



HAL
open science

Caractérisation des propriétés de surface, d'adhésion et de formation de biofilm de *Parabacteriodes distasonis* et étude de son interaction avec son hôte : du potentiel probiotique au pathogène opportuniste

Jordan Chamarande

► To cite this version:

Jordan Chamarande. Caractérisation des propriétés de surface, d'adhésion et de formation de biofilm de *Parabacteriodes distasonis* et étude de son interaction avec son hôte : du potentiel probiotique au pathogène opportuniste. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0001 . tel-04056815

HAL Id: tel-04056815

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04056815>

Submitted on 3 Apr 2023

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Jordan CHAMARANDE**

Caractérisation des propriétés de surface, d'adhésion et de formation de biofilm de *Parabacteroides distasonis* et étude de son interaction avec son hôte : du potentiel probiotique au pathogène opportuniste

Soutenue publiquement le 05 Janvier 2023 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Directrices de thèse :	Mme Catherine CAILLIEZ-GRIMAL	Maître de conférences, HDR, Université de Lorraine, Nancy, France
	Mme Corentine ALAUZET	Maître de conférences, PH, Université de Lorraine, Nancy, France
Rapporteurs :	M. Benoit FOLIGNE	Professeur des Universités, Université de Lille, Lille, France
	M. Jean-Pierre GRILL	Professeur des Universités, Sorbonne Université, Paris, France
Examineurs :	Mme Muriel THOMAS	Directrice de Recherche, Micalis, INRAE, Jouy-en-Josas, France
	M. Alain LOZNIIEWSKI	Professeur des Universités, PH, Université de Lorraine, Nancy, France

« Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world. »

- Louis Pasteur -

Remerciements

Ce travail s'est déroulé au laboratoire Stress, Immunité, Pathogènes (SIMPA) de l'Université de Lorraine. Je remercie M. le Professeur Jean-Pol Frippiat de m'avoir accueilli et permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire. Merci également pour l'aide que vous m'avez apporté tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier très sincèrement MM. les Professeurs Benoit Folligné et Jean-Pierre Grill d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi que pour l'analyse et la critique de ce mémoire. J'exprime également ma gratitude à Mme la Directrice de Recherche Muriel Thomas et M. le Professeur Alain Lozniewski pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Merci également à Mme la Directrice de Recherche Sophie Payot-Lacroix, M. le Docteur Xavier Bellanger et M. le Professeur Thomas Guillard qui m'ont suivi tout au long de cette thèse en faisant partie de mon comité de suivi de thèse ainsi qu'à Mmes les Docteurs Céline Caillet, Marianne Lind et Nadine Pavlov d'avoir pris le temps de me partager vos connaissances pratiques et théoriques. Votre aide, vos remarques et vos critiques m'ont beaucoup aidé.

A mes directrices de thèse, Catherine, Corentine et Lisiane. Un simple mot de remerciement ne suffirait pas à exprimer ce que vous avez été pour moi pendant ces 3 années. Pour tout ce que vous avez fait mais également pour les personnes que vous êtes, je vous suis très reconnaissant. Vous m'avez énormément appris aussi bien personnellement que professionnellement. Merci d'avoir été mes encadrantes, mes collègues et également mes amies. Vous avoir rencontré a été l'une des plus belles récompenses de ce travail.

Plus spécifiquement pour toi Cathy, je me demande toujours comment tu as fait pour être aussi patiente et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes multiples interrogations. Tu as su trouver l'équilibre parfait entre m'aider ou au contraire me laisser le champ libre tout au long de ce projet. Merci pour ta confiance, ta patience, ton professionnalisme, tu es une encadrante en or !

A toi Corentine. Merci de m'avoir partagé tes nombreuses connaissances qui m'ont beaucoup aidé pendant ce projet. Tu m'as toujours reçu avec le sourire malgré mes nombreux allers-retours dans ton bureau. Merci également pour ton soutien, ton humanité, ta bienveillance et pour t'être toujours assuré que ce projet se déroulait dans les meilleures conditions.

A toi Lisiane. Tu es une personne qui a le cœur sur la main et qui fera toujours tout pour aider les autres. Tu as été mon ange gardien pendant cette thèse. Je ne te remercierai jamais

assez pour ton soutien tout au long de ces trois années durant lesquelles tu es devenue bien plus qu'une collègue. Merci également à vous trois, avec Fred et Max, de m'avoir accueilli les bras ouverts chez vous.

Je tiens également à remercier les personnes sans qui tout ça n'aurait jamais pu être possible. Sœurlette, Maman, Papa, Wann merci pour tout. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours fait confiance, soutenu et accompagné dans toutes mes (més)aventures. Je vous dédie ce travail et tout ce qu'il représente pour moi. Je n'ai été que la main d'une encre que vous m'avez fournie.

A tous les membres de ma famille qui m'ont également suivi et soutenu, Tata, les Tontons, Anaïs, Tom, un grand merci à vous également de m'avoir encouragé. Ce travail est également pour vous. Et des bisous au plus beau des filleuls.

La famille c'est aussi les ami(e)s. Méliiss, tu m'as toujours soutenu et motivé. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as pu faire et ce que tu représentes pour moi. Jerem, Kro, Lilic, Valou merci d'avoir partagé avec moi cette coloc à distance et toutes ces soirées. Valou, on ne se connaît pas depuis très longtemps mais ça ne change en rien à la profondeur de notre amitié. A toi mon Kro, encore toutes mes félicitations pour ta demande. Cloé aura vaincu mais ce n'est que partie remise. Orane, merci pour toutes ces années passées à tes côtés ainsi que de m'avoir toujours encouragé dans ce que j'entreprenais. Un gros clin d'œil également à toi Momo, merci de nous permettre de nous retrouver chaque année au Fort. Dijon > Athis c'est indéniable. Cœur sur toi aussi Keï, nous n'avons pas eu la chance de nous voir durant ces trois dernières années mais ce n'est que pour mieux se retrouver !

Tous vous remercier individuellement serait impossible alors je dirais simplement : à la Fafa, aux amis d'Ingé, de Rosoy, de l'IUT et à tous les autres un grand merci d'avoir partagé une partie de cette aventure à mes côtés durant ces années d'études et de continuer d'être là.

Aux rencontres plus récentes, Anne-Lyse, Gaetano, Julie, Mathieu, Manu, Maurine, Paul, Pauline, Pierre, Thomas un grand merci. Cette aventure n'a été que plus amusante et enrichissante à vos côtés. En espérant continuer de partager de bons moments avec vous. Petite mention spéciale aux fous rires et galères passés avec toi Maurine (en espérant que tu ne fasses pas exploser les micro-ondes chez toi ou que tu ne laisses pas les robinets ouverts), aux « tu préfères » de Mathieu, aux séances de squash particulièrement non-productives avec Paul et aux discussions, soirées, restaurants et sorties avec Julie et Gaetano. C'est grâce à ces moments qu'il fait bon vivre même pendant une thèse !

Merci également à tous les membres du laboratoire SIMPA, Anne, Armelle, Florence, Sandra, Stéphan, Patricia ainsi que tous les autres pour toute l'aide que vous m'avez apporté ainsi que pour votre accueil et votre bonne humeur.

Je tiens également à remercier les stagiaires qui ont contribué à ce travail, et particulièrement à Alaïs, Dayan, Lucas, Lucie et Marie avec qui un lien d'amitié a suivi le stage. Alaïs, la prochaine fois que tu utilises un lecteur de plaque, s'il te plaît ne sélectionne aucun puits. Dayan, on attend toujours ton rapport de stage. Lucas, les produits chimiques c'est sous la sorbonne. Lucie, *P. distasonis* ne se retrouve pas dans l'alimentation (j'espère que tu profites à fond de l'école d'ingé !). Marie, au bon souvenir de cette première journée de Luminex qui a bien failli se terminer sans résultat. Bon courage à vous tous pour la poursuite de votre aventure professionnelle et personnelle !

J'aimerais également remercier les personnes qui ont fortement contribué à mon apprentissage et sans qui ce parcours n'aurait peut-être jamais existé. Tania, grâce à toi j'ai pu découvrir ce monde merveilleux qu'est la recherche et ce de la plus belle des façons. Tu es la personne qui m'a donnée envie de continuer sur cette voie et qui a initié mon parcours en tant que potentiel futur chercheur. Muriel, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir toujours soutenu dans mes choix et de m'avoir permis de me dépasser pour en être là où j'en suis aujourd'hui. Vous faites toutes deux parties des fondations qui ont permis la construction et la finalisation de ce projet de thèse. Merci également à toi Hiroshi pour le temps que tu as passé à me partager ton savoir.

To you Patrick, my trouble-maker master, I would also like to thank you for your support during these last 3 years. You never missed an opportunity to motivate me. I can't wait to visit you again and to make some trouble over there as you taught me.

Aux personnes ayant contribué à la rédaction et à la correction de ce manuscrit et à tous ceux que j'ai pu oublier mais qui ont participé de près ou de loin à cette aventure, un grand MERCI !

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	1
Liste des abréviations	1
Avant-propos	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique et Objectifs.....	7
I. Le microbiote intestinal	8
I.1. Définition et généralités.....	8
I.2. Techniques d'étude du microbiote intestinal	9
1. Approche culture-dépendante	9
2. Approche culture-indépendante	10
I.3. Composition du MI.....	11
I.4. Rôles du MI	13
1. Métabolisme des nutriments	13
2. Epithélium intestinal	14
3. Système immunitaire.....	15
4. Système nerveux	15
I.5. Dysbiose intestinale et pathologies.....	16
1. Maladies inflammatoires chroniques intestinales	16
2. Obésité	17
3. Diabète	18
4. Autres pathologies.....	18
I.6. Le MI comme cible thérapeutique	19
1. Prébiotiques.....	19
2. Probiotiques	20
3. Bactériothérapie fécale.....	23
II. Interactions hôte-MI et colonisation de l'épithélium intestinal	25
II.1. Structure de l'épithélium intestinal.....	25
II.2. Colonisation de l'épithélium intestinal.....	27
II.3. Quand les bactéries s'adressent à l'hôte	28
1. La paroi bactérienne.....	28
2. Métabolites synthétisés ou dérivés du MI.....	32
3. Quorum sensing	33
II.4. Quand l'hôte s'adresse aux bactéries.....	35
1. Hôte et Quorum sensing.....	35
2. Inhibiteur du Quorum sensing.....	35
III. <i>Parabacteroides distasonis</i> , un allié au bien-être de l'hôte ?.....	36
III.1. <i>Parabacteroides distasonis</i>	37
1. Genre <i>Parabacteroides</i>	37
2. Caractéristiques morphologiques de <i>P. distasonis</i>	37
3. Ecologie de <i>P. distasonis</i>	37
4. Caractéristiques métaboliques de <i>P. distasonis</i>	38
5. Caractéristiques génomiques de <i>P. distasonis</i>	38
III.2. Un rôle bénéfique ?	40
1. Intégrité de l'épithélium intestinal	40
2. Maladies inflammatoires et cancers	40
3. Diabète et obésité	41

4. Autres rôles bénéfiques	42
III.3. Ou un rôle délétère ?	43
1. Intégrité de l'épithélium intestinal	43
2. Maladies inflammatoires	43
3. Diabète	44
4. Autres rôles délétères	44
IV. Objectifs	44
1. Propriétés de surface, d'adhésion et de formation de biofilm de <i>P. distasonis</i> et impact du stress sur ces propriétés	45
2. Structures externes de <i>P. distasonis</i> impliquées dans son maintien au sein du MI et dans sa potentielle pathogénicité	45
3. Propriétés de <i>P. distasonis</i> liées à la sélection de nouveaux produits biothérapeutiques.....	45
Chapitre II : Résultats	47
I. Etudes des propriétés d'adhésion et de formation de biofilm de <i>P. distasonis</i> et impact des molécules produites lors d'un stress sur ces propriétés	49
I.1. Introduction.....	49
I.2 : Surface Properties of <i>Parabacteroides distasonis</i> and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities	51
Abstract	51
1. Introduction.....	51
2. Materials and Methods.....	53
3. Results.....	56
4. Discussion	61
4. Conclusion	63
References.....	64
I.3. Contributions de l'article	70
II. Etude <i>in silico</i> des structures de surface de <i>P. distasonis</i> impliquées dans son maintien au sein du microbiote intestinal	73
II.1. Introduction	73
II.2 : In Silico Study of Cell Surface Structures of <i>Parabacteroides distasonis</i> Involved in Its Maintenance within the Gut Microbiota	75
Abstract	75
1. Introduction.....	75
2. Results.....	76
3. Discussion	87
4. Materials and Methods.....	90
References.....	92
II.3. Contributions de l'article	99
III. Propriétés de <i>P. distasonis</i> liées à la sélection de nouveaux produits biothérapeutiques	102
III.1. Introduction	102
III.2 : <i>Parabacteroides distasonis</i> Properties Linked to the Selection of New Biotherapeutics .	105
Abstract	105
1. Introduction.....	105
2. Materials and Method	106
3. Results.....	108
4. Discussion	113
5. Conclusions.....	116
References.....	116
III.3. Contributions de l'article.....	119
Chapitre III : Conclusion et Perspectives	121

Références bibliographiques.....	131
Annexe.....	153
Application de la méthode vapeur pour l'étude des biofilms des bactéries anaérobies	155
Abstract	155
1. Introduction.....	155
2. Methods.....	156
3. Results and discussion	157
4. Conclusion	159
5. Limitations	160
References.....	160

Liste des figures

Figure 1. Exemple taxonomique de la composition du MI.	12
Figure 2. Mécanismes d'action des probiotiques.	21
Figure 3. Structure et organisation de l'épithélium intestinal humain et représentation d'une jonction serrée.	25
Figure 4. Communication entre les différents types cellulaires présents à l'interface de l'épithélium intestinal.	27
Figure 5. Détection du LPS bactérien par les TLR4 et activation de NF- κ B et IRF-3 impliqués dans la réponse inflammatoire.	30
Figure 6. Principe général du Quorum sensing avec pour exemple l'induction de la formation d'un biofilm.	33
Figure 7. Représentation schématique des objectifs de la thèse.	46
Figure 8. Homo-aggregation coefficient, adhesion and biofilm formation capacities of 14 strains of <i>P. distasonis</i>	57
Figure 9. Impact of electrolyte concentration on the electrophoretic mobility of 3 <i>P. distasonis</i> strains and controls LGG, <i>Bf</i> 638R and <i>Bt</i> VPI-5482.	59
Figure 10. (A) Two-dimensional principal component (2-D PCA) analysis biplot showing relationship amongst the charge density, the surface permeability, the homo-aggregation coefficient, the adhesion and biofilm formation capacities of <i>P. distasonis</i> . (B) Dendrogram representing clustering of <i>P. distasonis</i> strains based on the similarity of their capacities analyzed by hierarchical agglomerative clustering (HAC).	60
Figure 11. Impact of dopamine, epinephrine, norepinephrine, serotonin and cortisol on the adhesion and biofilm formation capacity of 14 strains of <i>P. distasonis</i>	61
Figure 12. Arbitrarily-PCR (a) and Enterobacterial Repetitive Intergenic-PCR (b) patterns of 19 strains of <i>P. distasonis</i>	68
Figure 13. Impact of electrolyte concentration on the electrophoretic mobility of 14 <i>P. distasonis</i> strains and controls LGG, <i>Bf</i> 638R and <i>Bt</i> VPI-5482.	69
Figure 14. <i>P. distasonis</i> genomes characterization.	78
Figure 15. Identification of <i>upxY</i> -like gene clusters on <i>P. distasonis</i> genomes.	83
Figure 16. Identification of <i>fim</i> -like gene clusters on <i>P. distasonis</i> genomes compared to <i>P. gingivalis</i> cluster.	84
Figure 17. Identification of <i>mfa</i> -like gene clusters on <i>P. distasonis</i> genomes compared to <i>P. gingivalis</i> and <i>B. thetaiotaomicron</i> clusters.	85
Figure 18. Classification and characterization of <i>rfaB</i> genes of <i>P. distasonis</i>	86
Figure 19. Hypothetical schematic representation of <i>P. distasonis</i> (A) fimbriae and (B) pili from the Fim and Mfa system, respectively.	89
Figure 20. Multiple-sequence alignment of <i>P. distasonis</i> (A) <i>uphY</i> -like, (B) <i>fim</i> -like and (C) <i>mfa</i> -like genes listed in Table 3.	96
Figure 21. Propriétés immunomodulatrices de (A) <i>P. distasonis</i> ATCC 8503 ^T et (B) <i>P.</i>	

<i>distasonis</i> CS1 sur PBMC non stimulées et stimulées par le LPS d' <i>E. coli</i> (18h ; 100 ng/mL). Les cytokines ont été quantifiées par Cytokine Array.	103
Figure 22. Adhesion capacity of 14 strains of <i>P. distasonis</i> and LGG (positive control) on Caco-2 cells after 3 h of incubation at 37 °C under 5% CO ₂ atmosphere.	109
Figure 23. Bacterial survival of 14 <i>P. distasonis</i> strains to gastric stress after 120 min of incubation.	109
Figure 24. Effect of 14 strains of <i>P. distasonis</i> on IL-8 production by nonstimulated and LPS-stimulated (4 h; 1 ng/mL) HT-29 cells.	110
Figure 25. Effect of <i>P. distasonis</i> strains on Caco-2 monolayer TEER.	110
Figure 26. Immunomodulation properties of <i>P. distasonis</i> on nonstimulated and LPS-stimulated (18 h; 100 ng/mL) PBMCs.	112
Figure 27. Résumé des principaux résultats obtenus dans ce projet.	122
Figure 28. Analyse génomique comparative d'un gène <i>luxR</i> de <i>B. fragilis</i> ATCC 25285 ^T chez <i>P. distasonis</i> ATCC 8503 ^T	126
Figure 29. Biofilm quantification by CV (OD _{620nm}) after steam (S) or the pipette based-washing method (P) for <i>S. aureus</i> SH1000 (Sa), <i>B. fragilis</i> 638R (Bf), <i>P. distasonis</i> DSM 20701 ^T (Pd), <i>C. perfringens</i> CIP 6060 (Cp), <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (Ca), <i>F. solani</i> CBS 124631 (Fs) and <i>A. fumigatus</i> ATCC 3626 (Af).	158
Figure 30. Viable cell quantification by enumeration for bacteria and XTT staining (OD _{450nm}) for fungi after steam-washing.	158
Figure 31. Biofilm quantification by CV staining (OD _{620nm}) or PBS-turbidity (OD _{490nm}) after steam-washing for <i>B. fragilis</i> 638R (Bf), <i>P. distasonis</i> DSM 20701 ^T (Pd) and <i>C. perfringens</i> CIP 6060 (Cp).	159

Liste des tableaux

Tableau 1. Charge density (ρ_0/F , expressed in concentration of (anionic) charges) and cell surface permeability ($1/\lambda_0$) of <i>P. distasonis</i> and control strains.....	58
Tableau 2. <i>P. distasonis</i> strain isolation.....	77
Tableau 3. <i>P. distasonis</i> genes sharing synteny with reference genes and auto-assigned as part of CPS, fimbriae or pili synthesis.....	79
Tableau 4. Identification of CPS loci in 26 <i>P. distasonis</i> genomes and phage insertion within clusters.....	83
Tableau 5. Identification of cell surface structures present on 26 <i>P. distasonis</i> strains based on host status.	87
Tableau 6. Reference genes used to determine external structures of <i>P. distasonis</i>	91
Tableau 7. Identification of CPS loci in 26 <i>P. distasonis</i> genomes.	97
Tableau 8. <i>rfaA</i> copy number and classification of each <i>P. distasonis</i> strain.	98
Tableau 9. Summary of the beneficial and nondetrimental properties of the 14 strains of <i>P. distasonis</i> investigated in this study.	115

Liste des abréviations

%	: pourcentage
°C	: degré Celsius
AA	: abcès abdominal
ACBS	: animalerie du campus biologie santé
ACT	: coefficient d'homo-agrégation
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNr	: acide désoxyribonucléique ribosomal
AGCC	: acide gras à chaîne courte
AHL	: acyl-homosérine lactones
AI	: auto-inducteur
ANOVA	: analyse de la variance
ARN	: acide ribonucléique
ARNr	: acide ribonucléique ribosomal
ATCC	: collection américaine de micro-organismes
B	: bactériémie
BBA	: Brucella Blood Agar
BHE	: barrière hémato-encéphalique
BHI	: infusion cœur-cerveau
BLAST	: outil de recherche d'alignement local de base
bp, pb	: paire de base
Bru	: Brucella
CCD	: dispositif à couplage de charges
CD, MD	: maladie de Crohn
CDS	: séquence codante
CFU	: unité formant colonie
CHRU	: Centre Hospitalier Régional Universitaire
CIP	: collection de l'Institut Pasteur
cm, mm, µm	: centimètre, millimètre, micromètre
CNES	: Centre National d'Etudes Spatiales
CO ₂	: dioxyde de carbone
CPS	: capsule polysaccharides
CS	: souche clinique
CUMS	: chronic unpredictable mild stress
CV	: cristal violet
CXCL	: chemokine (C-X-C motif) ligand
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DNA	: acide désoxyribonucléique
DSM	: collection allemande de micro-organismes
DSS	: sodium dextran sulfate
DT	: diabète de type
EFSA	: Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments
EPS	: exopolysaccharide
ESA	: Agence Européenne Spatiale
Fim	: système fimbriae
FISH	: l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
g, mg, µg	: gramme, milligramme, microgramme
GABA	: acide γ-aminobutyrique

GEPAM	: plateforme expérimentale gravitationnelle pour les modèles animaux
GLP-1	: glucagon-like peptide-1
GRAS	: generally recognized as safe
h, min, s	: heure, minute, seconde
HAC	: classification ascendante hiérarchique
HCl	: acide chlorhydrique
HU	: hindlimb unloading
IFN	: interferon
Ig	: immunoglobuline
IL	: interleukine
IRF	: interferon regulatory factor
ISS	: Station Spatiale Internationale
JS	: jonction serrée
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L, mL, μ L	: litre, millilitre, microlitre
LGG	: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LPS	: lipopolysaccharides
M, mM, μ M	: mol/litre, millimol/litre, micromol/litre
MaGe	: plateforme d'annotation et d'analyse du génome microbien
MALDI-TOF	: spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol
MAMP	: motifs moléculaires associés aux microbes
Mb	: mégabase
MC	: maladie de Crohn
Mfa	: système pilus de type V
MH	: Mueller-Hinton
MI, GM	: microbiote intestinal
MICI	: maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MOPS	: acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MTX	: méthotrexate
MyD88	: réponse primaire de différenciation myéloïde 88
Nb	: nombre
NBRC	: conseil national des soins respiratoires
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	: facteur de transcription κ B
NGS	: séquençage à haut débit
NK	: natural killer
NLR	: récepteur NOD-like
NOD	: nucleotide oligomerization domain
NPB, NBP	: nouveau produit biothérapeutique
OD	: densité optique
OI	: infection ostéoarticulaire
OM	: membrane externe
P	: méthode de lavage à la micropipette
p	: valeur-p, p-value
Pa	: pascal
PAMP	: motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC	: cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	: tampon phosphate salin
PCA	: analyse en composantes principales

PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
Pglyrps	: peptidoglycan recognition proteins
pH	: potentiel hydrogène
PNG	: probiotiques de nouvelle génération
PRR	: récepteurs de reconnaissance des motifs
QPS	: qualified presumption of safety
QS	: quorum sensing
RCH	: rectocolite hémorragique
RPM	: random positonning machine
S	: méthode de lavage à la vapeur
SG	: SYBR Green
SLA	: sclérose latérale amyotrophique
SNC	: système nerveux central
SS	: système de sécrétion
SST	: système de sécrétion de type
T	: type
TAS2R	: récepteurs de la saveur amère
TLR	: récepteur Toll-like
TMF	: transplantation de microbiote fécal
TNBS	: acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique
TNF	: facteur de nécrose tumorale
TRIF	: Toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adaptor-inducing interferon- β
UCP1	: uncoupling protein 1
v/v	: volume par volume
VI	: infection vulvaire
xg	: accélération de la pesanteur
XTT	: chlorure de triphényltétrazolium

Les genres bactériens :

B.	: <i>Bacillus</i>
B.	: <i>Bacteroides</i>
E.	: <i>Escherichia</i>
L.	: <i>Lactobacillus</i>
P.	: <i>Parabacteroides</i>
P.	: <i>Porphyromonas</i>
S.	: <i>Staphylococcus</i>
S.	: <i>Streptococcus</i>
C.	: <i>Clostridium</i>
C.	: <i>Clostridioides</i>

Avant-propos

Le laboratoire **Stress, IMM**unité **PA**thogènes (SIMPA) a été créé en 2013 et fait partie du pôle Biologie-Médecine-Santé (BMS) situé sur le Campus Biologie et Santé de l'Université de Lorraine. Il rassemble immunologistes, neurobiologistes et microbiologistes dont les études portent sur l'impact de **stress socio-environnementaux chroniques** et/ou **gravitaires** sur le système immunitaire, le système nerveux central et les micro-organismes, plus particulièrement au sein du microbiote intestinal (MI).

Les principales cibles des recherches portant sur les stress gravitaires sont les astronautes via différents projets s'effectuant en collaboration avec l'Agence Spatiale Européenne (ESA) et le Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). Parmi ces projets se trouve notamment le projet Pre-Glu visant à étudier l'effets des oligosaccharides du lait humain (prébiotiques) sur le MI, le système immunitaire et le métabolisme des adultes durant un hivernage en Antarctique (modèle d'étude des astronautes). Le but de ce dernier est de développer de nouvelles stratégies permettant de limiter l'impact de ces stress sur la santé. Le stress étant omniprésent dans notre société, l'étude des stress socio-environnementaux chroniques permet d'élargir l'application des recherches menées au laboratoire à l'ensemble de la population.

Le MI, bien que décrit pour la première fois à la fin des années 1800, est devenu un sujet d'étude en plein essor, avec notamment la mise au point de nouvelles techniques d'analyses dont le séquençage à haut débit du matériel génétique. Depuis lors, une nouvelle ère d'études visant à discriminer les micro-organismes bénéfiques des pathogènes a fait son apparition au sein de la communauté scientifique et a radicalement changé la façon dont nous percevons la santé et les maladies.

L'implication du MI dans les fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques en fait un organe à part entière dont l'importance n'est plus à remettre en question. De plus, une altération de sa composition, également appelée dysbiose, est étroitement liée au développement ou à l'aggravation de diverses pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'obésité, le diabète, les maladies du foie, cardiovasculaires, neurodégénératives et également dans le développement de cancers.

Le MI est donc devenu une cible thérapeutique majeure. Les probiotiques (micro-organismes vivants), les prébiotiques (éléments favorisant la croissance ou l'activité de micro-

organismes bénéfiques) ou la transplantation fécale permettent notamment de moduler et rééquilibrer sa composition en cas de dysbiose. Cependant, il n'existe pas encore de traitement curatif pour certaines pathologies liées au MI, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Comprendre les mécanismes sous-jacents aux interactions hôte-MI et définir de nouveaux produits biothérapeutiques est donc un enjeu majeur pour combattre ces pathologies.

Les travaux effectués au laboratoire ont permis d'identifier *Parabacteroides distasonis* comme l'une des espèces bactériennes du MI les plus négativement impactées lors d'un stress chronique aussi bien gravitaire que socio-environnemental. Cette espèce bactérienne qui appartient à la famille des *Tannerellaceae*, est une bactérie anaérobie stricte à Gram négatif, commensale du MI de l'Homme et faisant partie du *core microbiome*. De récentes études suggèrent que *P. distasonis* pourrait exercer des effets protecteurs contre des maladies, notamment la sclérose en plaques, le diabète de type II, le cancer colorectal et les maladies inflammatoires. Cette bactérie pourrait être utilisée comme potentiel nouveau produit biothérapeutique.

Cependant, d'autres données expérimentales tendent à montrer *P. distasonis* comme potentiel pathogène opportuniste. En effet, il a été observé lors d'études une corrélation positive entre sa présence dans le MI et l'aggravation des pathologies inflammatoires telles que la colite chez la souris ou encore dans l'intensification des symptômes de la maladie de Charcot. Il semblerait donc que *P. distasonis* puisse avoir un rôle dichotomique dépendant du contexte, de l'environnement et possiblement de la souche.

Cette thèse a pour objectif de déterminer comment *P. distasonis* qui est largement conservée au sein de notre MI se maintient dans cet environnement très compétitif, de définir plus spécifiquement les éléments impliqués dans son comportement parfois bénéfique, parfois délétère et ses caractéristiques liées à la sélection de nouvelles souches biothérapeutiques.

Ce manuscrit se décline en trois parties :

La synthèse bibliographique et les objectifs, présentant l'état de l'art des grands domaines abordés dans cette thèse ainsi que les principaux objectifs de ce projet :

- La première partie définit ce qu'est le MI, ce qui le compose, son rôle dans la santé humaine et les traitements actuellement disponibles pour traiter les pathologies intestinales ;
- La seconde partie décrit plus spécifiquement les mécanismes sous-jacents aux interactions du MI avec son hôte et les éléments impliqués dans leur communication bidirectionnelle ;
- La troisième partie concerne plus spécifiquement *P. distasonis* et les connaissances acquises sur cette bactérie au cours des dernières années, dont les effets principalement bénéfiques mais parfois délétères qu'elle apporte à son hôte ;
- La quatrième partie porte sur les principaux objectifs de cette thèse.

Les résultats, présentés sous forme de 3 parties comprenant chacune une publication scientifique acceptée :

- La première partie est axée sur les propriétés d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis* et de l'impact d'un stress direct sur ces propriétés ;
- La seconde partie se concentre sur l'étude *in silico* des structures de surface de *P. distasonis* impliquées dans son maintien et dans ses interactions au sein du MI ;
- La troisième partie concerne la caractérisation des propriétés de *P. distasonis* liées à la sélection de nouveaux produits biothérapeutiques.

Les conclusions générales et les perspectives de cette étude.

*Valorisation scientifique***Publications**

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Céline Caillet, Laurence Mathieu, Jérôme FL Duval, Alain Lozniewski, Jean-Pol Fripiat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal. Surface properties of *Parabacteroides distasonis* and impacts of stress-induced molecules on its surface adhesion and biofilm formation capacities. *Microorganisms* 2021, 9, 1602. IF : 4.926

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal. *In silico* study of cell surface structures of *Parabacteroides distasonis* involved in its maintenance within the gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 9411. IF : 6.208

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Nadine, Pavlov, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal. *Parabacteroides distasonis* properties linked to the selection of new biotherapeutics. *Nutrients* 2022, 14, 4176. IF : 6.706

Jordan Chamarande, Maurine D'agostino, Lisiane Cunat, Marie Machouart, Corentine Alauzet, Anne Debourgogne, Catherine Cailliez-Grimal. Application of the steam-washing method to anaerobic bacteria and fungi biofilms. *BMC Research Notes*. Soumises. IF : 2.145

Communications orales

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal. *In silico* study of cell surface structures of *Parabacteroides distasonis* involved in its maintenance within the gut microbiota. *International Conference on Microbiome* 2022, Amsterdam (visioconférence), Pays-Bas.

Communications affichées

Jordan Chamarande, Maurine D'agostino, Lisiane Cunat, Marie Machouart, Corentine Alauzet, Anne Debourgogne, Catherine Cailliez-Grimal. Application of the steam-based washing methods to anaerobic bacteria and fungi biofilms. *16^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie* 2021, Nantes, France.

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal. *In silico* study of cell surface structures of *Parabacteroides distasonis* involved in its maintenance within the gut microbiota. *16^{ème} Journée scientifique de l'école doctorale* 2022, Nancy, France.

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal. *In silico* study of cell surface structures of *Parabacteroides distasonis* involved in its maintenance within the gut microbiota. *17^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie* 2022, Montpellier, France.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique et Objectifs

I. Le microbiote intestinal

I.1. Définition et généralités

Toutes les plantes et tous les animaux, y compris les humains, abritent de nombreux micro-organismes qui entretiennent une étroite relation avec leur hôte. Ces relations sont divisées en trois catégories principales suivant si celles-ci sont bénéfiques, nocives ou sans impact pour l'hôte (Leung and Poulin, 2008). Quand les deux entités cohabitent profitent réciproquement de la relation, celle-ci sera dite de « mutualisme », tandis que si l'organisme ayant colonisé l'hôte profite de l'hôte sans que celui-ci n'ait de bénéfice, il sera alors considéré comme « commensal ». En revanche, si le colonisateur utilise l'hôte et nuit directement ou indirectement à son bien-être, la relation sera alors définie comme du « parasitisme » (Paracer et al., 2000).

Cependant, un tel schéma de classification ne reflète que rarement la véritable dynamique des relations observables dans la nature. En effet, ces relations entre les micro-organismes et leur hôte sont souvent finement équilibrées et peuvent rapidement changer, pouvant entraîner des infections d'origine « endogène » ou « opportuniste » (Wilson, 2004).

L'ensemble des micro-organismes présent dans un environnement défini est appelé « microbiote ». Les premiers scientifiques à mentionner ce terme sont Lederberg et McCray, évoquant l'importance des micro-organismes dans la santé et les maladies notamment humaines (Farré-Maduell and Casals-Pascual, 2019; Lederberg and McCray, 2001). Le terme de « microbiome », quant à lui, correspond à l'ensemble de l'habitat, incluant ainsi les micro-organismes et également leurs génomes et les conditions environnementales. Cette définition suit celle du terme « biome », c'est-à-dire l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques d'un environnement donné. Dans certains cas, la définition du microbiome se limite à l'ensemble des gènes et des génomes des membres d'un microbiote donné (Marchesi and Ravel, 2015).

L'hôte et les micro-organismes qui lui sont associés sont parfois définis comme « holobionte » et leur génome collectif comme « hologénome ». Ces termes correspondent à l'association d'un hôte et aux communautés microbiennes vivant autour ou à l'intérieur de celui-ci et qui forment ensemble une seule entité pouvant être définie comme « super-organisme » (Gordon et al., 2013; Simon et al., 2019).

Parmi les différents microbiotes humains se trouve le microbiote intestinal (MI) qui contient une communauté microbienne abondante et diversifiée rassemblant plus de 100 trillions de micro-organismes. La densité microbienne du côlon en fait l'un des habitats microbiens les plus densément peuplés connus sur terre (Thursby and Juge, 2017). L'une des

principales difficultés d'étudier cet environnement a été la capacité de cultiver les micro-organismes qui le constituent (Moore and Holdeman, 1974). Cependant, de nouvelles technologies ont permis d'identifier phylogénétiquement et/ou de quantifier les composants du MI en analysant les acides nucléiques (ADN et ARN) directement extraits des selles (Rinninella et al., 2019).

I.2. Techniques d'étude du microbiote intestinal

La plupart des connaissances sur le MI humain adulte provenaient de méthodes de culture exigeantes en main-d'œuvre (Namsolleck et al., 2004). Récemment, la capacité à étudier l'étendue du MI s'est considérablement améliorée grâce à la découverte d'approches indépendantes de la culture, telles que les méthodes de séquençage à haut débit (Doré et al., 2017).

1. Approche culture-dépendante

En 1881, Robert Koch a introduit la technique d'ensemencement sur gélose pour pouvoir cultiver et identifier des micro-organismes via leurs propriétés biochimiques et physiologiques. Une méthode basée sur la culture ne détecte cependant qu'un faible pourcentage des bactéries présentes dans l'intestin, les conditions de culture en laboratoire offrant un environnement moins favorable à leur croissance (Adak and Khan, 2019).

Conventionnellement, différents milieux sélectifs et nutritifs sont utilisés pour isoler et cultiver les bactéries à partir de prélèvements complexes comme les fèces. Des améliorations ont récemment fait leur apparition avec notamment l'utilisation de milieux enrichis ou encore, par exemple, la pré-incubation des fèces dans des flacons d'hémoculture. Ces modifications agissent comme des stimulants naturels et facilitent l'isolement de bactéries jusqu'alors non cultivables (Browne et al., 2016).

Cette approche de culture est souvent couplée à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol) et/ou à l'amplification/séquençage Sanger de l'ADNr 16S afin d'identifier des colonies non-identifiées jusqu'alors. Cet ensemble de méthode a permis l'identification de 1057 espèces procaryotes ajoutant au répertoire intestinal humain 531 espèces dont 146 bactéries connues mais non-identifiées auparavant, 187 bactéries et 1 archée non-isolée de l'homme, ainsi que 197 potentielles nouvelles espèces (Lagier et al., 2016). Par conséquent, cette approche dite de culturomique est indispensable pour comprendre le rôle causatif ou curatif de ces micro-organismes dans la santé et la maladie. Cependant, la croissance des bactéries prédominantes dans les fèces masque l'isolement des espèces minoritaires.

2. Approche culture-indépendante

Avec l'avènement du séquençage Sanger en 1977, l'ADN codant l'ARNr 16S a fait son apparition afin de caractériser les taxons bactériens et leur phylogénie (Sanger et al., 1977; Suau et al., 1999; Woese and Fox, 1977). Ces deux découvertes majeures ont permis au cours des 30 années suivantes la mise au point de méthodes permettant de surmonter les limites de la culture *in vitro* et ainsi de documenter la diversité du microbiote, y compris les souches non-cultivables à la paillasse. Parmi ces méthodes se trouvent notamment la réaction en chaîne par polymérase (PCR), les puces à ADN ou encore l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH ; Metzker, 2005). L'ensemble de ces méthodes a alors ouvert la voie à l'identification de la composition taxonomique et de la phylogénie des communautés microbiennes habitant une niche écologique spécifique.

Quelques années plus tard, les techniques de séquençage à haut débit (NGS) ont été développées. Ces techniques reposent sur différentes méthodes de séquençage ayant comme point commun de séquencer des millions de petits fragments d'ADN en parallèle (Behjati and Tarpey, 2013). La méthode de Sanger étant donc le séquençage de première génération, celles-ci sont dites de deuxième génération avec le séquençage « Illumina » et de troisième génération avec le séquençage « PacBio » et la technologie « Oxford Nanopore » qui permettent une analyse plus fine et en temps réel à partir de moins de matériel.

Des projets d'envergure ont fait suite à l'invention de ces méthodes de séquençage dont le projet Meta Hit où 3,3 millions de gènes microbiens fécaux non redondants ont été identifiés, multipliant le nombre de gènes initialement référencés par environ 150 (Qin et al., 2010). Actuellement, environ 10 millions de gènes non redondants sont listés après l'analyse des selles de 1267 individus supplémentaires (Li et al., 2014). À noter que les nouveaux gènes référencés dans le catalogue sont principalement des gènes rares, retrouvés chez peu d'individus. La même étude a été réalisée chez 184 souris révélant après comparaison avec le génome humain une importante dissimilitude avec seulement 4 % des gènes communs aux deux catalogues (Xiao et al., 2015). En revanche, l'étude de la fonction connue des gènes, *via* l'outil d'annotation Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), a permis de mettre en évidence une importance similarité fonctionnelle (80 %).

L'avancée des méthodes de séquençage et des outils de méta-analyse, en plus de permettre le référencement de nombreux gènes, a également été d'une aide majeure pour l'analyse de la diversité microbienne.

I.3. Composition du MI

Le MI abrite un vaste éventail de micro-organismes incluant bactéries, champignons, levures, archées et virus (Matijašić et al., 2020). Bien qu'un nouveau paradigme soutienne la possibilité que le nourrisson soit colonisé *in utero* par des bactéries provenant du microbiote placentaire maternel (Aagaard et al., 2014), le tractus intestinal néonatal est rapidement et massivement colonisé après la naissance par des bactéries provenant de la mère et de l'environnement. La méthode d'accouchement, naturelle ou par césarienne, est un facteur déterminant des premiers colonisateurs microbiens du tractus intestinal néonatal avec des travaux montrant des différences nettes dans la composition du MI entre les bébés nés par césarienne et ceux nés par voie naturelle (Biasucci et al., 2010; Jakobsson et al., 2014). La même observation a été faite entre les bébés nourris au sein et ceux nourris au lait maternisé (Fan et al., 2014; Thum et al., 2012). Le MI continue alors de se développer tout au long de l'enfance pour devenir stable et mature entre 3 et 5 ans (Odamaki et al., 2016). La communauté bactérienne de ce consortium est la mieux étudiée, notamment car elle présente la densité microbienne la plus élevée, avec des estimations récentes allant de 10^{13} à 10^{14} cellules bactériennes dans le côlon humain (Sender et al., 2016; Thursby and Juge, 2017). Des chercheurs estimaient ainsi que le corps humain était composé de 10 fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines. Une estimation plus récente a cependant suggéré que ce rapport se rapprochait davantage de 1:1 (Sender et al., 2016). L'ensemble de ces bactéries correspond à une information génétique composée d'environ 2 millions de gènes, soit 100 fois plus que les 20 milles gènes de l'être humain (Gilbert et al., 2018).

