bacterial growth, if any.

Said incubation period depends on several parameters such as HAB type, HAB concentration, culture medium and culture temperature, which can be determined by one skilled in the art.

Typically, HAB are cultivated in the presence of the sample for at least 5 hours, and up to 24 hours. In some embodiments, HAB are cultivated in the presence of the sample between 8 and 16 hours.

20 The signal remains stable even after prolonged storage at room temperature, and thus samples can be read over a long time period.

HAB are cultivated in the presence of said sample, *i.e.*, the sample is deposited in or on the culture medium and HAB can access said sample, so as to use the protoporphyrin to allow or stimulate their growth.

25

Step b) of the method

By “bacterial growth”, it is intended in the present application the division of a given bacterial cell into two daughter cells. Accordingly bacterial growth therefore induces an increase of the bacterial biomass.

30 The “extent” of said bacterial growth corresponds advantageously to the increase in said bacterial biomass.

The extent of bacterial growth is estimated, and notably “visualized” or “measured”, to obtain the said “signal”.

In particular, by “sample signal”, it is intended the extent of HAB growth, which is stimulated in the presence of the sample, and which is estimated (visualized and/or measured) at step b).

35 By “visualized” or “measured” extent of growth, it is intended advantageously as a direct or indirect eye visualization, and/or direct or indirect machine detection.

The said extent of HAB growth can be visualized (in particular for qualitative detection) and/or measured (in particular for semi-quantitative detection) according to classical methods of the art. For example, cell density in liquid medium is determined by a simple inexpensive spectrophotometer. In solid medium as used in the examples, HAB growth is seen as a halo around the wells within which the samples containing protoporphyrin are deposited. Gels can be scanned and signal density and diameters would correspond to the area of stimulated growth. In an alternative embodiment, cells can be genetically modified to express a fluorescent marker and the extent of HAB growth would be reflected by the intensity and area of the fluorescent signal. The use of such genetically modified HAB facilitates signal detection directly by visual inspection or using typically a fluorimeter, or even a simple UV box with a camera.

The nature of the signal thus depends on the methods used to estimate growth stimulation. Accordingly, any method commonly used for bacteriological growth readings and usable with the here-reported device can be employed.

Most easily among the methods referred to above, the extent of bacterial growth can be visualized by the formation of a halo (namely a change in the contrast/density of the medium) surrounding the heme-containing sample (*i.e.*: around the position where the sample was deposited). Therefore, the extent of bacterial growth can be estimated (or measured) by the contrast value and/or the size or surface of said halo surrounding the heme-containing sample.

Hence the signal can consist in:

- optical density of the halo, or
- measurement of the surface area of the halo.

The intensity or level of said extent of bacterial growth (*e.g.*: optical density of the halo or surface area of the halo) can be advantageously detected by a machine, such as an adapted optical reader, a spectrophotometer, or a fluorimeter, as used to evaluate bacterial growth.

Step c) of the method

In some embodiments, identification of the presence of protoporphyrin in a sample is achieved by the detection of a sample signal as mentioned as step b).

Preferentially however, qualitative or semi-quantitative detection of protoporphyrin in a sample is achieved by comparison of the sample signal obtained at step b) with at least one reference signal obtained from at least one reference sample. The said at least one reference signal can be predetermined, or determined in parallel to the sample signal.

A reference signal is obtained when HAB have access to a reference sample that is deposited in, or on, the culture medium, such that the growth of said HAB would be stimulated if the said reference sample contains protoporphyrin.

Reference signal(s) can be negative and/or positive reference signal(s). A negative reference sample gives a negative reference signal. A positive reference sample gives a positive reference signal.

By “standardized implementing conditions” it is herein intended the same type of HAB, and potentially the same cultivating time (namely the same “determined lapse of time” as used in step a) of the method) and/or the same protoporphyrin-lacking culture medium. The said references signals are therefore generally determined or predetermined, or theoretically
5 determined, in the same standardized implementing conditions than the sample signal.

By “qualitative protoporphyrin detection”, it is intended the determination of the presence, or the absence, of protoporphyrin, in the sample that is tested.

Typically, one negative reference sample and/or one or more positive reference sample(s) can be used, and the signals they generate are compared with the sample signal
10 generated by the sample that is analyzed.

By “negative reference signal”, it is intended the extent of growth obtained by culturing HAB in the protoporphyrin-lacking medium, but in the absence of the test sample (typically using a negative reference sample devoid of protoporphyrin). In practice, the negative reference signal is generally the signal that is generated by the overall background, as schematized in
15 Figure 1A. It is noted that if a HAB uses heme but not PPIX, heme-specific detection is achieved, and the negative reference sample should be devoid of heme. On the contrary, if the HAB strain uses both heme and PPIX, the negative reference sample should be devoid of both heme and PPIX.

By “positive reference signal”, it is intended the extent of HAB growth obtained by
20 culturing HAB in the protoporphyrin-lacking culture medium, for a determined lapse of time, in the presence of a positive reference sample containing protoporphyrin. A positive reference sample can contain purified heme and/or PPIX and/or hemoglobin, and/or blood, as shown in Figure 2A. Alternatively, a positive reference sample may also be obtained by addition of purified heme, and/or hemoglobin, and/or PPIX, and/or blood to a sample (*e.g.*, urine, feces, or
25 gastric fluids) of a healthy patient, or from the tested patient, as shown in Figure 3A and 3B upper panels, respectively.

The comparison of the sample signal with the reference signal(s) at step c) consists advantageously in determining if the sample signal is different or identical to the said reference signal(s).

At least one negative reference signal produced by a negative reference sample can be
30 compared at step c) with the sample signal, and can therefore be considered as a “negative threshold reference signal” (the negative reference sample being therefore considered in this case as a “negative threshold reference sample”). Said “negative threshold reference signal” corresponds to the signal intensity, above which, a positive result, namely the presence of
35 protoporphyrin in the sample, is identified. If the HAB strain is activated solely by heme, the negative threshold reference sample should be devoid of heme. If the HAB strain is activated by heme and PPIX, the negative threshold reference sample should be devoid of both heme and PPIX.

In practice at step c) of the method, the presence of protoporphyrin is generally identified in the sample, if the sample signal is stronger than the negative threshold reference signal.

When the reference signal to be compared at step c) with the sample signal is a positive reference signal, the comparison therefore consists in determining if the sample signal is lower or higher than the said at least one positive reference signal.

Hence, at step a), in addition to the sample being tested, one would advantageously include at least one positive reference sample and/or one negative threshold reference sample.

The comparison at step c) of the at least one reference signal with the sample signal will therefore distinguish:

- a "positive" sample whereof the sample signal is higher than the negative threshold reference signal, corresponding to a sample comprising protoporphyrin, or having a level of protoporphyrin above that of the protoporphyrin threshold level , and
- a "negative" sample whereof the sample signal is the same as or lower than that of the negative threshold reference signal, and corresponding to a sample which does not comprise protoporphyrin, or has a protoporphyrin level that is identical or lower than said protoporphyrin threshold.

By "identify the presence of protoporphyrin", it is also intended that the invention is suitable for semi-quantitative protoporphyrin detection. Indeed, the performances of the method, or of the device according to the invention, also allow embodiments, wherein a semi-quantitative protoporphyrin measurement in a sample is achieved.

In these embodiments, the positive reference signal according to the invention can therefore be a benchmark reference signal. Typically such benchmark reference signal is established as mentioned above for the positive-reference signal, but by using a benchmark reference sample having a pre-determined concentration of protoporphyrin (heme and/or hemoglobin, and/or PPIX and preferentially heme alone).

In these embodiments the use of at least one benchmark reference sample allows one to attribute, by comparison of the at least one benchmark reference signal with the sample signal, a quantitative value of protoporphyrin to the analyzed sample.

Several benchmark reference samples, having each a different pre-determined protoporphyrin concentration (and generating each a different benchmark reference signal) can therefore be used. The amount of protoporphyrin in the sample is obtained by comparing the sample signal issued at step b) with said benchmark reference signals.

Advantageously, one benchmark reference sample may contain an amount of protoporphyrin considered as corresponding to the presence of a pathological amount of protoporphyrin. Said benchmark reference sample is therefore a positive threshold reference sample that generates a positive threshold reference signal. In this embodiment, if the sample signal is the same or stronger than the positive threshold reference signal, it is considered that

the analyzed sample contains a pathological amount of protoporphyrin. At the contrary, if the sample signal is lower than the positive threshold reference signal, it is considered that the analyzed sample contains a non-pathological, or normal, amount of protoporphyrin (corresponding to "background" level protoporphyrin in sample)

5 Advantageously also, a benchmark reference sample may contain an amount of protoporphyrin correlated with a risk of disease, as known from the state of the art. In this embodiment, if the sample signal is the same or stronger than the positive threshold reference signal, it is considered that the analyzed sample contains an amount of protoporphyrin that is correlated with a risk of disease. At the contrary, if the sample signal is lower than the positive
10 threshold reference signal, it is considered that the analyzed sample contains an amount of protoporphyrin that is not a risk of a disease.

 For example, the cut-off value for a positive heme test using Hemocult II® reportedly corresponds to about 300 µg hemoglobin, *i.e.*, about 12 µg heme per gram feces. In comparison, the test of the present invention detects less than 0.2 µg per gram feces. Thus,
15 appropriate heme standards will give robust results using the present invention,

 Preferentially, the sample signal is first compared with a negative threshold reference signal for qualitative result and further compared with at least one benchmark reference signal, in order to obtain a semi-quantitative determination of the amount of protoporphyrin in the sample.

20 The method according to the invention is therefore interesting in that it is suited for the qualitative detection of the presence of protoporphyrin, or of the specific presence of heme in a sample, namely the identification of a positive or a negative result, as well for the semi-quantitative determination of the amount of protoporphyrin, or specifically of heme.

 The method of the invention can comprise a further step of identifying the presence of
25 blood in said sample, in regard to the step c) of identification of protoporphyrin in the sample.

 In practice, the said presence of protoporphyrin and notably of heme in a sample is correlated with the presence of blood in said sample.

Sample according to the invention:

30 By « sample », it is intended according to the invention, any solid, semi-solid, or liquid specimens wherein protoporphyrin potentially present is to be detected.

 For example the method allows detection of protoporphyrin and notably heme in any specimens. These include biological or bodily samples or environmental specimens such as food products or soil. Biological or bodily samples are for example feces (also named fecal
35 material), blood, urine, saliva, or swab specimens of the cervix, urethra, nostril, or throat, bronchial lavage, pleural fluid, pulmonary fluid, synovial fluid, peritoneal fluid, gastro-intestinal fluids, abdominal fluids, or milk from a lactating mammal.

In preferred embodiments of the method, the sample is selected from feces, urine, gastro-intestinal fluids, abdominal fluids or milk.

Generally, samples to be tested according to the invention are complex samples comprising more than one compound. Contrary to biochemical or immunological tests, wherein
5 complex samples may cause signal quenching, or where the detection threshold is high, in the method of the invention it has been demonstrated, as detailed in the experimental part, that the sample signal is not quenched by fecal material. Additionally, the signal does not fade with time (as is the case for Hemocult II® test, for example).