Du point de vue taxonomique, les bactéries sont classées en phyla, classes, ordres, familles, genres et espèces. Les phyla bactériens dominants au niveau du MI sont les *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, et *Verrucomicrobia*, avec les *Firmicutes* et *Bacteroidetes* représentant 90 % du MI (Figure 1). Les *Firmicutes* sont composés de plus de 200 genres différents, principalement à Gram positif, dont les *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* et *Ruminococcus* avec les *Clostridium* représentant 95 % des *Firmicutes*. Les *Bacteroidetes*, bactéries à Gram négatif anaérobies strictes, quant à eux sont principalement représentés au niveau du MI par les *Bacteroides* et les *Prevotella*. L'embranchement des *Actinobacteria* est principalement représenté par le genre *Bifidobacterium* (Arumugam et al., 2011).

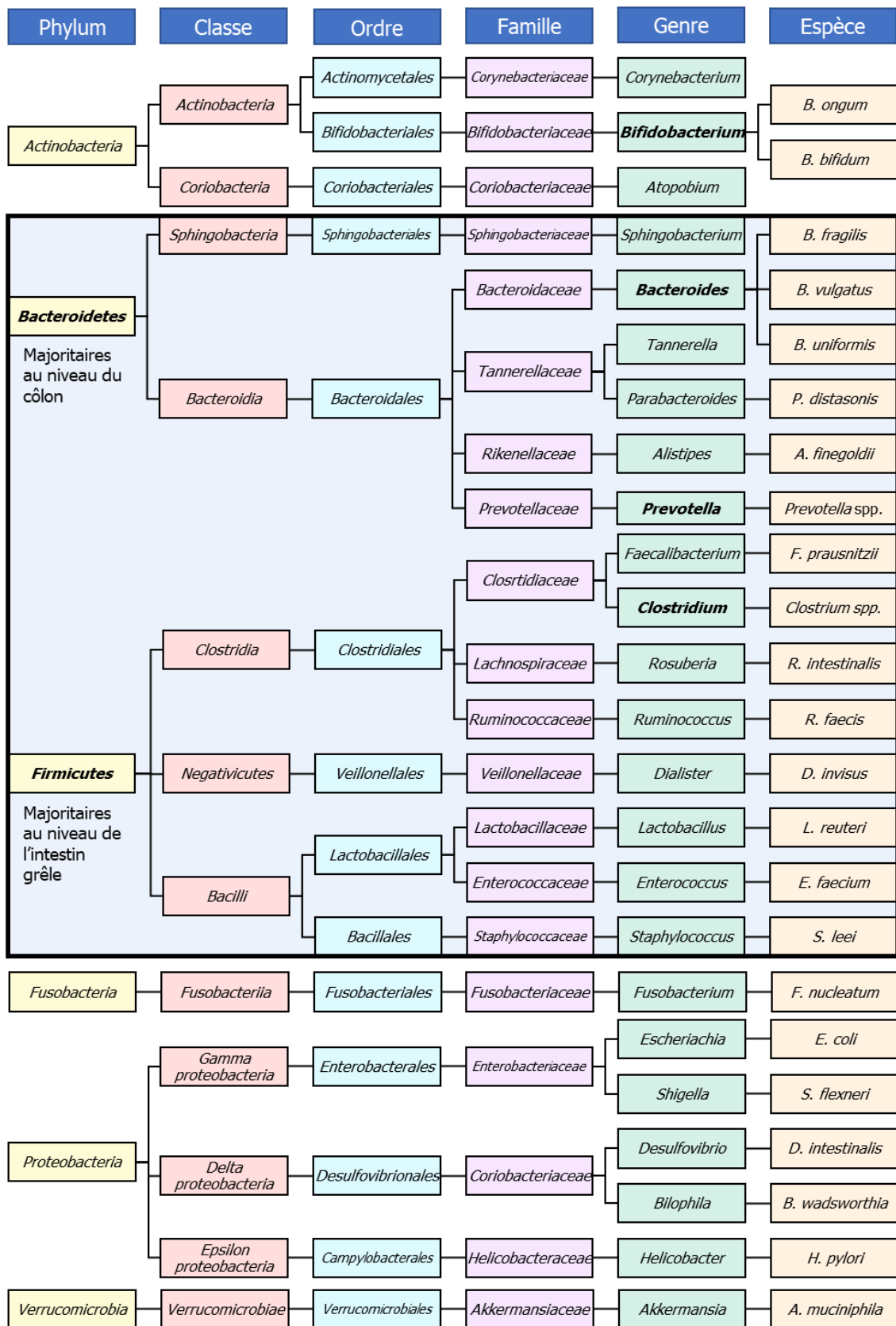


Figure 1. Exemple taxonomique de la composition du MI. Dans le cadre bleu sont représentées les bactéries appartenant aux phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* représentant 90 % du MI. Les phyla et genres majoritaires sont écrits en caractères gras. D’après Rinninella et al., 2019.

Généralement, les différents segments du tractus gastro-intestinal sont colonisés par des communautés microbiennes différentes : les bactéries à Gram positif sont prédominantes dans l'intestin grêle, tandis que les bactéries à Gram négatif prédominent dans le gros intestin (Ghoshal and Ghoshal, 2017). Environ 95 % des bactéries présentes dans le côlon sont anaérobies strictes (Lagier et al., 2012).

Chaque individu possède environ 500 à 1000 espèces bactériennes différentes avec une abondance variable au sein de leur tractus gastro-intestinal, mais de 5 à 30 % des espèces sont partagées par l'ensemble de la population. C'est ce que l'on appelle le « *core microbiome* » (Faith et al., 2013; Salonen et al., 2012). La partie variable du MI dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que l'âge, le régime alimentaire, l'environnement dans lequel évolue l'individu ou encore la prise de médicaments et plus particulièrement d'antibiotiques (Peroni et al., 2020). Un nombre croissant d'études montre également qu'un stress de l'hôte a des effets sur la composition et l'organisation du MI (Bailey et al., 2011; Siopi et al., 2020). Ceci pourrait s'effectuer de façon directe via la synthèse de médiateurs de stress (catécholamines, glucocorticoïdes) libérés dans la lumière intestinale et qui agiraient sur les bactéries, ou de manière indirecte en modulant l'immunité locale et l'environnement intestinal (Galley et al., 2014). Des travaux récents de notre équipe ont montré dans des modèles murins de stress chronique une diminution du genre *Parabacteroides* et de l'espèce *P. distasonis* dans le MI des animaux stressés (Alauzet et al., 2019, 2020).

I.4. Rôles du MI

Il est maintenant bien défini que le MI intervient dans les processus physiologiques de l'hôte et qu'en retour, celui-ci fournit un environnement nutritif et hospitalier aux micro-organismes qu'il héberge. En plus des avantages métaboliques, les membres du MI confèrent à l'individu sain d'importantes fonctions notamment de protection de l'épithélium intestinal et de maintien de l'homéostasie immunitaire. Cette grande plasticité fonctionnelle lui vaut d'être considéré comme un organe à part entière (Anwar et al., 2020; Baquero and Nombela, 2012; Evans et al., 2013). Bien que la grande majorité du MI soit mutualiste ou commensale, d'autres bactéries qui ne provoquent habituellement pas de maladie peuvent devenir pathogènes suivant les conditions dans lesquelles elles se développent. Ces bactéries sont communément appelées pathogènes opportunistes ou pathobiontes.

1. Métabolisme des nutriments

Le MI tire en grande partie ses nutriments des glucides alimentaires. De nombreuses bactéries vont en effet fermenter les glucides ayant échappé à la digestion proximale et les

oligosaccharides initialement indigestes pour l'hôte. Cette fermentation va alors entraîner la synthèse de nutriments dont les acides gras à chaîne courte (AGCC ; butyrate, propionate, acétate), qui sont de riches sources d'énergie pour l'hôte. Les membres du genre *Bacteroides*, qui sont les organismes prédominants qui participent au métabolisme des hydrates de carbone, le font en exprimant des enzymes telles que les glycosyltransférases, les glycoside hydrolases et les polysaccharide lyases. Le meilleur exemple parmi ces organismes est *B. thetaiotaomicron* qui contient au sein de son génome plus de 260 gènes impliqués dans l'expression d'hydrolases, ce qui est bien plus que le nombre codé par le génome humain (Cantarel et al., 2012). Un autre exemple pourrait être la synthèse de la vitamine K par notamment certains *Bacillus* dont *B. subtilis natto* et de la vitamine B, majoritairement produite au sein du MI par les *Bacteroidetes* et *Fusobacteria*, qui jouent également un rôle clé dans le bien-être de l'individu (Hossain et al., 2022; Kang et al., 2022).

Certaines bactéries de la lumière intestinale possèdent également une machinerie permettant la conversion des acides aminés en micronutriments nécessaires à la santé de l'hôte. Un exemple pourrait être la transformation de la L-histidine en histamine par l'histamine décarboxylase ou encore la transformation du glutamate en acide γ -amino butyrique (GABA) par les glutamate décarboxylases de certaines bactéries lactiques (De Biase and Pennacchietti, 2012; Thomas et al., 2012).

Le MI intervient dans d'autres fonctions métaboliques telles que la production de polyphénols, de triméthylamine, d'acide indolepropionique ou encore dans le métabolisme des acides biliaires (Long et al., 2017; Marín et al., 2015).

2. *Epithélium intestinal*

Le MI joue également un rôle important dans le développement de l'épithélium intestinal ainsi que dans sa protection. L'un des principaux mécanismes derrière cette fonction est l'induction de la transcription d'angiogenin-3, qui est impliquée dans le développement de la microvasculature intestinale (Sekirov et al., 2010). D'autres études réalisées sur des modèles murins axéniques ont également montré une réduction significative du réseau capillaire villositaire, de la surface intestinale et des microvillosités ; ainsi qu'une augmentation de la durée du cycle cellulaire ou encore une altération du péristaltisme intestinal en l'absence de MI (Alam et al., 1994; Banasaz et al., 2002; Gordon and Bruckner-Kardoss, 1961; Husebye et al., 1994).

Le MI contribue aussi au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale notamment via la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des protéines formant

les jonctions serrées qui relient mécaniquement les cellules épithéliales entre elles (Allam-Ndoul et al., 2020; Cuffaro et al., 2020).

Le MI participe par ailleurs de façon significative à la protection de l'épithélium intestinal contre les infections potentielles par des pathogènes. Ce phénomène s'organise selon plusieurs mécanismes pouvant être directs ou indirects (Pickard et al., 2017). Parmi les mécanismes directs se trouve celui de la compétition où les nutriments sont limités ainsi que l'espace disponible à la colonisation. Afin d'avoir de meilleures chances de survie, des bactéries ont également développé des mécanismes de défense dont la synthèse d'antimicrobiens ou de métabolites inhibiteurs, afin de pouvoir survivre dans cet environnement compétitif (Lawhon et al., 2002; Rolfe, 1984; Todorov et al., 2020). Outre la concurrence directe, les bactéries peuvent également se faire concurrence indirectement en agissant sur l'hôte. Cela implique généralement la stimulation du système immunitaire inné ou adaptatif qui engendrera des réponses potentiellement délétères à certaines espèces et ainsi, favoriser la colonisation par d'autres (Pickard et al., 2017).

3. Système immunitaire

Il arrive que le MI et le système immunitaire de l'hôte communiquent que ce soit de façon directe par contact ou indirectement via la production de métabolites. Ce contact direct entre les deux types cellulaires inclut que le système immunitaire accepte les micro-organismes mutualistes ou commensaux, qu'il définit comme n'étant pas une menace pour l'hôte.

Ces interactions ont un rôle critique dans le développement et dans l'équilibre fonctionnel du système immunitaire. Par exemple, la détection du microbiote commensal par la voie de signalisation récepteur Toll-Like (TLR)-réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88) peut induire la réparation de l'épithélium intestinal endommagé ou encore induire la synthèse de la protéine antimicrobienne RegIII γ (Hooper et al., 2012). Un autre exemple serait celui de la composition des sous-ensembles de lymphocytes T, dont l'équilibre est indispensable à l'homéostasie de la muqueuse intestinale et qui dépend directement de la composition du MI (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009).

Ainsi, lorsqu'elle fonctionne de manière optimale, l'alliance entre le système immunitaire et le microbiote permet un dialogue qui sélectionne et calibre les réponses de la manière la plus appropriée.

4. Système nerveux

Le système nerveux central (SNC) est étroitement lié au tractus gastro-intestinal et joue

un rôle important dans la régulation de la fonction intestinale et de l'homéostasie. En retour, le MI affecte des processus neuronaux fondamentaux. Cette étroite communication est identifiée comme l'axe Intestin-Cerveau (Zhu et al., 2017). Des études se sont intéressées à cette communication bidirectionnelle avec pour modèle principal des animaux axéniques (Bravo et al., 2012).

Ces études ont notamment montré que la colonisation du MI est essentielle au développement et à la maturation du système nerveux entérique et central et au bon déroulement de la myélinisation corticale (Heijtz et al., 2011; Hoban et al., 2016). L'absence de colonisation microbienne du rat ou de la souris est donc associée à des altérations pouvant se traduire par un retard de la vidange gastrique et du transit intestinal, une réduction de la récurrence cyclique du complexe moteur migrant et de la propagation distale et une augmentation de la taille du cæcum (Carabotti et al., 2015).

Un autre des processus neuronaux impacté par le MI chez la souris est le développement et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Il a en effet été démontré que l'absence de MI est associée à une perméabilité accrue de la BHE et à une expression altérée des protéines de la jonction serrée (Braniste et al., 2014).

I.5. Dysbiose intestinale et pathologies

La composition du MI est donc partie intégrante du bon développement de l'hôte et de son bien-être. Or, comme vu précédemment, le MI présente un haut degré de plasticité et sa composition peut être affectée par de nombreux facteurs environnementaux et liés à l'hôte. L'ensemble de ces facteurs peut donc générer un déséquilibre des fonctions du MI, déséquilibre plus communément appelé dysbiose.

1. Maladies inflammatoires chroniques intestinales

La dysbiose intestinale a été associée au développement ou à l'aggravation de maladies intestinales et extra-intestinales. Parmi les maladies intestinales associées à une dysbiose se trouvent les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) incluant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) qui touchent 0,3 % à 0,5 % de la population mondiale (Ng et al., 2017). Ces deux pathologies se définissent par une inflammation de la paroi du tube digestif résultant d'une dérégulation du système immunitaire intestinal causant des lésions tissulaires et une chronicité de la maladie. Divers facteurs sont impliqués dans le développement des MICI, notamment la génétique de l'hôte, le dérèglement immunitaire et les altérations du MI. La modulation du MI dans ces pathologies s'initialise par un appauvrissement des bactéries bénéfiques à l'hôte telles que *Bifidobacterium longum* dans la

RCH ou d'*Eubacterium rectale*, de *Faecalibacterium prausnitzii* et de *Roseburia intestinalis* dans la MC. *A contrario*, l'abondance relative et le taux de croissance des bactéries potentiellement pathogènes telles que certaines espèces du genre *Streptococcus* dont *S. anginosus* ou *S. gordonii* sont augmentés (Vich Vila et al., 2018). Des équipes de recherche se sont alors intéressées aux mécanismes par lesquels le MI pourrait induire les MICI. Parmi celles-ci, Roy et al. ont démontré que le développement des MICI pouvait être dû à une communauté microbienne qui endommagerait la barrière intestinale via l'action des cellules immunitaires (Roy et al., 2017). Cependant, les variations interindividuelles entre les patients atteints de MICI (génétique, stade de la maladie, régime alimentaire...) ainsi que les difficultés de reproduire avec précision leur physiopathologie chez le modèle murin rendent difficile la compréhension du rôle du MI dans ces maladies. Il a cependant été montré dans un modèle murin de RCH qu'un transfert du microbiote vers des souris saines entraînait un phénotype de colite : le MI est donc colitogénique (Garrett et al., 2007).

2. Obésité

Un lien entre l'obésité et le MI a également été mis en évidence. L'un des principaux exemples de l'implication du MI chez les personnes souffrant d'obésité est la réduction des *Bacteroidetes* et l'augmentation des *Firmicutes* en comparaison aux personnes de poids moyen (Ley et al., 2005). Or, l'une des espèces de *Bacteroidetes* les plus diminuées chez les personnes atteintes d'obésité est *B. thetaiotaomicron*. Son transfert chez des souris ayant suivi un régime riche en graisses a significativement diminué leur prise de poids et le développement excessif du tissu graisseux (Liu et al., 2017). Des études ont également établi que la diversité du MI, en terme d'espèces et d'informations génétiques, était altérée pendant l'obésité (Aron-Wisniewsky et al., 2019; Cotillard et al., 2013; Le Chatelier et al., 2013). Une autre étude réalisée sur des souris axéniques a également établi que les souris élevées de manière conventionnelle ont une masse graisseuse supérieure de 40 % et une teneur en graisse gonadique supérieure de 47 % à celles des souris axéniques malgré une plus faible prise alimentaire (Bäckhed et al., 2007, 2004).

Les mécanismes par lesquels le MI contribue à la physiopathologie de l'obésité ont fait l'objet de nombreuses études animales ayant permis de mieux comprendre l'impact du MI sur le maintien de l'équilibre énergétique de l'hôte. En utilisant des souris de type sauvage et des souris déficientes en leptine (*ob/ob*), Turnbaugh et ses collègues ont démontré que le MI des souris obèses produisait davantage d'AGCCs et fournissait un surplus d'énergie en comparaison au MI des souris minces (Turnbaugh et al., 2006). La même observation a été faite chez

l'Homme en comparant la concentration en AGCCs des fèces de sujets obèses et minces (Schwiertz et al., 2010).

3. Diabète

Au même titre que l'obésité, la composition du MI diffère entre un individu sain et un individu atteint de diabète. Chez les patients atteints de diabète de type (DT) 1, une diminution du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* a été observée (Demirci et al., 2020; Huang et al., 2018). Une diminution de la diversité et de la richesse du MI a également été décrite chez les patients atteints de DT1 et DT2 (Leiva-Gea et al., 2018; Li et al., 2020). Parmi les bactéries impactées, l'abondance des *Bifidobacterium*, *Akkermansia* et *Faecalibacterium*, productrices de butyrate, est considérablement réduite chez les patients atteints de DT2 (Li et al., 2020; Wu et al., 2020). Karlsson et al. ont découvert que les profils métagénomiques du MI des patients atteints de cette pathologie étaient redondants et suggèrent ainsi son utilisation pour identifier les individus atteints de DT2 (Karlsson et al., 2013). Un lien entre le MI et la résistance à l'insuline a également été identifié ce qui suggère une association entre la composition du MI et le développement du DT2 (Chen et al., 2021).

4. Autres pathologies

D'autres pathologies sont associées à des modifications du MI. Une étude métagénomique a notamment montré un enrichissement en *Enterobacteriaceae*, dont *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. dont *Klebsiella aerogenes*, au sein des MI d'individus atteints de maladies cardio-métaboliques. Il est également de plus en plus reconnu qu'une perturbation du MI pourrait être l'un des facteurs de la physiopathologie des maladies du foie dont la stéatose hépatique non alcoolique, des allergies et de certains cancers dont le cancer colorectal (Baba et al., 2017; Fan and Pedersen, 2021; Ho and Bunyavanich, 2018). La composition du MI ainsi que les métabolites qui lui sont associés sont également liés à des troubles neurologiques et psychiatriques, dont la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les troubles du spectre autistique et la dépression (Bastiaanssen et al., 2019).

L'implication directe du MI dans la plupart de ces pathologies reste cependant non élucidée. Sa modification pourrait en effet être la cause et non l'élément déclencheur de la pathologie. La relation hôte-MI et son rôle dans ses maladies a fait l'objet de nombreuses études et les connaissances quant à son utilisation en tant que cible thérapeutique évoluent progressivement.

I.6. Le MI comme cible thérapeutique

Bien que le MI soit doté d'une capacité de résilience, c'est-à-dire de retour à l'équilibre après un événement perturbateur, celle-ci peut être incomplète et suivie d'effets délétères pour l'hôte (De La Cochetière et al., 2005; Dogra et al., 2020). L'un des objectifs majeurs de ces dernières années a donc été de jouer sur la composition du MI afin de passer d'une composition dysbiotique à un microbiote équilibré et bénéfique à l'hôte.

1. Prébiotiques

Les prébiotiques, définis pour la première fois en 1995, sont des éléments qui entraînent des modifications spécifiques de la composition et/ou de l'activité du MI humain, offrant ainsi des avantages pour la santé de l'hôte (Gibson and Roberfroid, 1995). La définition exacte de ce terme a été revisitée en 2017 par : "un substrat qui est utilisé sélectivement par les micro-organismes de l'hôte, conférant un bénéfice pour la santé" afin de clarifier ce qui constitue ou non une substance prébiotique face à l'évolution des progrès scientifiques (Gibson et al., 2017).

Selon cette définition, certains aliments sont considérés comme prébiotiques. Parmi ceux-ci, les fibres alimentaires, définies comme « tous les polysaccharides et la lignine, qui ne sont pas digérés par les sécrétions endogènes du tube digestif humain », sont les plus utilisées en tant que prébiotiques (Jha and Mishra, 2021). Bien que celles-ci ne peuvent être hydrolysées par les enzymes digestives humaines, les bactéries du MI possèdent la machinerie nécessaire à leur digestion. Les fibres alimentaires regroupent plusieurs types de glucides dont l'amidon résistant, les polysaccharides non amylicés (celluloses, hémicelluloses, pectines, gommés et mucilages), l'inuline et des oligosaccharides tels que les fructooligosaccharides (un sous-groupe de l'inuline dont le degré de polymérisation est inférieur à 10), les galactooligosaccharides (2 à 8) et les xylooligosaccharides (2 à 10) (Anderson et al., 2009).

Parmi les produits issus de la fermentation des prébiotiques par le MI, les AGCCs sont les plus étudiés. Comme vu précédemment, les AGCCs peuvent agir comme des sources d'énergie au niveau de la muqueuse intestinale. Au cours du processus d'absorption intestinale, le butyrate sera métabolisé par les colonocytes tandis que le reste des AGCCs sera transporté par la veine hépatique pour être métabolisé par le foie pour finalement intégrer diverses voies métaboliques des glucides et des lipides. Le propionate ira principalement dans la gluconéogenèse tandis que l'acétate et le butyrate seront principalement utilisés dans la biosynthèse des lipides (Ríos-Covián et al., 2016). En plus de servir de source d'énergie, les AGCCs présentent également des fonctions physiologiques, dont le maintien du pH luminal, l'inhibition de la croissance de bactéries pathogènes, l'influence de la motilité intestinale et la

réduction du cancer du côlon en stimulant l'apoptose des cellules cancéreuses (Sun and O'Riordan, 2013).

Bien que les prébiotiques reposent principalement sur l'utilisation de glucides, d'autres substances, telles que les polyphénols et les acides gras polyinsaturés, sont également utilisées. Un exemple pourrait être la fraction insoluble des graines de cacao, riche en polyphénol, qui augmente significativement l'abondance des bifidobactéries, des lactobacilles et la production de butyrate (Fogliano et al., 2011).

2. Probiotiques

Le concept de probiotique a probablement évolué à partir d'une théorie proposée par le scientifique russe Eli Metchnikoff, lauréat du prix Nobel, qui a suggéré en 1908 que la longévité des paysans bulgares était due à leur consommation de produits laitiers fermentés. Le terme « probiotique » (du latin pro et du grec bios signifiant « pour la vie ») a été utilisé pour la première fois par le scientifique allemand Werner Kollath en 1953 pour désigner des « substances actives essentielles au bon développement de la vie ». Par la suite, l'effet et les mécanismes sous-jacents de ce que nous définissons aujourd'hui comme « probiotiques » ont été identifiés comme étant étroitement liés à l'existence de bactéries telles que les lactobacilles dont les produits de fermentation pourraient promouvoir le bien-être de l'hôte. En 1965, ce terme est repris par Lilly et Stillwell afin de parler des « substances sécrétées par un organisme qui stimulent la croissance d'un autre organisme » pour finalement devenir officiellement en 2013 « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte » (Gasbarrini et al., 2016).

De nombreuses bactéries et autres organismes sont maintenant utilisés comme probiotique avec principalement :

- Des lactobacilles : *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. sporogenes*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. johnsonii* et *L. acidophilus* ;
- Des bifidobactéries : *B. bifidum*, *B. bifidus*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. breve* et *B. infantis*.

D'autres probiotiques sont également disponibles sur le marché dont *Propionibacterium freudenreichii*, *Streptococcus thermophilus*, *S. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus SF68*... (Deutsch et al., 2017; Fijan, 2014; Plé et al., 2016).

Les effets bénéfiques de ces probiotiques peuvent varier entre espèces mais également entre souches bactériennes d'une même espèce. Il est ainsi indispensable d'évaluer les fonctions et effets de chaque souche bactérienne potentiellement probiotique. L'association scientifique internationale pour les probiotiques et les prébiotiques a décrit les principaux mécanismes par

lesquels ces organismes améliorent la santé de leur hôte (Figure 2). Ces mécanismes peuvent être conservés par plusieurs probiotiques ou au contraire spécifiques d'un organisme donné. Parmi ces effets bénéfiques se trouvent le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité intestinale, l'exclusion compétitive de la colonisation des pathogènes, la production d'acides gras essentiels et de vitamines, le métabolisme des sels biliaires primaires et secondaires, la régulation du transit gastro-intestinal, l'augmentation de la régénération des entérocytes par l'activation des cellules souches, la digestion enzymatique (notamment de certaines fibres), et la neutralisation des carcinogènes (Hill et al., 2014; Sivaprakasam et al., 2016). Il est également important de préciser que le maintien de l'immunité intestinale est essentiel au bien-être de l'hôte et que celle-ci dépend directement, comme vu précédemment, de la composition du MI. Conserver un équilibre entre les principaux phyla (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* et *Verrucomicrobia*) est donc primordial.

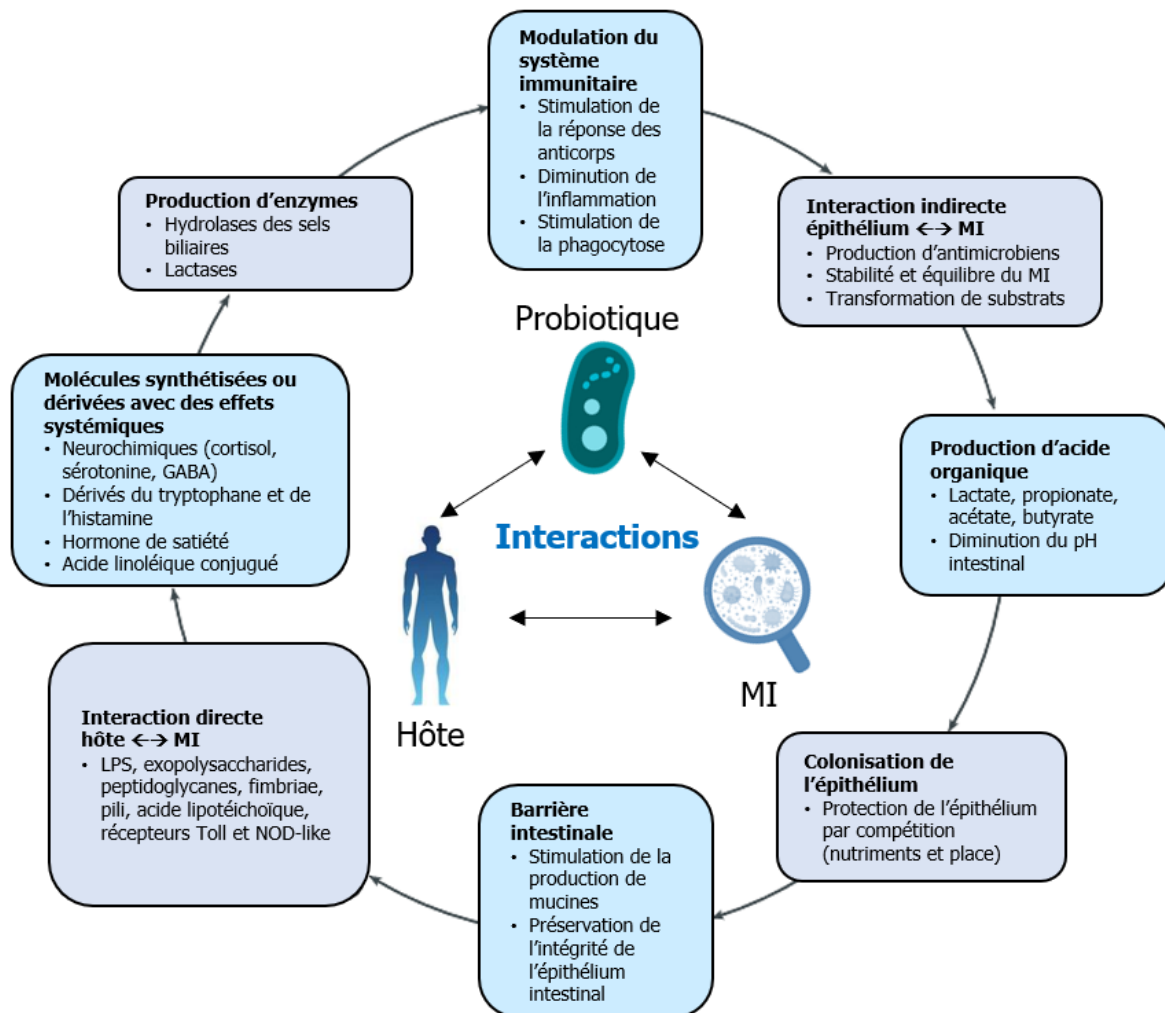


Figure 2. Mécanismes d'action des probiotiques. D'après Sanders et al., 2019.

Les probiotiques, de façon générale, doivent respecter plusieurs critères :

- Ce sont des micro-organismes. Bien que la plupart des probiotiques commercialisés soient des lactobacilles et des bifidobactéries, le terme probiotique ne fait pas référence qu'aux bactéries ;
- Ils doivent être vivants lors de l'administration. Leur survie dans le tractus gastro-intestinal, si non-nécessaire, n'est cependant pas une obligation ;
- Ils doivent être administrés, que ce soit par ingestion ou par un autre moyen ;
- L'administration doit se faire à une concentration spécifique indiquée dans les revues scientifiques et cliniques ;
- Ils doivent apporter au moins un bénéfice à l'hôte.

En plus de devoir respecter ce cahier des charges, le ou les micro-organismes utilisés doivent eux aussi respecter des critères. Le premier de ces critères est l'innocuité de la souche. Celle-ci doit être caractérisée phénotypiquement et génotypiquement et être dénuée de toute activité pathogène, mutagène ou carcinogène. Elle doit donc respecter le statut « generally recognized as safe » (GRAS) ou « qualified presumption of safety » (QPS). Un exemple serait celui de la souche probiotique *Lactobacillus helveticus* MTCC5463 où les gènes impliqués dans les catégories suivantes : résistome, métaux lourds, gènes métaboliques indésirables, gènes liés à la virulence et gènes liés au stress ont été répertoriés et utilisés pour définir la non-pathogénicité de cette souche (Senan et al., 2015). Il est également important de préciser que toutes les souches portant des gènes de résistance aux antibiotiques portés par des éléments génétiques mobiles et donc transférables ne sont pas autorisées sur le marché. La souche doit ensuite être capable de résister aux conditions stressantes du tractus gastro-intestinal. Parmi ces conditions se trouve notamment l'acide gastrique, les sels biliaires, les enzymes gastro-intestinales (pepsine...) ou encore les peptides anti-microbiens sécrétés par les cellules de l'épithélium intestinal ou par les autres micro-organismes du MI. Afin que le probiotique puisse coloniser, si nécessaire, sa zone d'action, celui-ci doit également posséder des capacités d'adhésion et/ou de formation de biofilm. Le dernier point est celui de l'effet bénéfique du probiotique qui doit avoir fait préférentiellement l'objet d'études *in vitro*, *in vivo* et cliniques.

Une fois le probiotique défini et conceptualisé, celui-ci doit être produit pour pouvoir être commercialisé. Le producteur a donc pour mission de fournir au client un produit efficace et stable au cours du temps malgré les diverses conditions de conservation (température, humidité...). Il est important de préciser que le processus de fabrication d'un probiotique doit être adapté aux souches qu'il contient et à leur sensibilité aux différentes étapes de ce processus, afin d'assurer la survie de l'ensemble des micro-organismes dans le produit fini. Ces étapes

sont généralement identifiées et résolues au cours du développement en laboratoire, testées ensuite lors d'un projet pilote et enfin portées à l'échelle commerciale (Fenster et al., 2019). Les principales étapes sont :

- la culture du micro-organisme permettant d'atteindre la concentration souhaitée ;
- la centrifugation afin de le séparer du milieu de culture ;
- la lyophilisation afin d'éliminer l'eau du produit et d'optimiser la conservation du probiotique ;
- l'encapsulation.

Tandis que des travaux portent sur l'étude des différentes souches des probiotiques traditionnels (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) et sur les mécanismes par lesquels elles exercent leurs effets bénéfiques, d'autres recherches se concentrent sur l'identification de nouvelles espèces bactériennes pouvant prévenir ou même guérir des pathologies spécifiques telles que les MICI.

Les recherches portant sur ces nouvelles espèces, définies comme « probiotiques de nouvelle génération » (PNG) ou « nouveau produit biothérapeutique » (NPB), sont encore souvent à un stade précoce. Nous retrouvons parmi celles-ci *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia* ou quelques espèces de *Bacteroides* et *Clostridium* (Guo et al., 2020; Maioli et al., 2021). En Europe, l'agence responsable de l'évaluation des risques des probiotiques est l'Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments (EFSA). Contrairement aux probiotiques « conventionnels » qui sont principalement commercialisés et réglementés en tant qu'aliments ou aliments fonctionnels, les NPB, ayant des visées plus médicales, devront peut-être faire l'objet d'études précliniques sur leur mode d'action ou encore sur leur pharmacocinétique/dynamique (O'Toole et al., 2017). Leur législation reste cependant incertaine à ce jour.

3. Bactériothérapie fécale

Le principe de la bactériothérapie fécale, ou transplantation de microbiote fécal (TMF), repose sur le transfert de la matière fécale d'un patient sain à un patient atteint d'une pathologie liée à une dysbiose intestinale. La TMF a des parallèles dans le monde vétérinaire, où la pratique a été utilisée pendant des siècles pour traiter les ruminants atteints d'acidose ruminale sévère et d'autres troubles gastro-intestinaux ainsi que dans le traitement de la diarrhée équine (Borody et al., 2004).

La première étape de cette thérapie repose sur la sélection d'un donneur choisi minutieusement après un dépistage complet pour éviter la transmission de pathologies. La

famille proche du patient est souvent choisie sauf en cas de traitement d'une infection à *Clostridioides difficile*, où les membres de la famille et les contacts intimes peuvent être eux-mêmes porteurs de l'espèce toxigène. Ce dépistage comprend des questionnaires sur les antécédents médicaux, le dépistage de diverses maladies chroniques (MICI, cancer gastro-intestinal, ...) et des tests de laboratoire pour les infections gastro-intestinales (Cytomégalo virus, *C. difficile*, *Salmonella* spp...). Une fois le donneur sélectionné, l'échantillon peut alors être prélevé et dilué à l'aide d'une solution saline, d'eau stérile ou même de lait. La suspension est ensuite filtrée et transférée dans un récipient permettant l'administration (Drekonja et al., 2015; Terveer et al., 2017). Si la suspension doit être utilisée ultérieurement, elle peut être congelée après dilution dans du glycérol ou dessiccation sans que ceci n'impacte l'efficacité du transfert (Camarota et al., 2017; Merenstein et al., 2014; Reygner et al., 2020). La transplantation peut alors être effectuée à l'aide de tubes nasogastriques ou nasoduodénaux, d'un coloscope ou par lavement de rétention (Bakken et al., 2011).

Le principal mécanisme par lequel la transplantation permet de restaurer le MI d'un patient est probablement celui de l'exclusion par compétition (Khoruts and Sadowsky, 2016). Cependant, une étude récente menée sur cinq patients, a permis de démontrer que le filtrat fécal stérile était aussi efficace que la TMF classique dans le traitement de l'infection à *C. difficile*, suggérant également l'importance des produits de synthèses des micro-organismes dans le traitement de cette pathologie (Ott et al., 2017).

La réglementation concernant les TMF reste cependant stricte et ne permet pas de réaliser une TMF pour traiter n'importe quelle pathologie intestinale. En France, seule l'infection récidivante à *C. difficile* peut faire l'objet d'une TMF et ne peut être réalisée que dans certains hôpitaux. Pour le traitement d'autres pathologies, les indications ne sont encore qu'au stade expérimental et devront faire l'objet d'études plus approfondies pour être traitées par une TMF. En vue de l'intérêt grandissant de la TMF, plusieurs banques publiques de selles ont vu le jour notamment en France, aux Pays-Bas et aux Etats-Unis (Camarota et al., 2019; Nicco et al., 2020).

L'utilisation de la TMF a cependant entraîné le décès d'une personne suite au transfert d'une souche d'*E. coli* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi entraînant une bactériémie (DeFilipp et al., 2019). D'autres bactériémies ont été reportés à la suite d'une TMF. Dans la plupart des cas, une explication alternative autre que la TMF pouvait cependant expliquer ces infections (DeFilipp et al., 2019). Certains mécanismes sous-jacents à la TMF restent donc à comprendre et à découvrir pour l'utilisation de ce traitement qui semble néanmoins très prometteur.

II. Interactions hôte-MI et colonisation de l'épithélium intestinal

Bien que le MI confère de nombreux avantages à l'hôte, il peut être reconnu comme un organisme étranger par le système immunitaire. Il existe donc un système de barrière qui permet de séparer spatialement le MI des cellules immunitaires de l'hôte afin d'éviter des réponses immunitaires excessives. Les systèmes de barrières sont divisés en deux sous-types : les barrières physiques et les barrières chimiques. La barrière chimique consiste en la production de peptides antimicrobiens tandis que la barrière physique se manifeste principalement par la présence d'une couche de mucus et d'un glycocalyx, inhibant l'invasion bactérienne de l'épithélium intestinal (Gubatan et al., 2021; Kayama et al., 2020).

II.1. Structure de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est caractérisé par une organisation en villosités qui permet d'augmenter la surface d'absorption des nutriments ainsi que par des cryptes où se regroupent la majeure partie des cellules souches (Figure 3).