In one preferred embodiment of the invention, the sample is heat-inactivated prior to
10 step a) of cultivating HAB.

By “heat-inactivated”, it is intended according to the invention any process that eliminates (removes) or kills microorganisms, without altering protoporphyrin present in the sample.

Heat-inactivation is achieved by heating the sample above 90 °C for 5 to 15 minutes,
15 notably for 10 minutes.

Heat inactivation of the test sample increases its stability so that it can be preserved before testing, and may also limit any risks of contamination to the manipulator.

One interest of the method of the invention compared to immunologically-based tests is that it is insensitive to hemoglobin degradation.

20

Culture medium

The culture medium used to grow the HAB protoporphyrin indicator strain can be any suitable medium for growing the HAB strains of interest, provided that it does not include significant levels of protoporphyrin. For heme-specific HAB as described above, the culture
25 medium must not contain heme. When using HAB strains that are able to catalyze iron insertion in PPIX, the culture medium should be devoid of both heme and PPIX.

Non-limiting examples of suitable growth media include M17, MRS, BHI, or TH, which are common media for bacterial growth.

More particularly, the medium is a solid or a semi-solid medium. Preferentially, the
30 culture medium is in the form of a gel. In a particular embodiment, the gel comprises between 0.2 % and 1 % agar, preferably at around 0.6 %.

The HAB are advantageously re-suspended in a homogeneous manner, in said culture medium. In the case of the gel setup, HAB are typically added just prior to pouring and solidification at a temperature between 30 and 50°C, preferably at 42°C, depending on
35 temperature tolerance of the HAB strain.

The said HAB are incorporated at a concentration that is advantageously comprised between 10^5 and 10^6 colony-forming unit (cfu) / ml of culture medium.

Devices and kits according to the invention:

The present invention also relates to kits and devices suitable for implementing the method as described previously.

5 A device according to the invention allows detection of the presence of protoporphyrin and, by direct correlation, allows detection of blood in a sample.

The said device contains HAB re-suspended in a protoporphyrin-lacking semi-solid or solid medium and the one or more samples are deposited in wells (Figure 1A) or directly on the surface (Figure 1B) of said medium.

10 In one embodiment (Figure 1A), the device comprises at least one well, named "sample well", intended to receive the analyzed sample, such that HAB, re-suspended in the medium as mentioned above, can access any protoporphyrin present in said sample to stimulate growth. Assessment of single or multiple samples on a single device having multiple wells (one well per sample) can be envisioned.

15 Preferentially, the device comprises also at least another well, named "reference well" used for the reference sample. In particular, the device may comprise at least one well intended to receive a benchmark reference sample having a predetermined protoporphyrin (preferentially heme or hemoglobin) concentration. The reference sample may be pure protoporphyrin, or protoporphyrin re-suspended in a sample devoid of protoporphyrin, for example, a sample of a healthy patient, to simulate the test sample environment.

20 Preferentially, said device comprises 1 to 5 reference wells, which are intended to receive benchmark reference samples having a series of predetermined protoporphyrin concentrations as above-mentioned, and as illustrated in Figure 2A.

25 Preferentially, the protoporphyrin-lacking medium is in the form of a gel, wherein the well(s) are directly formed. Preferentially, the device according to the invention is a gel-like apparatus wherein at least one well is formed for receiving the sample. In this embodiment, the gel comprises the protoporphyrin-lacking medium.

30 In another embodiment (Figure 1B), the protoporphyrin-lacking medium is not pre-mixed with HAB, but may be deposited as a solid medium in a Petri dish. The HAB would then be either plated directly, or re-suspended in a gel overlay (referred to as "soft agar suspension" by those in the art), comprising the same protoporphyrin-lacking medium in approximately 0.5 to 0.8 % agar and deposited evenly on the solid medium.

In this case, depositing protoporphyrin or a sample containing protoporphyrin in a specific position on the plate will induce bacterial halo formation around the sample (schematized in Figure 1B).

35 Preferentially, the device according to the invention allows direct visualization of bacterial growth around the test wells. Typically, when HAB are mixed in a gel medium, or plated directly above the medium and incubated under the appropriate growth conditions for the HAB being

used, bacterial growth is visualized as a dense halo surrounding the protoporphyrin-containing sample.

A kit according to the invention comprises at least:

- the said device for implementing the method as described above
- 5 – a strain of HAB to be mixed with the protoporphyrin-lacking medium.
- at least one negative reference sample and/or at least one positive reference sample, and notably a benchmark reference containing a predetermined protoporphyrin concentration.

10 Preferentially, the kit comprises between two and five positive reference samples, each of which contains a different predetermined protoporphyrin concentration.

In one embodiment HAB are premixed with the protoporphyrin-lacking medium.

In practice, the implementation of such a kit comprises the following steps:

- 15 - if necessary, premixing HAB with the protoporphyrin-lacking medium, which is then deposited or spread in a gel-like apparatus for growth, with a space for sample wells (gel set-up illustrated in Figure 1A, plate set-up an alternative example in Figure 1B).
- depositing the sample(s), and the reference sample(s) if necessary, and
- implementing the steps of the method according to the invention, to detect protoporphyrin in the said sample(s) in a qualitative and/or semi-quantitative manner.

20

Use according to the invention:

The present invention is a highly sensitive and specific biological assay for determining the presence of protoporphyrin, and in particular the presence of heme and PPIX or the specific presence of heme, in a sample.

25 Said invention is particularly interesting as a diagnostic device in the pharmaceutical field. The said invention may also be used diagnostically to determine the presence of blood in a human or animal sample. The method of the invention can thereby be applied for preliminary screenings for potential inflammation or diseases such as colorectal cancer in the case of feces screening, hematuria in the case of urine screening or mastitis in the case of milk sample screening.

30

Furthermore, allowing detection of both heme and PPIX can further sensitize the test for cancer detection (Silva F R O et al., 2013, Journal of Fluorescence, 23(1):131-135). Porphyrin-related diseases or metal poisoning could also be detected (see Ng JC1 & Qi L, Moore MR Cell, 2002, Mol Biol ;48(1):111-23). Indeed in some embodiments, kits or devices according to the invention are used to determine protoporphyrin levels and notably heme levels in feces samples as a preliminary screening for potential inflammation or disease.

35

In some embodiments, the method of the invention or a kit according to the invention can be used in order to detect protoporphyrin and notably heme, and in particular the presence

of blood, in a sample of milk from a lactating mammal. Said mammal is notably a farm animal and in particular a farm animal used for milk production.

5 The presence of protoporphyrin and notably heme, and in particular the presence of blood, in a sample of milk from a lactating mammal can be correlated to the presence of mastitis.

10 In other embodiments, the method of the invention or a kit according to the invention can be used in order to detect the presence of heme, and in particular the presence of blood, in a food product. The presence of heme or blood may be correlated to the presence of meat-derived ingredients (or substances from animal origin) in food products. The method of the invention can therefore be used, for the detection of meat-derived ingredients and notably for the detection of substances from animal origin, in a food product.

15 The method according to the invention can be easily adapted to various implementing conditions. In particular, the method of the invention allows protoporphyrin detection in a sample with simple equipment. By contrast, the method can be automated if suitable equipment is available in order to improve the reliability and the precision of the method and potentially increase the rapidity of reading results.

20 To summarize, the method of the invention combines both sensitivity and specificity, as well as signal stability. The method of the invention and the kit according to the invention are therefore particularly suited for early detection of intestinal inflammation and diseases and in particular of colorectal cancers, which is routinely based on a primary screen for heme or hemoglobin detection in feces samples. The method of the invention can be simply operated, using automated reading notably at steps b) and or c), or by visual detection, depending on the available equipment, and does not require expensive products. All these characteristics taken together make it particularly suited for use in primary large scale screening of colorectal diseases, such as adenoma, polyps and colorectal cancers.

25 Traces of heme might also reveal inflammation such as mastitis, a frequent and costly problem in farm animals such as cows and goats. Detection by the "HemeScreen" test could lead to early treatment to prevent spread of infection.

30 The present invention is further described in the following experiments that provide non limitative examples of implementing the invention.

EXPERIMENTAL RESULTS

The test device of the invention is also named "HemeScreen" in the experimental part.

35 Materials and methods:

a) *Gel-type approach*: Prototype device using *Bacteroides* growth stimulation as heme indicator: The device in this embodiment is schematized in Figure 1A. Briefly, a vertical gel is set up with a 0.8 cm spacer. Metal prongs (typically 4-5 cm deep) on a comb are used as wells.

Bacteroides cells (around 10^5 to 10^6 cfu/ml) are added at around 42°C just prior to pouring. Once solidified, wells are loaded (at positions of black arrows), and gels are overlaid with 5 ml of a 1.2% agar plug.

5 *Bacteroides* growth stimulation by test samples is visualized as dense growth forming a cream-colored halo of growth around wells after 12 to 16 hour (typically overnight) incubation at 37°C. Sample-generated signals can be compared to the negative reference signal corresponding to background, as schematized in Figure 1A.

10 A ~0.5 to 1 cm no-growth-zone from the top of the gel is due to aerobic inhibition of *Bacteroides* growth. After incubation, the gel can be photographed for further analysis. The results are stable, and can be visualized over a period of several days.

b) *Petri plate approach*: Prototype set-up using *Lactococcus lactis* growth stimulation as heme indicator. The principle of the test is schematized in Figure 1B. Petri plates containing protoporphyrin-lacking solid medium are overlaid with about 10^5 to 10^7 cfu/ml of the HAB
15 (*Lactococcus lactis*) re-suspended in soft agar (i.e., medium containing 0.75 % agar in typically 5 ml volume per standard Petri plate) and then poured over plates. After the soft agar solidifies, heme positive reference samples (i.e., benchmark reference samples) and feces samples (between about 30 and 100 mg) are placed directly on plates, which are then incubated, usually
20 overnight, at the optimal HAB condition and growth temperature (as per current knowledge of the HAB, or determined empirically). Stimulatory effects of heme in samples are then observed visually and are photographed or scanned.

Samples of intestinal contents were obtained from healthy conventional and germfree mice routinely raised in the animal facilities. Meconium samples used in the present study were
25 collected from human newborns, and fecal samples were obtained from human adult volunteers. All samples were immediately used or stored at -80°C prior to use.

Fecal samples were routinely heated to 90°C for 10 minutes to avoid outgrowth of endogenous bacteria. Samples were routinely re-suspended 10 % weight/volume suspension in NaCl (0.9 %) and then heated. Volumes used as samples were 50 to 100 µl, and correspond to
30 about 5 mg feces per sample, as tested in setup described in Figure 1A. Samples tested in setup described in Figure 1B were used directly, such that 50-100 mg feces were deposited on plates for testing.

c) *Additives used in growth assays*. Heme, PPIX, biliverdin, and bilirubin were prepared
35 as 20 mM stock solutions as described (Fernandez et al., 2010 Plos Pathogens, 6(4):e1000860). Hemoglobin was prepared as a 10 mg/ml H₂O stock solution. Products were purchased from Sigma. Horse blood dilutions were prepared in 0.9 % NaCl.

d) *Strains and growth conditions*: *B. thetaiotaomicron* reference strain VPI-5482 (provided by Sylvie Rabot, INRA, France), and *Bacteroides fragilis* strain ADB77 provided by Michael Malamy (Tufts University, USA) were used as HAB. These *Bacteroides* cultures were routinely started from 50 µl frozen aliquots prepared as follows: An overnight culture was prepared in M17 plus 0.5 % glucose (M17-glu) containing heme (10 µM) and cysteine (4 mM) and grown anaerobically at 37°C; the culture was washed and re-suspended in fresh M17-glu medium containing 15 % glycerol and then aliquoted anaerobically and frozen. For all experiments, *Bacteroides* cultures were prepared as follows: 10 µl of a frozen aliquot was thawed and re-suspended in 10 ml M17-glu (without heme) and grown overnight at 37°C in anaerobic conditions, using either an anaerobic chamber or jar. The strain is routinely started from a frozen culture and grown aerobically overnight in static conditions in M17-glu at 30°C. *Lactococcus lactis* was grown as routinely described (Duwat et al., J Bacteriol., 2001, 183:4509-16).

15 Results:

The device is set up to use an easily cultivated bacterium whose growth requires exogenous heme. *Bacteroides (thetaiotaomicron or fragilis)* have been used due to their significant growth stimulation by low amounts of heme. Although these bacteria are considered as anaerobes, they tolerate low amounts of oxygen, which makes handling straightforward, and they grow rapidly (*i.e.*, to saturation upon overnight growth). Oxygen-tolerant *B fragilis* variants were reported, due to acquisition of mutations in a conserved flavoprotein (see Meehan et al., 2012, PNAS, 109:12153-58). *B. thetaiotaomicron* and *B fragilis* oxygen-tolerant variants may be used as indicator strains in the present protoporphyrin detection tests.

25 a) *The method is highly specific for heme/PPIX*. According to Figure 2A, different concentrations of: purified heme (upper panel), ranging from 0.5 to 256 ng of heme; hemoglobin (middle panel), ranging from 1 to 500 µg; or horse blood (lower panel) ranging from 12 to 6000 nl, were loaded in wells, and growth stimulation was evaluated. Heme-mediated growth stimulation was observed with as little as 1 ng heme as detected by dense growth surrounding sample wells. Hemoglobin-mediated HAB growth stimulation was observed with as little as 2 µg of hemoglobin and blood-mediated mediated HAB growth stimulation was observed with as little as 12 nl of blood.

35 According to Figure 2B, PPIX, the iron-free heme precursor also stimulated *B. thetaiotaomicron* (Bt) growth. The detection of both heme and PPIX suggests that *Bacteroides* encodes enzymatic activity allowing it to insert available iron into PPIX (see Sperry JF et al., 1977, Appl. Environ. Microbiol., 34:386-90). Studies in *E. coli* revealed a novel enzyme that is needed to remove iron from heme (Letoffe et al., 2009, PNAS, 106:11719-24). A homolog

having potentially reversible activity may be present in *Bacteroides*. Its inactivation could be useful to restrict detection to heme.

In contrast, bilirubin or biliverdin, which are heme breakdown products that may also be present in feces, did not impact on Bt growth, even at high concentrations (Figure 2B), attesting to the specificity of the test for protoporphyrins.

b) Heme detection in feces. In Figure 2C, feces samples were heated to 90°C for 10 minutes. It has been shown that heat treatment does not alter Bt growth stimulation but rather stabilizes the test and avoids bacterial contamination and gas bubbles due to fermentation, therefore improving quality of results.

Feces from healthy germfree or conventional mice (GF or CONV respectively), as well as samples from human meconium or adult (M or AD respectively), were deposited in wells (5 mg feces re-suspended to 50µl 0.9 % NaCl). At left, heme (120 ng, which is within the range of heme present in healthy individuals) was used as positive reference. The results showed that all feces samples from healthy individuals stimulated Bt growth. Specificity of heme stimulation was verified separately and allows one to conclude that heme or PPIX is responsible for the observed stimulation.

c) Semi-quantitative detection of heme in complex biological materials such as urine and feces. Signals are not quenched when measured in biological samples, and are more sensitive than conventional heme detection tests.

50 µl urine (Figure 3) or 5 mg feces suspended to 50 µL in 0.9 % saline (Figure 4) from healthy individuals was spiked with different heme concentrations such that the amounts of heme per above-stated aliquots corresponded to between 1 ng and 256 ng in Figure 3, and to between 4 ng and 1024 ng in Figure 4.

Figure 3: The spiked urine samples were loaded on the “HemeScreen” gel setup of the invention (3A UPPER), and the same sample was tested using Multistix® 8SG, which is routinely used to detect hematuria (3A LOWER).

Figure 4: The spiked fecal samples were loaded on the “HemeScreen” gel setup of the invention (4 UPPER), and the same sample was tested using Hemocult II® (4 LOWER).

Note that feces for the "0" point in Figure 4 is positive, consistent with the known and observed presence of trace heme in healthy individuals as also seen in Figure 2C. Growth stimulation is increased particularly when 128 ng heme are added to the sample, which indicates that this amount of heme can be distinguished from the amount present in the sample. Thus levels exceeding 128 ng of heme will be detectably higher than the amount of heme present in this normal feces sample. The results show that heme amounts can be quantified at very low levels, regardless of the complexity of the biological material, and even in healthy individuals.

It is well known that complex biological samples, especially feces, cause signal quenching when heme is measured biochemically.

Biochemically-based kits are available to quantify heme, either pure or in feces samples. We showed that purified heme was measurable, but as reported, signals diminish when feces were added to heme samples. A similar problem was reported for an immunological test; signals were 90-fold lower in samples containing feces, when compared to purified hemoglobin (Vaananen O & Tenhunen R, 1988, Clin Chem., 34:1763-66).

Importantly, and favoring the "HemeScreen" test of the invention, heme detection levels are not diminished by the biological material in which heme is present; indeed, the presence of complex samples such as urine or feces material does not quench the heme signal since increases in heme amounts in the samples are readily detected even at low levels.

Using the plate set-up (schematized in Figure 1B), another HAB was tested to detect the presence of heme (Figure 5). Upper panels show heme (120 ng) and different feces samples (between about 30 and 100 mg) deposited on an overlay of *L. lactis* strain MG1363. The halo surrounding the samples indicates growth stimulation of *L. lactis*. Lower panels show the same samples deposited around the MG1363 *cydA* strain, which is unable to use heme (Duwat et al., 2001, J Bacteriol., 183:4509-16). There is no stimulation by heme, nor by the test samples, showing specificity of the test.

Taken together, the above mentioned results show that heme can be readily evaluated using a bacterial-growth-based assay that is simple to set up at a low cost.

CLAIMS

1. A method for detecting the presence of protoporphyrin in a sample, said method comprising steps of:

5 a) cultivating heme auxotroph bacteria (HAB) in a protoporphyrin-lacking culture medium, in the presence of said sample, for a determined time period,

b) estimating the extent of HAB growth issued at step a), to obtain a sample signal, and

c) identifying the presence of protoporphyrin in said sample, by comparing the sample signal obtained at step b) with at least one reference signal.

10 2. A method according to claim 1, wherein the protoporphyrin is heme and wherein at step a), HAB are heme-specific HAB which are cultured in a heme-lacking medium.

3. A method according to claim 2, wherein heme-specific HAB are chosen among native or recombinant strains that are deficient in enzymes that catalyze iron insertion into protoporphyrin IX.

15 4. A method according to anyone of claims 1 to 3, wherein the reference signal consists in one negative reference signal and/or at least one positive reference signal.

5. A method according to anyone of claims 1 to 4, further comprising a step of estimating the amount of protoporphyrin in the sample by comparing the sample signal obtained at step b) with at least one benchmark reference signal.

20 6. A method according to anyone of claims 1 to 5, wherein HAB are chosen among the genera *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, heme auxotrophic mutants of *Escherichia*, heme auxotrophic mutants of *Bacillus*, or their recombinant HAB derivatives.

25 7. A method according to anyone of claims 1 to 6, wherein the sample is a complex sample, preferentially a food product such as milk, fecal material, a gastro-intestinal fluid, or urine.

8. A method according to anyone of claims 1 to 7, further comprising a step of heat-inactivating the sample, prior to step a).

30 9. A method for detecting the presence of blood in a sample, said method comprising:

- steps of the method according to any one of the claims 1 to 8, and

- a further step d) of identifying the presence of blood in said sample, in regard of step 1c) of identification of protoporphyrin in the sample.

10. A device for implementing a method according to any one of claims 1 to 9.

35 11. A device according to claim 10 containing HAB suspended in a protoporphyrin-lacking culture medium and at least one well intended to receive a sample, wherein said HAB can access to said sample.

12. A device according to claim 11 wherein the protoporphyrin-lacking culture medium is in the form of a gel.

13. A device according to claims 10 to 12, further containing at least one other well, which is intended to receive a reference sample.

5 14. A kit comprising:

- a device according to any one of claims 10 to 13,
- at least one benchmark reference sample having a predetermined protoporphyrin concentration, and
- a strain of HAB to be mixed with the protoporphyrin-lacking medium.

10 15. Use of a device according to claims 10 to 13 or a kit according to claim 14 for preliminary screening for potential inflammation or disease.

16. Use of a device according to claims 10 to 13 or a kit according to claim 14 for detection of mastitis in farm animals, especially those used for milk production.

15 17. Use of a device according to claims 10 to 13 or a kit according to claim 14 for detecting the presence of meat-derived ingredients in food products.