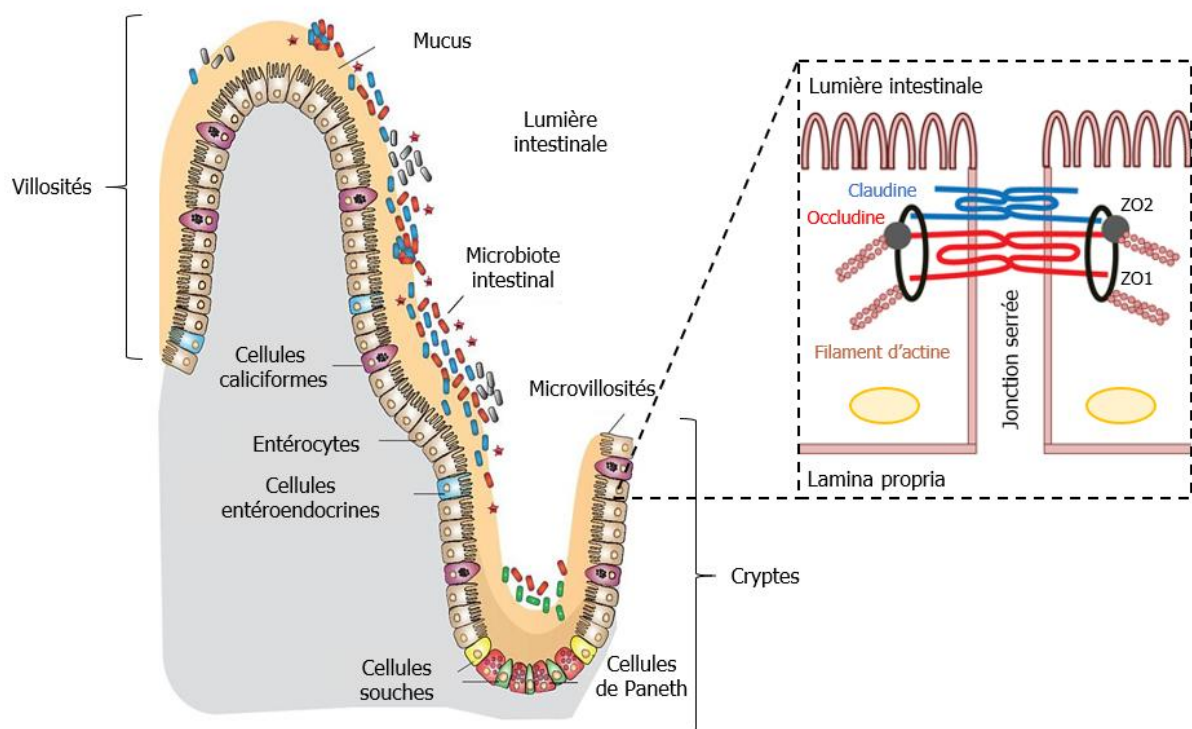


Figure 3. Structure et organisation de l'épithélium intestinal humain et représentation d'une jonction serrée. D'après Lee et al., 2018 et Wong et al., 2016.

La muqueuse intestinale est tapissée d'un épithélium colonnaire simple qui se compose principalement de cellules dites « absorbantes » (entérocytes), de cellules calciformes et des cellules entéroendocrines plus occasionnelles. Dans les cryptes, l'épithélium comprend

également des cellules de Paneth et des cellules souches. Ces cellules sont jointes grâce aux jonctions serrées (JS). Les JS sont un composant essentiel de la barrière intestinale, séparant la lamina propria de la lumière intestinale. Les JS sont des structures complexes composées de protéines transmembranaires dont les occludines, les claudines et les ZO-1,2,3 (Lee et al., 2018).

Les entérocytes sont chargés d'absorber les nutriments, l'eau et les métabolites produits par le MI afin qu'ils puissent traverser l'épithélium jusqu'à la lamina propria et être diffusés dans le système sanguin. Leur surface est composée de microvillosités, ou excroissances normales de la membrane plasmique, afin d'augmenter leur surface d'absorption.

Les cellules caliciformes quant à elles sécrètent du mucus qui constituera une barrière physique contre les agents pathogènes et qui permettra également le mouvement et la diffusion du contenu de l'intestin. La proportion de cellules caliciformes augmente généralement à mesure que l'on progresse dans le tube digestif.

Les autres types cellulaires, bien que moins représentés possèdent également d'importantes fonctions impliquées dans l'homéostasie de l'hôte. Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones permettant de réguler la sécrétion et la motilité de tube digestif. Les cellules de Paneth qui sont situées au fond des cryptes sécrètent des enzymes lysosomales et d'autres facteurs permettant de protéger les cellules souches. Les cellules souches, qui tapissent les parois des cryptes, vont permettre le renouvellement de l'épithélium intestinal, dont les entérocytes et les cellules caliciformes qui sont remplacés environ tous les quatre jours.

La lamina propria de chaque villosité est pourvue de capillaires sanguins permettant le transport des nutriments absorbés, de muscles lisses permettant vraisemblablement la mobilité des villosités individuelles et de nombreuses cellules immunitaires.

Cet interface hôte-MI est alors la source d'un dialogue continu où (Figure 4) :

- les cellules de l'hôte communiquent entre elles ;
- les cellules constituant le MI interagissent ensemble ;
- et où les cellules de l'hôte et le MI communiquent également ensemble.

Cette communication est indispensable. Elle permet la cohabitation de l'hôte et du microbiote, aux cellules immunitaires de répondre à la présence d'un agent pathogène, ou au contraire, à l'agent pathogène de moduler ses facteurs de virulence.

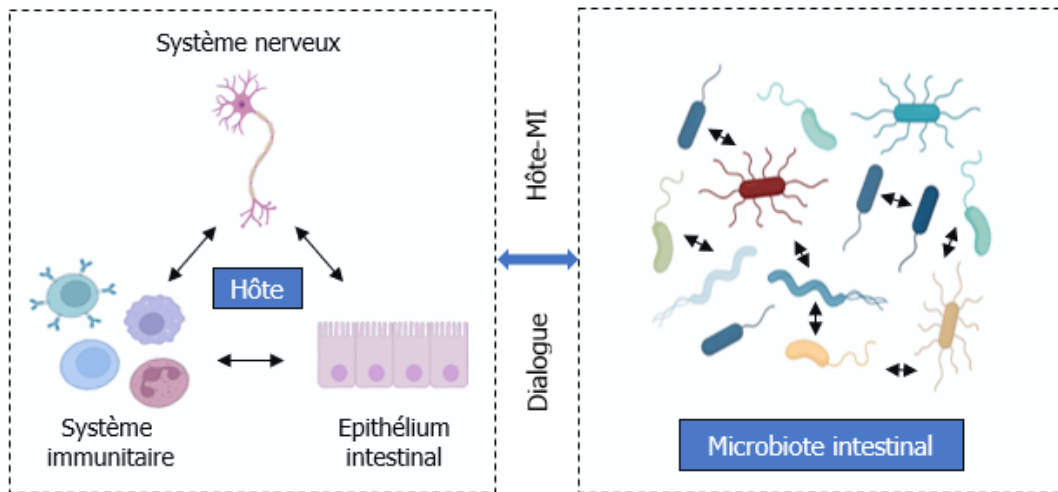


Figure 4. Communication entre les différents types cellulaires présents à l'interface de l'épithélium intestinal. Figure effectuée sur BioRender.

II.2. Colonisation de l'épithélium intestinal

Le mécanisme prédominant permettant aux bactéries de coloniser un environnement est la formation d'un biofilm. Le développement d'un biofilm sur une surface, qu'elle soit biotique ou abiotique, résulte à la fois du dépôt continu de cellules planctoniques et du développement bactérien.

Les bactéries doivent cependant tout d'abord atteindre un support avant de pouvoir interagir avec. Dans un environnement donné, le coefficient d'homo-agrégation est une mesure de la capacité d'un organisme bactérien à former des micro-colonies avec d'autres organismes de la même espèce. Plus la capacité d'un micro-organisme donné à s'agréger augmente, plus il va sédimenter et être en capacité d'atteindre un support (Pérez et al., 1998). La capacité des cellules à former des agrégats est donc une condition nécessaire à la formation d'amas multicellulaires, communément considérée comme l'une des premières étapes de la formation des biofilms. Les molécules de surface, telles que les protéines et les exopolysaccharides, sont généralement impliquées dans les interactions cellule-cellule et donc dans l'homo-agrégation.

Une fois le support atteint, les bactéries doivent y adhérer pour pouvoir le coloniser. L'étape d'adhésion commence par des processus physico-chimiques incluant les forces de Van der Waals de faible intensité, de London et les interactions hydrophobes. À ce stade, l'attachement est donc non spécifique et réversible. Afin de devenir spécifique et irréversible, les bactéries vont s'ancrer plus solidement au support via différentes structures de surface incluant les pili et les fimbriae (Chaffanel et al., 2018). Ces interactions dépendent de la composition du support sur lequel se trouve les bactéries et notamment de sa charge de surface, son hydrophobicité et des éléments chimiques le constituant.

Les pili et les fimbriae sont des appendices protéiques, filamenteux et polymériques exprimés à la surface des bactéries (Chapman et al., 2002). Chez les bactéries anaérobies, membres majeurs du MI, il existe plusieurs types de fimbriae et pili dont le système fimbriae (Fim) de *Porphyromonas gingivalis* et le système pilus de type V (Mfa) de *P. gingivalis* et *B. thetaiotaomicron*. Dans ce manuscrit, la désignation "pilus" est utilisée pour décrire la structure de surface provenant du système Mfa pour « minor fimbriae » (Hamada et al., 1996; Lamont et al., 2002). Les « fimbriae » font quant à eux référence aux structures issues du système Fim. Cependant, l'utilisation de cette désignation ne signifie pas que les pili soient des structures mineures et plus courtes que les fimbriae et sert plutôt à clarifier l'origine des appendices externes décrits.

Après la colonisation d'une surface par des cellules planctoniques, une conversion vers un mode de vie sessile est essentielle aux bactéries pour se protéger des stress environnementaux tels que les stress physiques, les antibiotiques, etc. Cette protection est assurée par la production d'une matrice extracellulaire généralement composée d'exopolysaccharides (EPS). De nombreuses fonctions ont été attribuées aux EPS, la plupart d'entre elles étant liées à la protection contre l'environnement extérieur ou à la rétention d'eau et de nutriments. La matrice EPS est principalement composée de polysaccharides, de protéines structurelles, d'enzymes, d'acides nucléiques et de lipides (Bircher et al., 2020).

Le biofilm entre alors dans sa dernière étape correspondant à sa dégradation et à sa dispersion dans le milieu environnant (Costerton, 1999; Costerton et al., 1995).

II.3. Quand les bactéries s'adressent à l'hôte

Les bactéries présentes au sein du MI vont induire une réponse de l'hôte par le biais d'éléments constituant leur paroi ou via la synthèse de métabolites, de petites molécules ou des acides nucléiques (Durmus et al., 2016; Guven-Maiorov et al., 2016).

1. La paroi bactérienne

La paroi bactérienne peut induire une réponse de l'hôte via ses différents constituants. Ce dialogue se fait principalement par l'intermédiaire de motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP) conservés chez les bactéries, qui seront reconnus par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR) des cellules du système immunitaire, dont les TLR et les récepteurs NLR pour « nucleotide oligomerization domain-like ». Parmi les MAMP se trouvent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Une interaction entre MAMP/PAMP et TLR déclenchera une réponse immunitaire si celui-ci est identifié comme pathogène (Nie et al., 2018; Tytgat et al., 2016). Le système immunitaire intègre probablement les différents

signaux lors des premiers mois de vie du nouveau-né, de façon à promouvoir une colonisation microbienne bénéfique à l'hôte (Belkaid and Hand, 2014). Une caractéristique des TLR est qu'ils peuvent se lier à plusieurs types de ligands incluant notamment des protéines, des lipopolysaccharides (LPS) et des acides nucléiques provenant d'agents pathogènes. Ils peuvent être situés sur la membrane cellulaire mais également au niveau des endosomes afin de permettre une reconnaissance des molécules externes et internes aux cellules (Gay and Gangloff, 2007).

Les principales structures de surface bactérienne impliquées dans ces interactions sont les LPS reconnus par les TLR4, les peptidoglycanes reconnus par les TLR2, les lipoprotéines reconnus par les TLR1/2/6, les acides lipotéichoïques reconnus par les TLR 2/6 et les flagellines reconnues par les TLR5 (El-Zayat et al., 2019).

Le LPS est un des principaux composants de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. La structure chimique du LPS peut être divisée en trois parties incluant le lipide A, région la plus conservée enchâssée dans la membrane plasmique, la chaîne oligosaccharidique centrale et la chaîne polysaccharidique très variable connue sous le nom d'antigène O (Raetz and Whitfield, 2002). Les LPS présents dans l'espace extracellulaire (bactéries ou débris) sont détectés par les TLR4 ainsi que par la protéine CD14 qui reconnaît spécifiquement le lipide A. Le TLR4 va alors transmettre un signal par l'intermédiaire de MyD88 permettant d'activer plusieurs cascades de signalisation au sein des cellules immunitaires dont la voie NF- κ B, induisant une réponse inflammatoire avec sécrétion de cytokines (Ouyang et al., 2017). Il existe également une voie indépendante de MyD88 fonctionnant via l'activation du récepteur TRIF pour « Toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adaptor-inducing interferon- β » puis du facteur de transcription IRF-3 pour « interferon regulatory factor 3 ». Ces cytokines dont l'expression va être induite par ces différents mécanismes vont jouer un rôle essentiel dans l'orchestration et l'harmonisation de la réponse immunitaire (Figure 5).

Les cytokines sont des protéines immunomodulatrices impliquées dans la signalisation autocrine, paracrine et endocrine. Il existe différents types de cytokines, notamment les chimiokines, les interférons (IFN), les facteurs de nécrose tumorale (TNF), les interleukines (IL) et les lymphokines.

Parmi les chimiokines se trouve l'IL-8, ou « chemokine (C-X-C motif) ligand 8 » (CXCL8), qui est considéré comme le chef de file des chimiokines. Cette cytokine est sécrétée par plusieurs types de cellules, dont les monocytes, les neutrophiles et les cellules épithéliales en réponse à un stimulus inflammatoire. Sa principale fonction va être de recruter les neutrophiles et les granulocytes sur le site de l'infection et de stimuler les fonctions bactéricides

et de phagocytose (Brat et al., 2005; Brennan and Zheng, 2007).

L'IFN- γ joue également un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. Il coordonne notamment plusieurs mécanismes biologiques impliqués dans la surveillance immunitaire, dans l'établissement de l'immunité adaptative et dans la régulation de l'inflammation, de l'apoptose et du cycle cellulaire. Il peut être synthétisé par plusieurs types cellulaires dont les lymphocytes B, T, natural killer (NK), NKT et les cellules présentatrices d'antigènes après stimulation de cytokines dont l'IL-12 ou après reconnaissance d'un MAMP (Castro et al., 2018).

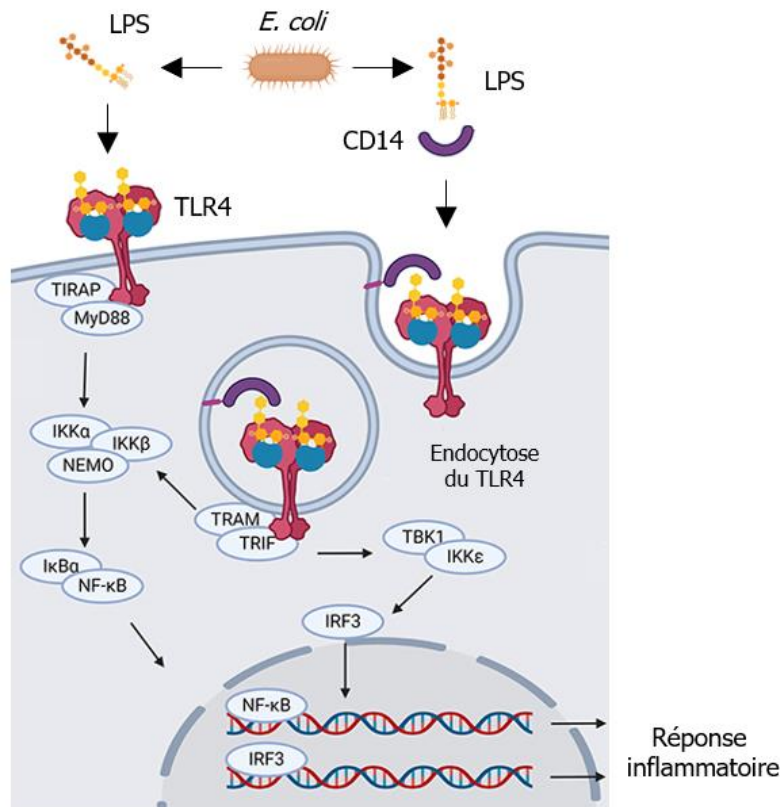


Figure 5. Détection du LPS bactérien par les TLR4 et activation de NF-κB et IRF-3 impliqués dans la réponse inflammatoire. D'après Romerio and Peri, 2020.

Le TNF- α est également impliqué dans la réponse inflammatoire et dans certains modèles de douleur. Il agit sur plusieurs voies de signalisation différentes afin de réguler les voies apoptotiques et d'activer l'inflammation via le système NF-κB. Il est principalement synthétisé par les macrophages, mais peut également être sécrété en quantité limitée par les lymphocytes B, NK ou encore les cellules épithéliales (Sethi and Hotamisligil, 2021).

Les interleukines (IL) constituent un vaste groupe de protéines pouvant déclencher des réactions via des récepteurs de haute affinité se trouvant à la surface des cellules cibles. Elles jouent un rôle essentiel dans l'activation et la différenciation des cellules immunitaires, ainsi que dans leur prolifération, leur maturation, leur migration ou encore leur adhésion. Elles ont également des propriétés pro- ou anti-inflammatoires. Parmi les ILs pro-inflammatoires se

trouvent l'IL-1 β , l'IL-6 ou encore l'IL-12. L'IL-1 β a des effets sur la prolifération, la différenciation et la fonction de diverses cellules de l'immunité innée. Elle induit également la synthèse de l'IL-8, favorisant l'inflammation via la libération de cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes par les neutrophiles. Plusieurs types cellulaires peuvent produire l'IL-1 β dont les macrophages, les monocytes, les lymphocytes ou encore les neutrophiles. L'IL-6 est une cytokine impliquée dans la régulation des réponses immunitaires et de l'inflammation. Elle est produite par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes et les macrophages en réponse à différents stimuli (IL-1, IL-17 et TNF- α). En cas d'inflammation, l'IL-6 va diriger le trafic et l'activation des leucocytes et favoriser la prolifération des cellules T, la différenciation et la survie des cellules B, et la production plasmocytaire d'immunoglobulines (Ig) A, d'IgG et d'IgM. L'IL-12, quant à elle, intervient dans le développement et le maintien des lymphocytes T en induisant la production d'IFN- γ . Elle va également activer indirectement l'activité antimicrobienne, antiparasitaire et antitumorale des macrophages et favoriser l'activité cytolytique des cellules NK. Elle est produite par les monocytes, les macrophages ou encore les cellules dendritiques (Akdis et al., 2011).

La régulation de la réponse inflammatoire est indispensable au bien-être de l'hôte. En effet, toute surréaction du système immunitaire pourrait mener à des maladies inflammatoires, auto-immunes et potentiellement au décès de l'individu comme décrit dans les formes sévères de la COVID-19 (Hu et al., 2022). Cette régulation se fait notamment via la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1RA et l'IL-10. L'IL-1RA est un antagoniste spécifique du récepteur de l'IL-1 qui se lie de manière compétitive au même récepteur que l'IL-1 β sans induire de signal cellulaire, bloquant ainsi les changements cellulaires médiés par l'IL-1 β (Zhang and An, 2007). L'IL-1RA est principalement produite par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles ou encore les cellules de l'épithélium intestinal et ce en réponse aux mêmes stimuli que l'IL-1 β (Eisenberg et al., 1990). Notons que l'équilibre entre l'IL-1 et l'IL-1RA influence le développement possible de maladies inflammatoires. Ainsi, en présence d'une quantité excessive d'IL-1, des pathologies inflammatoires et auto-immunes peuvent se développer dans le tractus gastro-intestinal (Akdis et al., 2011). L'IL-10 est également un facteur anti-inflammatoire permettant la régulation des réponses immunitaires. En effet, l'IL-10 a pour principale fonction de limiter la production de cytokines et chimiokines induites par les agonistes des TLR (principalement le LPS) ainsi que bon nombre d'autres cytokines. Parmi ces cytokines, la production d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-12 et du TNF- α , citées précédemment, est inhibée par l'IL-10. L'IL-10 est produite par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B, T, NK ainsi que par les cellules dendritiques (Akdis et al., 2011).

2. Métabolites synthétisés ou dérivés du MI

En plus des interactions classiques entre les MAMP bactériens et l'hôte, les métabolites produits ou dérivés du MI peuvent également être captés par l'hôte et affecter son métabolisme (Hooper et al., 2012).

Parmi ces produits se trouvent les AGCCs dont l'acétate (2 atomes de carbone : 2C), le propionate (3C) et le butyrate (4C) (Silva et al., 2020). Comme vu précédemment, les AGCCs vont être une source importante en énergie pour les colonocytes, les entérocytes et les hépatocytes et vont permettre à ces cellules de proliférer et ainsi de préserver l'intégrité de la barrière intestinale (Lu et al., 2022; Peng et al., 2009). Ils vont également interagir avec notre organisme en stimulant la production de mucus ou via leur implication dans la réduction du risque du cancer colorectal (Gaudier et al., 2009; O'Keefe, 2016). Le butyrate a également été décrit comme agent anti-inflammatoire de par son implication dans l'augmentation de la production d'IL-10 et dans la réduction de TNF- α (Chang et al., 2014; Chen and Vitetta, 2020).

Le MI est également une source de métabolites à fort potentiel neuroactif (neurotransmetteurs), dont la noradrénaline, la sérotonine, la dopamine et le GABA (Strandwitz, 2018). Ces molécules dérivées du MI peuvent également moduler l'homéostasie de l'hôte que ce soit localement ou sur des sites plus éloignés tels que le cerveau, via des cascades de signalisation neuronales, immunologiques et humorales complexes. Ceci correspond à l'axe Intestin-Cerveau (Gwak and Chang, 2021). Les signaux générés par ces neurotransmetteurs et molécules sont transportés vers le cerveau principalement via les fibres afférentes du nerf vague. En réponse, le cerveau renvoie des signaux aux cellules de la paroi intestinale, ainsi qu'au système immunitaire de la muqueuse par l'intermédiaire des fibres efférentes du nerf vague (Dicks, 2022a). Ces interactions, en plus de moduler l'environnement intestinal, le système immunitaire et le système endocrinien, peuvent également impacter les centres émotionnels et cognitifs du cerveau et jouer directement sur nos humeurs ou encore sur la sensation de satiété (Liang et al., 2018; Pizarroso et al., 2021).

D'autres métabolites dérivés du MI tels que le succinate, le D-lactate en encore la choline agissent également sur la physiologie de l'hôte (Arias et al., 2020; Fernández-Veledo and Vendrell, 2019; Louis et al., 2022). Le succinate, par exemple, en plus d'être un précurseur du propionate précédemment décrit, est également impliqué dans la régulation de la néoglucogenèse intestinale (De Vadder et al., 2016), de la thermogenèse (Mills et al., 2018), ainsi qu'en tant que médiateur dans la diminution de l'inflammation associée à l'obésité (Keiran et al., 2019).

3. Quorum sensing

De la même façon que notre organisme est capable d'identifier les micro-organismes qu'il abrite ou encore de capter et métaboliser certains de leurs produits dérivés, les bactéries du MI peuvent également percevoir et interpréter certains signaux envoyés par leur hôte.

Les bactéries communiquent entre-elles via un système appelé quorum sensing (QS). Le QS permet aux bactéries de réguler certaines de leurs activités dont la formation de biofilm, l'expression de facteurs de virulence, la production de métabolites secondaires ou encore les mécanismes impliqués dans l'adaptation au stress (Pena et al., 2019). Le QS repose sur la capacité des bactéries à synthétiser des molécules de faible poids moléculaire appelées auto-inducteurs (AI). Les AI sont alors libérés dans l'environnement et leur concentration augmentera avec l'augmentation de la densité cellulaire. A une concentration d'AI peut donc être attribuée une certaine densité bactérienne. La détection du « quorum » permettra ainsi aux bactéries de modifier de manière synchrone leur comportement en réponse à des changements dans la densité de population via l'activation d'un ou plusieurs gènes (Figure 6). Ce système implique différents éléments dont l'AI, la protéine réceptrice du signal et le(s) gène(s) régulé(s) (Mukherjee and Bassler, 2019).

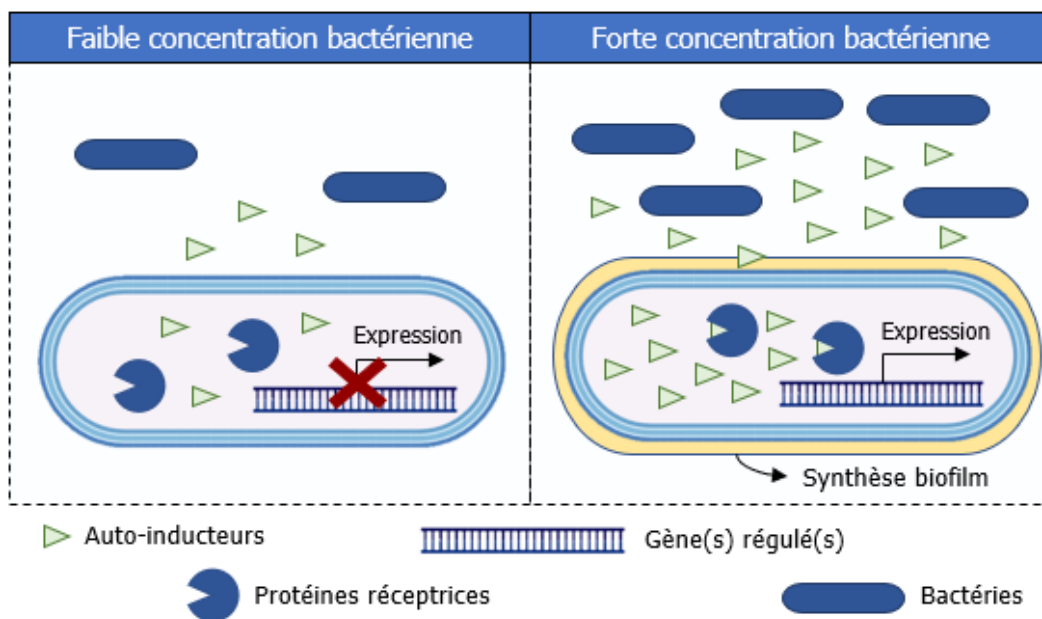


Figure 6. Principe général du Quorum sensing avec pour exemple l'induction de la formation d'un biofilm. Figure effectuée sur BioRender.

Il existe différents types de QS souvent relatifs à différentes espèces bactériennes. Parmi ceux-ci, trois principaux systèmes sont retrouvés :

- Le système LuxI/LuxR (I pour inducteur et R pour récepteur) propre aux bactéries à Gram négatif, qui utilisent des acyl-homosérine lactones (AHL) comme molécules de

signalisation. L'AHL va alors traverser la membrane bactérienne pour se lier aux récepteurs LuxR. Le complexe AHL-LuxR régulera alors l'expression des gènes cibles (Papenfort and Bassler, 2016) ;

- Le système à deux composants présent chez les bactéries à Gram négatif, également appelé QseB/C, pouvant être activé par l'auto-inducteur-3 (AI-3), le fucose, l'éthanolamine, la vitamine B12 mais également l'adrénaline et la noradrénaline. Ces molécules activeront alors les récepteurs transmembranaires de l'histidine kinase QseC induisant une cascade de réactions dont l'activation du régulateur QseB qui modulera l'expression de certains gènes (Prazdnova et al., 2022) ;
- Le système AI-2 dont l'expression est régulée par le gène *luxS*. Ce système est présent chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif et utilise quant à lui les récepteurs LuxP et LsrB pour moduler l'expression génique (Y. Wang et al., 2019).

Ces différents systèmes reposent donc sur deux grands principes. Le premier correspond à l'internalisation de l'inducteur qui ciblera un facteur de transcription. Le complexe inducteur-facteur de transcription permet alors la régulation des gènes cibles. Le second principe repose sur l'interaction des inducteurs avec des senseurs transmembranaires. Cette fixation induit une cascade de réaction permettant la régulation des gènes (Dicks, 2022b).

En plus d'être indispensable à la communication des bactéries, certains auto-inducteurs ont été décrits pour leur effet sur les cellules de l'hôte (De Spiegeleer et al., 2020; Landman et al., 2018; Turkina and Vikström, 2019). Certains de ces effets semblent favorables tandis que d'autres semblent délétères. L'auto-inducteur 3-oxo-C12-HSL, produit par *Pseudomonas aeruginosa*, semble notamment perturber l'homéostasie de l'hôte en interférant avec différents processus cellulaires tels que la synthèse des protéines, la signalisation calcique, ou encore la dynamique du cytosquelette de l'hôte (Turkina and Vikström, 2019). Un autre exemple pourrait être celui de l'auto-inducteur 3-oxo-C12:2-HSL dont la concentration diminue chez les patients atteints de MICI et qui est décrit pour ces capacités anti-inflammatoires sur la lignée cellulaire Caco-2, modèle d'étude de l'épithélium intestinal (Landman et al., 2018). Cette molécule permet également de réduire la synthèse des cytokines pro-inflammatoires $Il-1\beta$ et $TNF-\alpha$ des cellules RAW264.7, modèle d'étude des macrophages, stimulées au diméthylsulfoxyde (DMSO) ainsi que celle du $TNF-\alpha$ des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) stimulées. Cette interaction semble notamment se faire via l'activation de certains récepteurs de la saveur amère (TAS2R) qui entraîne la libération de calcium par le réticulum endoplasmique et l'atténuation des voies de signalisation JAK-STAT, impliquées dans la réponse immunitaire (Coquant et al., 2022).

II.4. Quand l'hôte s'adresse aux bactéries

1. Hôte et Quorum sensing

Pendant un stress de l'hôte, il a été mis en évidence que des molécules synthétisées et libérées dans la circulation sanguine ou encore dans la lumière intestinale pouvaient modifier le comportement des bactéries dont leur croissance et leurs capacités d'adhésion et/ou de formation de biofilms (Freestone and Lyte, 2008; Lyte and Ernst, 1992; Roberts et al., 2002). Parmi ces molécules, les catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) ont été les plus étudiées mais quelques études montrent que d'autres molécules dont la sérotonine peuvent également impacter la physiologie des bactéries (Declercq et al., 2019; Hiller et al., 2019; Knecht et al., 2016; Thewes et al., 2014; Torabi Delshad et al., 2018).

Cette réponse des bactéries aux molécules produites par l'hôte s'explique par la présence de récepteurs « adrénérique-like » impliqués dans le QS à la surface des bactéries. Ces récepteurs, dont le plus connu est le QseC du système à deux composants QseB/C d'*E. coli*, peuvent en effet être stimulés par des auto-inducteurs produits par les bactéries mais également par certaines hormones synthétisées par l'hôte dont l'adrénaline et la noradrénaline (Clarke et al., 2006). Ceci implique que l'état physiologique de l'hôte peut donc impacter l'état physiologique des bactéries qu'il héberge. Un hôte stressé va en effet produire des hormones et des neurotransmetteurs pouvant être détectés par les bactéries intestinales et induire une activation des voies de signalisation régulant par exemple les gènes codant les facteurs de virulence. Il a également été montré *in vitro* que les catécholamines induisaient une augmentation de la conjugaison bactérienne entre 2 genres d'entérobactéries (Peterson et al., 2011).

D'autres molécules synthétisées par l'hôte ont également été décrites comme pouvant induire une modification de propriétés bactériennes telles que l'insuline, la dynorphine ou encore certaines cytokines (Lesouhaitier et al., 2009).

2. Inhibiteur du Quorum sensing

Le QS étant impliqué dans l'expression de facteurs de virulence, les mécanismes d'inhibition de cette communication sont donc à l'étude. L'inhibition du QS peut ainsi être utilisée pour contrôler les infections bactériennes et la formation de biofilms (Rehman and Leiknes, 2018).

Des inhibiteurs du QS d'origine synthétique ou naturelle sont maintenant décrits. Parmi les inhibiteurs naturels, certains sont synthétisés par des bactéries appartenant aux *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ou encore aux *Proteobacteria*. Ces bactéries sont en

effet capables de produire des enzymes dégradant l'acyl-homosérine lactone utilisé comme molécule signal de certains QS. Ces molécules vont notamment leur permettre d'inhiber le développement d'autres espèces bactériennes avec lesquelles elles pourraient être en compétition pour les nutriments ou l'espace de colonisation disponible. D'autres organismes dont les algues rouges *Delisea pulchra* sont également décrits comme impliqués dans l'inhibition du QS (Santhakumari and Ravi, 2019).

Leurs modes d'action sont divers mais reposent essentiellement sur trois grands principes. Le premier mécanisme repose sur l'inhibition de la molécule signal via sa dégradation ou le blocage de sa synthèse. Un exemple serait celui cité ci-dessus avec les enzymes dégradant l'acyl-homosérine lactone. Ce mécanisme est appelé le Quorum Quenching. Le deuxième mode d'action des agents inhibiteurs du QS consiste à cibler les récepteurs des molécules de signalisation afin de les inactiver ou d'empêcher la fixation des auto-inducteurs par compétition. Le troisième et dernier mécanisme d'inactivation du QS consiste à bloquer la cascade de signalisation menant à l'expression des gènes régulés (L. Zhou et al., 2020).

Toutes les cellules de cet écosystème entretiennent donc un dialogue continu indispensable à leur cohabitation. Cette communication se révèle être parfois favorable, parfois délétère à un ou plusieurs des acteurs de celle-ci. A noter que l'état physiologique de l'hôte joue un rôle crucial dans cet échange via notamment la synthèse de molécules pouvant interférer dans la communication bactérienne et mener à une dysbiose du MI. De récents travaux menés au sein de notre équipe ont mis en évidence que l'une des espèces bactériennes les plus négativement impactées dans des modèles murins de stress chronique est *P. distasonis* (Alauzet et al., 2020, 2019).

III. *Parabacteroides distasonis*, un allié au bien-être de l'hôte ?

Parabacteroides distasonis a été décrit pour la première fois en 1933 sous la dénomination de *Bacteroides distasonis* (Eggerth and Gagnon, 1933). Cette dénomination a alors été conservée pendant plusieurs années jusqu'à une étude de l'ADNr 16S de trois *Bacteroides* menée en 2006. Cette étude a révélé que les trois souches étaient phénotypiquement similaires aux *Bacteroides*, mais phylogénétiquement et chimiotaxonomiquement distinctes. *Bacteroides distasonis*, *B. goldsteinii* et *B. merdae* sont alors devenues *Parabacteroides distasonis*, *P. goldsteinii* et *P. merdae* (Sakamoto and Benno, 2006). Malgré ce changement de genre, *Parabacteroides* reste encore affilié aux *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

III.1. *Parabacteroides distasonis*

1. Genre *Parabacteroides*

Parabacteroides est un genre bactérien appartenant à la famille des *Tannerellaceae*. A ce jour, ce genre comprend 10 espèces validement nommées dont la moitié ont été isolées des fèces humaines : *P. acidifaciens* (matières fécales humaines, 2019), *P. chartae* (eaux usées d'une papeterie, 2011), *P. chinchillae* (matières fécales animale, 2013), *P. chongii* (hémoculture, patient atteint de péritonite, 2018), *P. distasonis* (matières fécales humaines, 1933), *P. faecis* (matières fécales humaines, 2015), *P. goldsteinii* (liquide péritonéal, tissu de l'appendice et abcès intra-abdominal, 2005), *P. gordonii* (hémoculture, 1930), *P. johnsonii* (matières fécales humaines, 2007) et *P. merdae* (matières fécales humaines, 1978) (Ezeji et al., 2021).

2. Caractéristiques morphologiques de *P. distasonis*

De toutes les espèces citées ci-dessus, *P. distasonis* est l'espèce Type du genre *Parabacteroides*. C'est un petit bacille anaérobie strict, à Gram négatif, non sporulé et non mobile, dont la taille peut être comprise entre 0,8 et 1,6 × 1,2 et 12 µm. Le premier milieu décrit pour la culture de *P. distasonis* était composé de peptone, de mucines gastriques porcines, d'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄), et de sang de cheval (Eggerth and Gagnon, 1933). Par la suite, d'autres milieux riches apparentés supplémentés en sang (mouton ou cheval) ont été utilisés pour sa croissance. Les colonies obtenues sur milieu gélosé sont grisâtres, circulaires et de forme lisse. Il est important de préciser que bien que décrite comme anaérobie stricte, la tolérance de *P. distasonis* à l'oxygène en condition de culture n'a pas encore été évaluée.

3. Ecologie de *P. distasonis*

Parabacteroides distasonis a été identifiée pour la première fois dans des fèces humaines (Eggerth and Gagnon, 1933). Cette bactérie fait en effet partie du MI de l'Homme mais également de certains animaux dont les souris et les poules (Alauzet et al., 2019; Xiang et al., 2021). Bien que les *Bacteroidetes* constituent une large proportion des bactéries du MI pouvant aller jusqu'à 80 % suivant les populations (Magne et al., 2020), *P. distasonis* ne fait pas partie des espèces majoritaires (Alauzet et al., 2019; Qin et al., 2010; Sohn et al., 2014). Malgré sa faible abondance relative, cette espèce reste très conservée au sein du MI humain. Elle fait en effet partie du « set » commun de bactéries retrouvées au sein du tractus gastro-intestinal humain ou « core microbiome » (Gutiérrez-Repiso et al., 2021; Qin et al., 2010).

4. Caractéristiques métaboliques de *P. distasonis*

Comme l'ensemble des *Parabacteroides*, *P. distasonis* est saccharolytique et produit majoritairement de l'acétate et du succinate. Plus spécifiquement, *P. distasonis* est capable de métaboliser des hydrates de carbone tels que le mannose et le raffinose utilisés comme source d'énergie et peut se développer sur la gélose à l'esculine biliaire sélective des *Bacteroides*. Elle possède des gènes lui conférant une résistance au stress oxydatif, tels que *oxyR* et *katE* codant pour une catalase (Gregory et al., 1977; Sakamoto and Benno, 2006). La catalase permet d'assurer un rôle de détoxification contre le stress oxydatif via la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est un inhibiteur majeur de la croissance des bactéries intestinales. La production de catalase n'est pas une caractéristique commune à l'ensemble des *Bacteroides* où par exemple *P. distasonis* et *B. fragilis* sont catalases-positives, *B. eggerthii*, *B. thetaiotaomicron*, et *B. ovatus* ont une production variable ; et *Phocaeicola vulgatus* (anciennement *B. vulgatus*) et *B. uniformis* sont catalases-négatives (Rocha and Smith, 1995). *P. distasonis* possède également une superoxyde dismutase, enzyme antioxydante indispensable à l'élimination des radicaux libres (Gregory et al., 1977). Enfin, il s'agit d'une espèce capable de synthétiser du GABA, neurotransmetteur majeur du système nerveux central (Strandwitz et al., 2019).

5. Caractéristiques génomiques de *P. distasonis*

Le premier génome de *P. distasonis* à avoir été séquencé et assemblé est celui de l'actuelle souche Type ATCC 8503^T (Xu et al., 2007). La taille de son génome est de 4,81 Mégabases (Mb) et contient 45,10 % de G+C. Cette étude a mis en avant la faible taille du génome de *P. distasonis* en comparaison aux autres *Bacteroidetes* et la faible proportion de gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégradation des sources de carbones. Dans le même sens, le génome de *P. distasonis* ATCC 8503^T ne contient pas de gène impliqué dans la synthèse d'hémicellulases, de pectinases ou d'autres polysaccharidases qui ciblent les glucides non végétaux tels que les chitinases. Cependant, deux classes d'enzymes de transformation des glucides (famille 13 et 73 des glycoside hydrolases) sont plus abondantes dans le génome de *P. distasonis* que dans celui des autres *Bacteroidetes*. Le génome de *P. distasonis* contient également davantage de gènes impliqués dans la synthèse de désacétylases de polysaccharides. L'ensemble de ces caractéristiques font de *P. distasonis* une bactérie « fibrolytique spécialiste » (Xu et al., 2007). A ce jour, 28 génomes de *P. distasonis* complets sont disponibles sur la plateforme « National Center for Biotechnology Information » (NCBI). Leur taille varie de 4,77 à 5,56 Mb et le taux de G+C de 45,00 à 45,59 %. Parmi ces génomes,

14 ont été déposés en 2022 et proviennent d'une même étude clinique portant sur l'isolement de bactéries appartenant aux *Bacteroides* du groupe *fragilis* (PRJNA646575).