A B R E G E

TITRE :

Sensitive bacterial-growth-based protoporphyrin detection test

DEPOSANT :

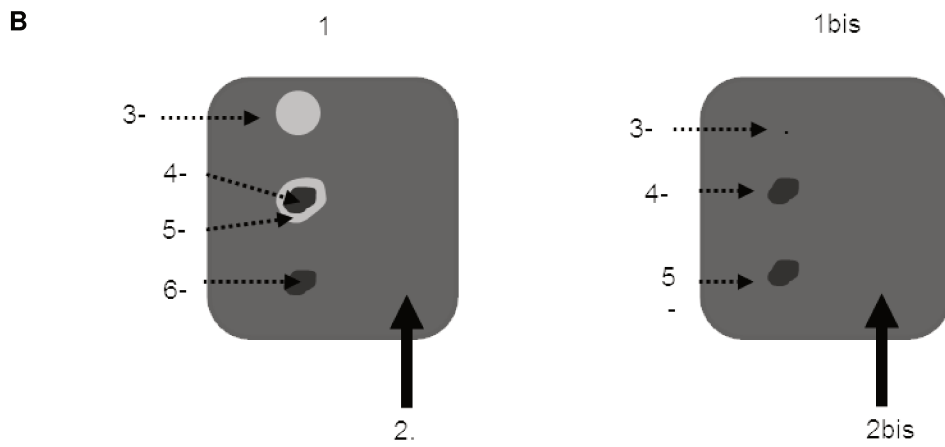
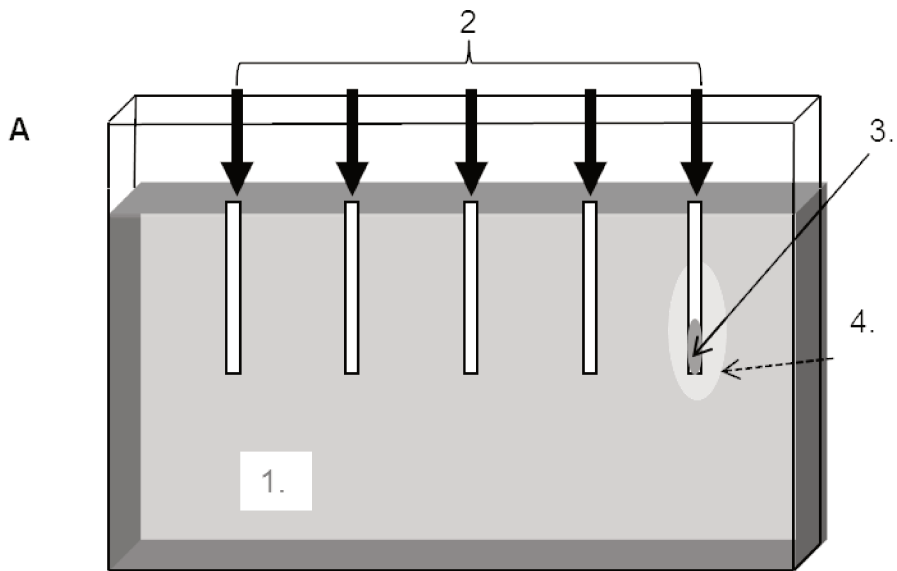
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE – INRA

A method for detecting the presence of protoporphyrin in a sample, said method comprising steps of:

- a) cultivating heme auxotroph bacteria (HAB) in a protoporphyrin-lacking culture medium, in the presence of said sample, for a determined time period,
- b) estimating the extent of HAB growth issued at step a), to obtain a sample signal, and
- c) identifying the presence of protoporphyrin in said sample, by comparing the sample signal obtained at step b) with at least one reference signal.

PAS DE FIGURE

1/4
Figure 1



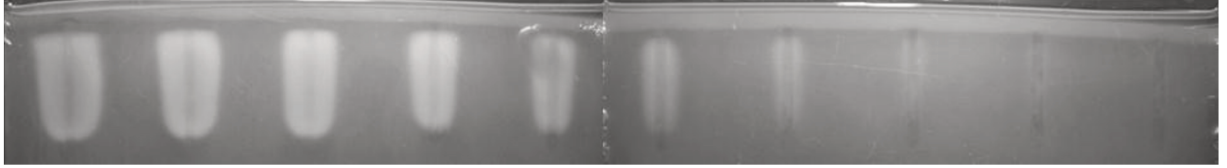
2/4

Figure 2

A

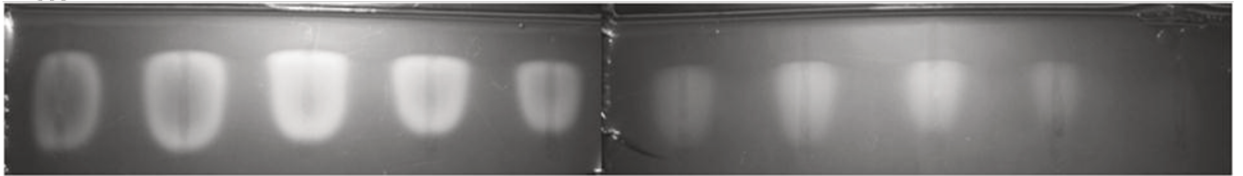
Heme (in nanograms)

256 128 64 32 16 8 4 2 1 0.5



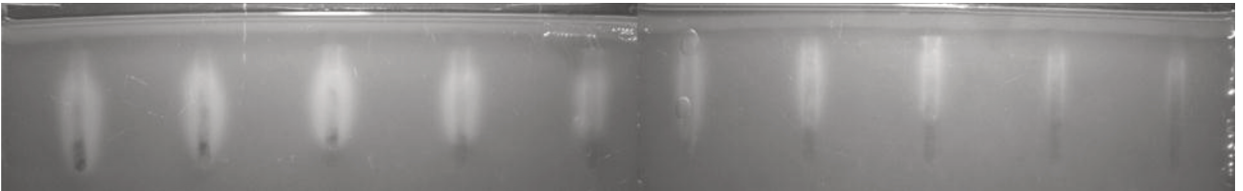
Hemoglobin (in micrograms)

500 250 125 62 31 16 8 4 2 1



Blood (horse) in nanoliters

6000 3000 1500 750 375 188 94 47 23 12



B

Heme
560 ng

PPIX
600 ng

Bilirubin

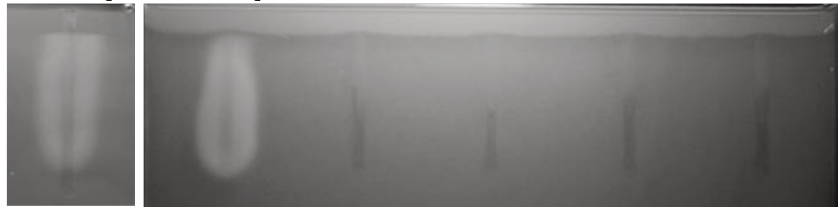
290 ng

2.9 µg

Bilirverdin

290 ng

2.9 µg



1

2

3

4

5

6

C

Feces

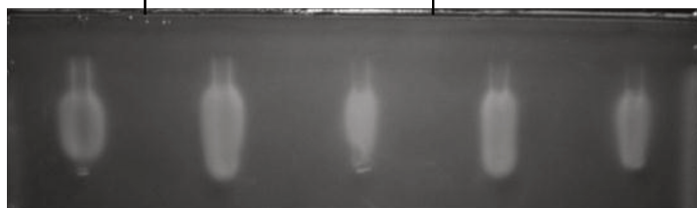
Heme

GF

CONV

MEC

AD



1

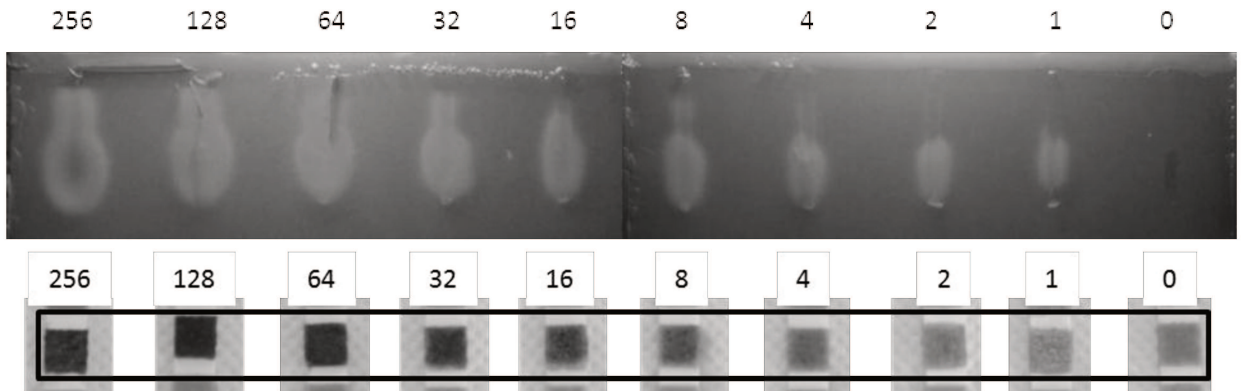
2

3

4

5

Figure 3



4/4

Figure 4

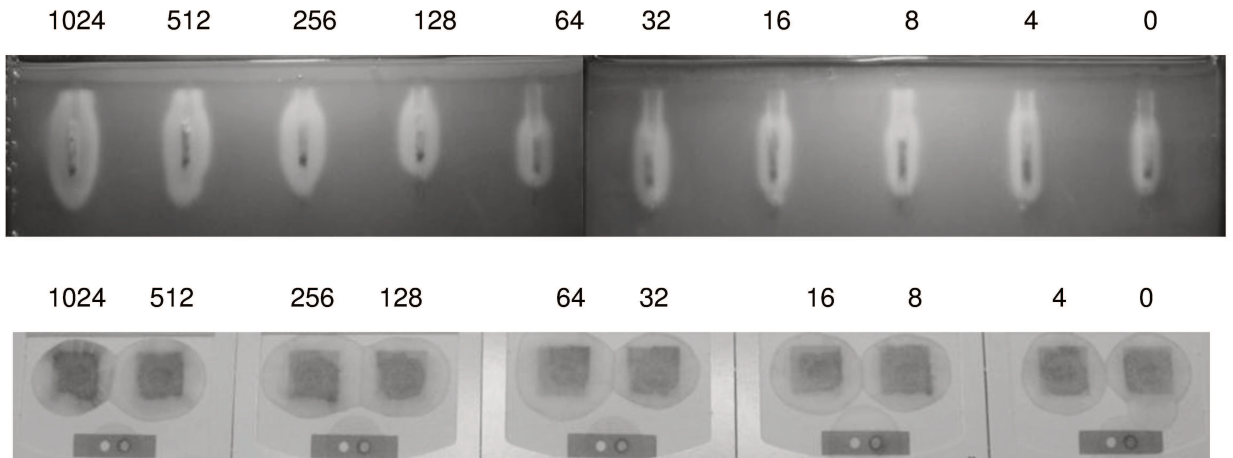
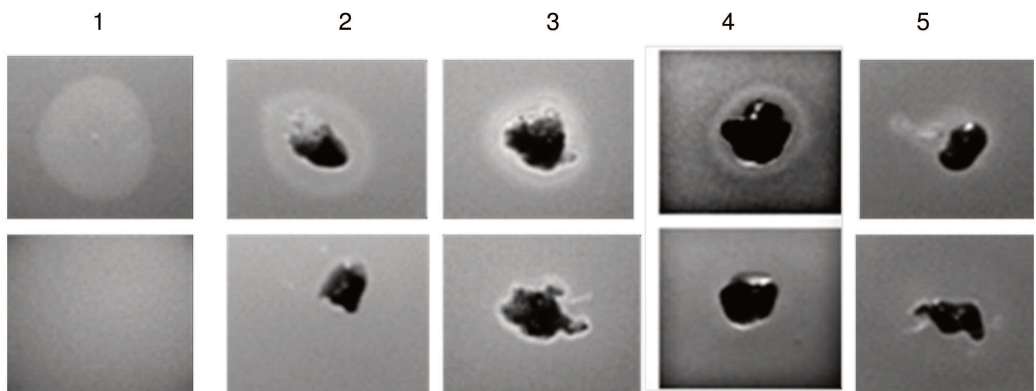


Figure 5



VIII – Bibliographie

Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6, 237ra265.

Abt, M. C., Osborne, L. C., Monticelli, L. A., Doering, T. A., Alenghat, T., Sonnenberg, G. F., Paley, M. A., Antenus, M., Williams, K. L., Erikson, J., *et al.* (2012). Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity* 37, 158-170.

Adlerberth, I. (2008). Factors influencing the establishment of the intestinal microbiota in infancy. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 62, 13-29; discussion 29-33.

Adlerberth, I., and Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* 98, 229-238.

Ahlquist, D. A., McGill, D. B., Schwartz, S., Taylor, W. F., Ellefson, M., and Owen, R. A. (1984). HemoQuant, a new quantitative assay for fecal hemoglobin. Comparison with Hemocult. *Ann Intern Med* 101, 297-302.

Ajslev, T. A., Andersen, C. S., Gamborg, M., Sorensen, T. I., and Jess, T. (2011). Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes (Lond)* 35, 522-529.

Albrecht, A., Caliskan, G., Oitzl, M. S., Heinemann, U., and Stork, O. (2013). Long-lasting increase of corticosterone after fear memory reactivation: anxiolytic effects and network activity modulation in the ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 38, 386-394.

An, D., Na, C., Bielawski, J., Hannun, Y. A., and Kasper, D. L. (2011). Membrane sphingolipids as essential molecular signals for *Bacteroides* survival in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4666-4671.

Andrews, S. C. (2010). The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta* 1800, 691-705.

Andrews, S. C., Robinson, A. K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215-237.

Arora, T., and Backhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J Intern Med*.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., *et al.* (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174-180.

Ascenzi, P., di Masi, A., Leboffe, L., Frangipani, E., Nardini, M., Verde, C., and Visca, P. (2015). Structural Biology of Bacterial Haemophores. *Adv Microb Physiol* 67, 127-176.

Atamna, H., and Frey, W. H., 2nd (2004). A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11153-11158.

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2, 2006 0008.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15718-15723.
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.
- Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., *et al.* (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17, 852.
- Bastide, N. M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R. L., Tache, S., Naud, N., Baradat, M., Jouanin, I., Surya, R., Hobbs, D. A., *et al.* (2015). A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* 75, 870-879.
- Baughn, A. D., and Malamy, M. H. (2003). The essential role of fumarate reductase in haem-dependent growth stimulation of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* 149, 1551-1558.
- Baughn, A. D., and Malamy, M. H. (2004). The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature* 427, 441-444.
- Belzer, C., Gerber, G. K., Roeselers, G., Delaney, M., DuBois, A., Liu, Q., Belavusava, V., Yeliseyev, V., Houseman, A., Onderdonk, A., *et al.* (2014). Dynamics of the microbiota in response to host infection. *PLoS One* 9, e95534.
- Benevides-Matos, N., Wandersman, C., and Biville, F. (2008). HasB, the *Serratia marcescens* TonB paralogue, is specific to HasR. *J Bacteriol* 190, 21-27.
- Benno, Y., Sawada, K., and Mitsuoka, T. (1984). The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 28, 975-986.
- Berg, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-435.
- Bermudez-Humaran, L. G., Cortes-Perez, N. G., Ah-Leung, S., Lefevre, F., Yang, G., Pang, Q., Wu, C., Zeng, Y., Adel-Patient, K., and Langella, P. (2008). Current prophylactic and therapeutic uses of a recombinant *Lactococcus lactis* strain secreting biologically active interleukin-12. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14, 80-89.
- Biagi, E., Quercia, S., Aceti, A., Beghetti, I., Rampelli, S., Turrone, S., Faldella, G., Candela, M., Brigidi, P., and Corvaglia, L. (2017). The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. *Front Microbiol* 8, 1214.
- Biville, F., Cwerman, H., Letoffe, S., Rossi, M. S., Drouet, V., Ghigo, J. M., and Wandersman, C. (2004). Haemophore-mediated signalling in *Serratia marcescens*: a new mode of regulation for an extra cytoplasmic function (ECF) sigma factor involved in haem acquisition. *Mol Microbiol* 53, 1267-1277.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., *et al.* (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.

Boleij, A., Hechenbleikner, E. M., Goodwin, A. C., Badani, R., Stein, E. M., Lazarev, M. G., Ellis, B., Carroll, K. C., Albesiano, E., Wick, E. C., *et al.* (2015). The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis* 60, 208-215.

Bornside, G. H., Donovan, W. E., and Myers, M. B. (1976). Intracolonic tensions of oxygen and carbon dioxide in germfree, conventional, and gnotobiotic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 151, 437-441.

Bouter, K. E., van Raalte, D. H., Groen, A. K., and Nieuwdorp, M. (2017). Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterology*.

Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., and International Agency for Research on Cancer Monograph Working, G. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* 16, 1599-1600.

Breton, J., Daniel, C., Dewulf, J., Pothion, S., Froux, N., Sauty, M., Thomas, P., Pot, B., and Foligne, B. (2013). Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicol Lett* 222, 132-138.

Brook, I. (1985). Enhancement of growth of aerobic and facultative bacteria in mixed infections with *Bacteroides* species. *Infect Immun* 50, 929-931.

Brook, I. (1989). Pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* group. *Ann Clin Lab Sci* 19, 360-376.

Buffie, C. G., and Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 13, 790-801.

Burkitt, D. P., Walker, A. R., and Painter, N. S. (1974). Dietary fiber and disease. *JAMA* 229, 1068-1074.

Caldwell, D. R., White, D. C., Bryant, M. P., and Doetsch, R. N. (1965). Specificity of the heme requirement for growth of *Bacteroides ruminicola*. *J Bacteriol* 90, 1645-1654.

Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J., and Andrews, S. C. (2006). Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* 19, 143-157.

Castellani, A., and Chalmers, A. J. (1919). *Manual of tropical medicine* - 3rd ed. Williams Wood and Co eds, New York, 959-960.

Cato, E. P., and Johnson, J. L. (1976). Reinstatement of Species Rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *B. vulgatus*: Designation of Neotype Strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. *Int J Syst Bacteriol* 26, 230-237.

Chalmers, N. I., Palmer, R. J., Jr., Cisar, J. O., and Kolenbrander, P. E. (2008). Characterization of a *Streptococcus sp.-Veillonella sp.* community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol* 190, 8145-8154.

Chen, D., Brown, J. D., Kawasaki, Y., Bommer, J., and Takemoto, J. Y. (2012). Scalable production of biliverdin IX α by *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 12, 89.

Cherbuy, C., Honvo-Houeto, E., Bruneau, A., Bridonneau, C., Mayeur, C., Duee, P. H., Langella, P., and Thomas, M. (2010). Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G348-357.

Cherrington, C. A., Hinton, M., Pearson, G. R., and Chopra, I. (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation. *J Appl Bacteriol* 70, 161-165.

Choby, J. E., and Skaar, E. P. (2016). Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *J Mol Biol* 428, 3408-3428.

Chu, D. M., Ma, J., Prince, A. L., Antony, K. M., Seferovic, M. D., and Aagaard, K. M. (2017). Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* 23, 314-326.

Collins, S. M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 10, 735-742.

Comstock, L. E., and Coyne, M. J. (2003). *Bacteroides thetaiotaomicron*: a dynamic, niche-adapted human symbiont. *Bioessays* 25, 926-929.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70, 1-12.

Corpet, D. E. (2011). Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Sci* 89, 310-316.

Coyne, M. J., Kalka-Moll, W., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L., and Comstock, L. E. (2000). *Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci. *Infect Immun* 68, 6176-6181.

Cross, A. J., Ferrucci, L. M., Risch, A., Graubard, B. I., Ward, M. H., Park, Y., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., and Sinha, R. (2010). A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 70, 2406-2414.

Crumevolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Dauge, V., Naudon, L., and Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 42, 207-217.

Cummings, J. H., and Macfarlane, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70, 443-459.

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

De Paepe, M., Leclerc, M., Tinsley, C. R., and Petit, M. A. (2014). Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol* 4, 39.

de Vos, W. M. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2, 289-295.

Distaso, A. (1912). Contribution à l'étude sur l'intoxication intestinale. *Zbl Bakt, I Abt Orig* 62, 433-468.

Distaso, A. (1916). Flora of wounds and flora of putrefaction. *The Lancet*, 74-75.

Dobell, C. (1932). Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals."

Domingo, J. L., and Nadal, M. (2017). Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food Chem Toxicol* 105, 256-261.

Donaldson, R. M., Jr. (1964a). Normal Bacterial Populations of the Intestine and Their Relation to Intestinal Function. *N Engl J Med* 270, 1050-1056 CONCL.

Donaldson, R. M., Jr. (1964b). Normal Bacterial Populations of the Intestine and Their Relation to Intestinal Function. *N Engl J Med* 270, 994-1001 CONTD.

Donaldson, R. M., Jr. (1964c). Normal Bacterial Populations of the Intestine and Their Relation to Intestinal Function. *N Engl J Med* 270, 938-945 CONTD.

Drasar, B. S. (1967). Cultivation of anaerobic intestinal bacteria. *J Pathol Bacteriol* 94, 417-427.

Drasar, B. S., and Hill, M. J. (1974). *Human Intestinal Flora*. Academic Press, London, UK.

Drasar, B. S., Shiner, M., and McLeod, G. M. (1969). Studies on the intestinal flora. I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology* 56, 71-79.

Dunn, D. L., and Simmons, R. L. (1984). The role of anaerobic bacteria in intraabdominal infections. *Rev Infect Dis* 6 *Suppl* 1, S139-146.

Dutra, F. F., and Bozza, M. T. (2014). Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 5, 115.

Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P., and Gruss, A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol* 183, 4509-4516.

Eggerth, A. H., and Gagnon, B. H. (1933). The *Bacteroides* of Human Feces. *J Bacteriol* 25, 389-413.

Escherich, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings (Les bactéries intestinale du nouveau-né et de l'enfant). *Fortschritte der Medicin* 3, 515-557.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., *et al.* (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9066-9071.

Fang, W., Shi, M., Huang, L., Chen, J., and Wang, Y. (1996). Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and in milk. *Vet Res* 27, 3-12.

Fernandez, A., Lechardeur, D., Derre-Bobillot, A., Couve, E., Gaudu, P., and Gruss, A. (2010). Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog* 6, e1000860.

Finegold, S. M. (2008). Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses* 70, 508-511.

Fleming, A. (1915). On the bacteriology of septic wounds. *The Lancet*, 638-643.

Flohe, L., Toppo, S., Cozza, G., and Ursini, F. (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 15, 763-780.

Foley, M. H., Cockburn, D. W., and Koropatkin, N. M. (2016). The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut *Bacteroidetes*. *Cell Mol Life Sci* 73, 2603-2617.

Frankenberg, N., Moser, J., and Jahn, D. (2003). Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 115-127.

Freter, R., and Abrams, G. D. (1972). Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to the normal state. *Infect Immun* 6, 119-126.

Freter, R., Brickner, H., Fekete, J., Vickerman, M. M., and Carey, K. E. (1983). Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* 39, 686-703.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., *et al.* (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547.

Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154, 1-9.

Gauss, G. H., Benas, P., Wiedenheft, B., Young, M., Douglas, T., and Lawrence, C. M. (2006). Structure of the DPS-like protein from *Sulfolobus solfataricus* reveals a bacterioferritin-like dimetal binding site within a DPS-like dodecameric assembly. *Biochemistry* 45, 10815-10827.

Geurts, L., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Knauf, C., and Cani, P. D. (2014). Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef Microbes* 5, 3-17.