Peu d'études portent sur l'analyse des génomes de *P. distasonis*. La première, citée précédemment, a permis de mieux comprendre le métabolisme de *P. distasonis* et a également mis en évidence 13 loci impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides ainsi que de nombreux éléments génétiques mobiles et des insertions de phages (Xu et al., 2007). Ceci coïncide avec une étude plus récente où deux nouveaux prophages ont été identifiés dans les génomes de *P. distasonis* et *P. merdae* (Quaiser et al., 2015). D'autres études ne se sont pas directement intéressées au génome de *P. distasonis* mais la citent seulement à titre de comparaison pour la présence ou l'absence de gènes (*gld*, *spr*, *fim*) (Sato et al., 2010; Xu et al., 2016). Deux études, menées en 2010 et 2013 ont mise en évidence par PCR la présence ou l'absence de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Dans l'étude de 2010, les gènes de beta-lactamases *cepA* et *cfxA*, de carbapénémase *cfiA*, de résistance à la tétracycline *tetQ*, à l'érythromycine *ermF* et au métronidazole *nim*, ont été trouvés dans respectivement 69,2 %, 9,6 %, 17,3 %, 50 %, 7,7 % et 3,8 % des souches de *Bacteroides* et *Parabacteroides* étudiées (Boente et al., 2010). Dans la deuxième étude, le gène *ermG* de résistance à l'érythromycine, souvent associé au gène *tetQ* au sein d'un transposon conjugatif, a été identifié dans les souches étudiées mais pas le gène *tetQ* malgré la résistance de certaines souches à la tétracycline (Quesada-Gómez et al., 2013). Une souche de *P. distasonis* (CavFT-hAR46), isolée chez un patient atteint de la MC, a récemment fait l'objet d'une étude génomique. Les caractéristiques générales de son génome ont été comparées avec celui de trois autres génomes de *P. distasonis* dont celui de la souche ATCC 8503^T. Cette comparaison a révélé un génome très proche de celui de la souche ATCC 8503^T en terme de taille, de régions codantes et de taux de G+C (Yang et al., 2019). Un variant de la protéine pré-proinsuline naturelle humaine pouvant être impliqué dans le DT1 a également été identifié dans un génome de *P. distasonis* (Matos et al., 2021). La première étude analysant spécifiquement plusieurs génomes de *P. distasonis* est parue en 2022 et propose l'utilisation du gène *rfaA*, impliqué dans la synthèse du LPS, pour classifier les souches de *P. distasonis* en fonction de l'effet, bénéfique ou pathogène, qu'elles ont pour leur hôte. Cette étude a été menée sur 15 génomes complets de *P. distasonis* (Bank et al., 2022). Bien que peu d'études s'intéressent spécifiquement à son génome, de nombreuses analyses métagénomiques, notamment du MI, citent *P. distasonis*. « *Parabacteroides distasonis* » apparaît en effet dans 29 publications en 2021 et 33 en 2022 (de Janvier à Octobre) dont environ 70 % ne font que mentionner une variation de l'abondance relative de *P. distasonis* lors d'un traitement ou d'une pathologie donnée (obtenues dans la base de données

pubmed.ncbi.nlm.nih.gov le 12/10/2022).

Parmi les 30 % restant, la moitié des travaux portent directement sur l'étude de *P. distasonis* dont la majorité sur son rôle dans le bien-être de son hôte.

III.2. Un rôle bénéfique ?

La question du rôle de *P. distasonis* au sein du MI se pose donc. Il est connu que le corps humain préserve ce qui lui est bénéfique ou utile et cherche à éliminer ce qui ne l'est pas. Le fait que *P. distasonis* soit conservée dans une large proportion de la population suggère donc dans un premier lieu un rôle bénéfique pour l'hôte.

1. Intégrité de l'épithélium intestinal

P. distasonis a pour habitat le tractus gastro-intestinal et peut donc potentiellement modifier l'intégrité de l'épithélium intestinal. Pour déterminer si une bactérie modifie l'intégrité d'un épithélium, la résistance transépithéliale de celui-ci est mesurée après mise en contact des bactéries avec la monocouche cellulaire. Une étude a ainsi mis en évidence que sur trois souches de *P. distasonis* testées, aucune ne modifiait l'intégrité de l'épithélium intestinal (Hiippala et al., 2020).

Une autre étude réalisée cette fois-ci sur cinq souches a démontré que *P. distasonis* permettait même de restaurer voire renforcer l'intégrité de l'épithélium après que celui-ci ait été endommagé avec de l' H_2O_2 (Cuffaro et al., 2020). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* où des souches de *P. distasonis* ont été capables de préserver l'intégrité de l'épithélium intestinal dans des modèles murins de colites induites via le rétablissement ou l'augmentation du niveau d'expression de l'Occludine et de la ZO-1 qui forment les jonctions serrées situées entre les cellules épithéliales (Cuffaro et al., 2020; Koh et al., 2020).

2. Maladies inflammatoires et cancers

Les études citées précédemment se sont également intéressées à l'effet immunomodulateur de *P. distasonis*. L'un des paramètres utilisés pour mesurer l'effet d'une bactérie sur l'immunomodulation cellulaire de l'hôte est la quantification de la production des cytokines. Deux méthodes peuvent être utilisées, l'une standard où les bactéries sont directement mises en contact avec le modèle cellulaire sélectionné et une seconde où une réaction inflammatoire, soit une surproduction des cytokines pro-inflammatoires, est induite par ajout de LPS d'*E. coli*. Il a ainsi été démontré que les trois souches testées dans la première étude réduisaient significativement la production de l'IL-8, pro-inflammatoire, après induction d'une réponse inflammatoire des cellules HT-29, lignée provenant d'adénocarcinome

colorectal servant de modèle d'étude de l'épithélium intestinal (Hiippala et al., 2020). Les cinq souches testées dans la seconde étude ont également montré des capacités anti-inflammatoires via l'augmentation du ratio IL-10 (anti-inflammatoire) / IL-12 (pro-inflammatoire) sur les PBMC ainsi qu'une réduction des colites induites par l'acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS) chez la souris (Cuffaro et al., 2020). *P. distasonis*, et plus particulièrement sa membrane, semble également réduire la production d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8, cytokines pro-inflammatoires, sur les cellules SW480, lignée provenant d'un adénocarcinome colorectal ; d'IL-1 β , d'IL-8 et de TNF- α sur HT-29 et la réduction de la cascade de signalisation TLR4 (Koh et al., 2018).

Ces résultats coïncident avec une étude antérieure *in vivo* qui rapportait que le traitement oral de souris BALB/c avec des fractions membranaires de *P. distasonis* réduisait significativement la sévérité de l'inflammation intestinale dans des modèles murins de colite induite (Kverka et al., 2011). *P. distasonis* semble de plus positivement corrélée aux phases de rémission de RCH (Zhu et al., 2022). La diminution de l'abondance relative de *P. distasonis* chez des patients atteints de la MC conforte l'ensemble de ces résultats (Sohn et al., 2014).

Au même titre que l'inflammation, certains cancers dont les cancers colorectaux semblent liés au MI. Des études *in vivo* ont démontré que l'administration de *P. distasonis* pouvait inhiber l'apparition de tumeurs dans des modèles murins traités à l'azoxyméthane (Koh et al., 2020, 2018). La réduction de la réponse inflammatoire via l'immunomodulation des cytokines et des cascades de signalisation TLR4/Akt, ou protéine kinase B, couplée à l'induction de l'apoptose de cellules cancéreuses par *P. distasonis* sont des mécanismes pouvant plausiblement expliquer le blocage de la formation de tumeurs. D'autres études ne portant pas directement sur *P. distasonis* ont mis en avant la corrélation négative de son abondance avec l'apparition de cancers colorectaux ou avec la charge tumorale observée lors de ces cancers (Bai et al., 2022; Gu et al., 2020; Parker et al., 2021; Yang et al., 2022). *P. distasonis* pourrait également être impliquée dans les mécanismes sous-jacents aux traitements contre le cancer du poumon (Huang et al., 2022).

3. Diabète et obésité

L'administration de *P. distasonis* a également été étudiée dans le cadre du traitement de pathologies telles que le diabète et l'obésité. Une étude a notamment démontré que l'abondance relative de *P. distasonis* était significativement réduite lors d'un régime restreint en calorie chez le modèle murin. Son administration a cependant amélioré la reprise de poids des souris ayant subi une restriction calorifique via l'augmentation des acides lithocholiques et

ursodésoxycholiques. Ces acides vont alors permettre l'activation des voies glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et uncoupling protein 1 ou thermogénine (UCP1) et ainsi améliorer le métabolisme du glucose et le métabolisme énergétique (Li et al., 2022). L'administration intragastrique de *P. distasonis* semble également diminuer significativement la résistance à l'insuline chez le rat Goto Kakizaki, modèle utilisé pour l'étude du DT2 sans obésité (Yue et al., 2022). Les résultats obtenus dans cette étude coïncident avec de précédents travaux où l'administration de *P. distasonis* induisait une augmentation de l'acide lithocholique et ursodésoxycholique ainsi que du succinate dans l'intestin de souris obèses. Cette même étude a également démontré que *P. distasonis* induisait une diminution de la prise de poids, de l'hyperglycémie et de la stéatose hépatique de ces mêmes souris. Le succinate et les acides biliaires secondaires produits par *P. distasonis* jouent donc un rôle clé dans la modulation du métabolisme de l'hôte (K. Wang et al., 2019).

Deux autres études non-spécifiques à *P. distasonis* soulignent également sa potentielle implication indirecte dans divers traitements utilisés contre ses pathologies. La première porte sur l'utilisation de polyphénols provenant de la pulpe de la grenade pour diminuer l'obésité et la résistance à l'insuline chez des modèles murins. Dans cette étude, *P. distasonis* est enrichie lors du traitement et semble négativement corrélée à certains marqueurs dont le poids corporel, le glucose, les taux de triglycérides et de cholestérol (Song et al., 2022). Dans la seconde étude, il est démontré qu'un régime riche et varié en fibres pourrait prévenir de certains risques cardiométaboliques tels que la dyslipidémie et la résistance à l'insuline. L'une des espèces enrichies lors de ce traitement étant *P. distasonis*, cette dernière est proposée comme étant potentiellement liée aux bénéfices du traitement étudié (Ranaivo et al., 2022).

4. Autres rôles bénéfiques

Parabacteroides distasonis a également été positivement corrélée à certains paramètres liés au sommeil. Une étude a notamment mis en évidence qu'un régime supplémenté en galacto-oligosaccharides et en polydextroses augmentait l'abondance relative de *P. distasonis* chez le rat. Cette observation était corrélée avec une restauration plus rapide de certains paramètres corporels, dont la température, chez des rats exposés à une perturbation chronique du cycle jour/nuit (Thompson et al., 2021). Une étude plus récente portant sur l'utilisation des galacto-oligosaccharides et en polydextroses dans le rétablissement du sommeil a confirmé ces observations (Bowers et al., 2022).

P. distasonis semble également impliquée dans des pathologies autres qu'intestinales ou liées au sommeil. Une étude a notamment mis en évidence que la transplantation d'une

souche de *P. distasonis* capable de produire des polyamines permettait d'améliorer les lésions testiculaires observées chez des modèles murins déficients en spermine (Zhao et al., 2021). L'abondance relative de *P. distasonis* semble également négativement corrélée à certaines pathologies dont la fibrose et la sclérose en plaques (Cekanaviciute et al., 2017; Yanavich et al., 2022).

III.3. Ou un rôle délétère ?

L'idée que *P. distasonis* est une bactérie bénéfique à son hôte est maintenant répandue. Il n'est ainsi pas rare que son abondance soit utilisée comme marqueur permettant d'expliquer les effets bénéfiques (augmentation) ou délétères (diminution) de certains traitements ou pathologies (Benítez-Páez et al., 2021; Gao et al., 2021; Lv et al., 2022; Thirion et al., 2022). *P. distasonis* est également désignée comme futur potentiel probiotique (Cuffaro et al., 2021, 2020; Li et al., 2022) et a fait l'objet à ce jour de deux brevets à des fins thérapeutiques (WO2017035188A1, WO2022058372A1). Malgré l'ensemble de ces études, certains travaux décrivent *P. distasonis* non pas comme bénéfique mais davantage comme pathogène.

1. Intégrité de l'épithélium intestinal

Contrairement aux études citées précédemment, la souche de *P. distasonis* PtFD14MH1 a été décrite comme endommageant les jonctions entre les cellules du modèle HT-29 MTX, cellules sécrétrices de mucus (Matos et al., 2021).

2. Maladies inflammatoires

Il en va de même concernant l'effet inflammatoire de *P. distasonis*. Une étude a en effet démontré que *P. distasonis* faisait partie des espèces dont l'abondance relative et absolue est augmentée chez les souris déficientes en protéines de reconnaissance du peptidoglycane (*Pglyrp*) qui sont des modèles murins sensibles aux colites induites par le sodium dextran sulfate (DSS). De plus, son administration chez des souris sauvages et ayant subi un traitement antibiotique a aggravé les colites induites par le DSS (Dziarski et al., 2016). Ces résultats suggèrent donc que *P. distasonis* contribue à l'accentuation des colites.

Une autre étude criblant le MI de patients souffrant de différentes pathologies intestinales a mis en évidence que *P. distasonis* était l'espèce la plus abondante au sein du MI des patients atteints de la MC (Lopetuso et al., 2018). Malgré sa capacité à produire du GABA, *P. distasonis* a par ailleurs été décrite comme induisant un comportement dépressif chez un modèle murin de la MC. Dans cette étude, la colonisation de l'épithélium intestinal par *P. distasonis* n'a cependant pas été associée à une augmentation de l'inflammation intestinale ou à

d'autres altérations (Gomez-Nguyen et al., 2021).

3. Diabète

P. distasonis semble également accélérer le développement du DT1 chez la souris via l'augmentation des macrophages, cellules dendritiques et cellules T CD8⁺ et la diminution des cellules T régulatrices FoxP3⁺. Cette réaction pourrait provenir de la synthèse du peptide *hprt4-18* par *P. distasonis* qui possède plus de 50 % de similarité avec un épitope important de l'insuline, insB:9-23 (Girdhar et al., 2022).

4. Autres rôles délétères

Plus spécifiquement à d'autres pathologies, l'administration de *P. distasonis* a été montrée comme accentuant les symptômes de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot chez des souris atteintes de SLA ayant suivi un traitement antibiotique (Blacher et al., 2019).

Il a également été démontré que *P. distasonis* était enrichie au sein du MI de patients atteints de spondylarthrite ankylosante ou de patients atteints de pelade, également appelée alopecia areata (Moreno-Arrones et al., 2020; C. Zhou et al., 2020). Deux études cliniques ont également rapporté 4 cas de bactériémies dues à *P. distasonis* et sa présence au sein d'un prélèvement tissulaire d'un patient atteint de fasciite nécrosante (Cobo et al., 2022; Weimer et al., 2017). Une étude récente a par ailleurs identifié une augmentation de l'abondance intestinale de *P. distasonis* chez le rat âgé souffrant d'ostéoporose (Wang et al., 2022).

Certaines de ces études ne proposent donc pas *P. distasonis* comme potentiel NPB mais comme marqueur de pathologie. Cependant, les mécanismes expliquant l'impact de *P. distasonis* dans ses maladies restent inconnus. Par ailleurs, au lieu d'être une cause de ces pathologies, la variation de l'abondance de *P. distasonis* pourrait être, au contraire, l'une des conséquences de celles-ci.

IV. Objectifs

P. distasonis est donc défini comme potentiel NPB et potentiel pathogène opportuniste. Cependant, aucune étude n'a encore exploré les mécanismes pouvant expliquer sa persistance ou au contraire sa perte dans l'intestin.

Ce projet a donc fait l'objet de 3 parties décrites ci-dessous dans le but de mieux comprendre comment *P. distasonis* colonise l'intestin, s'y maintient et interagit, que ce soit de façon bénéfique ou délétère, avec son hôte (Figure 7).

1. Propriétés de surface, d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis* et impact du stress sur ces propriétés

Le premier objectif de ce projet est donc d'étudier les différentes étapes nécessaires à *P. distasonis* pour coloniser un nouvel environnement et se maintenir dans le MI. Pour cela nous avons caractérisé ses principales propriétés de surface ainsi que ses capacités d'adhésion et de formation de biofilm sur support abiotique puis étudié l'impact du stress sur ces propriétés. Afin de limiter les biais dus à la variabilité inter-souche, ces propriétés ont été évaluées chez 13 souches cliniques non apparentées ainsi que chez la souche Type (ATCC 8503^T - DSM 20701^T). Les éléments suivants ont été étudiés :

- Mobilité électrophorétique, charge externe globale et perméabilité de surface (électrocinétique) ;
- Coefficient d'homo-agrégation ;
- Adhésion et formation de biofilm ;
- Impact de l'adrénaline, de la noradrénaline et de la dopamine (catécholamines) ainsi que du cortisol (glucocorticoïde) et de la sérotonine (monoamine) sur l'adhésion et sur la formation de biofilm.

2. Structures externes de *P. distasonis* impliquées dans son maintien au sein du MI et dans sa potentielle pathogénicité

Après avoir défini que *P. distasonis* pouvait se maintenir au sein de notre MI grâce à ses propriétés d'adhésion et de formation de biofilm, nous nous sommes intéressés aux structures de surface impliquées dans ces propriétés ainsi que dans son interaction avec son hôte. Parmi ces structures se trouvent notamment la capsule, les fimbriae ou encore les pili. La classification RfbA (Bank et al., 2022), basée sur la séquence du gène *rfaA* impliqué dans la synthèse du LPS des bactéries, a également été appliquée.

Cette étude a été réalisée sur 26 génomes de *P. distasonis* dont 13 génomes séquencés pour cette étude et 13 génomes publics. Différentes analyses *in silico* ont été effectuées :

- Analyse des core- et pan-génomes ;
- Analyse phylogénétique ;
- Analyse comparative des génomes (synténie et BLAST) ;
- Classification RfbA.

3. Propriétés de *P. distasonis* liées à la sélection de nouveaux produits biothérapeutiques

De par les propriétés bénéfiques qu'elle apporte à son hôte, cette espèce bactérienne

semble être prometteuse comme potentiel NPB. Le maintien, la survie et l'importance de *P. distasonis* pour son hôte sont des paramètres indispensables à la sélection de ces produits thérapeutiques qui semblent impactés par la variabilité inter-souche. Les propriétés suivantes ont donc été étudiées sur 14 souches non apparentées du laboratoire :

- Résistance aux conditions gastriques ;
- Adhérence sur cellules Caco-2 (lignée provenant d'adénocarcinome colorectal) ;
- Effet sur la résistance transépithéliale des cellules Caco-2 ;
- Propriétés anti-inflammatoires sur cellules HT-29 (lignée provenant d'adénocarcinome colorectal servant de modèle d'étude de l'épithélium intestinal) ;
- Propriétés anti-inflammatoires sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC ; extraites à partir de sang humain).

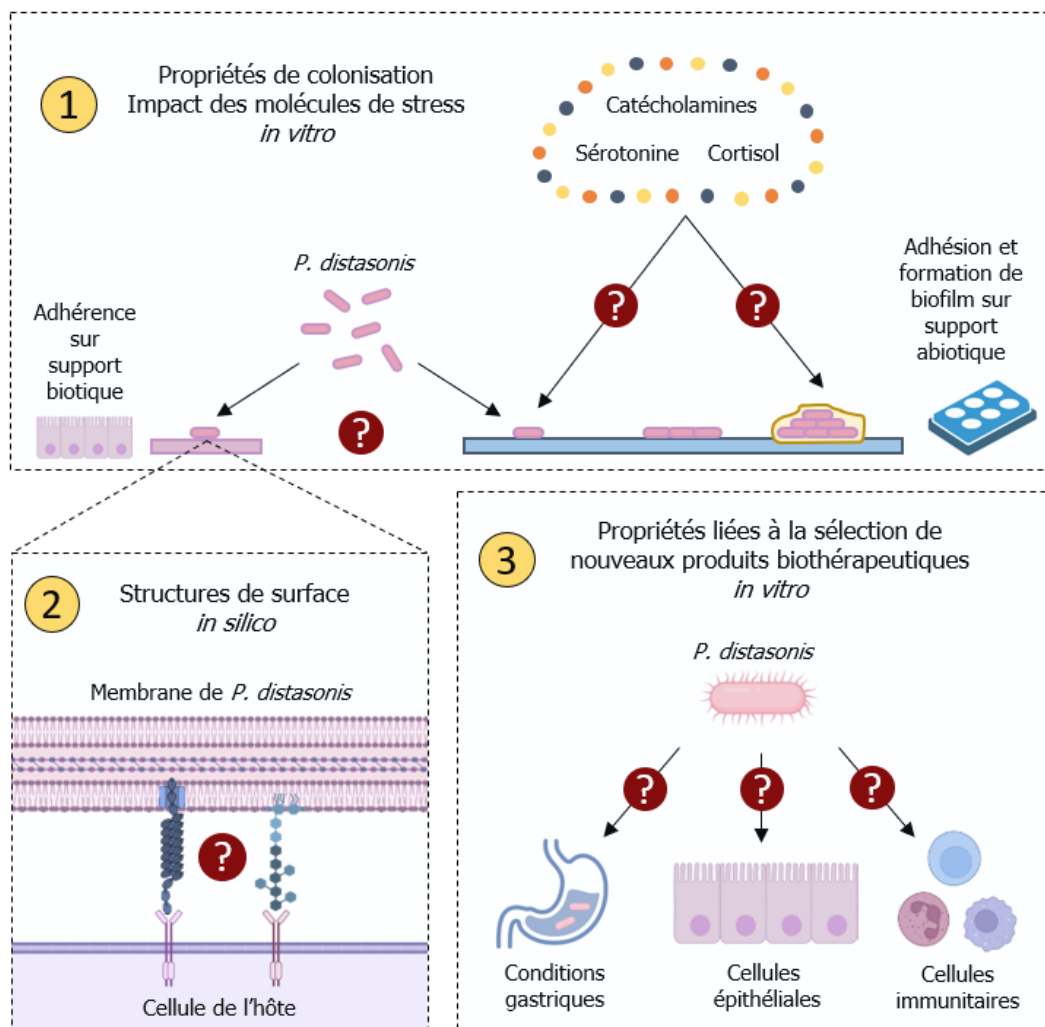


Figure 7. Représentation schématique des objectifs de la thèse. Figure effectuée sur BioRender.

Chapitre II :

Résultats

I. Etudes des propriétés d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis* et impact des molécules produites lors d'un stress sur ces propriétés

Surface properties of *Parabacteroides distasonis* and impacts of stress-induced molecules on its surface adhesion and biofilm formation capacities

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Céline Caillet, Laurence Mathieu, Jérôme F. L. Duval, Alain Lozniewski, Jean-Pol Frippiat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal

Microorganisms, 2021, 9, 1602

I. Etudes des propriétés d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis* et impact des molécules produites lors d'un stress sur ces propriétés

I.1. Introduction

De nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques à l'hôte peuvent modifier le MI tels que le régime alimentaire, l'environnement dans lequel évolue l'individu ou encore la prise d'antibiotiques (Hiippala et al., 2020). Un nombre croissant d'études montrent également que le stress a des effets sur la composition et l'organisation du MI (Bailey et al., 2011; Galley et al., 2017; Siopi et al., 2020). Ceci pourrait s'effectuer de façon directe via la synthèse de médiateurs de stress (catécholamines, glucocorticoïdes) libérés dans la lumière intestinale et qui agiraient sur les bactéries, ou de manière indirecte en modulant l'immunité locale et l'environnement intestinal (Galley et al., 2017).

De récents travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'une des espèces les plus négativement impactées lors d'un stress chronique dans un modèle murin est *P. distasonis* (Alauzet et al., 2020, 2019). *P. distasonis* est bacille à Gram négatif, anaérobie strict et faisant partie du « core microbiome » intestinal humain et murin. Comme précédemment décrit, cette espèce bactérienne semble apporter de nombreux bénéfices à son hôte. La perte de *P. distasonis* en cas de stress pourrait donc avoir des impacts sur la santé de l'hôte.

Le principal mécanisme de colonisation d'un environnement par des bactéries est la formation d'un biofilm (Costerton, 1999). Le passage à cette organisation dépend des capacités d'adhésion des bactéries au support directement liées à ses propriétés de surface. Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur les propriétés de surface de *P. distasonis*, ni sur un éventuel impact du stress de l'hôte sur ces mêmes propriétés.

Afin de comprendre comment *P. distasonis* colonise et se maintient au sein du tractus digestif, ses propriétés d'homo-agrégation, d'adhésion et de formation de biofilm ont été étudiées ainsi que l'impact direct d'un stress de l'hôte sur ces propriétés, via l'utilisation de molécules libérées dans la lumière intestinale au cours d'un stress.

La technique classiquement utilisée pour l'étude des biofilms bactériens est la méthode de la micropipette. Cette technique consiste à séparer les cellules planctoniques des bactéries sessiles en déposant et aspirant plusieurs fois du PBS stérile ou de l'eau physiologique dans des microplaques. Cependant, cette méthode est considérée comme agressive et induisant une variation dans les résultats ainsi qu'un manque de reproductibilité (Azeredo et al., 2017). Une nouvelle méthode utilisant la vapeur comme méthode de lavage pour étudier les biofilms bactériens de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *Pseudomonas aeruginosa* et

E. coli a récemment été proposée par l'équipe de Tasse et al. (Tasse et al., 2018).

Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation de la vapeur comme méthode de lavage. Les microplaques sur lesquelles le biofilm a été cultivé sont ainsi placées à l'envers au-dessus d'une source de vapeur (bain-marie). La vapeur générée par le bain-marie va alors se condenser et former des gouttelettes d'eau qui vont s'accumuler dans chaque puits à la surface du biofilm avant de retomber par gravité en entraînant les bactéries planctoniques. Un système de refroidissement est également placé sur les microplaques afin de favoriser la condensation et de maintenir une température acceptable pour les bactéries.

Cette méthode n'ayant jamais été appliquée à des biofilms de bactéries anaérobies, nous l'avons préalablement validée, notamment sur *P. distasonis*, dans une note soumise dans *BMC Research Notes* (Annexe 1) et utilisée dans la suite du projet.

Les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis* sont présentés sous la forme d'une publication publiée dans *Microorganisms* (2021, 9, 1602) : « **Surface Properties of *Parabacteroides distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities** ».



Article

Surface Properties of *Parabacteroides distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities

Jordan Chamarande ¹, Lisiane Cunat ¹, Céline Caillet ² , Laurence Mathieu ³ , Jérôme F. L. Duval ² , Alain Lozniewski ^{1,4}, Jean-Pol Frippiat ¹ , Corentine Alauzet ^{1,4} and Catherine Cailliez-Grimal ^{1,*}

¹ SIMPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; jordan.chamarande@univ-lorraine.fr (J.C.); lisiane.cunat@univ-lorraine.fr (L.C.); alain.lozniewski@univ-lorraine.fr (A.L.); jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr (J.-P.F.); corentine.alauzet@univ-lorraine.fr (C.A.)

² CNRS, LIEC, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; celine.caillet@univ-lorraine.fr (C.C.); jerome.duval@univ-lorraine.fr (J.F.L.D.)

³ Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (LCPME), Paris Sciences Lettres University (PSL), F-54500 Nancy, France; laurence.mathieu@univ-lorraine.fr

⁴ CHRU de Nancy, Service de Microbiologie, F-54000 Nancy, France

* Correspondence: catherine.cailliez@univ-lorraine.fr



Citation: Chamarande, J.; Cunat, L.; Caillet, C.; Mathieu, L.; Duval, J.F.L.; Lozniewski, A.; Frippiat, J.-P.; Alauzet, C.; Cailliez-Grimal, C. Surface Properties of *Parabacteroides distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1602. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081602>

Academic Editor: Pramod Gopal

Received: 21 June 2021

Accepted: 26 July 2021

Published: 27 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The gut microbiota is a complex and dynamic ecosystem whose balance and homeostasis are essential to the host's well-being and whose composition can be critically affected by various factors, including host stress. *Parabacteroides distasonis* causes well-known beneficial roles for its host, but is negatively impacted by stress. However, the mechanisms explaining its maintenance in the gut have not yet been explored, in particular its capacities to adhere onto (bio)surfaces, form biofilms and the way its physicochemical surface properties are affected by stressing conditions. In this paper, we reported adhesion and biofilm formation capacities of 14 unrelated strains of *P. distasonis* using a steam-based washing procedure, and the electrokinetic features of its surface. Results evidenced an important inter-strain variability for all experiments including the response to stress hormones. In fact, stress-induced molecules significantly impact *P. distasonis* adhesion and biofilm formation capacities in 35% and 23% of assays, respectively. This study not only provides basic data on the adhesion and biofilm formation capacities of *P. distasonis* to abiotic substrates but also paves the way for further research on how stress-molecules could be implicated in *P. distasonis* maintenance within the gut microbiota, which is a prerequisite for designing efficient solutions to optimize its survival within gut environment.

Keywords: *Parabacteroides distasonis*; stress; gut microbiota; adhesion and biofilm capacities

1. Introduction

A vast array of microbes, mostly bacteria, colonize the human body [1]. Most of these bacteria are located in the intestine as part of the gut microbiota (GM), with microbiota levels between 10^5 bacteria per gram of digesta in the upper parts of the small intestine, and more than 10^{12} bacteria per gram of digesta in the large intestine [2]. Several of these bacteria are merely opportunistic colonizers, while the majority are true symbiotic organisms [3]. The human GM consists primarily of the two phyla, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, as well as *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* and *Verrucomicrobia* [4]. The majority of these taxa have essential physiological functions such as breaking down fibers, stimulating the immune system or preventing pathogen colonization and are also involved in many other processes [5]. Intestinal dysbiosis, a pathological alteration of GM composition, has been associated with the onset or exacerbation of several chronic disorders such as inflammatory bowel diseases, metabolic syndromes, neurodegenerative and psychiatric conditions [6].

The composition of GM can be influenced by many factors, including intrinsic (host genetics, hormones) and extrinsic (diet, antibiotics, pollutants, and many others) factors [7]. An increasing number of studies has also shown that even moderate can lead to dysbiosis either directly via the action of stress mediators, released in the lumen, or indirectly by modulating the intestinal environment (local immunity, intestinal motility, pH) [3,8,9].

In our previous studies using two distinct murine models of chronic stress, we observed a stress-induced decrease in the intra-caecal relative abundance of *Parabacteroides*, and more specifically of *P. distasonis*, a Gram-negative strictly anaerobe belonging to the *Tannerellaceae* family within the *Bacteroidetes* phylum [10,11]. In spite of its low abundance, this genus was described as a member of the human and mouse core microbiomes [12–14]. This can be explained by its small but specific repertoire of degrading enzymes making it a specialist fibrolytic bacterium [15,16]. Moreover, some strains of *P. distasonis* have been shown to possess anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo and to reduce the severity of intestinal inflammation in murine models of colitis [17–20]. As a result of the production of succinate and secondary bile acids, this species also attenuates tumorigenesis and improves metabolic disorders [18,21,22]. Although there are several studies pointing to *P. distasonis* benefits and its potential use as the next-generation of probiotics [20,23], none of them have yet explored the mechanisms that may explain the persistence or loss of *P. distasonis* in the gut. Such mechanisms are related to bacterial surface properties leading to aggregation, adhesion and/or biofilm formation, that could all potentially be influenced by stress markers released by the host.

The predominant mechanism for bacteria to colonize an environment is the formation of a biofilm. Development of a biofilm on the surface, biotic or abiotic, results from both continuous deposition of planktonic cells and bacterial growth. Bacterial colonization begins through a series of recruitment processes that lead to several stages in the biofilm formation. The very first ones are clearly governed by physicochemical processes with the adhesion of planktonic bacteria to surface by the weak van der Waals and London dispersion forces and hydrophobic interactions. The colonist can then anchor to the surface using cell adhesion structure such as pili or fimbriae. At this point, the attachment that was non-specific and reversible become specific and irreversible. The biofilm, that can be made of one or several microorganisms, will then grow by cell division, cell recruitment and exopolysaccharide (EPS) matrix synthesis. Numerous functions have been attributed to EPS, most of them related to protection against the external environment or to the retain of water and nutrients. The EPS matrix is mainly composed of polysaccharides, structural proteins, enzymes, nucleic acids and lipids. Then, the biofilm enters its last stage corresponding to its degradation and dispersion that allow its propagation [24–26]. For a given species to form such a bacterial community, it must have the required adhesion capability which strongly depends on the physicochemical cell surface properties (electrostatic charge, presence of adhesins, degree of hydrophobicity) and the surrounding physicochemical conditions (pH, nature of electrolyte ions, salinity, etc). During a host stress situation, catecholamines (epinephrine, norepinephrine and dopamine), glucocorticoids (cortisol) and other stress-induced molecules (such as serotonin) are synthesized and released into blood circulation, oral cavity and gut lumen. It has been reported that these molecules can impact both in vitro and in situ the physiological behavior of bacteria, including their growth features, adhesion and/or biofilm formation capacities [27–32]. With the general objective to better understand the maintenance of this beneficial bacterial species within the GM, we characterized in this work the homo-aggregation, adhesion and biofilm formation capacities of 14 unrelated strains of *P. distasonis* and examine their response to stress molecules. Colloidal cell stability against aggregation was addressed via macroscopic homo-aggregation testing method [33–36]. In the literature, the terminology ‘auto-aggregation’ is sometimes used. However, this latter term tacitly implies that cell aggregation is mediated by auto-associative adhesins located at the surface of the interacting cells [37], rather than by conventional screening of the surface charge that cells carry, leading to suppression of inter-bacteria repulsive interactions. As the exact

mechanism of aggregation is unknown for *P. distasonis*, we thus employ the more neutral term ‘homo-aggregation’ taken from text-book colloidal stability literature. In order to determine the charge density and permeability of their external surfaces, analyses of the electrokinetic cell surface properties were performed using electrophoresis.

2. Materials and Method

2.1. Bacterial Strains and Culture Conditions

A total of 14 *P. distasonis* strains, including 13 nonredundant clinical and clonally unrelated (as assessed by AP-PCR and ERIC-PCR [38,39]; see Supplementary Materials Figure S1) isolates collected by the clinical microbiology laboratory of the University Hospital of Nancy, France, and the type strain *P. distasonis* DSM 20701^T were tested.

Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103 (LGG) was used as positive control for the homo-aggregation and adhesion capacity [40]. *Bacteroides fragilis* 638R (*Bf* 638R) and *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (*Bt* VPI-5482) were respectively used as positive and negative control for the biofilm formation study [41,42].

Strains were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in appropriate broth supplemented with 15% (*v/v*) glycerol. Prior to assay, *P. distasonis* strains, *B. fragilis* 638R and *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 strains were streaked onto Brucella agar plates (BBA) supplemented with 5% (*v/v*) of defibrinated sheep blood (Oxoid, Thermo Fisher Diagnostics, Dardilly, France), 1% (*v/v*) of hemin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and 1% (*v/v*) of vitamin K1 (Sigma-Aldrich). After an incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h in anaerobic conditions, strains were subcultured in Schaedler broth for 24 h in anaerobic conditions. LGG was streaked onto MRS agar and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h in aerobic conditions. Further subculture was performed in Schaedler broth for 24 h in aerobic conditions.

2.2. Sample Purity and Bacterial Enumeration by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

qPCR was used for sample purity and bacterial enumeration in the adhesion and biofilm formation assays. In all assays, genomic DNA was extracted by using the QiaAmp DNA MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The extracted DNA was added to 25 μL of the qPCR mixture containing Mesa Blue (2X, Master Mix Plus for SYBR, Eurogentec, Seraing, Belgium) and the following primers (10 μM): primers targeting an internal fragment of panbacterial 16S rRNA encoding gene (1369F: 5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3' and 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTGTTACGACTT-3') versus 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for *P. distasonis* (Pdist1115F: 5'-CTTGCCACTAGTTACTAACA-3' and Pdist1276R reverse: 5'-CCCTGTCGCCAGGTG-3') as previously described [10]. For DNA amplification, the following thermocycling conditions were applied with the MyiQTM2 real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France): initial denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min followed by 40 cycles of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (annealing and extension temperature) for 1 min.

2.3. Survivability of *P. distasonis* under Experimental Conditions

Three media were tested for the survivability of *P. distasonis* DSM 20701^T under aerobic or anaerobic conditions: saline solution (NaCl 0.9%), ten times-diluted Mueller-Hinton (MH, Sigma-Aldrich) and 1–250 mM NaNO₃ (Sigma-Aldrich) solution. The saline solution is used for bacterial suspension dilutions, diluted MH for adhesion capacity assays and NaNO₃ electrolyte for electrokinetic experiments as a dispersing medium. In experiments conducted in saline solution and diluted MH medium, bacterial suspensions (10^8 CFU/mL) were incubated for 48 h at room temperature under aerobic conditions and at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under anaerobic conditions, respectively. After 2, 4, 6, 24 and 48 h, an enumeration on BBA medium was carried out. An enumeration of *P. distasonis* DSM 20701^T was also performed after 1 h of incubation at room temperature under aerobic conditions in 1 mM and 250 mM NaNO₃ electrolyte solution. Two independent experiments were performed including triplicate of each conditions.

2.4. Homo-Aggregation Assays

The homo-aggregation property of *P. distasonis* was evaluated (two independent experiments, in triplicate) as previously described by Polak-Berecka et al. [40]. From colonies obtained on plates, a bacterial suspension of 10^8 CFU/mL was prepared in saline solution. The optical density (OD_{600nm}) has been measured on a PV4 spectrophotometer (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) using polystyrene cuvettes. OD_{600nm} was then recorded after 0, 2, 3 and 5 h of incubation at room temperature. The 'homo-aggregation coefficient time' (ACT) was estimated on the basis of the following Equation (1) [43]:

$$ACT = (1 - OD_{600nm, 15h} / OD_{600nm, 10h}) \times 100 \quad (1)$$

2.5. Abiotic Support and Microscopic Observation of the Resulting Microbial Organization

2.5.1. Microtiter Plate for Adhesion and Biofilm Formation Capacity

In order to avoid any misleading results that may occur when using microplates treated to enhance cell adhesion, untreated, pyrogenic and polystyrene 6-wells microplates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used to analyze adhesion and biofilm formation. For all experiments, microplates were inoculated with 10^8 CFU/mL of a bacterial suspension in MH broth.

Concerning cell adhesion-related experiments, the medium was removed after 48 h of incubation at 37°C under anaerobic conditions and the wells were carefully washed using the steam-based method as described by Tasse et al. [44]. Steam was used as a soft washing technique to preserve adherent bacteria and biofilm integrity as well as to improve the reproducibility in quantifying adhesion and biofilm formation capacity. This washing system was operated for 40 min in order to remove the medium and all non-adherent bacteria. The adherent bacteria were resuspended in PBS solution by scraping the well surfaces. The DNA was then extracted and a specific region of the 16S rRNA of *P. distasonis* was amplified and quantified by qPCR (see Section 2.2 for primers and protocol). Knowing the number of 16S operons in *P. distasonis* and controls, we then determined the number of bacterial cells/cm².

For biofilm-related experiments MH was gently removed after 48 h of incubation at 37°C under anaerobic conditions and the wells were then cleaned with PBS and subsequently reflowed with Schaedler broth, to promote the growth of the adherent bacteria. The microplates were further incubated using the same conditions for additional 6 days. The medium was renewed every 2 days. After 8 days of incubation in total, the biofilm was quantified as described for the adhesion-related experiments. The analysis of adhesion as well as that of biofilm formation were each carried out in triplicate in two independent experiments.

2.5.2. Microscopic Observation

Untreated, pyrogenic and polystyrene 6-wells microplates were inoculated as previously described for biofilm experiments in order to study the organization of *P. distasonis* biofilms. The plates were steam-washed and pyrogenic sterile water was added to the wells. For staining, a working solution of $100\times$ diluted SYBR[®] Green I (SG) (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) was used. 4 mL of the sample was stained with SG working solution at $10\ \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 15 min while protecting the plates from light. To remove the excess of SG, a second steam-wash was realized and an aluminum foil was used to protect plates from light. Stained bacteria were recovered in 2 mL of pyrogenic sterile water in order to perform in situ observations of the biofilms under an epifluorescence microscope (Olympus BX51, Life Science Europa GmbH, city, Germany), equipped with a water immersion objective ($\times 600$ magnification). A 470–490 nm (blue) excitation filter was used, coupled with a barrier filter at 520–530 nm.

2.6. Impact of Stress-Induced Molecules on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation

Effects of stress-induced molecules on adhesion and biofilm formation were investigated (in triplicate) using untreated, pyrogenic and polystyrene 96-wells microplates (Sarstedt). Before use, epinephrine, norepinephrine, dopamine and serotonin (Sigma-Aldrich) were dissolved in distilled water to a final concentration of 10 mM. Cortisol (Sigma-Aldrich) was dissolved in distilled water to a final concentration of 250 μM . A 0.2 μm filter was used to sterilize the solutions. The compounds were then used at the following concentrations: epinephrine: 100 μM , norepinephrine: 100 μM , dopamine: 100 μM , serotonin: 100 μM , cortisol: 0.250 μM and were added at two different times: either during the pre-culture phase as described in Section 2.1, or during the inoculation of bacterial cells in plates, corresponding to the beginning of the adhesion/biofilm formation phase.