Ghigo, J. M., Letoffe, S., and Wandersman, C. (1997). A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 3572-3579.

Ghosh, S., Dai, C., Brown, K., Rajendiran, E., Makarenko, S., Baker, J., Ma, C., Halder, S., Montero, M., Ionescu, V. A., *et al.* (2011). Colonic microbiota alters host susceptibility to infectious colitis by modulating inflammation, redox status, and ion transporter gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G39-49.

Gibbons, R. J., and Macdonald, J. B. (1960). Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol* 80, 164-170.

Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., Fais, T., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H. T., Barnich, N., *et al.* (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing

of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **18**, 617-631.

Gilbertsen, V. A., McHugh, R., Schuman, L., and Williams, S. E. (1980). The earlier detection of colorectal cancers: a preliminary report of the results of the Occult Blood Study. *Cancer* **45**, 2899-2901.

Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., and Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**, 1355-1359.

Glei, M., Klenow, S., Sauer, J., Wegewitz, U., Richter, K., and Pool-Zobel, B. L. (2006). Hemoglobin and heme induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* **594**, 162-171.

Goldstein, E. J. (1996). Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis* **23 Suppl 1**, S97-101.

Gomez de la Torre Canny, S., and Rawls, J. F. (2015). Baby, It's Cold Outside: Host-Microbiota Relationships Drive Temperature Adaptations. *Cell Host Microbe* **18**, 635-636.

Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., Fetissov, S., Godart, N., Melchior, J. C., Ramoz, N., *et al.* (2016). New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci* **10**, 256.

Gower-Rousseau, C. (2012). Epidémiologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin en France : apport du Registre EPIMAD. Thèse de Doctorat - Université Lille- Nord de France.

Granger, A., Richer, M. M., and Roustel, S. (2007). *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Ed.

Gruss, A., Borezee-Durant, E., and Lechardeur, D. (2012). Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv Microb Physiol* **61**, 69-124.

Haahtela, T., Holgate, S., Pawankar, R., Akdis, C. A., Benjaponpitak, S., Caraballo, L., Demain, J., Portnoy, J., von Hertzen, L., Change, W. A. O. S. C. o. C., and Biodiversity (2013). The biodiversity hypothesis and allergic disease: world allergy organization position statement. *World Allergy Organ J* **6**, 3.

Hagman, K. E., Pan, W., Spratt, B. G., Balthazar, J. T., Judd, R. C., and Shafer, W. M. (1995). Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* **141 (Pt 3)**, 611-622.

Hahnke, R. L., Meier-Kolthoff, J. P., Garcia-Lopez, M., Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N. N., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., and Goker, M. (2016). Genome-Based Taxonomic Classification of *Bacteroidetes*. *Front Microbiol* **7**, 2003.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**, 1-14.

Halpern, D., and Gruss, A. (2015). A sensitive bacterial-growth-based test reveals how intestinal *Bacteroides* meet their porphyrin requirement. *BMC Microbiol* **15**, 282.

Hammer, N. D., and Skaar, E. P. (2011). Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol* **65**, 129-147.

- Hantke, K. (2003). Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* 11, 192-195.
- Heinemann, I. U., Jahn, M., and Jahn, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 474, 238-251.
- Helmann, J. D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* 46, 47-110.
- Herren, C. D., Rocha, E. R., and Smith, C. J. (2003). Genetic analysis of an important oxidative stress locus in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Gene* 316, 167-175.
- Holdeman, L. V., Good, I. J., and Moore, W. E. (1976). Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 31, 359-375.
- Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., and Nicholson, J. K. (2012). Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab* 16, 559-564.
- Honda, K., and Littman, D. R. (2012). The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* 30, 759-795.
- Hoskins, L. C., Agustines, M., McKee, W. B., Boulding, E. T., Kriaris, M., and Niedermeyer, G. (1985). Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75, 944-953.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., *et al.* (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451-1463.
- Ijssennagger, N., Belzer, C., Hooiveld, G. J., Dekker, J., van Mil, S. W., Muller, M., Kleerebezem, M., and van der Meer, R. (2015). Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10038-10043.
- Ijssennagger, N., Derrien, M., van Doorn, G. M., Rijnierse, A., van den Bogert, B., Muller, M., Dekker, J., Kleerebezem, M., and van der Meer, R. (2012). Dietary heme alters microbiota and mucosa of mouse colon without functional changes in host-microbe cross-talk. *PLoS One* 7, e49868.
- Imlay, J. A. (2008a). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77, 755-776.
- Imlay, J. A. (2008b). How obligatory is anaerobiosis? *Mol Microbiol* 68, 801-804.
- Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Levin, T. R., Lavin, P., Lidgard, G. P., Ahlquist, D. A., and Berger, B. M. (2014). Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 370, 1287-1297.
- Jones, S. A., Gibson, T., Maltby, R. C., Chowdhury, F. Z., Stewart, V., Cohen, P. S., and Conway, T. (2011). Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* 79, 4218-4226.

- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., and Chassard, C. (2014). Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol* *16*, 2891-2904.
- Joubert, L., Dagieue, J. B., Fernandez, A., Derre-Bobillot, A., Borezee-Durant, E., Fleurot, I., Gruss, A., and Lechardeur, D. (2017). Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* *7*, 40435.
- Joubert, L., Derre-Bobillot, A., Gaudu, P., Gruss, A., and Lechardeur, D. (2014). HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* *93*, 823-833.
- Jungano, M., and Distaso, A. (1910). anaérobies.
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., and Nunez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* *14*, 685-690.
- Kanehisa, M. (1997). A database for post-genome analysis. *Trends Genet* *13*, 375-376.
- Karlsson, F. H., Fak, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., Petranovic, D., Backhed, F., and Nielsen, J. (2012). Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* *3*, 1245.
- Kato, K., Tanaka, R., Sano, S., Tanaka, A., and Hosaka, H. (2010). Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 16649-16654.
- Kirschner-Zilber, I., Rabizadeh, E., and Shaklai, N. (1982). The interaction of hemin and bilirubin with the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta* *690*, 20-30.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., and de Vos, W. M. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* *61*, 2771-2774.
- Knights, D., Ward, T. L., McKinlay, C. E., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., and Knight, R. (2014). Rethinking "enterotypes". *Cell Host Microbe* *16*, 433-437.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., and Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108 Suppl 1*, 4578-4585.
- Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fak, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C. J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R. E., and Backhed, F. (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108 Suppl 1*, 4592-4598.
- Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown, D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L., Ludwig, W., and Whitman, W. B. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition - Volume four.
- Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* *157*, 175-188.
- Kuwahara, T., Yamashita, A., Hirakawa, H., Nakayama, H., Toh, H., Okada, N., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T., and Ohnishi, Y. (2004). Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14919-14924.

- Kwon, S. J., de Boer, A. L., Petri, R., and Schmidt-Dannert, C. (2003). High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* *69*, 4875-4883.
- Lane, D. J., Bae, D. H., Merlot, A. M., Sahni, S., and Richardson, D. R. (2015). Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* *7*, 2274-2296.
- Laplace, J. P. (1975). Le transit digestif chez les monogastriques. *Ann Zootech* *24*, 489-552.
- Latalova, K., Hajda, M., and Prasko, J. (2017). Can gut microbes play a role in mental disorders and their treatment? *Psychiatr Danub* *29*, 28-30.
- Lau, C. K., Krewulak, K. D., and Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev* *40*, 273-298.
- Launoy, G. D., Bertrand, H. J., Berchi, C., Talbourdet, V. Y., Guizard, A. V., Bouvier, V. M., and Caces, E. R. (2005). Evaluation of an immunochemical fecal occult blood test with automated reading in screening for colorectal cancer in a general average-risk population. *Int J Cancer* *115*, 493-496.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Liebl, U., Vos, M. H., Fernandez, A., Brun, C., Gruss, A., and Gaudu, P. (2012). Discovery of intracellular heme-binding protein HrtR, which controls heme efflux by the conserved HrtB-HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* *287*, 4752-4758.
- Letoffe, S., Debarbieux, L., Izadi, N., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (2003). Ligand delivery by haem carrier proteins: the binding of *Serratia marcescens* haemophore to its outer membrane receptor is mediated by two distinct peptide regions. *Mol Microbiol* *50*, 77-88.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (2006). The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12891-12896.
- Letoffe, S., Ghigo, J. M., and Wandersman, C. (1994). Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9876-9880.
- Letoffe, S., Wecker, K., Delepierre, M., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (2005). Activities of the *Serratia marcescens* heme receptor HasR and isolated plug and beta-barrel domains: the beta-barrel forms a heme-specific channel. *J Bacteriol* *187*, 4637-4645.
- Levitt, M. D. (1970). Oxygen tension in the gut. *N Engl J Med* *282*, 1039-1040.
- Lewis, J. P., Plata, K., Yu, F., Rosato, A., and Anaya, C. (2006). Transcriptional organization, regulation and role of the *Porphyromonas gingivalis* W83 hmu haemin-uptake locus. *Microbiology* *152*, 3367-3382.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11070-11075.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* *444*, 1022-1023.

Lindquist, S., and Hernell, O. (2010). Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13, 314-320.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42, D490-495.

Lorber, B., and Swenson, R. M. (1975). The bacteriology of intra-abdominal infections. *Surg Clin North Am* 55, 1349-1354.

Louis, P. (2012). Does the human gut microbiota contribute to the etiology of autism spectrum disorders? *Dig Dis Sci* 57, 1987-1989.

Louis, P., Hold, G. L., and Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* 12, 661-672.

Lu, Z., and Imlay, J. A. (2017). The Fumarate Reductase of *Bacteroides thetaiotaomicron*, unlike That of *Escherichia coli*, Is Configured so that It Does Not Generate Reactive Oxygen Species. *MBio* 8.

Luckey, T. D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 25, 1292-1294.

Mackie, R. I., Sghir, A., and Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69, 1035S-1045S.

Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 3, 1021-1035.

Macpherson, A. J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665.

Macrae, F. A., St John, D. J., Caligiore, P., Taylor, L. S., and Legge, J. W. (1982). Optimal dietary conditions for hemocult testing. *Gastroenterology* 82, 899-903.

Macy, J., Probst, I., and Gottschalk, G. (1975). Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis by *Bacteroides fragilis* grown in the presence of hemin. *J Bacteriol* 123, 436-442.

Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H., Sogin, M. L., Foster, J. A., Edwards, W. H., Palumbo, P., and Hibberd, P. L. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 97, F456-462.

Manfredi, P., Lauber, F., Renzi, F., Hack, K., Hess, E., and Cornelis, G. R. (2015). New iron acquisition system in *Bacteroidetes*. *Infect Immun* 83, 300-310.

Marmol, I., Sanchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., and Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 18.

Martens, E. C., Chiang, H. C., and Gordon, J. I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 4, 447-457.

Martin, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J. J., Sokol, H., Verdu, E. F., Bercik, P., Bermudez-Humaran, L. G., and Langella, P. (2014). The commensal bacterium *Faecalibacterium*

prausnitzii is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis* 20, 417-430.

Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y., and Benno, Y. (2012). Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep* 2, 233.

Maurzerall, D. (1964). Normal Porphyrin Metabolism. *J Pediatr* 64, 5-16.