For these experiments, bacterial suspensions (10^8 CFU/mL) were inoculated into microplates in adapted medium as previously described. The plates were incubated for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions for both adhesion and biofilm formation assay. Using the steam-based method, the wells were then washed as previously described. Plates were dried for 10 min at 60 °C and stained for 5 min with 150 μL of 2% Gram's crystal violet solution (Sigma-Aldrich) like previously described by Donelli, et al. [45]. The excess stain was then rinsed for 40 min using steam-wash. After 10 min drying at 37 °C, the adherent bacteria were resuspended in 150 μL of 33% (v/v) glacial acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and analyzed by OD_{570nm} measurement.

2.7. Electrophoretic Mobility Measurements

Electrophoretic mobility experiments consist in following the displacements of particles in a quartz Suprasil® rectangular capillary (Helma, Jena, Germany) upon application of a constant direct-current electric field (800 V/m). Particle scattering tracking is monitored by reflection of a laser beam at 90° angle via a charge-coupled device (CCD) camera, with trajectories recorded in real time and processed by CAD image analysis software to derive electrophoretic mobility distributions [46].

Assays were incubated for 16 h on Schaedler broth, washed by centrifugation and resuspended in 1 mM NaNO₃. The washed bacterial suspensions were then diluted and added in 1 mM to 250 mM NaNO₃ in order to have a bacterial cell number of 10^2 in the quartz electrophoresis cell.

Electrophoretic mobility measurements were performed at natural pH and room temperature in triplicate in two independent experiments for each NaNO₃ electrolyte concentration tested using a Zetaphoremeter IV (CAD Instruments, Les Essarts-le-Roi, France). The electrophoretic mobility μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) of bacterial cells may be approximated at sufficiently large electrolyte concentrations in line with the establishment of Donnan electrostatics in the electrokinetically active peripheral cell surface layer, by the following expression [47]:

$$\mu = \frac{\rho_o}{\eta \lambda_o^2} + \frac{\varepsilon \psi^o / \kappa_m + \psi^D / \lambda_o}{\eta (1 / \kappa_m + 1 / \lambda_o)} \quad (2)$$

where ρ_o ($\text{C} \times \text{m}^{-3}$) represents the effective density of charges carried by the cell-layer, κ_m (m^{-1}) the reciprocal Debye layer thickness in that layer and λ_o the softness parameter. ε ($\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$) and η ($\text{Pa} \cdot \text{s}^{-1}$) refer to the dielectric permittivity and viscosity of the medium (with $\varepsilon = 8.854 \times 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$ and $\eta = 0.96 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}^{-1}$ under the temperature conditions of interest in the work). The quantity $1 / \lambda_o$ (m) corresponds to the characteristic penetration length of the electroosmotic flow developed under electrophoresis conditions within the soft permeable surface structure. In Equation (2), ψ^o (V) corresponds to the surface potential, i.e., the potential at the position corresponding to the location of the outer boundary of the surface layer, and ψ^D (V) is the Donnan potential, i.e., the electrostatic potential reached

within the bulk of that layer. The parameters ψ^D , ψ^0 and κ_m all depend on the space charge density ρ_0 according to the following expressions:

$$\psi^D = \frac{RT}{F} \sinh^{-1} \left(\frac{\rho_0}{2FI} \right) \quad (3)$$

$$\psi^0 = \psi^D - \frac{RT}{F} \tanh \left(\frac{F\psi^D}{2RT} \right) \quad (4)$$

$$\kappa_m = \kappa \left\{ \cosh \left(\frac{F\psi^D}{RT} \right) \right\}^{1/2} \quad (5)$$

where κ represents the reciprocal of the screening Debye layer thickness, R the gas constant, T the absolute temperature, F the Faraday number ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$) and I the solution ionic strength fixed in our experiments by the NaNO_3 electrolyte concentration. ρ_0 and $1/\lambda_0$ were determined from the measured variation of μ with changing I using standard Levenberg-Marquardt procedure for fitting cell electrophoretic mobility data to Equations (2)–(5).

2.8. Statistical Analysis

The one-way analysis of variance (ANOVA) was used to group the samples according to their adhesion or biofilm formation capacities. In order to determine whether stress-induced molecules significantly impact adhesion and biofilm formation, a t -test was adopted. The p values < 0.05 were considered as statistically significant. The principal component analysis (PCA) was used to highlight the potential correlation between the different variables studied and the hierarchical agglomerative clustering (HAC) to cluster *P. distasonis* strains based on the similarity of their capacities. All statistical analyses were carried out with XLSTATs program version 2021.2 (Addinsoft, Paris, France).

3. Results

3.1. Survival Capacity of *P. distasonis* during Stressing Conditions Linked to Experiments: Aerobic Condition, Saline Solution, Diluted MH and NaNO_3 electrolyte

In the experiments reported in this study, the protocols included cell manipulation in aerobic and other potentially stressful environments (physiological water, diluted MH and NaNO_3 electrolyte). To address whether these conditions may cause bacterial death, the ability of the cells of interest to survive under such conditions was investigated (Table S1).

Cell enumeration assays performed after 2, 4, 6, 24 and 48 h under aerobic condition and at room temperature in saline solution showed that *P. distasonis* DSM 20701^T was able to survive under such conditions at least for 6 h without any indication of mortality. This coincides with the presence of putative cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I and II genes annotated on the genome of *P. distasonis* DSM 20701^T (BDI_2648; BDI_2649).

We also observed that, under anaerobic condition, *P. distasonis* was able to survive 48 h in a diluted MH medium without any growth. In the same way, NaNO_3 concentration conditions adopted for electrokinetic measurements did not impact on the bacterial growth during the 1-h duration of the experiments.

3.2. Homo-Aggregation Capacity of *P. Distasonis*

P. distasonis strains exhibited homo-aggregation capacities ranging from 4.6% to 8.2% after 5 h which were significantly lower than that observed for the positive control LGG (14.7%) (Figure 1A).

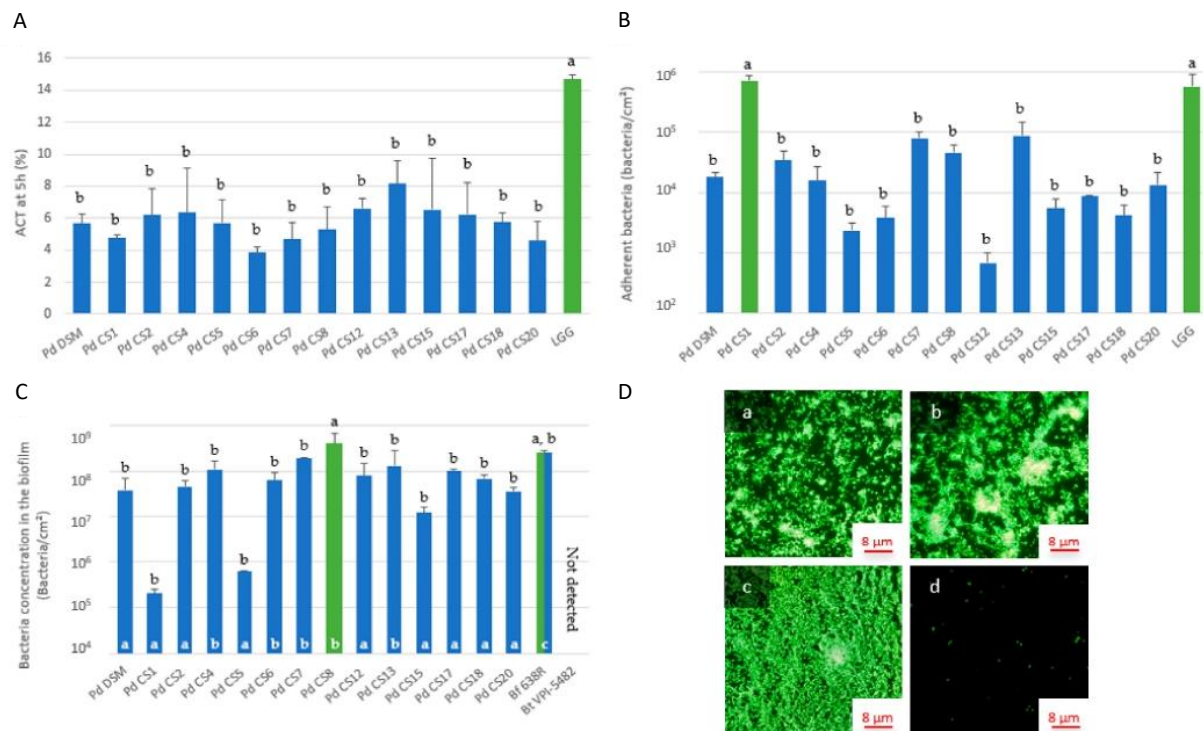


Figure 1. (A) Homo-aggregation coefficient (ACT) of 14 strains of *P. distasonis* and LGG (positive control) after 5 h of incubation at 37 °C under anaerobic conditions. The colors coupled with a and b indicate the significantly different groups after ANOVA, $p < 0.05$. Error bars reflect standard error of the mean. (B) Adhesion capacity of 14 strains of *P. distasonis* and LGG (positive control) on abiotic support after 48h of incubation at 37 °C under anaerobic conditions. The colors coupled with a and b indicate the significantly different groups after ANOVA, $p < 0.05$. Error bars reflect standard error of the mean. (C) Biofilm formation capacity of 14 strains of *P. distasonis*, *Bf* 638R (positive control) and *Bt* VPI-5482 (negative control) on abiotic support after 6 days of incubation at 37 °C under anaerobic conditions. The colors coupled with black a and b indicate the significantly different groups based on ANOVA, $p < 0.05$. White a, b, and c indicate the biofilm organization pictures collected in (D). Error bars reflect standard error of the mean. (D) Biofilm organization on abiotic support after 6 days. (a) Organization showing small clusters of bacteria from *P. distasonis* CS2 biofilm; (b) Organization showing large clusters of bacteria from *P. distasonis* CS7 biofilm; (c) Biofilm formed by the positive control *Bf* 638R; (d) Scattered cells from the negative control *Bt* VPI-5482. All the data represent mean \pm standard error or observations from at least two independent experiments performed with each strain in triplicate ($n = 2 \times 3$).

3.3. Adhesion and Biofilm Formation Capacities of *P. distasonis* Strains on Abiotic Support

Two significantly different groups could be identified from the adhesion assays (Figure 1B): the first one, denoted as (a), with the CS1 and the positive control LGG, and the second one, denoted as (b), that includes thirteen out of the fourteen *P. distasonis* strains. In this study, all tested strains showed adhesion capacities to an abiotic support after 48 h of incubation. The adhesion capacity of the 10^8 inoculated bacteria/cm² ranged from 7×10^2 adherent bacteria/cm² (strain CS12) to 7×10^5 adherent bacteria/cm² (with the strain CS1 showing an adhesion capacity as strong as that of the positive control LGG).

Concerning biofilm formation, the experiments showed that although all tested strains had the capacity to form a biofilm, an inter-strain variability was observed (Figure 1C), similarly to results pertaining to the adhesion capacity. The statistical comparison revealed two significantly different groups ranging from 2×10^5 to 4×10^8 bacteria/cm². The first group (a) included the CS8 while the second group (b) included thirteen additional *P. distasonis* strains. The positive control *Bf* 638R belonged to both groups with a bacterial cell number of approximately 3×10^8 bacteria/cm². The negative control *Bt* VPI-5482

did not form any biofilm after 48 h of incubation, its DNA concentration being below the detection limit (10^3 bacteria/mL) for the qPCR.

Additionally, although all *P. distasonis* strains tested formed biofilm, epifluorescence microscopic observations highlighted some differences in terms of biofilm organization (Figure 1D). Two distinct types of biofilm organization, different from the control strain *Bf* 638R, were observed for all the tested strains (Figure 1C): the first one included well-defined patches of single cells and of small clusters (a), and the second one showed larger bacterial clusters (b). *Bf* 638R biofilm was covering the entire surface of the well (c) whereas *Bt* VPI-5482 showed only a few single cells distributed over the entire abiotic surface (d). Overall, experiments on *P. distasonis* capacities revealed an important inter-strain variability for both adhesion and biofilm formation properties and biofilm structure.

3.4. Electrokinetic Properties of *P. distasonis*

The electrokinetic cell surface properties were estimated for the fourteen *P. distasonis* strains and the three control strains used in this study from proper fitting (Equations (2)–(5)) of the dependence of their electrophoretic mobility on NaNO_3 electrolyte concentration. For the sake of illustration, results are shown in Figure 2 for selected bacterial strains while profiles for all tested strains are reported in Figure S2. The theoretical electrophoretic mobility curves deviated from experiments below a threshold value of electrolyte concentration (ca. 10–20 mM). In addition, electrophoretic mobility tended asymptotically to a non-zero plateau value at sufficiently large electrolyte concentrations. Based on the confrontation between theory and experiments (Table 1), the charge density for CS1 was remarkably lower (−8.6 mM) than the charge density of the other *P. distasonis* strains tested (between −33.8 and −23.7 mM). The charge density of CS1 was further close to that of LGG (−7.0 mM), and, in less extent, of the biofilm formation positive control strain *Bf* 638R (−12.5 mM) while other strains had charge densities with order of magnitude comparable to *Bt* VPI-5482 (−27.3 mM). Based on the hydrodynamic penetration length scale $1/\lambda_0$, a significantly higher surface permeability was observed for the CS1 ($1/\lambda_0$ of 2.51 nm) compared to that of all other strains examined. The surface permeability of CS6 was also quite high with a $1/\lambda_0$ of 2.23 nm. All other *P. distasonis* strains exhibited a surface permeability ranging between 1.60 nm (CS2) and 1.98 nm (CS8). The $1/\lambda_0$ of the control strains *Bf* 638R and *Bt* VPI-5482 were in the same range (1.91 and 1.86 nm, respectively). Then, the hydrodynamic penetration length of LGG is the smallest evaluated with 1.07 nm.

Table 1. Charge density (ρ_0/F , expressed in concentration of equivalents (anionic) charges) and cell surface permeability ($1/\lambda_0$) of *P. distasonis* and control strains.

Strains	ρ_0/F (mM)	$1/\lambda_0$ (nm)
<i>P. distasonis</i> DSM 20701 ^T	−26.6	1.79
<i>P. distasonis</i> CS1	−8.6	2.51
<i>P. distasonis</i> CS2	−37.0	1.60
<i>P. distasonis</i> CS4	−30.4	1.80
<i>P. distasonis</i> CS5	−23.5	1.85
<i>P. distasonis</i> CS6	−23.7	2.23
<i>P. distasonis</i> CS7	−29.0	1.84
<i>P. distasonis</i> CS8	−32.3	1.98
<i>P. distasonis</i> CS12	−29.1	1.78
<i>P. distasonis</i> CS13	−33.8	1.80
<i>P. distasonis</i> CS15	−29.1	1.78
<i>P. distasonis</i> CS17	−33.8	2.04
<i>P. distasonis</i> CS18	−24.0	1.88
<i>P. distasonis</i> CS20	−27.4	1.87
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	−7.0	1.07
<i>B. fragilis</i> 638R	−12.5	1.91
<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	−27.3	1.86

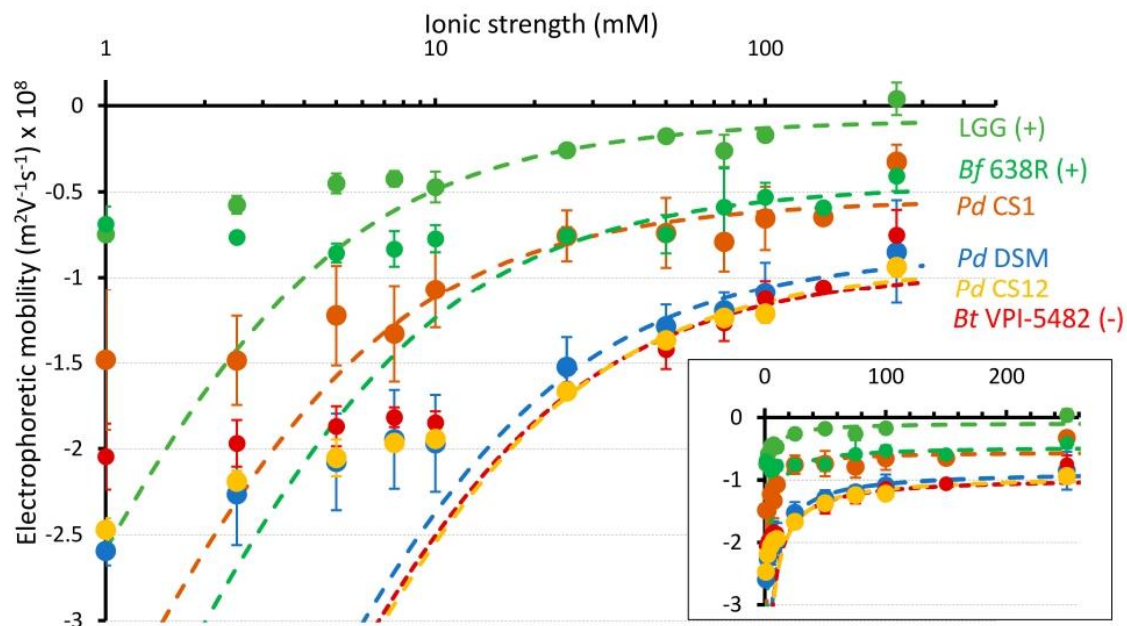


Figure 2. Impact of electrolyte concentration on the electrophoretic mobility of 3 *P. distasonis* strains (CS1, CS12 and DSM 20701^T) and controls LGG, *Bf* 638R and *Bt* VPI-5482. Points: experimental data. Dotted lines: fitting of the experimental electrokinetic data by the theoretical expressions 2-5 for the electrophoretic mobility of soft particles. In inset, electrokinetic data are represented according to linear axis in electrolyte concentration. Error bars reflect standard error of the mean. Data represent mean \pm standard error from at least two independent experiments performed with each strain in triplicate ($n = 2 \times 3$).

3.5. Correlation between ACT, Electrokinetic Surface, Adhesion and Biofilm Formation Properties of *P. distasonis*

PCA permitted us to analyze the relationship between homo-aggregation, adhesion, biofilm formation and electrokinetic properties of the fourteen *P. distasonis* strains tested (Figure 3). The 2-D PCA explained a total of 77.35% of the total variations in the dataset. The positive and negative controls (LGG, *Bf* 638R and *Bt* VPI-5482) used in this study were left out of the PCA analysis to avoid a masking effect caused by their significant differences from *P. distasonis*.

The 2-D PCA (Figure 3A) suggested a positive correlation between the charge density of the cell surface and the adhesion capacity on abiotic support with a narrow angle close to 0° . Indeed, CS1, that displayed the highest adhesion capacity, had also a significantly lower density of charges (and a larger cell surface permeability), suggesting the implication of rather extended and loose surface structures in its adhesion to abiotic substrate. A negative correlation between the ACT and the cell surface permeability may appeared as the CS1 and CS6 with the highest surface permeability also displayed the lowest ACT. However, as the difference between the ACTs of CS1, CS6 and the other strains were not significant, this correlation cannot be considered generic. The right-angles ($=90^\circ$) between other parameters indicated the independence and the absence of relationship between the variables. With the exception of CS1, CS6 and CS8, results were relatively similar. The clustering of *P. distasonis* strains by HAC (Figure 3B) conformed these observations by revealing five distinct clusters where the CS1, 6 and 8 were individually grouped. Despite differences in electrokinetic properties among all strains, the ACT of CS1 was not different from that of other *P. distasonis* strains. In the same way, the CS13 and the CS6, which exhibited respectively the highest and lowest ACTs, did not show any difference in their adhesion or biofilm formation capacities, demonstrating the absence of correlation between ACT and other surface properties. The CS7 and the CS8, which had the highest biofilm

formation capacities, had ACTs and electrokinetic properties comparable to those evaluated for the other strains. Similarly, CS1 which had the lowest density of charge and the highest surface permeability, and CS13 which had the highest ACT did not show particularly strong biofilm formation capacity.

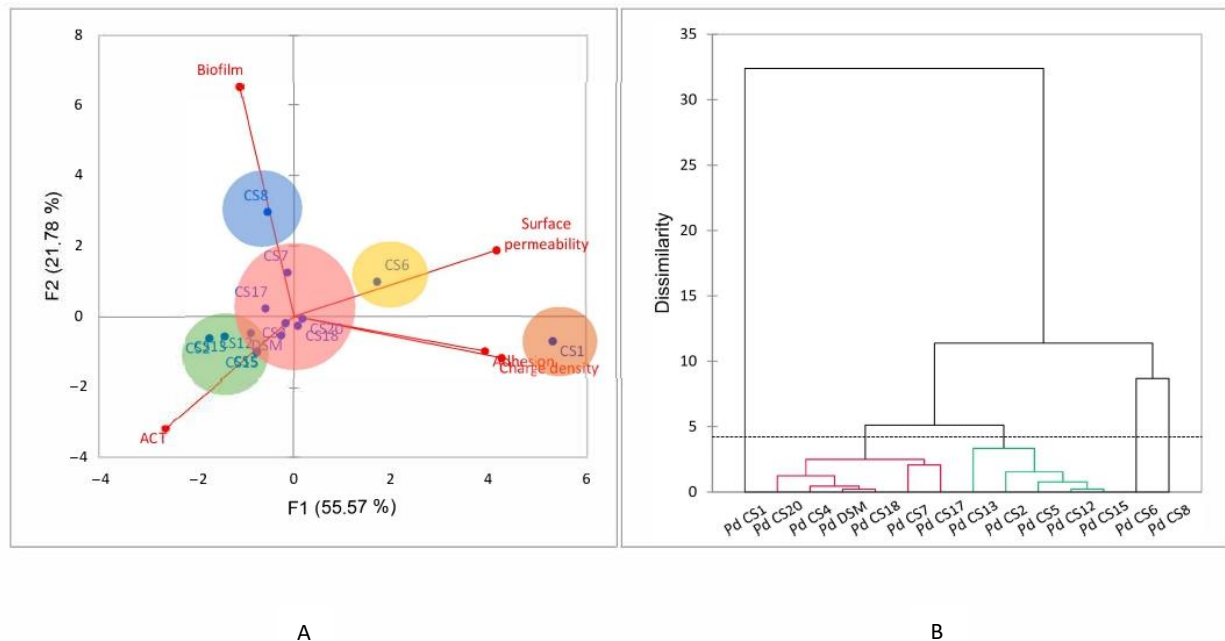


Figure 3. (A) Two-dimensional principal component (2-D PCA) analysis biplot showing relationships amongst the charge density (ρ_0/F), the surface permeability ($1/\lambda_0$), the homo-aggregation coefficient (ACT), the adhesion and biofilm formation capacities of *P. distasonis* strains with a F1 and F2 of 77.35%. (B) Dendrogram representing clustering of *P. distasonis* strains based on the similarity of their capacities analyzed by hierarchical agglomerative clustering (HAC). The dotted line characterizes the automatic truncation, leading to five groups identified with circles in the 2-D PCA.

3.6. Impact of Stress-Induced Molecules on Adhesion and Biofilm Formation

The impacts of the main stress-induced hormones and neurotransmitters released in the gut lumen on the adhesion and biofilm formation capacities of *P. distasonis* were investigated, in order to determine whether they may interfere with the persistence of *P. distasonis* within the GM. We observed that all the tested molecules had an effect, either positive or negative, on the adhesion and biofilm formation capacities of several *P. distasonis* strains (Figure 4). All but the type strain showed at least one response (positive or negative) to the stress markers, either on the adhesion (35% of the assays) or the biofilm formation (23% of the assays). Interestingly, results for most strains also depended on the time when molecules were added (i.e., during growth phase, adhesion phase or during biofilm formation). Basically, a significant reduction in the adhesion and the biofilm formation capacities was observed in respectively 29% and 14% of the assays, while respectively 6% and 9% showed a significant increase in these capacities. Reduction in the adhesion capacity occurred primarily when the molecules were added during the growth phase (19% versus 10% of reduction observed when molecules were added during the adhesion) whereas the reduction in biofilm formation occurred primarily when molecules were added during biofilm formation (10% versus 4% of reduction observed when molecules were added during the growth phase). Unexpectedly, a stress-induced effect on the adhesion capacity was rarely correlated with the same effect on the biofilm formation capacity.

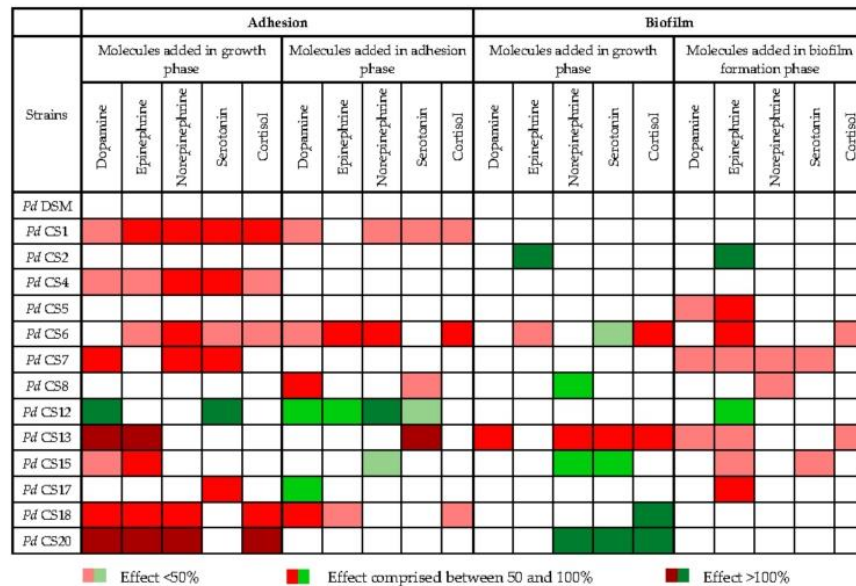


Figure 4. Impact of dopamine, epinephrine, norepinephrine, serotonin and cortisol on the adhesion and biofilm formation capacity of 14 strains of *P. distasonis*. Pd: *P. distasonis*. Red square indicates a significant reduction of the adhesion/biofilm formation capacities of the strains. Green square indicates a significant improvement of the adhesion/biofilm formation capacities of the strains. White square indicates no impact of the stress-induced molecules on the properties of the strains. Statistical analyses were done using the *t*-test. Data represent mean from triplicate for each condition (n = 3).

4. Discussion

P. distasonis is a member of the gut core microbiome that brings many beneficial properties for its host, on the metabolic, immune and intestinal inflammation aspect [15,18–20,48]. Its relative abundance within the GM has however been negatively associated with various chronic inflammatory diseases [48–51]. Interestingly, its abundance was also significantly decreased in chronic stress situations, being involved in the onset or exacerbation of such chronic disorders [8,10,11]. However, little is known so far about the properties of *P. distasonis* that could explain its persistence or loss within the GM.

Bacteria must reach a support before they can interact with it. In a given environment, the homo-aggregation coefficient is a measure of the ability of a bacterial organism to form microcolonies with other organisms of the same species. As a given microorganism’s ability to aggregate increases, the more it will sediment and reach the support [52]. Moreover, the ability of cells to form aggregates is a required condition for the formation of multicellular clumps, commonly considered to be one of the first steps in biofilm formation. Cell surface molecules, such as proteins and exopolysaccharides, may also be involved in cell-cell interactions and thereby homo-aggregation. This study demonstrated that all strains of *P. distasonis* investigated were able to homo-aggregate moderately, showing their potential to sediment and consequently, reach and adhere onto a given support.

The second step, after reaching the support, is the adhesion of the bacteria. The adhesion capacity of the bacteria to a support may be due to occurrence of specific interactions involving cell surface molecules and structures (pili, fimbriae, flagella, auto associative proteins, exo/lipopolysaccharides and many others) or unspecific interactions like van der Waals forces, hydrophobic and electrostatic interactions [53,54]. These interactions directly depend on the support composition on which bacteria are located, including its surface charge, its hydrophobicity and its chemical surface functionalities. In our study, untreated, polystyrene-plates were used, showing an uncharged surface with hydrophobic groups

which eliminates the potential involvement of surface charges in the adhesion process. Under the tested conditions, all *P. distasonis* strains showed an adhesion capacity, with one of the studied strains revealing an adhesion capacity as important as the positive control *L. rhamnosus* GG.

After the colonization of a surface by planktonic cells, a conversion into a sessile lifestyle is essential for bacteria in order to protect themselves against environmental stress (physical stress, antibiotics, etc.). This protection is provided by a matrix usually composed of exopolysaccharides, that improve the capture of nutrient by bacteria, as helped by the spongy structure of the exopolymeric matrix and by an increased enzyme retention that leads to more-efficient substrate conversion [55]. The bacterial transition from planktonic lifestyle to biofilm organization requires changes in gene expression and physiological modification that ensure the production of the extracellular matrix and the up/down-regulation of genes involved in the synthesis of factors required for biofilm formation, such as adhesion factors needed for the settling of the adhesion step [56]. In this study, we demonstrated that all the *P. distasonis* strains studied had the capacity to form a biofilm. Different organization of the biofilm could be observed among the strains. Not surprisingly, the organization seems to depend on the number of bacteria in the biofilm: the more important is the quantity of bacteria, the larger bacterial clusters will be observed.

The investigation of the electrokinetic properties of the cell peripheral regions (outer membrane and anchored surface structures) may provide a first qualitative picture of the surface determinants driving adhesion and biofilm formation. The electrophoretic mobility of all tested strains was negative and showed a plateau at sufficiently large ionic strengths. This asymptotic plateau value is the signature for the presence of a charged and permeable layer on the bacteria surface [46]. Gram-negative and Gram-positive bacteria show important differences in terms of cell wall structures. Differences between the positive control LGG (Gram-positive) and *P. distasonis* (Gram-negative) strains could thus be expected. Interestingly, the CS1 strain showed an external surface that was less electronegative than the other strains, with a charge density that was close to that of LGG. The electrokinetic features of LGG are due to the presence of exopolysaccharides and pili at its surface, which could suggest the possible presence of such surface structures for the CS1 strain that is defined by similar adhesion capacity [46]. Other *P. distasonis* CS revealed charge densities closer to that of *Bt* VPI-5482. *B. fragilis* 638R, that show an external surface slightly less charged than the majority of *P. distasonis* strains but a close surface permeability, is well-described for its 10 distinct polysaccharide (PS) biosynthesis loci [57]. Previous studies on several strains of *B. fragilis* have further shown the presence of fimbriae, lipopolysaccharides with particular structure, OmpA and outer-membrane vesicles on its surface, all potentially involved in its adhesion [58,59]. In *P. distasonis* DSM 20701^T, 13 capsular PS biosynthesis loci have been described with four of them that are disrupted by phage insertions between the upstream regulatory genes (*upcY* and *upcZ*) and the downstream PS biosynthesis gene cluster of capsular PS [15]. No study has yet highlighted the presence of other external structures involved in the adhesion and biofilm formation capacity of *P. distasonis*. Just one study revealed the absence of fimbriae-like structure in *P. distasonis* as well as *B. fragilis* [60].

The expression of surface components of *B. fragilis* is subject to phase variations, a reversible ON-OFF phenotype, controlled by DNA inversions of the polysaccharide biosynthesis loci promoters. These abilities allow the bacteria to elaborate an extremely flexible and adaptive surface architecture that is likely pivotal for their long-term survival and predominance in the human colon [57,61,62]. In *P. distasonis*, such a mechanism has been described for a phase-variable S-layer glycoprotein and for 11 of the 13 capsular PS biosynthesis loci, with a tyrosine-type site-specific recombinase encoding gene upstream the *UpxY* homolog gene [15,62]. The same study revealed an important proportion of laterally transferred genes in *P. distasonis* genome, potentially involved in its maintenance within the GM [15].

Our findings give a first qualitative insight into the adhesion and biofilm formation capacities of a large panel of *P. distasonis* strains and provide some hypothesis about the mechanisms that could explain its persistence in the digestive tract. However, the experiments performed on an abiotic support, obviously, cannot reflect on their own the complexity of the digestive tract as the pH effects and/or presence of adhesins at the surface of epithelial cells may considerably affect (positively or negatively) the adhesion and biofilm formation capacities. Bacterial surface structures are decisive to mediate interactions with other microorganisms as well as with the host's cells [40,52]. Except the correlation between the charge density of the cell surface and the adhesion capacity suggesting the implication of rather extended and loose surface structures in the CS1 adhesion capacities to abiotic substrate, no clear and generic correlation between the other cell properties has been found. This is an important result as such. Indeed, our observations can be explained by the very diversity in the structure of *P. distasonis* surface that is inherently related to the inter-strain variability observed in all our experiments. This underscores a large panel of cell surface arsenal and corresponding flexible cell adhesion capacities: the very diversity of *P. distasonis* could be a decisive property that promotes its persistence in gut via efficient adhesion and subsequent biofilms formation abilities. However, it is important to specify that the study relates to the adhesion and to the early biofilm formation phases of *P. distasonis*. More precise analysis of the biofilm architecture is required for evaluation of the biofilm development and the role of surface structures in cell adhesion [63,64].

As we previously described in murine models, a chronic stress led to a decrease in intestinal relative abundance of *P. distasonis* [10,11]. This reduction may be due to the action of stress markers released in the intestine that have been described to modulate bacterial adhesion and biofilm formation [31,32,53,65]. In the present study, we have investigated the potential effect of such markers on the adhesion and biofilm formation capacities of *P. distasonis*. Our results showed that all the molecules tested, hormones and/or neurotransmitters, can either reduce or improve its adhesion and biofilm formation capacities, depending on the strain and the molecule tested. These findings suggest the presence of sensing elements at the bacterial surface that are potentially activated/triggered by host signal molecules. The sensor kinase QseC, part of the two-component regulator system in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, is well-described to act as an adrenergic receptor for host catecholamines [66,67]. Signal-sensing systems have also been described in anaerobic bacteria with, e.g., the LuxS/Autoinducer-2 quorum sensing system in *Porphyromonas gingivalis* or the LuxR homologues in *B. fragilis* [68,69]. However, although an impact of catecholamines has already been observed in *P. gingivalis* [70,71], no study has yet demonstrated the potential implication of these signal-sensing systems in the response of anaerobic bacteria to host stress molecules. In the public sequenced genomes of *P. distasonis* (Microbial Genome Annotation and Analysis Platform, LABGeM, CEA), only one putative LuxR with 39–40% synteny with the *B. fragilis* LuxR was found. The presence of such signal-sensing system in *P. distasonis* could explain the potential impact of the stress-induced molecules on its persistence through the GM.

5. Conclusions

Although there is growing evidence of the beneficial roles of *P. distasonis* within the GM, little is known about its capacities to interact with other bacteria, to adhere to surfaces and to form biofilms. This study, performed on a wide diversity of strains, allows a better knowledge of the homo-aggregation, adhesion and biofilm formation capacities of *P. distasonis* and potential mechanisms involved in it. Under the conditions of interest in our work, all tested strains showed capacities to homo-aggregate, to adhere and to form a biofilm with an important inter-strain variability. These results, in addition to the high adaptability of *P. distasonis* demonstrated in previous studies, give a first explanation to its persistence within the GM. The evaluation of the impact of five stress-markers on the adhesion and biofilm formation capacities of *P. distasonis* also revealed a remarkable

strain variability with either positive or negative effects, depending on the molecule tested. Interestingly, catecholamines mainly reduced in vitro adhesion capacity of *P. distasonis* on abiotic support, which coincides with the in vivo stress-induced abundance decrease that we previously described in murine models. Further researches on the nature of the external structures harbored by the various *P. distasonis* strains and the existence of potential signal-sensing systems of this species could be valuable for a better understanding of the molecular pathways explaining how a chronic stress impact *P. distasonis*. Such data will further help in designing ways to counteract the stress-induced loss of this beneficial species within the digestive tract and to promote its use in next-generation probiotics.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9081602/s1>. Figure S1. Arbitrarily primed-PCR and Enterobacterial Repetitive Intergenic-PCR patterns of 20 strains of *P. distasonis*; Table S1. Survivability of *P. distasonis* DSM 20701^T under experimental conditions; Figure S2. Impact of electrolyte concentration on the electrophoretic mobility of 14 *P. distasonis* strains and controls LGG, Bf 638R and Bt VPI-5482.