Mazmanian, S. K., Round, J. L., and Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625.

McCord, J. M., Keele, B. B., Jr., and Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 1024-1027.

McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., *et al.* (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5, 299-309.

Meehan, B. M., Baughn, A. D., Gallegos, R., and Malamy, M. H. (2012). Inactivation of a single gene enables microaerobic growth of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12153-12158.

Meehan, B. M., and Malamy, M. H. (2012). Fumarate reductase is a major contributor to the generation of reactive oxygen species in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* 158, 539-546.

Mehta, M., Goldfarb, D. S., and Nazzal, L. (2016). The role of the microbiome in kidney stone formation. *Int J Surg* 36, 607-612.

Mense, S. M., and Zhang, L. (2006). Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res* 16, 681-692.

Meslin, J. C., Sacquet, E., and Guenet, J. L. (1973). Action de la flore bactérienne sur la morphologie et la surface de la muqueuse de l'intestin grêle du rat. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 13, 203-214.

Meslin, J. C., Sacquet, E., and Raibaud, P. (1974). Action d'une flore microbienne qui ne déconjugue pas les sels biliaries sur la morphologie et le renouvellement cellulaire de la muqueuse de l'intestin grêle du rat. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 14, 709-720.

Metchnikoff, E. (1903a). Les microbes intestinaux. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 1.

Metchnikoff, E. (1903b). The nature of man: studies in optimistic philosophy: Heinemann).

Miethke, M. (2013). Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics* 5, 15-28.

Mirzaei, M. K., and Maurice, C. F. (2017). Menage a trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat Rev Microbiol*.

Mishra, S., and Imlay, J. A. (2013). An anaerobic bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, uses a consortium of enzymes to scavenge hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 90, 1356-1371.

- Mitsuoka, T. (1996). Intestinal flora and human health. *Asia Pac J Clin Nutr* 5, 2-9.
- Mitsuoka, T. (2014). Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 33, 99-116.
- Mokili, J. L., Rohwer, F., and Dutilh, B. E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* 2, 63-77.
- Moore, W. E., and Holdeman, L. V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961-979.
- Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., and Galy, B. (2017). A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* 168, 344-361.
- Neilands, J. B. (1981). Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* 50, 715-731.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., and Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 64, 43-60.
- Nuttall, G., and Thierfelder, H. (1895). Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal (Vie animale sans bactérie dans le tractus digestif). *Ztschr f physiol Chem* 21, 22.
- O'Brian, M. R., and Thony-Meyer, L. (2002). Biochemistry, regulation and genomics of haem biosynthesis in prokaryotes. *Adv Microb Physiol* 46, 257-318.
- Oates, P. S., and West, A. R. (2006). Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol* 12, 4281-4295.
- Olczak, T., Sroka, A., Potempa, J., and Olczak, M. (2008). Porphyromonas gingivalis HmuY and HmuR: further characterization of a novel mechanism of heme utilization. *Arch Microbiol* 189, 197-210.
- Oliver, W. W., and Wherry, W. B. (1921). Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. *J Infectious Diseases* 28, 2341-2344.
- Otto, B. R., Kusters, J. G., Luirink, J., de Graaf, F. K., and Oudega, B. (1996). Molecular characterization of a heme-binding protein of *Bacteroides fragilis* BE1. *Infect Immun* 64, 4345-4350.
- Otto, B. R., Sparrius, M., Wors, D. J., de Graaf, F. K., and MacLaren, D. M. (1994). Utilization of haem from the haptoglobin-haemoglobin complex by *Bacteroides fragilis*. *Microb Pathog* 17, 137-147.
- Otto, B. R., van Dooren, S. J., Dozois, C. M., Luirink, J., and Oudega, B. (2002). *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* 70, 5-10.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., and Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5, e177.
- Pan, N., and Imlay, J. A. (2001). How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mol Microbiol* 39, 1562-1571.

Parker, D. S. (1976). The measurement of production rates of volatile fatty acids in the caecum of the conscious rabbit. *Br J Nutr* 36, 61-70.

Perkins-Balding, D., Ratliff-Griffin, M., and Stojiljkovic, I. (2004). Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 154-171.

Pierre, F., Tache, S., Petit, C. R., Van der Meer, R., and Corpet, D. E. (2003). Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* 24, 1683-1690.

Pittman, K. A., and Bryant, M. P. (1964). Peptides and Other Nitrogen Sources for Growth of *Bacteroides Ruminicola*. *J Bacteriol* 88, 401-410.

Privalle, C. T., and Gregory, E. M. (1979). Superoxide dismutase and O₂ lethality in *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 138, 139-145.

Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Nakano, V., Avila-Campos, M. J., Piazza, R. M., and Wexler, H. M. (2007). Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb Pathog* 43, 78-87.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65.

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., *et al.* (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55-60.

Quinto, G. (1962). Nutrition of five *Bacteroides* strains. *J Bacteriol* 84, 559-562.

Rai, R., Saraswat, V. A., and Dhiman, R. K. (2015). Gut microbiota: its role in hepatic encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol* 5, S29-36.

Reeves, A. R., D'Elia, J. N., Frias, J., and Salyers, A. A. (1996). A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. *J Bacteriol* 178, 823-830.

Reeves, A. R., Wang, G. R., and Salyers, A. A. (1997). Characterization of four outer membrane proteins that play a role in utilization of starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 179, 643-649.

Riepe, S. P., Goldstein, J., and Alpers, D. H. (1980). Effect of secreted *Bacteroides* proteases on human intestinal brush border hydrolases. *J Clin Invest* 66, 314-322.

Riiser, A. (2015). The human microbiome, asthma, and allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 11, 35.

Robertson, K. P., Smith, C. J., Gough, A. M., and Rocha, E. R. (2006). Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. *Infect Immun* 74, 2304-2316.

Rocha, E. R., Herren, C. D., Smalley, D. J., and Smith, C. J. (2003). The complex oxidative stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression. *Anaerobe* 9, 165-173.

Rocha, E. R., and Krykunivsky, A. S. (2017). Anaerobic utilization of Fe(III)-xenosiderophores among *Bacteroides* species and the distinct assimilation of Fe(III)-ferrichrome by *Bacteroides fragilis* within the genus. *Microbiologyopen*.

Rocha, E. R., and Smith, C. J. (1999). Role of the alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) gene in oxidative stress defense of the obligate Anaerobe *bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* *181*, 5701-5710.

Rocha, E. R., and Smith, C. J. (2010). Haem and Iron Metabolism in *Bacteroides*. Iron uptake and homeostasis in microorganisms, 153.

Rocha, E. R., and Smith, C. J. (2013). Ferritin-like family proteins in the anaerobe *Bacteroides fragilis*: when an oxygen storm is coming, take your iron to the shelter. *Biometals* *26*, 577-591.

Rochat, T., Bermudez-Humaran, L., Gratadoux, J. J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., and Langella, P. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* *6*, 22.

Rockey, D. C. (1999). Occult gastrointestinal bleeding. *N Engl J Med* *341*, 38-46.

Rodriguez, J. M. (2014). The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* *5*, 779-784.

Rossi, M. S., Paquelin, A., Ghigo, J. M., and Wandersman, C. (2003). Haemophore-mediated signal transduction across the bacterial cell envelope in *Serratia marcescens*: the inducer and the transported substrate are different molecules. *Mol Microbiol* *48*, 1467-1480.

Rotstein, O. D., Pruett, T. L., Wells, C. L., and Simmons, R. L. (1987a). The role of *Bacteroides* encapsulation in the lethal synergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides* species studied in a rat fibrin clot peritonitis model. *J Infect* *15*, 135-146.

Rotstein, O. D., Wells, C. L., Pruett, T. L., Sorenson, J. J., and Simmons, R. L. (1987b). Succinic acid production by *Bacteroides fragilis*. A potential bacterial virulence factor. *Arch Surg* *122*, 93-98.

Salyers, A. A., Vercellotti, J. R., West, S. E., and Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl Environ Microbiol* *33*, 319-322.

Sawa, T., Akaike, T., Kida, K., Fukushima, Y., Takagi, K., and Maeda, H. (1998). Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *7*, 1007-1012.

Schaedler, R. W., Dubos, R., and Costello, R. (1965). Association of Germfree Mice with Bacteria Isolated from Normal Mice. *J Exp Med* *122*, 77-82.

Schiano, T. D. (2010). Treatment options for hepatic encephalopathy. *Pharmacotherapy* *30*, 16S-21S.

Schottelius, M. (1899). Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung (L'importance des bactéries intestinale dans la nutrition). *Archiv für Hygiene* *34*, 210.

Schroder, I., Johnson, E., and de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* *27*, 427-447.

- Schwabacher, H., Lucas, D. R., and Rimington, C. (1947). *Bacterium melaninogenicum*; a misnomer. *J Gen Microbiol* *1*, 109-120.
- Schwartz, S., Dahl, J., Ellefson, M., and Ahlquist, D. (1983). The "HemoQuant" test: a specific and quantitative determination of heme (hemoglobin) in feces and other materials. *Clin Chem* *29*, 2061-2067.
- Sears, C. L. (2001). The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon* *39*, 1737-1746.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., and Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* *90*, 859-904.
- Seksik, P., Sokol, H., Lepage, P., Vasquez, N., Manichanh, C., Mangin, I., Pochart, P., Dore, J., and Marteau, P. (2006). Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* *24 Suppl 3*, 11-18.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* *14*, e1002533.
- Sesink, A. L., Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., and Van der Meer, R. (1999). Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res* *59*, 5704-5709.
- Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C., and Luisi, B. (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur J Biochem* *268*, 5011-5026.
- Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H., and Mazmanian, S. K. (2016). The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* *167*, 915-932.
- Sheldon, J. R., and Heinrichs, D. E. (2015). Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev* *39*, 592-630.
- Smalley, J. W., and Olczak, T. (2017). Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* - strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. *Mol Oral Microbiol* *32*, 1-23.
- Snyder, M. L. (1936). The bacterial flora of meconium specimens collected from sixty-four infants within four hours after delivery. *J Pediatrics* *9*, 624-632.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P., Corthier, G., *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.
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., and Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* *307*, 1955-1959.
- Sperry, J. F., Appleman, M. D., and Wilkins, T. D. (1977). Requirement of heme for growth of *Bacteroides fragilis*. *Appl Environ Microbiol* *34*, 386-390.
- Spor, A., Koren, O., and Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* *9*, 279-290.