Author Contributions: Conceptualization, C.C.-G., C.A., L.C. and J.C.; methodology, C.C.-G., L.C., C.A., J.C., C.C. and L.M.; formal analysis, J.C.; investigation, J.C., L.C. and C.C.-G.; resources, C.C., L.M. and C.A.; writing—original draft preparation, J.C., C.C.-G. and L.C.; writing—review and editing, J.C., C.C.-G., L.C., C.A., J.F.L.D., L.M., C.C., A.L. and J.-P.F.; supervision, C.C.-G., C.A. and L.C.; project administration, C.C.-G., C.A. and L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported partly by the French PIA project Lorraine Université d'Excellence, reference ANR-15-IDEX-04-LUE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the technical assistance of V. Pottier and T. Carlier. The authors are also grateful to F. Laurent and J. Tasse (CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007 Lyon, France) for their help in the establishment of the steam-based washing method.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- O'Hara, A.M.; Shanahan, F. The Gut Flora as a Forgotten Organ. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 688–693. [[CrossRef](#)]
- Sekirov, I.; Russell, S.L.; Antunes, L.C.M.; Finlay, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 46. [[CrossRef](#)]
- Bailey, M.T.; Dowd, S.E.; Galley, J.D.; Hufnagle, A.R.; Allen, R.G.; Lyte, M. Exposure to a Social Stressor Alters the Structure of the Intestinal Microbiota: Implications for Stressor-Induced Immunomodulation. *Brain Behav. Immun.* **2011**, *25*, 397–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.; Gasbarrini, A.; Mele, M. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **2019**, *7*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pickard, J.M.; Zeng, M.Y.; Caruso, R.; Núñez, G. Gut Microbiota: Role in Pathogen Colonization, Immune Responses and Inflammatory Disease. *Immunol. Rev.* **2018**, *39*, 70–89. [[CrossRef](#)]
- Chen, Y.; Zhou, J.; Wang, L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 625913. [[CrossRef](#)]
- Zhernakova, A.; Kurilshikov, A.; Bonder, M.J.; Tigchelaar, E.F.; Schirmer, M.; Vatanen, T.; Mujagic, Z.; Vila, A.V.; Falony, G.; Vieira-Silva, S.; et al. Population-Based Metagenomics Analysis Reveals Markers for Gut Microbiome Composition and Diversity. *Science* **2016**, *352*, 565–569. [[CrossRef](#)]
- Galley, J.D.; Parry, N.M.; Ahmer, B.M.M.; Fox, J.G.; Bailey, M.T. The Commensal Microbiota Exacerbate Infectious Colitis in Stressor-Exposed Mice. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *60*, 44–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Siopi, E.; Chevalier, G.; Katsimpardi, L.; Saha, S.; Bigot, M.; Moigneu, C.; Eberl, G.; Lledo, P.-M. Changes in Gut Microbiota by Chronic Stress Impair the Efficacy of Fluoxetine. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3682–3690.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Alauzet, C.; Cunat, L.; Wack, M.; Lozniewski, A.; Busby, H.; Agrinier, N.; Cailliez-Grimal, C.; Fripiat, J.-P. Hypergravity Disrupts Murine Intestinal Microbiota. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Alauzet, C.; Cunat, L.; Wack, M.; Lanfumey, L.; Legrand-Frossi, C.; Lozniewski, A.; Agrinier, N.; Cailliez-Grimal, C.; Fripiat, J.-P. Impact of a Model Used to Simulate Chronic Socio-Environmental Stressors Encountered during Spaceflight on Murine Intestinal Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7863. [[CrossRef](#)]
12. Falony, G.; Joossens, M.; Vieira-Silva, S.; Wang, J.; Darzi, Y.; Faust, K.; Kurilshikov, A.; Bonder, M.J.; Valles-Colomer, M.; Vandeputte, D.; et al. Population-Level Analysis of Gut Microbiome Variation. *Science* **2016**, *352*, 560–564. [[CrossRef](#)]
13. Gutiérrez-Repiso, C.; Molina-Vega, M.; Bernal-López, M.R.; Garrido-Sánchez, L.; García-Almeida, J.M.; Sajoux, I.; Moreno-Indias, I.; Tinahones, F.J. Different Weight Loss Intervention Approaches Reveal a Lack of a Common Pattern of Gut Microbiota Changes. *Pers. Med.* **2021**, *11*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)]
15. Xu, J.; Mahowald, M.A.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; Hamady, M.; Martens, E.C.; Henrissat, B.; Coutinho, P.M.; Minx, P.; Latreille, P.; et al. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e156. [[CrossRef](#)]
16. Wang, X.; Conway, P.L.; Brown, I.L.; Evans, A.J. In Vitro Utilization of Amylopectin and High-Amylose Maize (Amylomaize) Starch Granules by Human Colonic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4848–4854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hiippala, K.; Kainulainen, V.; Suutarinen, M.; Heini, T.; Bowers, J.R.; Jasso-Selles, D.; Lemmer, D.; Valentine, M.; Barnes, R.; Engelthaler, D.M.; et al. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing *Bacteroides* and *Parabacteroides* spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients* **2020**, *12*, 935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Koh, G.Y.; Kane, A.; Lee, K.; Xu, Q.; Wu, X.; Roper, J.; Mason, J.B.; Crott, J.W. *Parabacteroides distasonis* Attenuates Toll-like Receptor 4 Signaling and Akt Activation and Blocks Colon Tumor Formation in High-fat Diet-fed Azoxymethane-treated Mice. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 1797–1805. [[CrossRef](#)]
19. Kverka, M.; Zakostelska, Z.; Klimesova, K.; Sokol, D.; Hudcovic, T.; Hrnčir, T.; Rossmann, P.; Mrazek, J.; Kopecny, J.; Verdu, E.F.; et al. Oral Administration of *Parabacteroides distasonis* Antigens Attenuates Experimental Murine Colitis through Modulation of Immunity and Microbiota Composition: Bacterial Components and Experimental Colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, *163*, 250–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Cuffaro, B.; Assouhoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Súkeniková, L.; Desramaut, J.; Boudebouze, S.; Salomé-Desnoulez, S.; Hrdý, J.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Maguin, E.; et al. In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of *Parabacteroides distasonis* Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* **2020**, *9*, 2104. [[CrossRef](#)]
21. Koh, G.Y.; Kane, A.V.; Wu, X.; Crott, J.W. *Parabacteroides distasonis* Attenuates Tumorigenesis, Modulates Inflammatory Markers and Promotes Intestinal Barrier Integrity in Azoxymethane-Treated A/J Mice. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 909–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wang, K.; Liao, M.; Zhou, N.; Bao, L.; Ma, K.; Zheng, Z.; Wang, Y.; Liu, C.; Wang, W.; Wang, J.; et al. *Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 222–235.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cuffaro, B.; Assouhoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Peucelle, V.; Desramaut, J.; Boudebouze, S.; Croyal, M.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Rhimi, M.; Grangette, C.; et al. Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms* **2021**, *9*, 565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R.; Lappin-Scott, H.M. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *35*, 711–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Costerton, J. Introduction to Biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* **1999**, *11*, 217–221. [[CrossRef](#)]
26. Nikolaev, Y.A.; Plakunov, V.K. Biofilm—“City of Microbes” or an Analogue of Multicellular Organisms? *Microbiology* **2007**, *76*, 125–138. [[CrossRef](#)]
27. Roberts, A.; Matthews, J.B.; Socransky, S.S.; Freestone, P.P.E.; Williams, P.H.; Chapple, I.L.C. Stress and the Periodontal Diseases: Effects of Catecholamines on the Growth of Periodontal Bacteria In Vitro: Effects of Catecholamines on Periodontal Bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* **2002**, *17*, 296–303. [[CrossRef](#)]
28. Freestone, P.P.E.; Lyte, M. Chapter 2 Microbial Endocrinology: Experimental Design Issues in the Study of Interkingdom Signalling in Infectious Disease. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; Volume 64, pp. 75–105. ISBN 978-0-12-374338-1.
29. Knecht, L.D.; O’Connor, G.; Mittal, R.; Liu, X.Z.; Daftarian, P.; Deo, S.K.; Daunert, S. Serotonin Activates Bacterial Quorum Sensing and Enhances the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the Host. *EBioMedicine* **2016**, *9*, 161–169. [[CrossRef](#)]
30. Torabi Delshad, S.; Soltanian, S.; Sharifiyazdi, H.; Bossier, P. Effect of Catecholamine Stress Hormones (Dopamine and Norepinephrine) on Growth, Swimming Motility, Biofilm Formation and Virulence Factors of *Yersinia ruckeri* In Vitro and an in Vivo Evaluation in Rainbow Trout. *J. Fish Dis.* **2019**, *42*, 477–487. [[CrossRef](#)]
31. Declercq, A.M.; Cai, W.; Naranjo, E.; Thongda, W.; Eeckhaut, V.; Bauwens, E.; Arias, C.; De La Fuente, L.; Beck, B.H.; Lange, M.D.; et al. Evidence That the Stress Hormone Cortisol Regulates Biofilm Formation Differently among *Flavobacterium columnare* Isolates. *Vet. Res.* **2019**, *50*, 24. [[CrossRef](#)]
32. Hiller, C.C.; Lucca, V.; Carvalho, D.; Borsoi, A.; Borges, K.A.; Furian, T.Q.; do Nascimento, V.P. Influence of Catecholamines on Biofilm Formation by *Salmonella enteritidis*. *Microb. Pathog.* **2019**, *130*, 54–58. [[CrossRef](#)]

33. Francius, G.; Polyakov, P.; Merlin, J.; Abe, Y.; Ghigo, J.-M.; Merlin, C.; Beloin, C.; Duval, J.F.L. Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20066. [[CrossRef](#)]
34. Gosselin, F.; Duval, J.F.L.; Simonet, J.; Ginevra, C.; Gaboriaud, F.; Jarraud, S.; Mathieu, L. Impact of the Virulence-Associated MAb3/1 Epitope on the Physicochemical Surface Properties of *Legionella pneumophila* Sg1: An Issue to Explain Infection Potential? *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *82*, 283–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hyono, A.; Gaboriaud, F.; Mazda, T.; Takata, Y.; Ohshima, H.; Duval, J.F.L. Impacts of Papain and Neuraminidase Enzyme Treatment on Electrohydrodynamics and IgG-Mediated Agglutination of Type A Red Blood Cells. *Langmuir* **2009**, *25*, 10873–10885. [[CrossRef](#)]
36. Pagnout, C.; Sohm, B.; Razafitianamaharavo, A.; Caillet, C.; Offroy, M.; Leduc, M.; Gendre, H.; Jomini, S.; Beaussart, A.; Bauda, P.; et al. Pleiotropic Effects of Rfa-Gene Mutations on *Escherichia coli* Envelope Properties. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Jacquot, A.; Sakamoto, C.; Razafitianamaharavo, A.; Caillet, C.; Merlin, J.; Fahs, A.; Ghigo, J.-M.; Duval, J.F.L.; Beloin, C.; Francius, G. The Dynamics and PH-Dependence of Ag43 Adhesins' Self-Association Probed by Atomic Force Spectroscopy. *Nanoscale* **2014**, *6*, 12665–12681. [[CrossRef](#)]
38. Van Belkum, A.; Kluytmans, J.; van Leeuwen, W.; Bax, R.; Quint, W.; Peters, E.; Fluit, A.; Vandenbroucke-Grauls, C.; van den Brule, A.; Koeleman, H. Multicenter Evaluation of Arbitrarily Primed PCR for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 1537–1547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R. Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genomes. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *9*, 6823–6831. [[CrossRef](#)]
40. Polak-Berecka, M.; Waško, A.; Paduch, R.; Skrzypek, T.; Sroka-Bartnicka, A. The Effect of Cell Surface Components on Adhesion Ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **2014**, *106*, 751–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. De Sá Almeida, J.S.; de Oliveira Marre, A.T.; Teixeira, F.L.; Boente, R.F.; Domingues, R.M.C.P.; de Paula, G.R.; Lobo, L.A. Lactoferrin and Lactoferricin B Reduce Adhesion and Biofilm Formation in the Intestinal Symbionts *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe* **2020**, *64*, 102232. [[CrossRef](#)]
42. Mihajlovic, J.; Bechon, N.; Ivanova, C.; Chain, F.; Almeida, A.; Langella, P.; Beloin, C.; Ghigo, J.-M. A Putative Type V Pilus Contributes to *Bacteroides thetaiotaomicron* Biofilm Formation Capacity. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00650-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Collado, M.C.; Meriluoto, J.; Salminen, S. Adhesion and Aggregation Properties of Probiotic and Pathogen Strains. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 1065–1073. [[CrossRef](#)]
44. Tasse, J.; Cara, A.; Saglio, M.; Villet, R.; Laurent, F. A Steam-Based Method to Investigate Biofilm. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Donelli, G.; Vuotto, C.; Cardines, R.; Mastrantonio, P. Biofilm-Growing Intestinal Anaerobic Bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *65*, 318–325. [[CrossRef](#)]
46. Duval, J.F.L.; Gaboriaud, F. Progress in Electrohydrodynamics of Soft Microbial Particle Interphases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 184–195. [[CrossRef](#)]
47. Ohshima, H. Electrophoresis of Soft Particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *47*, 189–235. [[CrossRef](#)]
48. Cekanaviciute, E.; Yoo, B.B.; Runia, T.F.; Debelius, J.W.; Singh, S.; Nelson, C.A.; Kanner, R.; Bencosme, Y.; Lee, Y.K.; Hauser, S.L.; et al. Gut Bacteria from Multiple Sclerosis Patients Modulate Human T Cells and Exacerbate Symptoms in Mouse Models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 10713–10718. [[CrossRef](#)]
49. Zitomersky, N.L.; Atkinson, B.J.; Franklin, S.W.; Mitchell, P.D.; Snapper, S.B.; Comstock, L.E.; Bousvaros, A. Characterization of Adherent *Bacteroidales* from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63686. [[CrossRef](#)]
50. Pascal, V.; Pozuelo, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Campos, D.; Santiago, A.; Martinez, X.; Varela, E.; Sarrabayrouse, G.; Machiels, K.; et al. A Microbial Signature for Crohn's Disease. *Gut* **2017**, *66*, 813–822. [[CrossRef](#)]
51. Pfalzer, A.C.; Nesbeth, P.-D.C.; Parnell, L.D.; Iyer, L.K.; Liu, Z.; Kane, A.V.; Chen, C.-Y.O.; Tai, A.K.; Bowman, T.A.; Obin, M.S.; et al. Diet- and Genetically-Induced Obesity Differentially Affect the Fecal Microbiome and Metabolome in Apc1638N Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135758. [[CrossRef](#)]
52. Pérez, P.F.; Minnaard, Y.; Disalvo, E.A.; De Antoni, G.L. Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 21–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Thewes, N.; Loskill, P.; Jung, P.; Peisker, H.; Bischoff, M.; Herrmann, M.; Jacobs, K. Hydrophobic Interaction Governs Unspecific Adhesion of *Staphylococci*: A Single Cell Force Spectroscopy Study. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1501–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hogley, L.; Harkins, C.; MacPhee, C.E.; Stanley-Wall, N.R. Giving Structure to the Biofilm Matrix: An Overview of Individual Strategies and Emerging Common Themes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 649–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bircher, L.; Schwab, C.; Geirnaert, A.; Greppi, A.; Lacroix, C. Planktonic and Sessile Artificial Colonic Microbiota Harbor Distinct Composition and Reestablish Differently upon Frozen and Freeze-Dried Long-Term Storage. *mSystems* **2020**, *5*, e00521-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Berlanga, M.; Guerrero, R. Living Together in Biofilms: The Microbial Cell Factory and Its Biotechnological Implications. *Microb. Cell. Fact.* **2016**, *15*, 165. [[CrossRef](#)]

57. Patrick, S.; Blakely, G.W.; Houston, S.; Moore, J.; Abratt, V.R.; Bertalan, M.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Quail, M.A.; Corton, N.; Corton, C.; et al. Twenty-Eight Divergent Polysaccharide Loci Specifying within- and amongst-Strain Capsule Diversity in Three Strains of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* **2010**, *156*, 3255–3269. [[CrossRef](#)]
58. Pumbwe, L.; Skilbeck, C.A.; Wexler, H.M. The *Bacteroides fragilis* Cell Envelope: Quarterback, Linebacker, Coach—or All Three? *Anaerobe* **2006**, *12*, 211–220. [[CrossRef](#)]
59. Wexler, H.M. *Bacteroides*: The Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 593–621. [[CrossRef](#)]
60. Nakano, V.; Piazza, R.M.F.; Cianciarullo, A.M.; Bueris, V.; Santos, M.F.; Menezes, M.A.; Mendes-Ledesma, M.R.B.; Szulcowski, V.; Elias, W.P.; Pumbwe, L.; et al. Adherence and Invasion of *Bacteroidales* Isolated from the Human Intestinal Tract. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 955–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Coyne, M.J.; Weinacht, K.G.; Krinos, C.M.; Comstock, L.E. Mpi Recombinase Globally Modulates the Surface Architecture of a Human Commensal Bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10446–10451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Fletcher, C.M.; Coyne, M.J.; Bentley, D.L.; Villa, O.F.; Comstock, L.E. Phase-Variable Expression of a Family of Glycoproteins Imparts a Dynamic Surface to a Symbiont in Its Human Intestinal Ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2413–2418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Konduri, R.; Saiabhilash, C.R.; Shivaji, S. Biofilm-Forming Potential of Ocular Fluid *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on Ex Vivo Human Corneas from Attachment to Dispersal Phase. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Burtseva, O.; Baulina, O.; Zaytseva, A.; Fedorenko, T.; Chekanov, K.; Lobakova, E. In Vitro Biofilm Formation by Bioluminescent Bacteria Isolated from the Marine Fish Gut. *Microb. Ecol.* **2021**, *81*, 932–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chen, C.; Brown, D.R.; Xie, Y.; Green, B.T.; Lyte, M. Catecholamines Modulate *Escherichia coli* O157:H7 Adherence to Murine Cecal Mucosa. *Shock* **2003**, *20*, 183–188. [[CrossRef](#)]
66. Clarke, M.B.; Hughes, D.T.; Zhu, C.; Boedeker, E.C.; Sperandio, V. The QseC Sensor Kinase: A Bacterial Adrenergic Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10420–10425. [[CrossRef](#)]
67. Sarkodie, E.K.; Zhou, S.; Baidoo, S.A.; Chu, W. Influences of Stress Hormones on Microbial Infections. *Microb. Pathog.* **2019**, *131*, 270–276. [[CrossRef](#)]
68. Gerits, E.; Verstraeten, N.; Michiels, J. New Approaches to Combat *Porphyromonas gingivalis* Biofilms. *J. Oral Microbiol.* **2017**, *9*, 1300366. [[CrossRef](#)]
69. Pumbwe, L.; Skilbeck, C.A.; Wexler, H.M. Presence of Quorum-Sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb. Ecol.* **2008**, *56*, 412–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Boyanova, L. Stress Hormone Epinephrine (Adrenaline) and Norepinephrine (Noradrenaline) Effects on the Anaerobic Bacteria. *Anaerobe* **2017**, *44*, 13–19. [[CrossRef](#)]
71. Saito, T.; Inagaki, S.; Sakurai, K.; Okuda, K.; Ishihara, K. Exposure of *P. gingivalis* to Noradrenaline Reduces Bacterial Growth and Elevates ArgX Protease Activity. *Arch. Oral Biol.* **2011**, *56*, 244–250. [[CrossRef](#)]

Surface properties of *Parabacteroides distasonis* and impacts of stress-induced molecules on its surface adhesion and biofilm formation capacities

Jordan Chamarande ¹, Lisiane Cunat ¹, Céline Caillet ², Laurence Mathieu ³, Jérôme F.L. Duval ², Alain Lozniewski ^{1,4}, Jean-Pol Frippiat ¹, Corentine Alauzet ^{1,4} and Catherine Cailliez-Grimal ^{1,*}

Supplementary material

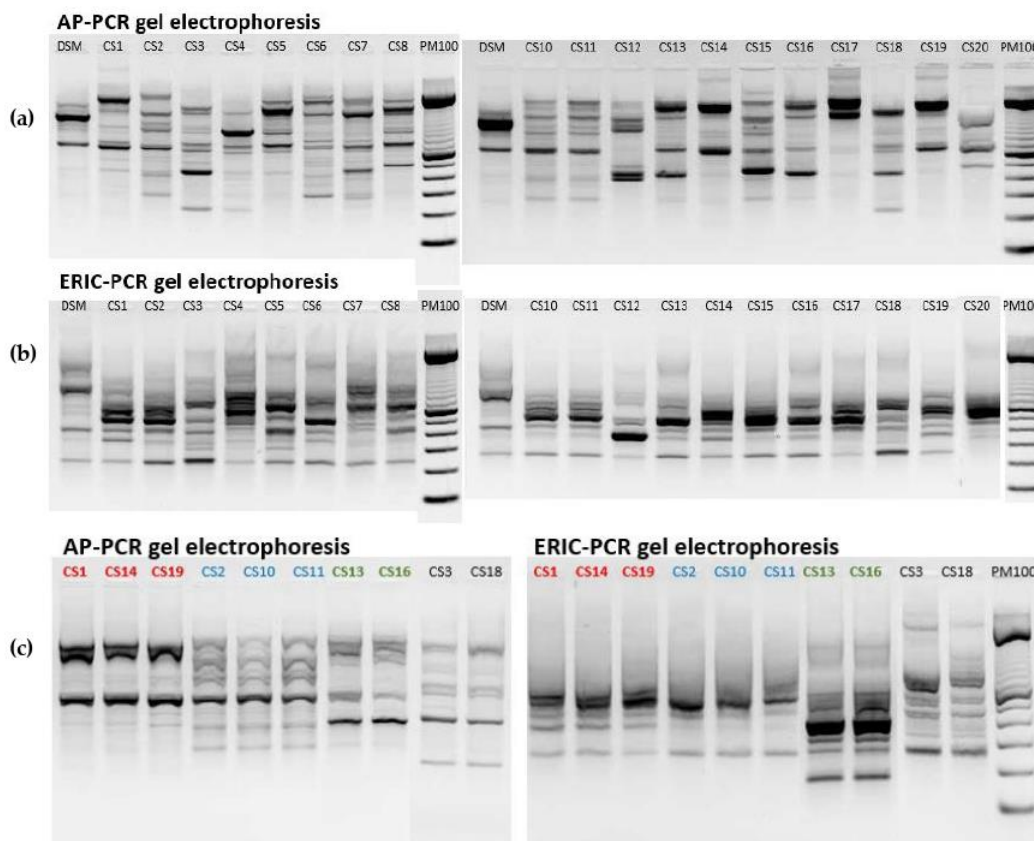


Figure S1. Arbitrarily-PCR (a) and Enterobacterial Repetitive Intergenic-PCR (b) patterns of 19 strains of *P. distasonis*. Alignment of gel electrophoresis revealed identical patterns (c), allowing the selection of the 14 non-clonal strains: DSM, CS1 (clonal to CS14 and CS19), CS2 (clonal to CS13 and CS11), CS4, CS5, CS6, CS7, CS8, CS12, CS13 (clonal to CS16), CS15, CS17, CS18 (clonal to CS3), CS20.

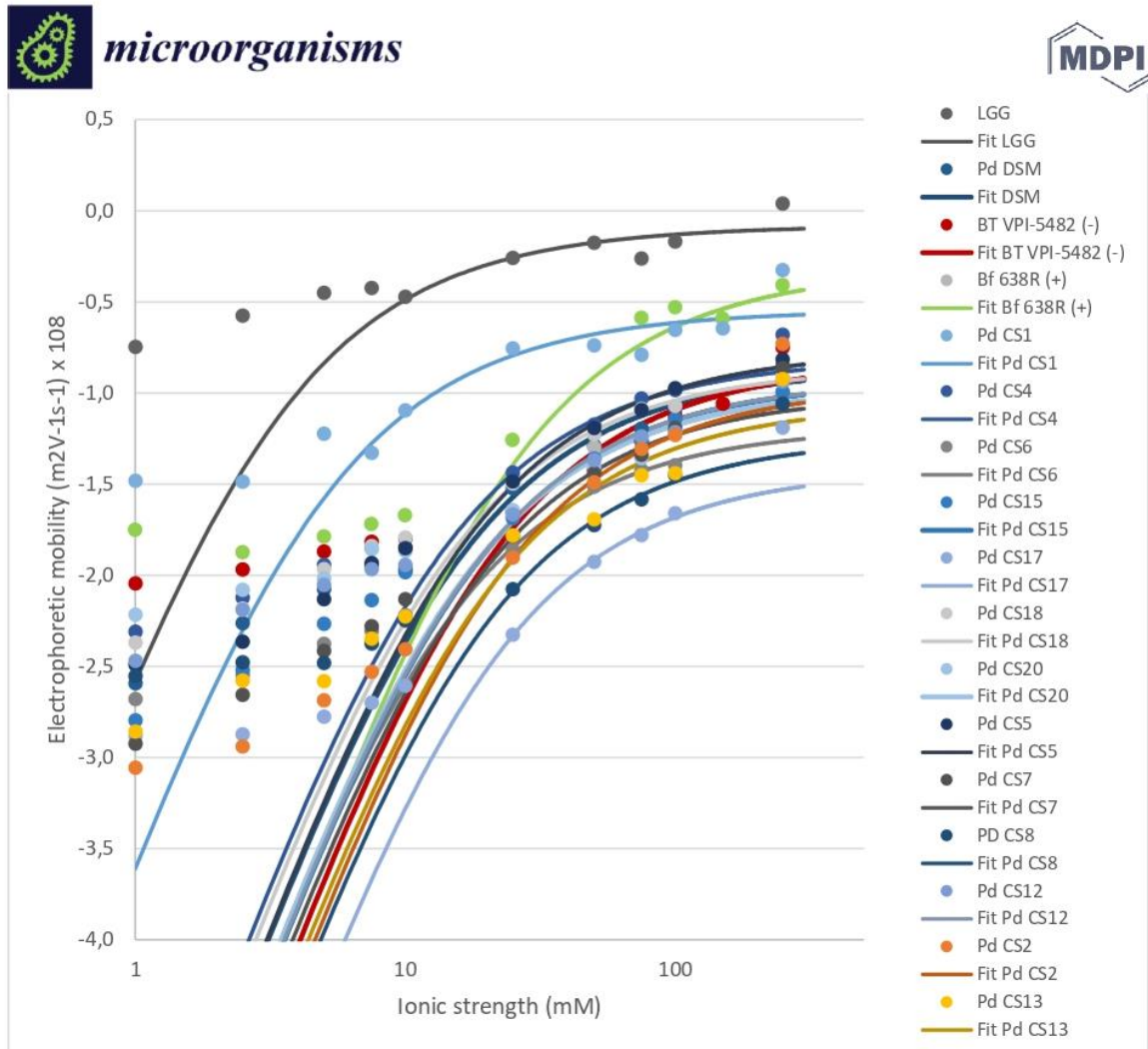


Figure S2. Impact of electrolyte concentration on the electrophoretic mobility of 14 *P. distasonis* strains and controls LGG, *Bf* 638R and *Bt* VPI-5482.

I.3. Contributions de l'article

La capacité des cellules à former des agrégats est considérée comme l'une des premières étapes de la formation d'un biofilm. Cette étude a démontré que toutes les souches de *P. distasonis* étudiées étaient capables de s'homo-agrégier modérément, ce qui montre leur potentiel à sédimenter et par conséquent, d'atteindre et d'adhérer à un support donné.

La capacité d'adhésion des bactéries à un support peut être due à plusieurs types d'interactions. Celles-ci peuvent en effet être spécifiques via les structures de surface ou non spécifiques avec notamment les forces de van der Waals ou les interactions hydrophobes et électrostatiques (Hobley et al., 2015; Thewes et al., 2014). Dans les conditions testées, toutes les souches de *P. distasonis* ont été capable d'adhérer au support abiotique, avec l'une des souches (CS1) montrant une capacité d'adhésion aussi importante que celle du témoin positif *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG).

La dernière étape de colonisation d'un milieu par les bactéries est le passage du mode de vie planctonique à l'organisation en biofilm via la production d'une matrice extracellulaire et la régulation des gènes impliqués dans la synthèse des facteurs nécessaires à la formation du biofilm (Berlanga and Guerrero, 2016). Dans cette étude, nous avons démontré que toutes les souches de *P. distasonis* étudiées avaient la capacité de former un biofilm. Différentes organisations de biofilm ont cependant pu être observées en fonction des souches avec certains biofilms formés de plusieurs petits clusters bactériens et d'autres formés d'un seul et unique cluster.

L'étude des propriétés électrocinétiques a permis d'obtenir une première image qualitative des marqueurs de surface bactérien permettant leur adhésion et la formation d'un biofilm. La mobilité électrophorétique de toutes les souches testées était négative et a atteint un plateau dans des conditions de forces ioniques suffisamment élevées. Ces valeurs reflètent la présence d'une couche chargée et perméable comme attendu pour une bactérie à Gram négatif. La CS1, qui possède les propriétés d'adhésion les plus importantes, a montré une densité de charge de surface moins électronégative que les autres souches, comme observé pour le contrôle LGG. Ceci peut être expliqué par la présence d'exopolysaccharides et de pili à sa surface. Les autres souches de *P. distasonis* ont, pour leur part, des densités de charge plus proches de celles des contrôles *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 et *B. fragilis* 638R pouvant signaler la présence d'une matrice extracellulaire.

Ces résultats donnent un premier aperçu qualitatif des capacités d'adhésion et de formation de biofilms de plusieurs souches de *P. distasonis* et fournissent quelques hypothèses sur les mécanismes qui pourraient expliquer sa persistance dans le tube digestif.

L'ensemble de ces résultats permet également de mettre en avant une variabilité inter-souche de *P. distasonis* en termes de propriétés de colonisation pouvant être expliquées par la présence d'une importante diversité de structures de surface.

Enfin, la diminution de l'abondance relative intestinale de *P. distasonis* en conditions de stress peut être due à l'action de marqueurs de stress libérés dans l'intestin, décrits comme pouvant moduler l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms (Chen et al., 2003; Francius et al., 2011; Hiller et al., 2019; Thewes et al., 2014). Dans la présente étude, nous avons étudié l'effet potentiel des catécholamines (adrénaline, dopamine, noradrénaline), des glucocorticoïdes (cortisol) et de la sérotonine sur les capacités d'adhésion et de formation de biofilms de *P. distasonis*. Nos résultats ont montré que toutes les molécules testées, hormones et/ou neurotransmetteurs, peuvent réduire ou améliorer les capacités d'adhésion et de formation de biofilms de *P. distasonis*, selon la souche et la molécule testée. Ces résultats suggèrent la présence d'éléments de détection à la surface de la bactérie qui sont potentiellement activés/déclenchés par des molécules produites par l'hôte en conditions de stress.

II. Etude *in silico* des structures de surface de *P. distasonis* impliquées dans son maintien au sein du microbiote intestinal

In silico study of cell surface structures of *Parabacteroides distasonis* involved in its maintenance within the gut microbiota

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal

International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 9411

II. Etude *in silico* des structures de surface de *P. distasonis* impliquées dans son maintien au sein du microbiote intestinal

II.1. Introduction

P. distasonis possède donc la capacité de coloniser le MI et de s'y maintenir via ses capacités d'adhésion et de formation de biofilm (Chamarande et al., 2021).

Bien que les mécanismes sous-jacents aux interactions entre l'hôte et le microbiote ne soient pas entièrement décrits, il est désormais bien établi que les structures de surface du microbiote jouent un rôle clé dans l'établissement des espèces dans l'environnement versatile et compétitif de l'intestin (Ligthart et al., 2020). Parmi les marqueurs de surface cellulaire, nous retrouvons notamment la capsule, les fimbriae et les pili, tous bien décrits pour leur rôle crucial dans la colonisation de l'épithélium de l'hôte par les micro-organismes.

Ces marqueurs de surface cellulaire vont alors être reconnus par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR) des cellules du système immunitaire, notamment les récepteurs Toll (TLR). Une interaction entre les motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP) et le TLR déclenchera alors la réponse immunitaire si le MAMP est identifié comme pathogène (Nie et al., 2018; Tytgat et al., 2016).

La membrane de *P. distasonis*, arborant possiblement ces structures, a été identifiée comme jouant un rôle majeur dans ses propriétés bénéfiques. Il a notamment été démontré qu'elle réduit significativement la production de cytokines pro-inflammatoires dans des modèles murins obèses (Pfalzer et al., 2015) et qu'elle induit l'apoptose cellulaire de lignées cancéreuses du colon, suggérant des effets anti-inflammatoires et anticancéreux (Koh et al., 2018). Les composants membranaires de *P. distasonis* sont également impliqués dans la diminution de la sévérité de l'inflammation intestinale dans des modèles murins de colite induite par le DSS (Kverka et al., 2011).

Alors que *P. distasonis* est fortement reconnue comme une espèce commensale intestinale avec des avantages pour son hôte, plusieurs études ont montré des résultats controversés, identifiant cette bactérie comme un pathogène opportuniste (Blacher et al., 2019; Dziarski et al., 2016; Moreno-Arrones et al., 2020; C. Zhou et al., 2020).

Les structures de surface des bactéries jouant un rôle crucial dans leur colonisation et dans le dialogue qu'elles entretiennent avec leur hôte, leur étude chez *P. distasonis* permettrait ainsi d'identifier les éléments impliqués dans ces capacités de maintien au sein du MI et de mieux comprendre son comportement parfois bénéfique, parfois pathogène. Cette étude porte ainsi sur l'analyse *in silico* des différentes structures de surface de *P. distasonis*. Pour ce faire,

26 génomes de *P. distasonis* ont été analysés dont 13 génomes séquencés pour cette étude et 13 génomes publics.

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'une publication publiée dans *International Journal of Molecular Sciences* (2022, 23, 9411) : « **In Silico Study of Cell Surface Structures of *Parabacteroides distasonis* Involved in Its Maintenance within the Gut Microbiota** ».



Article

In Silico Study of Cell Surface Structures of *Parabacteroides distasonis* Involved in Its Maintenance within the Gut Microbiota

Jordan Chamarande ¹ , Lisiane Cunat ¹, Corentine Alauzet ^{1,2} and Catherine Cailliez-Grimal ^{1,*}¹ Stress Immunity Pathogens (SIMPA), Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France² CHRU de Nancy, Service de Microbiologie, F-54000 Nancy, France

* Correspondence: catherine.cailliez@univ-lorraine.fr

Abstract: The health-promoting *Parabacteroides distasonis*, which is part of the core microbiome, has recently received a lot of attention, showing beneficial properties for its host and potential as a new biotherapeutic product. However, no study has yet investigated the cell surface molecules and structures of *P. distasonis* that allow its maintenance within the gut microbiota. Moreover, although *P. distasonis* is strongly recognized as an intestinal commensal species with benefits for its host, several works displayed controversial results, showing it as an opportunistic pathogen. In this study, we reported gene clusters potentially involved in the synthesis of capsule, fimbriae-like and pili-like cell surface structures in 26 *P. distasonis* genomes and applied the new RfbA-typing classification in order to better understand and characterize the beneficial/pathogenic behavior related to *P. distasonis* strains. Two different types of fimbriae, three different types of pilus and up to fourteen capsular polysaccharide loci were identified over the 26 genomes studied. Moreover, the addition of data to the *rfaA*-type classification modified the outcome by rearranging *rfaA* genes and adding a fifth group to the classification. In conclusion, the strain variability in terms of external proteinaceous structure could explain the inter-strain differences previously observed of *P. distasonis* adhesion capacities and its potential pathogenicity, but no specific structure related to *P. distasonis* beneficial or detrimental activity was identified.

Keywords: gut microbiota; *Parabacteroides distasonis*; capsular polysaccharide; fimbriae; pilus; O-antigen; pathogenicity; probiotic; comparative genomics



Citation: Chamarande, J.; Cunat, L.; Alauzet, C.; Cailliez-Grimal, C. In Silico Study of Cell Surface Structures of *Parabacteroides distasonis* Involved in Its Maintenance within the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9411. <https://doi.org/10.3390/ijms23169411>

Academic Editor: Alfredo Micheli

Received: 11 July 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 20 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Gut microbiota (GM) is now considered as a new organ system mainly due to the microorganisms' specific biochemical interaction with their hosts and their systemic integration into the host biology [1,2]. Bacteria that are predominant in the GM are mainly defined by anaerobic bacteria part of the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla [3]. Advances in sequencing methods have facilitated the characterization and understanding of the contribution of the GM to the host well-being, which is now indisputable. In fact, it is now well-defined that the cooperation between the GM and its host is essential to regulate the development and function of the immune, metabolic and nervous system. In turn, one of the major roles of the immune system is to control and maintain its relationships with the GM. The intestinal microbiota, in addition to contributing to the development of the immune system and to intervene into host metabolic and nervous function, also creates a protective barrier against external pathogens and participate in maintaining the structure and integrity of the gastrointestinal tract [4–6]. In the long run, the GM can modulate host behavior and nervous system function through dynamic and bidirectional communication along the gut–brain axis [7].

Although mechanisms underlying host–microbiota interactions are not fully described, it is now well-established that cell surface molecules and structures of the GM play a key

role in such relationships via conserved microbe-associated molecular patterns (MAMPs) that will be recognized by pattern recognition receptors (PRRs) of immune system cells, including Toll-like receptors (TLRs). An interaction between MAMP and TLR will then initiate the immune response if the MAMP is identified as pathogenic [8,9]. The study of secreted and surface molecules of microbiota members is also fundamental for their involvement in the establishment of species in the versatile and competitive environment of the gut and their key role as a potential virulence factor [10]. Among cell surface markers are capsular polysaccharide (CPS), fimbriae and pili, all well-described for their crucial role in microorganism colonization of the host epithelium.

In Gram-negative anaerobic bacteria, various systems have been described for each of these cell surface markers, including the CPS of *Bacteroides fragilis*, the fimbriae system (Fim) of *Porphyromonas gingivalis*, the type V pilus system (Mfa) of *P. gingivalis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* and the immunogenic component of lipopolysaccharide (LPS); O-antigen (Rfb) is well-described in the facultative anaerobic *Escherichia coli* [11–15].

Among the gut microbiota members is *Parabacteroides distasonis*, a Gram-negative bacterium strictly anaerobe belonging to the *Tannerellaceae* family within the *Bacteroidetes* phylum. This bacterial species, part of the *core microbiome*, has recently received a lot of attention, showing beneficial properties for its host. In fact, although strain-dependent, *P. distasonis* display anti-inflammatory/cancer properties and activities on decreasing weight gain, hyperglycemia and hepatic steatosis in *ob/ob* and high-fat diet-fed mice [16–18]. The importance of *P. distasonis* membrane in these disease treatments has been pointed out in numerous studies. Notably, it has been shown to largely suppress production of pro-inflammatory cytokines in obese animal models [19] and induce apoptosis in colon cancer cell lines, suggesting anti-inflammatory and anti-cancer effects [20]. The membrane components of *P. distasonis* have also been reported to decrease the severity of gut inflammation in the non-immunocompromised mouse models that had induced acute and chronic colitis [21]. Many studies have highlighted these abilities to promote *P. distasonis* as a new potential biotherapeutic product [22–24]. In our previous work, we explored *P. distasonis* capacities related to its maintenance within the digestive tract and the electrokinetic properties of its cell peripheral regions to provide a first qualitative picture of its surface structure [25]. This work evidenced a strain-dependent ability to adhere and to form a biofilm related to the putative presence of cell surface structures such as CPS, fimbriae, pili or capsule.

Although numerous studies described the beneficial aspects of *P. distasonis* or its ability to colonize the intestine, few explore mechanisms behind these aptitudes. Moreover, while *P. distasonis* is strongly recognized as intestinal commensal specie with benefits for its host, several studies displayed controversial results, showing *P. distasonis* as an opportunistic pathogen [26–29]. In this study, we investigated the cell surface structures of *P. distasonis* that may influence host–*P. distasonis* crosstalk and play an essential role in its maintenance and stability within the GM. We reported gene clusters potentially involved in the synthesis of capsule, fimbriae-like and pili-like outer membrane structure and applied the new *rfaA*-typing classification on 26 genomes of *P. distasonis* including 13 new clinical strains (CS) in order to investigate its maintenance within the digestive tract and its potential pathogenicity [30]. In this study, the designation “pilus” is used to describe the external cell surface structure originating from the “minor fimbriae” Mfa system [31,32]. “Fimbriae” refer to structures arising from the Fim system. However, the use of this designation does not mean that Mfa structures are minor and short in comparison with Fim fimbriae [33]; rather, it serves to better clarify the origin of the external appendages described.

2. Results

2.1. *P. distasonis* Genomes Characterization

Thirteen nonredundant *P. distasonis* CS were isolated (Table 1) by the Clinical Microbiology Laboratory of the University Hospital of Nancy, France, and sequenced using Illumina technology. All genomes were then integrated in the Microbial Genome Anno-

tation and Analysis Platform (MaGe) in addition to 13 other public *P. distasonis* genomes (Figure 1).

Table 1. *P. distasonis* strain isolation.

	Strain	Type of Sample	Host Status	Isolation Date	Isolation Country	References
	ATCC 8503 ^T	Human feces	Apparently normal	1933	USA	[34]
	APCS2/PD	Human feces	Unknown	2017	Ireland	NCBI
	CavFT-hAR46	Human intramural gut wall	Severe Crohn's disease	2019	USA	[35]
	CBBP-1	Feces	Unknown	Unknown	Unknown	[36]
	CL03T12C09	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NCBI
	CL06T03C10	Human feces	Unknown	2009	USA	[37]
	CL09T03C24	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NCBI
	CL11T00C22	Human feces	Unknown	2009	USA	[37]
	FDAAROS_1234	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NCBI
	FDAARGOS_615	Human feces	Unknown	Unknown	Unknown	Not Published
	FDAARGOS_759	Human feces	Unknown	Unknown	USA	[38]
	NRBC 113806	Human feces	Normal	Unknown	Unknown	NCBI
	82G9	Human feces	Unknown	Unknown	Japan	NCBI
	CS1	Peritoneal fluid	Peritonitis	2016	France	[25]
	CS2	Peritoneal fluid	Peritonitis	2016	France	[25]
<i>Parabacteroides distasonis</i>	CS4	Vulvectomy	Vulvar infection	2016	France	[25]
	CS5	Peritoneal fluid	Peritonitis	2016	France	[25]
	CS6	Sterility control of mesenchymal stem cells	Unknown	2016	France	[25]
	CS7	Peritoneal fluid	Peritonitis	2016	France	[25]
	CS8	Blood culture	Bacteremia	2016	France	[25]
	CS12	Bone, sacrum	Osteo-articular infection	2016	France	[25]
	CS13	Peritoneal fluid	Peritonitis	2016	France	[25]
	CS15	Peritoneal fluid	Peritonitis	2016	France	[25]
	CS17	Small intestine collection	Abdominal abscess	2017	France	[25]
	CS18	Abdominal collection	Abdominal abscess	2017	France	[25]
	CS20	Peritoneal fluid	Peritonitis	2017	France	[25]

^T—type strain in microbiology.

The length of *P. distasonis* CS genomes range from ~4.8 to 5.6 Mb with an average GC content of 45.00% and a percentage of protein coding density of approximately 91.00%. The pan-genome analysis revealed 2479 functional genes presented in all strains (core-genome), between 1680 and 2479 genes presented in at least two strains function (dispensable genomes) and an average of 253 genes specific to one strain (specific genomes).

The evolutionary relationships among these strains were then investigated by constructing a phylogenetic tree based on the pairwise distances using a neighbor joining algorithm (MaGe).

The tree revealed a partial evolution of *P. distasonis* strains and some similarities notably with FDAARGOS_1234 and ATCC 8503^T genomes that appear to be relatively closed. This genome similarity is notably highlighted by the poor specific genomes of both strains.