- Stauff, D. L., Torres, V. J., and Skaar, E. P. (2007). Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J Biol Chem* *282*, 26111-26121.
- Stecher, B., and Hardt, W. D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* *16*, 107-114.
- Stinson, L. F., Payne, M. S., and Keelan, J. A. (2016). Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-18.
- Stojiljkovic, I., Evavold, B. D., and Kumar, V. (2001). Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin Investig Drugs* *10*, 309-320.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., and Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* *65*, 4799-4807.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., Kubo, C., and Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* *558*, 263-275.
- Sund, C. J., Rocha, E. R., Tzianabos, A. O., Wells, W. G., Gee, J. M., Reott, M. A., O'Rourke, D. P., and Smith, C. J. (2008). The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence. *Mol Microbiol* *67*, 129-142.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L. P., and Lochs, H. (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* *43*, 3380-3389.
- Tally, F. P., Stewart, P. R., Sutter, V. L., and Rosenblatt, J. E. (1975). Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* *1*, 161-164.
- Tang, Y. P., Dallas, M. M., and Malmay, M. H. (1999). Characterization of the BatI (*Bacteroides* aerotolerance) operon in *Bacteroides fragilis*: isolation of a *B. fragilis* mutant with reduced aerotolerance and impaired growth in in vivo model systems. *Mol Microbiol* *32*, 139-149.
- Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourissons : état normal et pathologique: G. Carré et C. Naud eds).
- Tomas, J., Reygner, J., Mayeur, C., Ducroc, R., Bouet, S., Bridonneau, C., Cavin, J. B., Thomas, M., Langella, P., and Cherbuy, C. (2014). Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *ISME J*.
- Tomas, J., Wrzosek, L., Bouznad, N., Bouet, S., Mayeur, C., Noordine, M. L., Honvo-Houeto, E., Langella, P., Thomas, M., and Cherbuy, C. (2012). Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J* *27*, 645-655.
- Toprak, N. U., Yagci, A., Gulluoglu, B. M., Akin, M. L., Demirkalem, P., Celenk, T., and Soyletir, G. (2006). A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect* *12*, 782-786.

- Turlin, E., Heuck, G., Simoes Brandao, M. I., Szili, N., Mellin, J. R., Lange, N., and Wandersman, C. (2014). Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* 3, 849-859.
- Tzianabos, A. O., Onderdonk, A. B., Rosner, B., Cisneros, R. L., and Kasper, D. L. (1993). Structural features of polysaccharides that induce intra-abdominal abscesses. *Science* 262, 416-419.
- Väänänen, P., and Tenhunen, R. (1988). Rapid immunochemical detection of fecal occult blood by use of a latex-agglutination test. *Clin Chem* 34, 1763-1766.
- Van Camp, J. M., Tomaselli, V., and Coran, A. G. (1994). Bacterial translocation in the neonate. *Curr Opin Pediatr* 6, 327-333.
- van den Berg, J. W., Koole-Lesuis, R., Edixhoven-Bosdijk, A., and Brouwers, N. (1988). Automating the quantification of heme in feces. *Clin Chem* 34, 2125-2126.
- Van Den Elsen, L. W., Poyntz, H. C., Weyrich, L. S., Young, W., and Forbes-Blom, E. E. (2017). Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases. *Clin Transl Immunology* 6, e125.
- van Lanschot, M. C., Carvalho, B., Coupe, V. M., van Engeland, M., Dekker, E., and Meijer, G. A. (2017). Molecular stool testing as an alternative for surveillance colonoscopy: a cross-sectional cohort study. *BMC Cancer* 17, 116.
- Varel, V. H., and Bryant, M. P. (1974). Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Appl Microbiol* 28, 251-257.
- Vasquez, N., Mangin, I., Lepage, P., Seksik, P., Duong, J. P., Blum, S., Schiffrin, E., Suau, A., Allez, M., Vernier, G., *et al.* (2007). Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: a study using fluorescence in situ hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 13, 684-692.
- Veillon, A., and Zuber, A. (1898). Recherches sur quelques microbes strictements anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch Med Exp Anat Pathol Serie* 1, 517.
- Vieira, J. M., Seabra, S. H., Vallim, D. C., Americo, M. A., Fracallanza, S. E., Vommaro, R. C., and Domingues, R. M. (2009). *Bacteroides fragilis* induce necrosis on mice peritoneal macrophages: In vitro and in vivo assays. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 627-632.
- Vieira, J. M., Vallim, D. C., Ferreira, E. O., Seabra, S. H., Vommaro, R. C., Avelar, K. E., De Souza, W., Ferreira, M. C., and Domingues, R. M. (2005). *Bacteroides fragilis* interferes with iNOS activity and leads to pore formation in macrophage surface. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 607-613.
- Villarino, N. F., LeCleir, G. R., Denny, J. E., Dearth, S. P., Harding, C. L., Sloan, S. S., Gribble, J. L., Campagna, S. R., Wilhelm, S. W., and Schmidt, N. W. (2016). Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 2235-2240.
- Vogt, S. L., Pena-Diaz, J., and Finlay, B. B. (2015). Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 34, 106-115.

- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojarvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., *et al.* (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* *143*, 913-916 e917.
- Vuong, H. E., and Hsiao, E. Y. (2017). Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry* *81*, 411-423.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* *58*, 611-647.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., *et al.* (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* *472*, 57-63.
- Wexler, H. M. (2007). *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* *20*, 593-621.
- Wilson, K. H., and Blichington, R. B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* *62*, 2273-2278.
- Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5088-5090.
- Wojtowicz, H., Guevara, T., Tallant, C., Olczak, M., Sroka, A., Potempa, J., Sola, M., Olczak, T., and Gomis-Ruth, F. X. (2009). Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathog* *5*, e1000419.
- Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J. M., Fontecave, M., and Ollagnier de Choudens, S. (2010). Iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly: the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *J Biol Chem* *285*, 23331-23341.
- Woting, A., and Blaut, M. (2016). The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients* *8*.
- Wu, C. Y., Bermudez-Humaran, L. G., Yue, F., Li, M., and Zhang, L. P. (2015). Intranasal administration with recombinant *Lactococcus lactis* expressing heme oxygenase-1 reduces hyperoxia-induced lung inflammation in rat pups. *Biotechnol Lett* *37*, 1203-1211.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., *et al.* (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* *334*, 105-108.
- Wu, S., Lim, K. C., Huang, J., Saidi, R. F., and Sears, C. L. (1998). *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14979-14984.
- Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., Hooper, L. V., and Gordon, J. I. (2003). A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* *299*, 2074-2076.
- Xu, J., and Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10452-10459.

Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P. (2005). Respiration metabolism of Group B *Streptococcus* is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. *Mol Microbiol* 56, 525-534.

Zambolin, S., Clantin, B., Chami, M., Hoos, S., Haouz, A., Villeret, V., and Delepelaire, P. (2016). Structural basis for haem piracy from host haemopexin by *Haemophilus influenzae*. *Nat Commun* 7, 11590.

Zgurskaya, H. I., Krishnamoorthy, G., Ntrel, A., and Lu, S. (2011). Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria. *Front Microbiol* 2, 189.

Titre : Rôle de l'hème dans la primo-colonisation de *Bacteroides thetaiotaomicron* dans le tractus digestif

Mots clés : Hème, métabolites, primo-colonisation intestinale, oxygène, survie, *Bacteroides*

Résumé : Le microbiote intestinal comprend l'ensemble des micro-organismes présents dans le tractus digestif. Cette flore et sa variabilité est unique et spécifique à chaque individu. L'équilibre microbien, état critique pour la santé, se développe progressivement à partir de la naissance. En complément de la fonction connue du microbiote dans la digestion, son rôle est maintenant avéré comme central dans le métabolisme humain. Dans cet écosystème complexe dans lequel cohabitent et interagissent 10^{13} bactéries, les *Bacteroides*, genre majoritaire au sein du microbiote, prennent en charge les fibres non digestibles de l'alimentation. Ces bactéries, anaérobies à Gram négatif, sont particulièrement bien adaptées à l'environnement intestinal tout particulièrement dans le domaine de la prise en charge des polysaccharides complexes et celui de la résistance à l'oxygène.

Etonnamment, bien que l'hème soit un métabolite requis pour la croissance des *Bacteroides*, ces bactéries sont incapables de le synthétiser. L'hème, constitué d'un atome de fer fixé sur une porphyrine, est un cofacteur impliqué dans de nombreuses réactions enzymatiques essentielles au métabolisme central. Sa réactivité biochimique le rend responsable d'une induction de phénomènes inflammatoires de l'intestin. Nous avons étudié les interactions entre la bactérie *Bacteroides*

thetaitaomicron et l'hème environnemental. Nous avons d'abord développé un test permettant la détection de quantités d'hème de l'ordre du nanogramme dans des milieux complexes tels que le contenu intestinal. Nous avons ensuite montré que la bactérie commensale *E. coli* n'est pas la principale source d'hème lors de la colonisation du tractus digestif par *Bacteroides* dans un modèle de souris axénique et que l'hôte remplit ce rôle. Nous avons mis en place un système permettant de moduler la quantité d'hème présente dans le tractus digestif en piégeant la molécule sur l'hémophore HasA de *Serratia marcescens*. Nous avons confirmé que le système HasA était actif in vitro. Les résultats préliminaires montrent que d'une part il réduit la quantité d'hème intestinal disponible et d'autre part cela entraîne un retard lors de la colonisation du tractus digestif par *Bacteroides*. Ce travail fournit des outils permettant de mieux comprendre les facteurs influant sur l'implantation des *Bacteroides* et souligne l'importance de l'hème dans le processus crucial de la primo-colonisation. Mais cela autorise également à plus long terme d'envisager l'utilisation de ce système pour diminuer la quantité d'hème disponible dans l'intestin et donc son effet pro-inflammatoire, dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Title: The role of heme in primary colonization of the digestive tract by *Bacteroides thetaiotaomicron*

Keywords: Heme, metabolites, intestinal primocolonization, oxygen, survival, *Bacteroides*

Abstract: The intestinal microbiota comprises the numerous microorganisms colonizing the digestive tract. This flora, and the variations it undergoes are unique and specific to each individual. The microbial balance, which is a determinant of our state of health, develops gradually from birth. In addition to the known roles of the microbiote in digestion, it is now recognized as an important contributor to human metabolism. Among the 10¹³ bacteria inhabiting the human gut, the genus *Bacteroides* comprises the dominant genus, and is needed to digest complex dietary polysaccharide fibers. This feature, and the resistance to trace oxygen of these Gram-negative anaerobes make them particularly well adapted to the intestinal environment.

Remarkably, although heme is a required metabolite for *Bacteroides* growth, these bacteria are incapable of heme synthesis. Heme, which comprises an iron atom trapped within a porphyrin ring, is a cofactor involved in numerous enzymatic reactions essential to central metabolism. Its bioactivity may also provoke intestinal inflammatory phenomena. We investigated the interactions between the bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* and environmental heme. We first

developed a test to detect nanogram amounts of heme in complex media such as intestinal contents. We then showed that the commensal bacterium *Escherichia coli* donates heme to *B. thetaiotaomicron* in vitro. Nevertheless, we found that *E. coli* is not the major heme source for *Bacteroides* colonization, as tested in a germfree mouse model. This study led us to conclude that the host must be the major heme donor. We then set up a system to modulate heme availability in the digestive tract by capturing free heme on a hemophore HasA, from *Serratia marcescens*. We confirmed the HasA system was active in vitro. Preliminary experiments indicate that it 1- reduces levels of intestinal heme, and 2- delays *B. thetaiotaomicron* colonization. The present work provides tools for better understanding the factors needed for *Bacteroides* implantation in the gut and underlines the importance of heme in this crucial process of primocolonization. In the longer term, the bacterial heme-capture system may be considered as a means of decreasing free intestinal pools of heme and thereby its pro-inflammatory effect, in chronic inflammatory bowel disease.

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