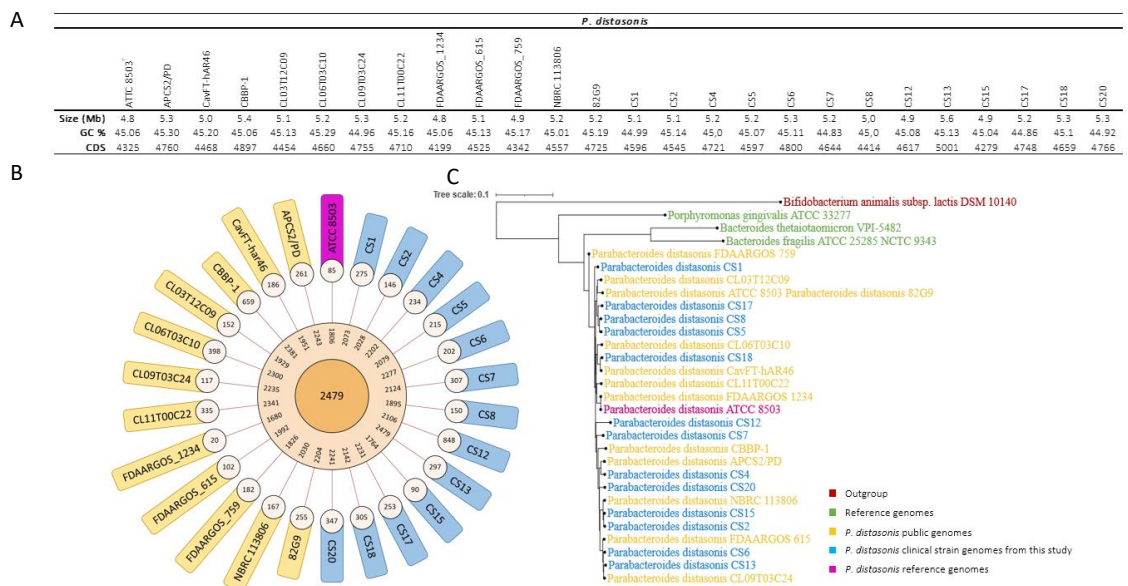


Figure 1. *P. distasonis* genomes characterization. (A) General features of *P. distasonis* genomes used in this study. (B) Graphical representations of the pangenome characteristics. From the center outward: core, dispensable and specific genome. (C) Phylogenetic analysis of 26 strains of *P. distasonis*. *B. thetaiotaomicron* VPI-5482^T [39], *P. gingivalis* ATCC 33277^T [40] and *B. fragilis* ATCC 25285^T [41] were added as reference genomes used in this study. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140^T was used as outgroup genome.

2.2. Identification of *P. distasonis* Genes Potentially Involved in Capsule, Fimbriae-like and Pilus-like Synthesis

In order to determine the potential presence of capsule, fimbriae or pili at the surface of *P. distasonis*, reference genes involved in their synthesis were selected from *B. fragilis* (gut), *B. thetaiotaomicron* (gut) and *P. gingivalis* (oral cavity), as three strictly anaerobe Gram-negative bacteria part of the Bacteroidetes phyla, and referenced as opportunistic pathogens [39–41]. Indeed, *B. fragilis* is well-known for its numerous divergent polysaccharides loci all starting by genes designated as UpxY and UpxZ families, where x goes from a to h depending on the locus. *upxY* genes are transcriptional antitermination factors essential to the CS synthesis, while *upxZ* genes inhibit their secretions [11]. *P. gingivalis*, for its part, is well described for its proteinaceous, filamentous appendages at its surface including fimbriae and pili, synthesized through the Fim (fimA-E) and Mfa (mfa1-5) systems, respectively [15]. A similar Mfa system including only *mfa1* and *mfa2* has also been described in *B. thetaiotaomicron* [13].

Synteny analysis of reference genes on *P. distasonis* genomes revealed a set of genes whose function possibly approaches that of the reference genes. To refine the search, only genes with an automatic functional assignment linked to the synthesis of the sought structures were listed (Table 2).

No result was found for *up(a-g)Y* and *up(a-h)Z*, while 15 genes from 15 distinct strains were referred to as potentially *uphY*-like with homologies ranging from 33.10% to 36.90%. Concerning the fim gene cluster, although homologies are relatively low (from 22.50% to 27.10%), all reference genes possess a synteny in at least one genome of *P. distasonis* with an auto-assigned function related to the fimbriae synthesis. The synteny analysis between the *mfa* cluster of *B. thetaiotaomicron* VPI-5482^T and *P. distasonis* genomes revealed only one positive result for *B. thetaiotaomicron mfa2*, while the *mfa* gene cluster of *P. gingivalis* ATCC 33277^T permitted the listing of multiple genes for *P. gingivalis mfa1*, *mfa2* and *mfa4*. No result was found for *P. gingivalis mfa3* and *mfa5* genes.

Multiple sequence alignments of the listed genes (Figure S1) revealed either the conservation of one sequence (*fimB*-like, *fimC*-like, *fimD*-like, Bt *mfa2*-like, Pg *mfa1*-like and Pg *mfa4*-like) or the presence of two distinct sequences (*uphY*-like 1/2, *fimA*-like 1/2, *fimE*-like 1/2 and Pg *mfa2*-like 1/2).

Table 2. *P. distasonis* genes sharing synteny with reference genes and auto-assigned as part of CPS, fimbriae or pili synthesis.

Structure	Reference Gene	<i>Pdist</i> Strain	Label	Length (aa)	Automatic Assignment of Biological Function	% Homology	
Capsule	<i>up(a-g)Y</i>			No match			
	<i>up(a-g)Z</i>			No match			
			CS12	PDI_v1_160022	185	Transcription antitermination protein UpdY	36.90
			CL09T03C24	AGZN01_v1_510002	192	Transcription antitermination protein UpdY	36.00
			CS4	PDI_v1_220060	192	Transcription antitermination protein UpdY	36.00
			FDAARGOS_615	FOB23_12755	179	UpxY family transcription antiterminator	33.72
			APCS2/PD	FQN59_13885	179	UpxY family transcription antiterminator	33.70
			CS2	PDI_v1_140109	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.70
			CS5	PDI_v1_140028	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.70
		<i>uphY</i>	CS6	PDI_v1_170031	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.70
			CS8	PDI_v1_150106	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.70
			CS15	PDI_v1_340019	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.70
			CL03T12C09	AGZM01_v1_20031	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.14
			FDAARGOS_759	FIU22_01625	179	UpxY family transcription antiterminator	33.14
			82G9	E0E49_RS00075	179	UpxY family transcription antiterminator	33.14
			CS1	PDI_v1_140105	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.10
			CS7	PDI_v1_130113	179	Transcription antitermination protein UpdY	33.10
	<i>upgZ</i>			No match			

Table 2. Cont.

Structure	Reference Gene	<i>Pdist</i> Strain	Label	Length (aa)	Automatic Assignment of Biological Function	% Homology		
Fimbriae	<i>fimA</i>	82G9	E0E49_RS19850	444	fimbrial protein	26.21		
		ATCC 8503 ^T	BDI_3514	444	putative fimbrial protein precursor	25.99		
		CavFT-hAR46	FE931_00755	444	fimbrial protein	25.99		
		FDAARGOS_759	FIU22_19490	444	fimbrial protein	25.99		
		CS6	PDI_v1_70115	432	Fimbrial protein	25.60		
		CS13	PDI_v1_70087	432	Fimbrial protein	25.60		
		CL11T00C22	INE94_02450	431	Major fimbrium subunit FimA type-2	25.30		
		CS12	PDI_v1_10340	431	Major fimbrial subunit protein (FimA)	25.10		
		CS1	PDI_v1_20076	434	Major fimbrial subunit protein type II	24.90		
		CS2	PDI_v1_300040	419	Fimbrial protein	24.20		
		CS15	PDI_v1_330008	419	Fimbrial protein	24.20		
		CS20	PDI_v1_10539	419	Fimbrial protein	24.20		
		APCS2/PD	FQN59_10875	419	fimbrial protein	24.10		
		CS4	PDI_v1_10167	419	Fimbrial protein	24.10		
		CL06T03C10	INE86_01122	420	Major fimbrium subunit FimA type-2	24.00		
		CS18	PDI_v1_50210	420	Fimbrial protein P_gingi_FimA	24.00		
		CS8	PDI_v1_30239	421	domain-containing protein P_gingi_FimA	23.70		
		CS5	PDI_v1_240063	421	domain-containing protein P_gingi_FimA	23.70		
		CS17	PDI_v1_20464	421	domain-containing protein P_gingi_FimA	23.70		
		FDAARGOS_1234	I6J64_10580	421	fimbrial protein	23.50		
		CS7	PDI_v1_30250	437	Fimbrial protein	23.20		
		Fimbriae	<i>fimB</i>	82G9	E0E49_RS19870	303	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	29.90
				CBBP-1	HHO38_19050	303	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	29.90
				CL06T03C10	INE86_01123	303	Fimbrillin-A associated anchor proteins Mfa1 and Mfa2	29.90
				FDAARGOS_1234	I6J64_10575	303	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	29.90
FDAARGOS_759	FIU22_19510			303	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	29.90		
CS1	PDI_v1_20075			303	Fimbrillin-A associated anchor proteins Mfa1 and Mfa2	29.90		
CS6	PDI_v1_70114			303	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	29.90		
CS12	PDI_v1_10341			305	Fimbrillin-A associated anchor proteins Mfa1 and Mfa2	29.90		
CS13	PDI_v1_70088			303	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	29.90		
CL11T00C22	INE94_02449			305	Fimbrillin-A associated anchor proteins Mfa1 and Mfa2	29.00		

Table 2. Cont.

Structure	Reference Gene	Pdist Strain	Label	Length (aa)	Automatic Assignment of Biological Function	% Homology
	<i>fimC</i>	CL11T00C22	INE94_02448	375	Putative fimbrium tip subunit Fim1C	22.50
		CS2	PDI_v1_10054	684	P_gingi_FimA domain-containing protein	26.40
		CS15	PDI_v1_140036	684	P_gingi_FimA domain-containing protein	26.40
		CS12	PDI_v1_60229	685	P_gingi_FimA domain-containing protein	26.10
		CS17	PDI_v1_40059	685	P_gingi_FimA domain-containing protein	26.10
	<i>fimD</i>	CS18	PDI_v1_40032	685	P_gingi_FimA domain-containing protein	26.10
		CL03T12C09	AGZM01_v1_210059	684	P_gingi_FimA domain-containing protein	26.02
		CS5	PDI_v1_120056	675	P_gingi_FimA domain-containing protein	25.70
		CS8	PDI_v1_160055	675	P_gingi_FimA domain-containing protein	25.70
		CS4	PDI_v1_100056	677	P_gingi_FimA domain-containing protein	25.10
		CL09T03C24	AGZN01_v1_280002	678	P_gingi_FimA domain-containing protein	24.76
	<i>fimE</i>	CL11T00C22	INE94_03253	632	Major fimbrium tip subunit FimE	27.10
		CL06T03C10	INE86_00220	632	Major fimbrium tip subunit FimE	25.30
CBBP-1		HHO38_14390	688	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	23.01	
Pilus	Bt <i>mfa1</i>			No match		
	Bt <i>mfa2</i>	FDAARGOS_759	FIU22_05440	350	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	28.98
	Pg <i>mfa1</i>	CS12	PDI_v1_130034	509	Fimbrillin_C domain-containing protein	26.50
		CS18	PDI_v1_30088	509	Fimbrillin_C domain-containing protein	26.50
		CL06T03C10	INE86_02000	392	Minor fimbrium subunit Mfa1	25.40
		CL11T00C22	INE94_00002	509	Major fimbrial subunit protein type IV	25.40

Table 2. Cont.

Structure	Reference Gene	Pdist Strain	Label	Length (aa)	Automatic Assignment of Biological Function	% Homology
		CL06T03C10	INE86_02001	329	Minor fimbrium anchoring subunit Mfa2	31.20
		CL11T00C22	INE94_00003	329	Minor fimbrium anchoring subunit Mfa2	31.20
	Pg <i>mfa2</i>	CS12	PDI_v1_130033	329	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	30.90
		CS18	PDI_v1_30089	329	putative Minor fimbrium anchoring subunit Mfa2	30.40
		FDAARGOS_759	FIU22_15640	300	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	24.32
		82G9	E0E49_RS15860	300	FimB/Mfa2 family fimbrial subunit	24.32
		Pg <i>mfa3</i>	No match			
		FDAARGOS_759	FIU22_15635	463	Mfa1 fimbriin C-terminal domain-containing protein	20.83
	Pg <i>mfa4</i>	ATCC 8503 ^T	BDI_2708	463	putative outer membrane protein Fimbrillin_C	20.51
		CL03T12C09	AGZM01_v1_210028	463	domain-containing protein Mfa1 fimbriin	20.51
		82G9	E0E49_RS15855	463	C-terminal domain-containing protein	20.20
	Pg <i>mfa5</i>	No match				

aa: amino acid; Bt: *B. thetaiotaomicron*; Pg: *P. gingivalis*..

2.2.1. *P. distasonis* Gene Cluster Potentially Involved in Capsule Synthesis

BLAST of the consensus sequences *uphY*-like 1 against *P. distasonis* genomes revealed genes with high similarity (from 99% to 100%) in 21 of the 26 studied genomes (Figure 2A). Among these genes, 15 are from the syntenic analysis while 6 are from BLAST. These last six sequences were not found during the syntenic analysis probably due to variations in their genomic organizations. On the contrary, the *uphY*-like 2 was identified in only three genomes with still an important sequence conservation (from 86% to 100%). Each *uphY*-like genomic region was then analyzed to allow the discovery of very conserved regions with a high gene homology (Figure 2B). Among them are genes linked to the CPS synthesis including glycosyltransferase, polysaccharide export, polysaccharide biosynthesis and CPS biosynthesis genes. Each CPS cluster is also composed of downstream gene encoding an integrase. The three genes similar to *uphY*-like 2 were analyzed and integrated at the syntenic analysis. The genomic environment of *uphY*-like 2 appear to be relatively close to the first loci identified with *uphY*-like 1, including an integrase, a glycosyltransferase, a polysaccharide export, a polysaccharide biosynthesis and a CPS biosynthesis gene, too.

Specific research on *P. distasonis* ATCC 8503^T CPS loci genomes allowed us to find a 14th CPS loci, in addition to the 13 already identified [42]. All CPS loci were then explored on other *P. distasonis* genomes (Table 3, gene details in Table S1). Among the 26 *P. distasonis* genomes, only ATCC 8503^T and FDAARGOS_1234 possess the 14 CPS loci identified. Loci 3, 6, 9, 13 and 14 are shared between all *P. distasonis*, while only few strains possess loci 10, 11 and 12. Loci 7 and 8 are also conserved over genomes, but important intra-variations have been identified within these loci. Moreover, not all gene loci are different: 2 and 8 show high gene sequence conservation with a similar *upxY*-like gene. Locus 5 appear to be relatively close to 2 and 8 too, but with more variations. In the same way, the locus 4 shows some similarities with 2, 5 and 8 but has a different *upxY*. On the contrary, locus 13

possesses a similar *upxY* to 2, 5 and 8 but a different locus. Loci 3, 6, 7 and 1, 11, 12 also display similarities, especially between 6, 7 and 11, 12. Locus 1, although close to 11 and 12, presents a distinct *upxY*. Moreover, the conserved part of locus 9 does not always seem to be the one involved in the CPS synthesis.

A

Consensus sequence	Nb of genomes with positive result	% Homology
<i>uphY</i> -like 1	21	99-100%
<i>uphY</i> -like 2	3	86-100%

B

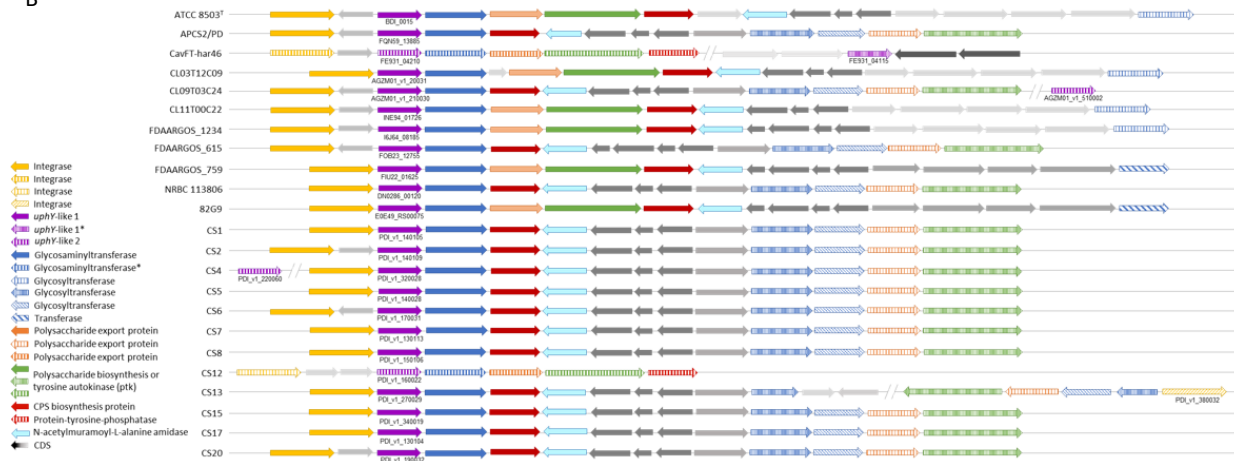
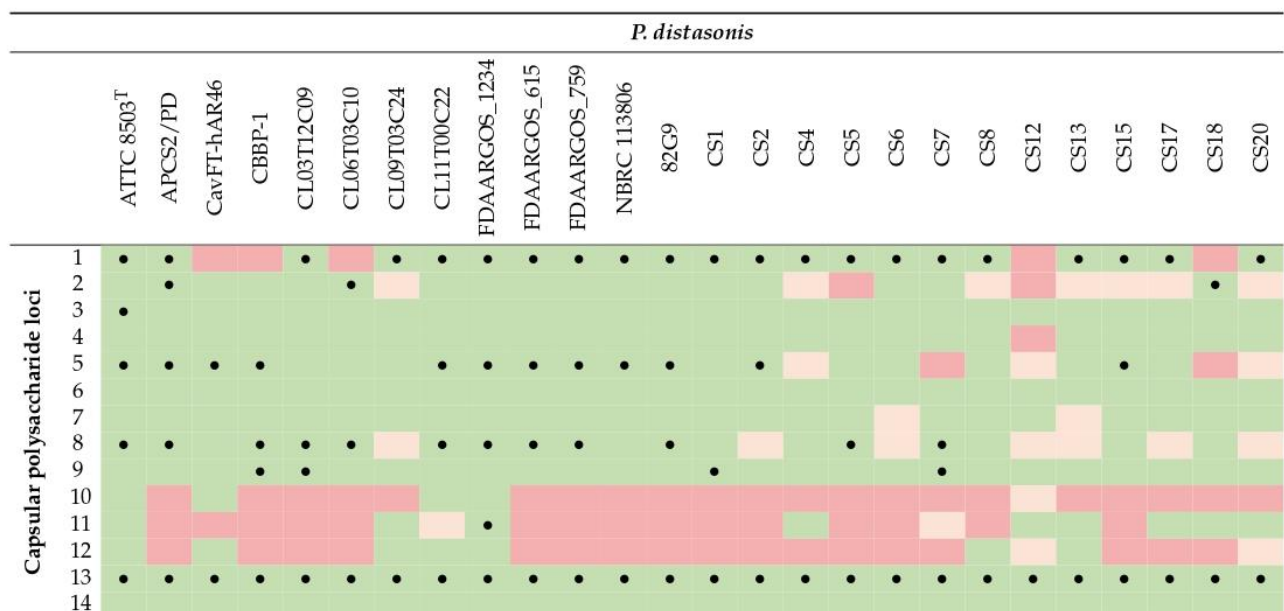


Figure 2. Identification of *upxY*-like gene clusters on *P. distasonis* genomes. **(A)** BLAST of *upxY*-like consensus sequences against *P. distasonis* genomes. **(B)** Syntenic analysis of *P. distasonis* capsular polysaccharide gene clusters centered on *uphY*-like 1 gene. Vertical and diagonal striped arrows refer to genes having a high homology and sharing synteny with reference gene. (*) indicate genes with low homology but sharing synteny over *P. distasonis* genomes. CDS: coding sequences are represented by gray arrows.

Table 3. Identification of CPS loci in 26 *P. distasonis* genomes and phage insertion within clusters. Color code: presence (green), partial presence (orange) or absence (red) of the CPS locus by comparison with ATCC 8503^T CPS loci. Partial clusters include loci either possessing similar genes compared to ATCC 8503^T loci but no *upxY*-like gene or an identical *upxY*-like gene to ATCC 8503^T but a different gene locus. • indicate loci containing phage gene insertions.



In addition to *upxY* genes, several of these CPS loci contain a phage insertion (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, homolog of phage T7 lysozyme) that may modulate its expression (Table 3). Among them, CPS loci 1 and 13 of the 26 *P. distasonis* genomes all harbor these insertions. For CPS loci 1, this inserted segment (light blue arrows in Figure 2) is oriented in the opposite direction to *upxY*-like gene downstream of the CPS biosynthesis genes (red arrows in Figure 2).

2.2.1. *P. distasonis* Gene Cluster Potentially Involved in Fimbriae-like Synthesis

Almost all the *fim*-like genes investigated have been identified in the 26 *P. distasonis* genomes (Figure 3). The few genes not found by BLAST have been highlighted in the syntenic analysis showing *fimA-E* on every *P. distasonis* genome. Notably, BLAST of *fimC*-like allowed the identification of another *fimC*-like gene possessed by 24 of the 26 studied genomes. The identified *fim*-like gene cluster is composed of a various gene blocks, including one main block of four genes (*fimA*-like, *fimB*-like and *fimC*-like); a second block of two genes (*fimD*-like and *fimE*-like) that are always together but not located in the same region as *fimA-C*; and several genes showing a slight homology but a synteny with *fimA*-like 2, which are located sometimes in and sometimes out of the main block of genes. One nonsense mutation was found on the *fimE*-like gene of the CL03T12C09 that probably avoid its synthesis. Compared to the *P. gingivalis* *fim* cluster, whose genes all follow each other, *P. distasonis* *fim*-like cluster appeared to be relatively close in terms of organization, with only *fimD*-like and *fimE*-like displaying a different location.

A

Consensus sequence	Nb of genomes with positive result	% Homology
<i>fimA</i> -like 1	24	79-100%
<i>fimA</i> -like 2	23	92-99%
<i>fimB</i> -like	26	80-99%
<i>fimC</i> -like	2	99-100%
<i>fimD</i> -like	24	90-97%
<i>fimE</i> -like 1	24	94-99%
<i>fimE</i> -like 2	2	98-100%

B

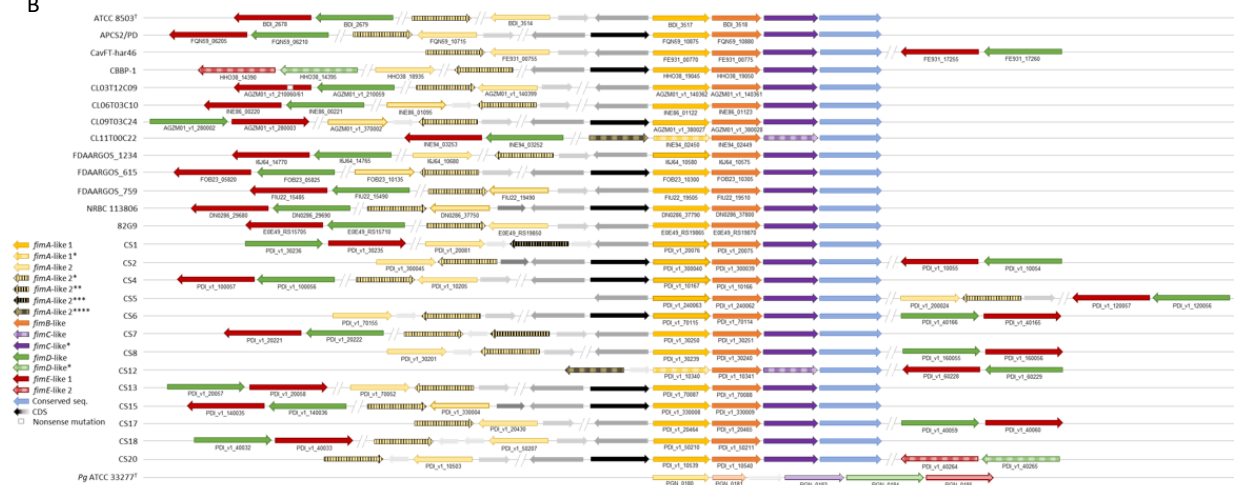


Figure 3. Identification of *fim*-like gene clusters on *P. distasonis* genomes compared to *P. gingivalis* cluster. (A) BLAST of *fim*-like consensus sequences against *P. distasonis* genomes. (B) Syntenic analysis of *P. distasonis* fimbriae gene clusters centered on *fimA*-like 1 gene. Vertical striped arrows refer to genes having a high homology and sharing synteny with reference gene. (*) indicate genes with low homology but sharing synteny over *P. distasonis* genomes. CDS: coding sequences are represented by gray and black arrows. Horizontal striped arrows are used for the *Fim* cluster of the reference genome: *P. gingivalis* ATCC 33277^T.

2.2.2. *P. distasonis* Gene Cluster Potentially Involved in Pili-like Synthesis

Homologue sequences of Bt *mfa2*-like genes were found in only two *P. distasonis* genomes, while Pg *mfa1*-like/Pg *mfa2*-like 2 and Pg *mfa2*-like 1/Pg *mfa4*-like genes were found on five and eight genomes, respectively (Figure 4A). Interestingly, the five genomes containing Pg *mfa1*-like gene correspond to the five genomes holding Pg *mfa2*-like 2. In the same way, the eight genomes positive to the BLAST are the same for Pg *mfa2*-like 1 and Pg *mfa4*-like genes. The syntenic analysis of Bt *mfa2*-like gene (Figure 4B) revealed a conserved gene downstream of Bt *mfa2*-like gene showing similarities with Bt *mfa1*, identified as putative Bt *mfa1*-like gene. Some strains harbor several *mfa*-like clusters, such as putative Bt *mfa1*-like/Bt *mfa2*-like + Pg *mfa2*-like 1/Pg *mfa4*-like genes or Pg *mfa1*-like/Pg *mfa2*-like 2 + Pg *mfa2*-like 1/Pg *mfa4*-like genes.

A

Consensus sequence	Nb of genomes with positive result	% Homology
Bt <i>mfa2</i> -like	2	97-100%
Pg <i>mfa1</i> -like	5	90-97%
Pg <i>mfa2</i> -like 1	8	99-100%
Pg <i>mfa2</i> -like 2	5	93-97%
Pg <i>mfa4</i> -like	8	99%

B



Figure 4. Identification of pili-like gene clusters on *P. distasonis* genomes compared to *P. gingivalis* and *B. thetaiotaomicron* cluster. (A) BLAST of *mfa*-like consensus sequences against *P. distasonis* genomes. (B) Syntenic analysis of *P. distasonis* pilus gene clusters centered on *fimA*-like 1 gene. CDS: coding sequences are represented by gray arrows. Horizontal striped arrows are used for the Mfa cluster of the reference genomes: *B. thetaiotaomicron* VPI-5482^T and *P. gingivalis* ATCC 33277^T.

2.3. *rfbA* Classification and Investigation

In order to determine the potential pathogenicity of *P. distasonis*, the new *rfbA*-type classification was applied to the 26 studied genomes (Figure 5A, gene details in Table S2). The addition of new data modified the classification. A fifth group was identified and the previous gene repartition changed, notably with the presence of a *rfbA*-type 1 gene in all the 26 *P. distasonis* strains. In order to better understand the variation between each *rfbA*-type gene, the multiple sequence alignment of all the *rfbA* genes was explored (Figure 5B). The analysis revealed the presence of three gaps, two in 5' and one in 3'. The *rfbA*-type 1 seems to be characterized by the presence of gaps 1 and 2, leading to a shorter *rfbA* sequence (876 nucleotides) with some point mutation observable. The *rfbA*-type 2, in addition to being characterized by the gaps 1 and 2, shows specific variations compared to the *rfbA*-type 1. Interestingly, a start codon ATG is observable in position 73 of every *rfbA*-type 2 gene that could lead to the suppression of the gap 1. The *rfbA*-type 3 is also identified by the gap 1 and variations from *rfbA*-type 1 that are relatively closed to *rfbA*-type 2. The gap 1 is also present for the types 4 and 5 which, however, display very unique sequences.

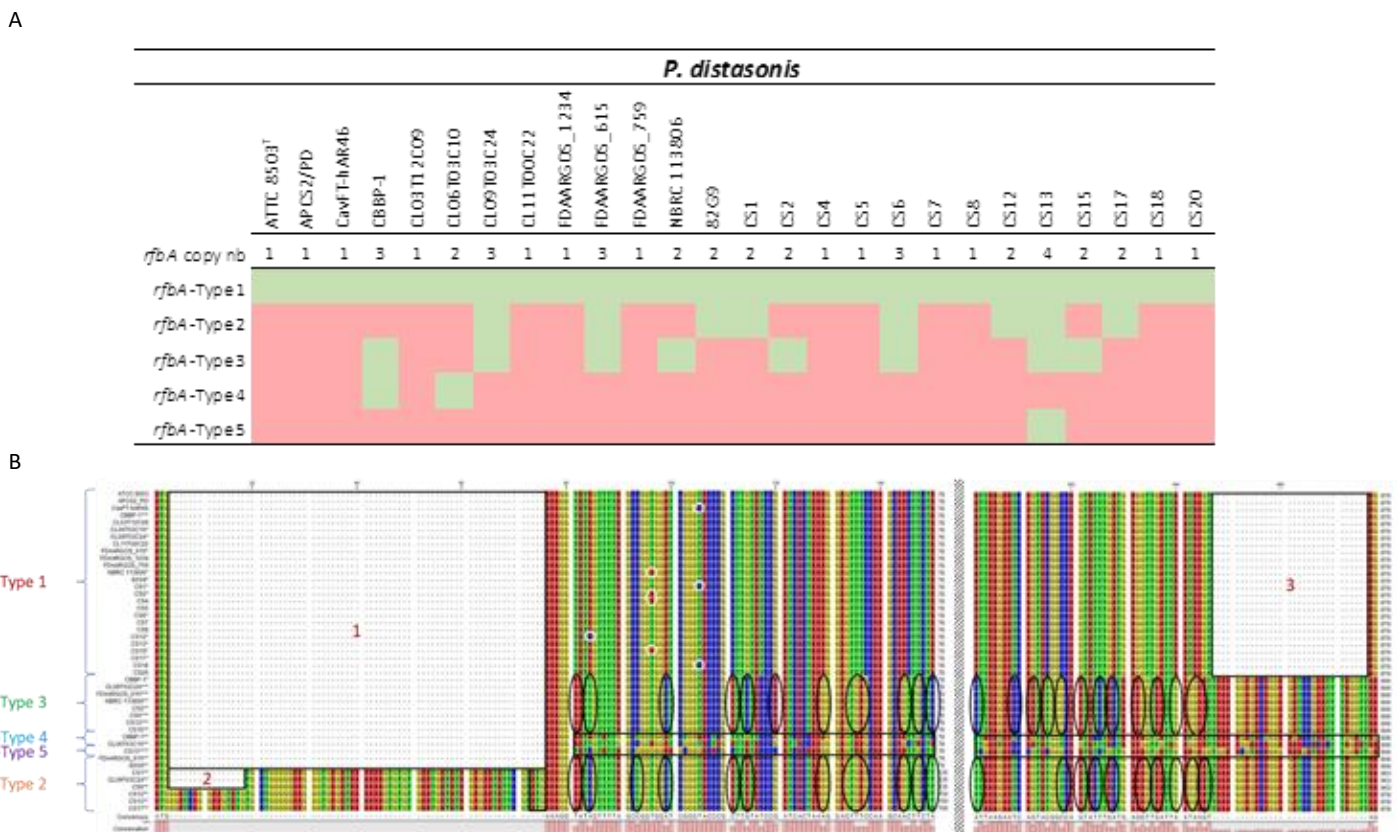


Figure 5. Classification and characterization of *rfbA* genes of *P. distasonis*. **(A)** *rfbA* copy number and classification of each *P. distasonis* strain. Color code: presence (green) or absence (red) of the *rfbA* gene of the indicated type. **(B)** *rfbA*-type nucleotide sequences and gaps analysis. Gaps are framed and numerated from 1 to 3. *rfbA*-type 1 single-nucleotide polymorphisms are surrounded in white. Variation of *rfbA*-type 2 and 3 from *rfbA*-type 1 are highlighted by black circles. *rfbA*-type 4 and 5 are framed in black due to the important number of variations compared to the *rfbA*-type 1.

2.4. Implication of *P. distasonis* Cell Surface Structures in Its Potential Pathogenicity

All the data generated in this study were compiled in order to determine the implication of *P. distasonis* cell surface markers in its potential pathogenicity (Table 4). Strains were classified as commensal (ATCC 8503^T and NBRC 113806) or potential pathogens (CavFT-hAR46 and CS1-20 except CS6) on the basis of the health status of their original host (based on the isolation source of each strain, Table 1), and as beneficial or detrimental based on the literature [16,20,26,27,36]. The comparison of outer membrane structure from both categories does not bring to the fore any specific structure. Indeed, all the external structures harbored by the potential pathogen strains are identified in at least one of the commensal strains. In the same way, all structures absent from the surface of commensal strains are not systematically carried by the potential pathogens.

Table 4. Identification of cell surface structures present on 26 *P. distasonis* strains based on host status. The beneficial or detrimental activity of strains (based on the literature) was added in order to compare potential pathogen from probiotic strains. Color code: beneficial properties (blue), detrimental properties (black), presence (green), partial presence (orange), absence (red). ATCC 8503^T is represented as blue/black for its beneficial/detrimental activities due to various results found in the literature. Dashes (-) have been added for unknown status.

		<i>P. distasonis</i>																													
		ATCC 8503 ^T	NBRC 113806	APCS2/PD	CBBP-1	CL03T12C09	CL06T03C10	CL09T03C24	CL11T00C22	FDAARGOS_1234	FDAARGOS_615	FDAARGOS_759	82G9	CS6	CavFT-hAR46	CS1	CS2	CS5	CS7	CS13	CS15	CS20	CS4	CS8	CS12	CS17	CS18				
Host statut		Normal	Unkown host statut													CD	Peritonitis				VI	B	OI	AA							
Beneficial/Detrimental		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Cell surface structures	Fimbriae 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	Fimbriae 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	Pili 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Pili 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Pili 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	CPS 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CPS 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CPS 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPS 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rfa</i> A-Type 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rfa</i> A-Type 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rfa</i> A-Type 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rfa</i> A-Type 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rfa</i> A-Type 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CD: Crohn’s disease; VI: vulvar infection; B: bacteremia; OI: osteo-articular infection; AA: abdominal abscess.

3. Discussion

The human GM and its trillion of bacteria are now well-known for their commensal and symbiotic relationships with the host. One of the GM members is *P. distasonis*, a Gram-negative anaerobe part of the *core microbiome*. While a large number of studies promotes this species as a new potential biotherapeutic product due to its multiple benefits provided to its host, controversial results have identified it as an opportunistic pathogen [22–24,26–29]. Although there is still a lot to understand about the mechanisms involved in the GM–host interaction, the implication of cell surface structures of GM members

is now well-defined [9,43,44]. In the present study, we investigated cell surface structures of 26 *P. distasonis* genomes in order to better understand its maintenance within the digestive tract and its potential virulence. Among the 26 genomes, 13 new clinical strain genomes of the member of the distal gut microbiome *P. distasonis* were sequenced and computed on the MaGe platform. The general features of new genomes were very similar to other *P. distasonis* genomes already available, with an average size of 5.2 Mb and a core-genome of 2479 CDS. The phylogenetic analysis did not highlight any special difference between CS genome from this study and other *P. distasonis* genome with a homogenous distribution of CS genomes over the tree.

A previous investigation of CPS loci revealed the presence of the UpxY regulator on *P. distasonis* ATCC 8503^T genome, leading to the identification of 13 putative CPS loci over its genome [42]. In our study, a 14th putative locus was identified on the ATCC 8503^T genome. Although well conserved, not all 14 CPS loci are conserved over the 26 *P. distasonis* strains investigated in this study. Surprisingly, any of the *upxY* genes identified seem to be coupled with a *upxZ* regulator genes. However, if UpxY positively regulates *B. fragilis* CPS synthesis by preventing premature transcription termination in the untranslated region, UpxZ is indispensable to limit production of multiple CPSs, as described in *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* [45,46]. Consequently, *P. distasonis* surface polysaccharide seems to result in the combination of multiple CPS loci whose expression is potentially controlled by inversions of the promoter region, leading to phase variable synthesis [47]. The presence of phage insertions within several of these CPS loci may also modulate its expression. In addition, *P. distasonis* strains do not all display the same number of CPS loci and can also have sequence variations over the loci, emphasizing the strain-dependent nature of *P. distasonis* CPS.

In addition to external polysaccharides, another proteinaceous surface structure involved in host–microbiota interaction is the fimbriae. One of the most described fimbriae organization is the *P. gingivalis* Fim system strongly identified as a virulence factor [15]. A previous study identified an analogous typical pilin encoding operon on the *P. distasonis* ATCC 8503^T genome [48]. In our work, almost all the *fim*-like genes investigated were identified in the 26 *P. distasonis* genomes, revealing the important conservation of a gene cluster involved in the fimbriae-like synthesis. Among these clusters, two distinct type of fimbriae were identified. The first one is present on 24 of the 26 studied genomes and seems to be conserved, while the second one is only harbored by two genomes. Both clusters are composed of *fimA-B-C-D-E*-like genes with some variations, including the putative presence of other *fimA*-like genes through the Fim clusters or different gene sequences such as the *fimD-E* of CBBP-1 and CS20 strains that display low similarity with others *fimD-E*. Fimbriae do not necessarily mean pathogenicity by contributing to host epithelium colonization, thus forming a protective barrier against external pathogens and stimulating the host immune system, as recently demonstrated by the recombinant pLA-K88/*Lactobacillus casei* strain [49].

Pili, as well as capsular polysaccharides and fimbriae, are external proteinaceous structures involved in host–GM interaction. *P. gingivalis* that display fimbriae also harbor pili, also called “minor fimbriae” [33]. The Mfa system of *P. gingivalis* involved in the pilus synthesis has also been identified in the gut commensal *B. thetaiotaomicron* [13]. Although partially found, no complete *mfa*-like gene cluster has been identified in the studied *P. distasonis* strains. However, 11 of the 26 genomes possess a pair of genes composed of either Bt *mfa1/mfa2*, Pg *mfa1/mfa2* or Pg *mfa4/mfa2* with *mfa1/mfa4* encoding for an external polymer and *mfa2* involved in the anchoring of the pilus and length regulation of Mfa1. The absence of pilus gene cluster on other genomes could be explained either by a greater diversity of pilus with pili showing important differences from the investigated ones or by the absence of pili on more than half of the studied strains. As for fimbriae, the presence of pili does not necessarily imply pathogenicity. The well-studied probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and its spaCBA-encoded pili confirmed this by showing multiple benefits for its host despite its proteinaceous heteropolymeric extracellular appendages [50].

The identification of fimbriae-like and pili-like gene clusters allowed the representation of cell surface markers potentially present at the surface of *P. distasonis* (Figure 6). Two distinct fimbriae-like and three pili-like gene clusters have been represented depending on the gene clusters found. The first type of fimbriae (left) is harbored by 24 *P. distasonis* while the second one (right) is harbored by the last two studied strains (CL11T00C22 and CS12). Concerning the pili, four strains (ATCC 8503^T, FDAARGOS_1234, 82G9 and CS17) harbor only the first type (left), three (CavFT-har46, CS12 and CS18) harbor only the second type (middle) and none harbor only the third type (right). Some strains also presented combination of several pilus: two (CL06T03C10 and CL11T00C22) harbor the first and second pili type and two (CL03T12C09 and FDAARGOS_759) harbor the first and third type.

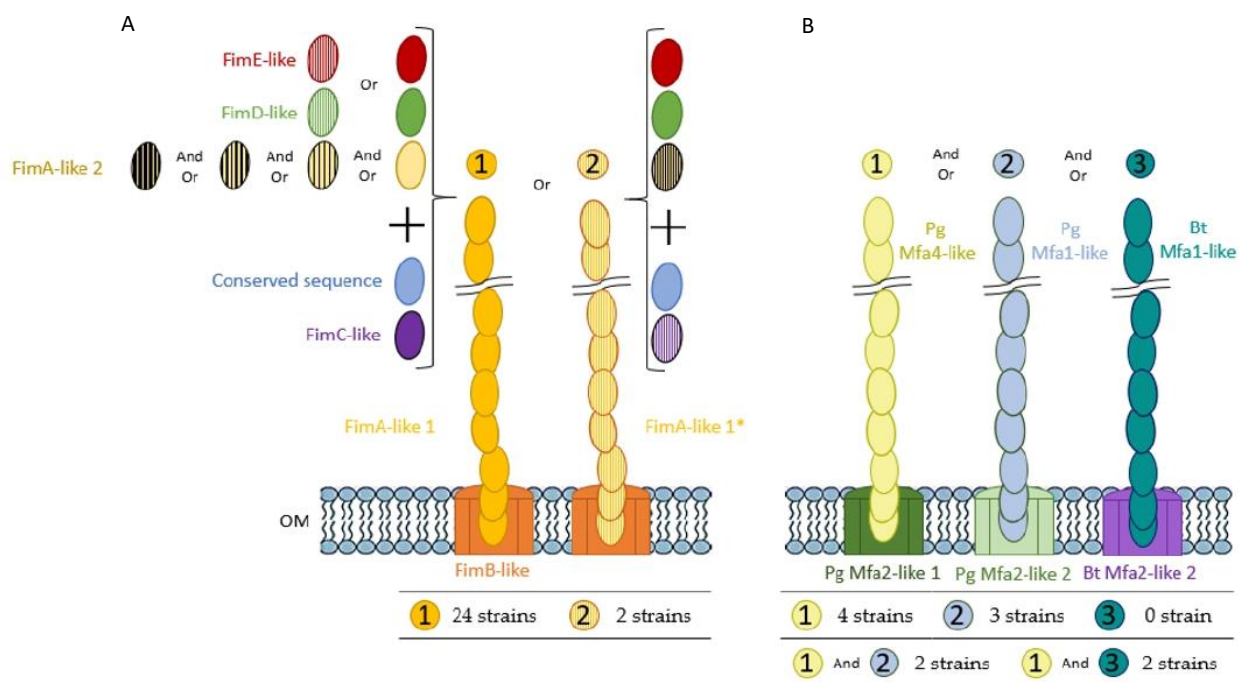


Figure 6. Hypothetical schematic representation of *P. distasonis* (A) fimbriae and (B) pili from the Fim and Mfa system, respectively. The different type of fimbriae and pili have been identified from 1 to 2 and from 1 to 3, respectively. The table below each structure represents the number of strains harboring the gene cluster encoding the hypothetical structure. The color code corresponds to the syntenic analysis. “Or” indicates that one *P. distasonis* strain can harbor only one of the proteins encoding genes concerned. For example, type 1 Fim cluster of *P. distasonis* contains either *fimE*-like or striped *fimE*-like genes but never both in the 24 identified clusters. “And Or” indicates that one *P. distasonis* strain can harbor one or several of the protein encoding genes. For example, various *fimA*-like 2 genes combinations can be found within type 1 Fim cluster of *P. distasonis*.

In order to discriminate strains regarding their LPS, all the *rfa* genes of the 26 *P. distasonis* genomes have here been referenced, and RfaA-type classification has been applied. As described in Bank et al., 2022 [30], most of the listed *rfa* genes belong to type I, highlighting the conservation of this LPS type with the ATCC 8503^T *rfa* belonging to the type I, and that was isolated more than 80 years ago. However, the addition of new data modified the classification with the identification of a fifth type and a new repartition of the *rfa* genes within the five types. The analysis of *rfa*-type variation revealed the presence of three main gaps and multiple sequence variations that shape the *rfa*-type organization, including one major gap potentially non-existent due to the presence of a start codon within some *rfa* gene sequences. Unlike the previous classification, the new

rfaA gene repartition shows CS possessing type 1 *rfaA* and no specific *rfaA*-type allowing the distinction of CS from other *P. distasonis* strains. Thus, this typing does not seem to be adequate to differentiate pathogenic from non-pathogenic strains.

The comparison of outer membrane structures from commensal to potential pathogenic strains does not allow the identification of specific surface markers responsible for the putative pathogenicity of *P. distasonis*. The inter-strain variability observed for *P. distasonis* properties and potential pathogenicity could be explained by the association of all differences observed in this study, including the presence/absence of cell surface markers, loci/clusters organization and gene sequences. These variations are correlated with the phylogenetical analysis where, for example, *P. distasonis* ATCC 8503^T and FDAARGOS_1234 strains, which are genetically close, display the exact same external structures. In the same way, FDAARGOS_759 and CL09T03C24 that are the most genetically different strains appear to differ from each other in the presence/absence of seven outer structures. Moreover, the synthesis of these external structures seems to depend on numerous factors, including genetic regulators themselves potentially contingent on environment conditions in which bacteria are evolving [47,51,52]. Thus, one plausible response to the pathogenic effects of *P. distasonis* is the involvement of other mechanisms than its CPS, pili, fimbriae or LPS/O-antigen membrane fractions and to the dissemination of this species from the GM to sterile sites, as an opportunistic pathogen.

Concerning *P. distasonis* maintenance within the GM, the presence of such external proteinaceous structures could explain its ability to adhere and persist in this complex and competitive environment. These results are consistent with our previous study that illustrates the adhesion and biofilm formation capacity of the 13 *P. distasonis* [25]. Although all the strains were able to adhere, an inter-strain variation was observable. These differences could be explained by a different shape of the external surface of the strains. Interestingly, the CS12 that displays the lowest adhesion capacity is also the only CS strain that does not harbor the type 1 fimbriae gene cluster identified in this study. This result could highlight the potential involvement of the type 1 fimbriae in the maintenance of *P. distasonis* within the GM. However, it does not seem that there is a link between the presence of a special cell surface marker for the higher adhesion or biofilm abilities. In fact, the CS1 that displays the most important adhesion capacity does not show a specific cell surface appendage that could explain this adhesion capacity. In the same way, the CS8 that has the strongest biofilm formation capacity does not show a particular cell surface structure explaining its greater capacity.

In conclusion, this work permitted the identification of several gene clusters involved in the capsule, fimbriae and pili synthesis. The presence or absence of these cell surface structures coupled with variations in gene sequences could explain *P. distasonis* maintenance within the GM and the inter-strain variability observed for its beneficial capacities and potential pathogenicity. However, no specific external cell surface structure that could explain *P. distasonis* behavior was identified. This study provides a better comprehension of the preservation of *P. distasonis* through the human gut and tools to better understand and characterize the beneficial/pathogenic behavior related to *P. distasonis* strains.

4. Materials and Methods

4.1. Whole-Genome Sequencing

The genomic DNA of the 13 CS of *P. distasonis* was extracted by the QiaAmpDNA MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France). De Novo Microbial Genome Sequencing using Illumina technology was used to sequence the 13 CS of *P. distasonis* (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). All genomes were integrated in the MaGe platform [53] (v3.15.3; The LABGeM, CEA/Genoscope and CNRS UMR8030).

4.2. Genome Data Used

In silico analyses of cell surface structures were performed on the 13 CS of *P. distasonis* and 13 public genomes available on the MaGe platform.

4.3. Pan and Core-Genome Analysis

The pan and core-genome of *P. distasonis* were calculated with the Pan/Core-Genome tool of MaGe, based on MicroScope gene families (MICFAM) which are computed using an algorithm implemented in the SiLiX software. The following were used as stringent parameters: 80% amino acid identity and 80% alignment coverage.

4.4. Phylogenetic Analysis

P. distasonis whole-genome sequences were used to determine the phylogenetic relationship among the isolates and public databases. Reference genomes (*P. gingivalis* ATCC 33277^T, *B. thetaiotaomicron* VPI-5482^T and *B. fragilis* ATCC 25285^T) used in this study were added to the tree to demonstrate their closeness with *P. distasonis*. The phylogenetic tree was computed on MaGe using the Genome Clustering tool and reworked on the Interactive Tree Of Life online tool [54] (iTOL).

4.5. Comparative Genome Analysis

In order to determine the potential presence of fimbriae, pili and/or capsular polysaccharides at the surface of *P. distasonis*, reference genes involved in their synthesis were selected from species related to *P. distasonis* (Table 5).

Table 5. Reference genes used to determine external structures of *P. distasonis*.

Structure	Reference Genome	Gene	Label	Length (Aa)	Reference
Capsule	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 ^T	<i>upaY</i>	BF1367	172	[11,42,55]
		<i>upaZ</i>	BF1368	157	
		<i>upbY</i>	BF1893	174	
		<i>upbZ</i>	BF1894	161	
		<i>upcY</i>	BF1009	172	
		<i>upcZ</i>	BF1010	130	
		<i>updY</i>	BF3699	179	
		<i>updZ</i>	BF3698	161	
		<i>upeY</i>	BF2606	172	
		<i>upeZ</i>	BF2605	160	
		<i>upfY</i>	BF1549	199	
		<i>upfZ</i>	BF1550	160	
		<i>upgY</i>	BF0731	178	
		<i>upgZ</i>	BF0732	162	
<i>uphY</i>	BF3466	179			
<i>uphZ</i>	BF3465	161			
Fimbriae	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^T	<i>fimA</i>	PGN_0180	383	[12,15]
		<i>fimB</i>	PGN_0181	118	
		<i>fimC</i>	PGN_0183	462	
		<i>fimD</i>	PGN_0184	670	
		<i>fimE</i>	PGN_0185	550	
Pilus	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482 ^T	<i>mfa1</i>	BT_3147	388	[13]
		<i>mfa2</i>	BT_3148	430	
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^T	<i>mfa1</i>	PGN_0287	563	
		<i>mfa2</i>	PGN_0288	324	
		<i>mfa3</i>	PGN_0289	446	
<i>mfa4</i>	PGN_0290	333			
<i>mfa5</i>	PGN_0291	1228			

Synteny enabled us to identify the conservation of homologous genes and gene order between genomes of different strains or species. Synteny blocks between references and *P. distasonis* genomes were investigated using the Genome Browser/Syntonome tools of MaGe and allowed the selection of a pool of genes potentially involved in the synthesis of the targeted structures. To reduce the number of *P. distasonis* genes and refine the search,

only genes with an auto-assignment function related to the synthesis of the sought element were preserved and listed. The automatic functional assignment of MaGe follows an algorithm based on homologous relations with model organisms and completion of gene editor (gene name, product, EC numbers, roles . . .) using various programs or databases (RefGen, SwissProt, UniFIRE, TrEMBL . . .).

Multiple sequence alignments of each pool of genes related to each reference gene were then performed using CLC Viewer 8.0 to obtain one or several consensus sequences related to each reference gene.

Consensus sequences were then used for BLAST investigation against the 26 *P. distasonis* genomes using the Blast and Pattern Searches tool of MaGe.

Matching genes were then used to generate a syntenic block analysis between *P. distasonis* genome for each cell surface structure studied.

4.6. *rfbA*-Type Determination and Analysis

In order to determine the *rfbA*-type genes of the latest sequenced *P. distasonis* genomes, the classification method recently described by Bank et al. was used [30].

rfbA genes of *P. distasonis* were first referenced and aligned using CLC Viewer 8.0. The multiple sequence alignment was then used to generate a phylogenetic tree, allowing the classification of new *rfbA* genes.

As the *rfbA*-type genes obtained in this study were different from the previous classification, analyses of nucleotide sequences and gaps of distinct *rfbA*-type genes were performed in order to determine and better understand the variation between each type.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23169411/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, J.C., C.C.-G. and L.C.; methodology, J.C. and C.C.-G.; software, J.C. and C.C.-G.; formal analysis, J.C.; investigation, J.C. and C.C.-G.; writing—original draft preparation, J.C., C.C.-G. and L.C.; writing—review and editing, J.C., C.C.-G., L.C. and C.A.; supervision, C.C.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French PIA project Lorraine Université d'Excellence, reference ANR-15-IDEX-04-LUE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The genome sequencing data generated are indexed under the BioProject accession number PRJNA838851.

Conflicts of Interest: No potential conflict of interest was reported by the author(s).

References

- O'Hara, A.M.; Shanahan, F. The Gut Flora as a Forgotten Organ. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 688–693. [CrossRef] [PubMed]
- Anwar, H.; Irfan, S.; Hussain, G.; Naeem Faisal, M.; Muzaffar, H.; Mustafa, I.; Mukhtar, I.; Malik, S.; Irfan Ullah, M. Gut Microbiome: A New Organ System in Body. In *Parasitology and Microbiology Research*; Antonio Bastidas Pacheco, G., Ali Kamboh, A., Eds.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2020; ISBN 978-1-78985-901-0.
- Wang, H.-X.; Wang, Y.-P. Gut Microbiota-Brain Axis. *Chin. Med. J.* **2016**, *129*, 2373–2380. [CrossRef] [PubMed]
- Talham, G.L.; Jiang, H.-Q.; Bos, N.A.; Cebra, J.J. Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 1992–2000. [CrossRef] [PubMed]
- Jandhyala, S.M. Role of the Normal Gut Microbiota. *WJG* **2015**, *21*, 8787. [CrossRef] [PubMed]
- Lynch, J.B.; Hsiao, E.Y. Microbiomes as Sources of Emergent Host Phenotypes. *Science* **2019**, *365*, 1405–1409. [CrossRef] [PubMed]
- Morais, L.H.; Schreiber, H.L.; Mazmanian, S.K. The Gut Microbiota-Brain Axis in Behaviour and Brain Disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 241–255. [CrossRef]
- Nie, L.; Cai, S.-Y.; Shao, J.-Z.; Chen, J. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1523. [CrossRef]

9. Tytgat, H.L.P.; Van Teijlingen, N.H.; Sullan, R.M.A.; Douillard, F.P.; Rasinkangas, P.; Messing, M.; Reunanen, J.; Satokari, R.; Vanderleyden, J.; Dufrière, Y.F.; et al. Probiotic Gut Microbiota Isolate Interacts with Dendritic Cells via Glycosylated Heterotrimeric Pili. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151824. [[CrossRef](#)]
10. Lighthart, K.; Belzer, C.; De Vos, W.M.; Tytgat, H.L.P. Bridging Bacteria and the Gut: Functional Aspects of Type IV Pili. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 340–348. [[CrossRef](#)]
11. Patrick, S.; Blakely, G.W.; Houston, S.; Moore, J.; Abratt, V.R.; Bertalan, M.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Quail, M.A.; Corton, N.; Corton, C.; et al. Twenty-Eight Divergent Polysaccharide Loci Specifying within- and amongst-Strain Capsule Diversity in Three Strains of *Bacteroides Fragilis*. *Microbiology* **2010**, *156*, 3255–3269. [[CrossRef](#)]
12. Nagano, K.; Hasegawa, Y.; Abiko, Y.; Yoshida, Y.; Murakami, Y.; Yoshimura, F. *Porphyromonas Gingivalis* FimA Fimbriae: Fimbrial Assembly by FimA Alone in the Fim Gene Cluster and Differential Antigenicity among FimA Genotypes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43722. [[CrossRef](#)]
13. Mihajlovic, J.; Bechon, N.; Ivanova, C.; Chain, F.; Almeida, A.; Langella, P.; Beloin, C.; Ghigo, J.-M. A Putative Type V Pilus Contributes to *Bacteroides Thetaiotaomicron* Biofilm Formation Capacity. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00650-18. [[CrossRef](#)]
14. Hasegawa, Y.; Iwami, J.; Sato, K.; Park, Y.; Nishikawa, K.; Atsumi, T.; Moriguchi, K.; Murakami, Y.; Lamont, R.J.; Nakamura, H.; et al. Anchoring and Length Regulation of *Porphyromonas Gingivalis* Mfa1 Fimbriae by the Downstream Gene Product Mfa2. *Microbiology* **2009**, *155*, 3333–3347. [[CrossRef](#)]
15. Hasegawa, Y.; Nagano, K. *Porphyromonas Gingivalis* FimA and Mfa1 Fimbriae: Current Insights on Localization, Function, Biogenesis, and Genotype. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2021**, *57*, 190–200. [[CrossRef](#)]
16. Koh, G.Y.; Kane, A.V.; Wu, X.; Crott, J.W. *Parabacteroides Distasonis* Attenuates Tumorigenesis, Modulates Inflammatory Markers and Promotes Intestinal Barrier Integrity in Azoxymethane-Treated A/J Mice. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 909–917. [[CrossRef](#)]
17. Wang, K.; Liao, M.; Zhou, N.; Bao, L.; Ma, K.; Zheng, Z.; Wang, Y.; Liu, C.; Wang, W.; Wang, J.; et al. *Parabacteroides Distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 222–235.e5. [[CrossRef](#)]
18. Li, M.; Wang, S.; Li, Y.; Zhao, M.; Kuang, J.; Liang, D.; Wang, J.; Wei, M.; Rajani, C.; Ma, X.; et al. Gut Microbiota-Bile Acid Crosstalk Contributes to the Rebound Weight Gain after Calorie Restriction in Mice. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pfalzer, A.C.; Nesbeth, P.-D.C.; Parnell, L.D.; Iyer, L.K.; Liu, Z.; Kane, A.V.; Chen, C.-Y.O.; Tai, A.K.; Bowman, T.A.; Obin, M.S.; et al. Diet- and Genetically-Induced Obesity Differentially Affect the Fecal Microbiome and Metabolome in Apc1638N Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Koh, G.Y.; Kane, A.; Lee, K.; Xu, Q.; Wu, X.; Roper, J.; Mason, J.B.; Crott, J.W. *Parabacteroides Distasonis* Attenuates Toll-like Receptor 4 Signaling and Akt Activation and Blocks Colon Tumor Formation in High-fat Diet-fed Azoxymethane-treated Mice. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 1797–1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kverka, M.; Zakostelska, Z.; Klimesova, K.; Sokol, D.; Hudcovic, T.; Hrnčir, T.; Rossmann, P.; Mrazek, J.; Kopečný, J.; Verdu, E.F.; et al. Oral Administration of *Parabacteroides Distasonis* Antigens Attenuates Experimental Murine Colitis through Modulation of Immunity and Microbiota Composition. *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, *163*, 250–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cuffaro, B.; Assouhoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Súkeniková, L.; Desramaut, J.; Boudebouze, S.; Salomé-Desnoulez, S.; Hrdý, J.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Maguin, E.; et al. In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of *Parabacteroides Distasonis* Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* **2020**, *9*, 2104. [[CrossRef](#)]
23. Cuffaro, B.; Assouhoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Peucelle, V.; Desramaut, J.; Boudebouze, S.; Croyal, M.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Rhimi, M.; Grangette, C.; et al. Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms* **2021**, *9*, 565. [[CrossRef](#)]
24. Hiippala, K.; Kainulainen, V.; Suutarinen, M.; Heini, T.; Bowers, J.R.; Jasso-Selles, D.; Lemmer, D.; Valentine, M.; Barnes, R.; Engelthaler, D.M.; et al. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing *Bacteroides* and *Parabacteroides* Spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients* **2020**, *12*, 935. [[CrossRef](#)]
25. Chamarande, J.; Cunat, L.; Caillet, C.; Mathieu, L.; Duval, J.F.L.; Lozniewski, A.; Fripiat, J.-P.; Alauzet, C.; Cailliez-Grimal, C. Surface Properties of *Parabacteroides Distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1602. [[CrossRef](#)]
26. Dziarski, R.; Park, S.Y.; Kashyap, D.R.; Dowd, S.E.; Gupta, D. Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella Falsenii*, *Parabacteroides Distasonis* and *Bacteroides Eggerthii* Enhance and *Alistipes Finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146162. [[CrossRef](#)]
27. Blacher, E.; Bashiardes, S.; Shapiro, H.; Rothschild, D.; Mor, U.; Dori-Bachash, M.; Kleimeyer, C.; Moresi, C.; Harnik, Y.; Zur, M.; et al. Potential Roles of Gut Microbiome and Metabolites in Modulating ALS in Mice. *Nature* **2019**, *572*, 474–480. [[CrossRef](#)]
28. Moreno-Arrones, O.M.; Serrano-Villar, S.; Perez-Brocá, V.; Saceda-Corralo, D.; Morales-Raya, C.; Rodrigues-Barata, R.; Moya, A.; Jaen-Olasolo, P.; Vano-Galvan, S. Analysis of the Gut Microbiota in Alopecia Areata: Identification of Bacterial Biomarkers. *J. Eur. Acad. Derm. Venereol.* **2020**, *34*, 400–405. [[CrossRef](#)]
29. Zhou, C.; Zhao, H.; Xiao, X.; Chen, B.; Guo, R.; Wang, Q.; Chen, H.; Zhao, L.; Zhang, C.; Jiao, Y.; et al. Metagenomic Profiling of the Pro-Inflammatory Gut Microbiota in Ankylosing Spondylitis. *J. Autoimmun.* **2020**, *107*, 102360. [[CrossRef](#)]

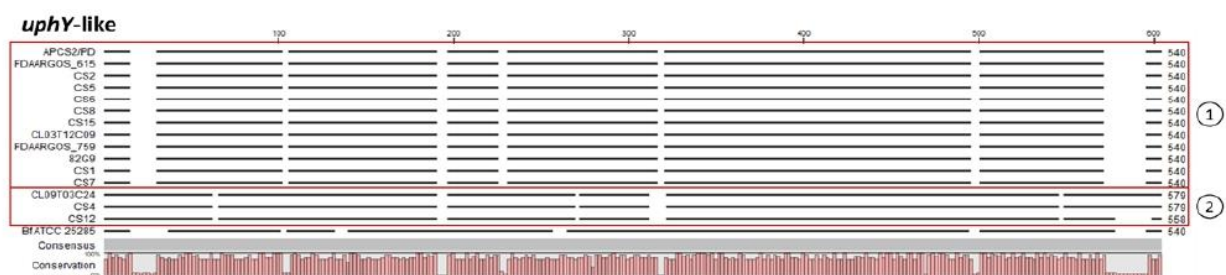
30. Bank, N.C.; Singh, V.; Rodriguez-Palacios, A. Classification of *Parabacteroides Distasonis* and Other *Bacteroidetes* Using O- Antigen Virulence Gene: *RfbA* -Typing and Hypothesis for Pathogenic vs. Probiotic Strain Differentiation. *Gut Microbes* **2022**, *14*, 1997293. [CrossRef]
31. Hamada, N.; Sojar, H.T.; Cho, M.I.; Genco, R.J. Isolation and Characterization of a Minor Fimbria from *Porphyromonas Gingivalis*. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 4788–4794. [CrossRef]
32. Lamont, R.J.; El-Sabaeny, A.; Park, Y.; Cook, G.S.; Costerton, J.W.; Demuth, D.R. Role of the *Streptococcus Gordonii* SspB Protein in the Development of *Porphyromonas Gingivalis* Biofilms on Streptococcal Substrates. *Microbiology* **2002**, *148*, 1627–1636. [CrossRef]
33. Nagano, K.; Hasegawa, Y.; Yoshida, Y.; Yoshimura, F. A Major Fimbrilin Variant of Mfa1 Fimbriae in *Porphyromonas Gingivalis*. *J. Dent. Res.* **2015**, *94*, 1143–1148. [CrossRef]
34. Eggerth, A.H.; Gagnon, B.H. The *Bacteroides* of Human Feces. *J. Bacteriol.* **1933**, *25*, 389–413. [CrossRef]
35. Yang, F.; Kumar, A.; Davenport, K.W.; Kelliher, J.M.; Ezeji, J.C.; Good, C.E.; Jacobs, M.R.; Conger, M.; West, G.; Fiocchi, C.; et al. Complete Genome Sequence of a *Parabacteroides Distasonis* Strain (CavFT HAR46) Isolated from a Gut Wall-Cavitating Microlesion in a Patient with Severe Crohn's Disease. *Microbiol. Resour. Announc.* **2019**, *8*, e00585-19. [CrossRef]
36. Caballero, S.; Kim, S.; Carter, R.A.; Leiner, I.M.; Sušac, B.; Miller, L.; Kim, G.J.; Ling, L.; Pamer, E.G. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus Faecium*. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 592–602.e4. [CrossRef]
37. García-Bayona, L.; Coyne, M.J.; Comstock, L.E. Mobile Type VI Secretion System Loci of the Gut *Bacteroidales* Display Extensive Intra-Ecosystem Transfer, Multi-Species Spread and Geographical Clustering. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009541. [CrossRef]
38. Sichtig, H.; Minogue, T.; Yan, Y.; Stefan, C.; Hall, A.; Tallon, L.; Sadzewicz, L.; Nadendla, S.; Klimke, W.; Hatcher, E.; et al. FDA-ARGOS Is a Database with Public Quality-Controlled Reference Genomes for Diagnostic Use and Regulatory Science. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3313. [CrossRef]
39. Thornton, R.F.; Murphy, E.C.; Kagawa, T.F.; O'Toole, P.W.; Cooney, J.C. The Effect of Environmental Conditions on Expression of *Bacteroides Thetaiotaomicron* C10 Protease Genes. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 190. [CrossRef]
40. Bostanci, N.; Belibasakis, G.N. *Porphyromonas Gingivalis*: An Invasive and Evasive Opportunistic Oral Pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *333*, 1–9. [CrossRef]
41. Wexler, H.M. *Bacteroides*: The Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 593–621. [CrossRef]
42. Xu, J.; Mahowald, M.A.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; Hamady, M.; Martens, E.C.; Henrissat, B.; Coutinho, P.M.; Minx, P.; Latreille, P.; et al. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e156. [CrossRef] [PubMed]
43. Palmela, C.; Chevarin, C.; Xu, Z.; Torres, J.; Sevrin, G.; Hirten, R.; Barnich, N.; Ng, S.C.; Colombel, J.-F. Adherent-Invasive *Escherichia Coli* in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2018**, *67*, 574–587. [CrossRef] [PubMed]
44. Garber, J.M.; Hennet, T.; Szymanski, C.M. Significance of Fucose in Intestinal Health and Disease. *Mol. Microbiol.* **2021**, *115*, 1086–1093. [CrossRef] [PubMed]
45. Chatzidaki-Livanis, M.; Weinacht, K.G.; Comstock, L.E. *Trans* Locus Inhibitors Limit Concomitant Polysaccharide Synthesis in the Human Gut Symbiont *Bacteroides Fragilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11976–11980. [CrossRef]
46. Bechon, N.; Mihajlovic, J.; Vendrell-Fernández, S.; Chain, F.; Langella, P.; Beloin, C.; Ghigo, J.-M. *Capsular Polysaccharides Cross-Regulation Modulates Bacteroides Thetaiotaomicron* biofilm formation. *Microbiology* **2020**, *11*, e00729-20. [CrossRef]
47. Patrick, S.; Parkhill, J.; McCoy, L.J.; Lennard, N.; Larkin, M.J.; Collins, M.; Sczaniecka, M.; Blakely, G. Multiple Inverted DNA Repeats of *Bacteroides Fragilis* That Control Polysaccharide Antigenic Variation Are Similar to the *Hin* Region Inverted Repeats of *Salmonella Typhimurium*. *Microbiology* **2003**, *149*, 915–924. [CrossRef]
48. Xu, Q.; Shoji, M.; Shibata, S.; Naito, M.; Sato, K.; Elsliger, M.-A.; Grant, J.C.; Axelrod, H.L.; Chiu, H.-J.; Farr, C.L.; et al. A Distinct Type of Pilus from the Human Microbiome. *Cell* **2016**, *165*, 690–703. [CrossRef]
49. Qin, D.; Bai, Y.; Li, Y.; Huang, Y.; Li, L.; Wang, G.; Qu, Y.; Wang, J.; Yu, L.-Y.; Hou, X. Changes in Gut Microbiota by the *Lactobacillus Casei* Anchoring the K88 Fimbrial Protein Prevented Newborn Piglets From Clinical Diarrhea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 842007. [CrossRef]
50. Vargas García, C.E.; Petrova, M.; Claes, I.J.J.; De Boeck, I.; Verhoeven, T.L.A.; Dilissen, E.; Von Ossowski, I.; Palva, A.; Bullens, D.M.; Vanderleyden, J.; et al. Piliation of *Lactobacillus Rhamnosus* GG Promotes Adhesion, Phagocytosis, and Cytokine Modulation in Macrophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 2050–2062. [CrossRef]
51. Pruzzo, C.; Dainelli, B.; Ricchetti, M. Piliated *Bacteroides Fragilis* Strains Adhere to Epithelial Cells and Are More Sensitive to Phagocytosis by Human Neutrophils Than Nonpiliated Strains. *Infect. Immun.* **1984**, *43*, 6. [CrossRef]
52. Fletcher, C.M.; Coyne, M.J.; Bentley, D.L.; Villa, O.F.; Comstock, L.E. Phase-Variable Expression of a Family of Glycoproteins Imparts a Dynamic Surface to a Symbiont in Its Human Intestinal Ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2413–2418. [CrossRef]
53. Vallenet, D.; Belda, E.; Calteau, A.; Cruveiller, S.; Engelen, S.; Lajus, A.; Le Fèvre, F.; Longin, C.; Mornico, D.; Roche, D.; et al. MicroScope—An Integrated Microbial Resource for the Curation and Comparative Analysis of Genomic and Metabolic Data. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D636–D647. [CrossRef]
54. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (ITOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [CrossRef]
55. Coyne, M.J.; Kalka-Moll, W.; Tzianabos, A.O.; Kasper, D.L.; Comstock, L.E. *Bacteroides Fragilis* NCTC9343 Produces at Least Three Distinct Capsular Polysaccharides: Cloning, Characterization, and Reassignment of Polysaccharide B and C Biosynthesis Loci. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6. [CrossRef]

In silico study of cell surface structures of *Parabacteroides distasonis* involved in its maintenance within the gut microbiota

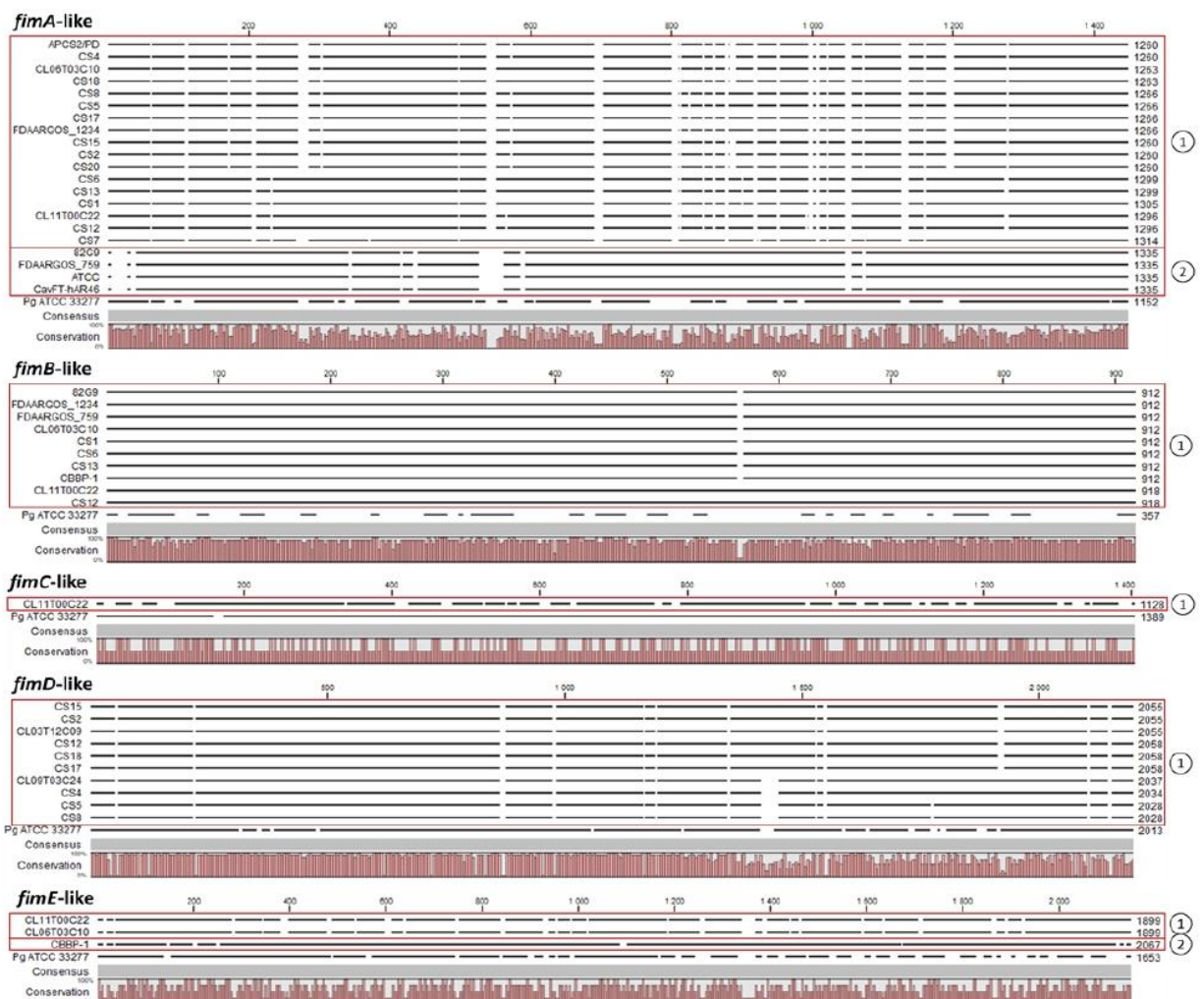
Jordan Chamarande¹, Lisiane Cunat¹, Corentine Alauzet^{1,2} and Catherine Cailliez-Grimal^{1,*}

Supplementary material

A



B



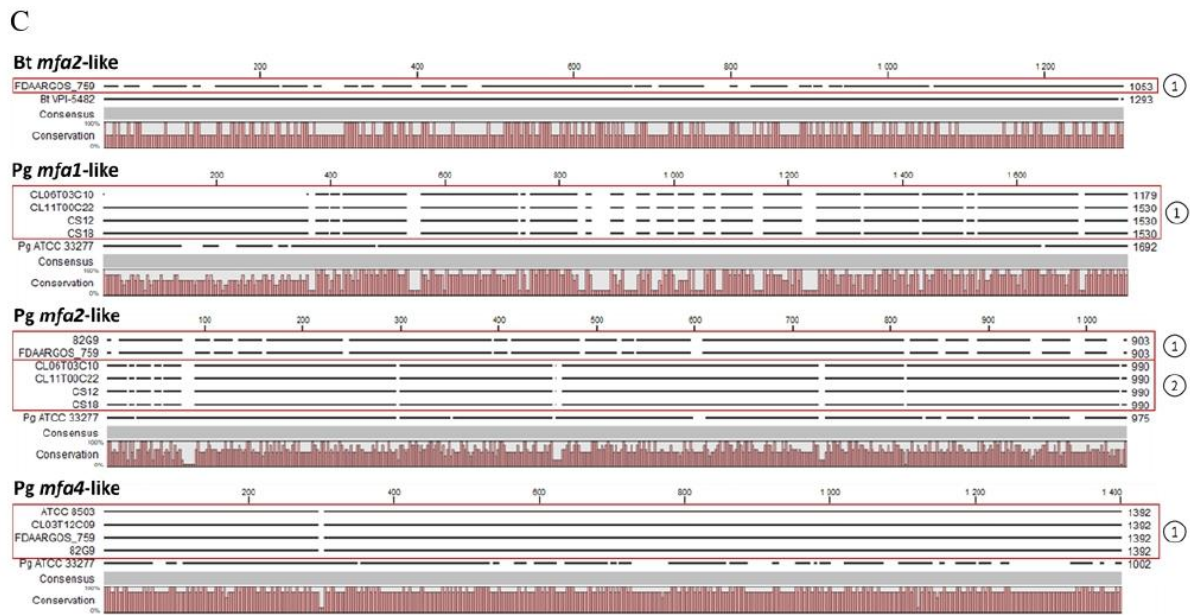


Figure S1. Multiple-sequence alignment of *P. distasonis* (A) *uphY*-like, (B) *fim*-like and (C) *mfa*-like genes listed in table 2. Each group of genes sharing similar patterns and sequences has been identified (red frame, 1 and 2) and aligned to generate a consensus sequence. As example, for *uphY*-like genes, two sequences have been generated: *uphY*-like 1 and *uphY*-like 2.

Table S2. *rfaA* copy number and classification of each *P. distasonis* strain. Colour code: presence (green) or absence (red) of the *rfaA* gene of the indicated type.

	<i>rfaA</i> copy nb	<i>rfaA</i> -Type				
		<i>rfaA</i> -Type 1	<i>rfaA</i> -Type 2	<i>rfaA</i> -Type 3	<i>rfaA</i> -Type 4	<i>rfaA</i> -Type 5
ATTC 8503 ^T	1	BDI_0650				
APCS2/PD	1	FQN59_00935				
CavFT-hAR46	1	FE931_07025				
CBBP-1	3	HHO38_06945		HHO38_00900	HHO38_19695	
CLO3T12C09	1	GZM01_v1_80504				
CLO6T03C10	2	INE86_02314			INE86_01284	
CLO9T03C24	3	GZN01_v1_18006;GZN01_v1_5010;GZN01_v1_60062				
CL11T00C22	1	INE94_00323				
FDAARGOS_1234	1	I6J64_04985				
FDAARGOS_615	3	FOB23_16170	FOB23_15745	FOB23_00375		
FDAARGOS_759	1	FIU22_04975				
NBRC 113806	2	DN0286_07410		DN0286_20480		
82G9	2	EOE49_RS04005	EOE49_RS03555			
CS1	2	PDI_v1_10862	PDI_v1_10966			
CS2	2	PDI_v1_400025		PDI_v1_310020		
CS4	1	PDI_v1_30145				
CS5	1	PDI_v1_50113				
CS6	3	PDI_v1_20113	PDI_v1_260007	PDI_v1_90120		
CS7	1	PDI_v1_80002				
CS8	1	PDI_v1_10138				
CS12	2	PDI_v1_50109	PDI_v1_50013			
CS13	4	PDI_v1_40095	PDI_v1_40005	PDI_v1_150064		PDI_v1_340013
CS15	2	PDI_v1_70074		PDI_v1_150106		
CS17	2	PDI_v1_30101	PDI_v1_30006			
CS18	1	PDI_v1_10083				
CS20	1	PDI_v1_90122				

II.3. Contributions de l'article

Une étude antérieure a révélé la présence de 13 loci impliqués dans la synthèse d'une capsule chez *P. distasonis* ATCC 8503^T (Xu et al., 2007). Dans notre étude, un 14^{ème} locus putatif a été identifié au sein du génome de l'ATCC 8503^T. Bien que conservés, les 14 loci impliqués dans la synthèse d'une capsule n'ont pas tous été retrouvés dans les 26 génomes de *P. distasonis* analysés dans cette étude. De plus, aucun des gènes *upxY* identifiés ne semble être couplé à un gène régulateur *upxZ*. Par conséquent, les potentiels polysaccharides de surface de *P. distasonis* semblent résulter de la combinaison de multiples loci de capsule dont l'expression est potentiellement contrôlée par des inversions de la région promotrice.

Outre les exopolysaccharides, les fimbriae et les pili sont d'autres structures protéiques de surface impliquées dans la colonisation de l'épithélium intestinal et dans l'interaction hôte-microbiote. Cette étude a permis l'identification de clusters de gènes chez *P. distasonis* potentiellement impliqués dans la synthèse de fimbriae et de pili. Deux types de fimbriae et trois types de pili ont été identifiés et ont permis la réalisation d'une illustration des marqueurs de surface potentiellement présents à la surface de *P. distasonis*.

La présence de telles structures protéiques externes pourrait expliquer la capacité de *P. distasonis* à adhérer, former un biofilm et ainsi de persister dans cet environnement complexe qu'est le MI. Cependant, il ne semble pas qu'il y ait un lien entre la présence d'un marqueur de surface et des capacités d'adhésion ou de formation de biofilm plus importantes. En effet, la CS1 qui présente la capacité d'adhésion la plus importante ne montre pas, au sein des gènes étudiés, de gène codant pour un appendice de surface spécifique expliquant cette capacité (Chamarande et al., 2021). De la même manière, la CS8 dont la formation de biofilm est la plus importante ne montrent pas de structure de surface connue particulière.

Afin de discriminer les souches en fonction de leur LPS, la nouvelle classification basée sur la séquence du gène *rfaA* a été appliquée aux 26 génomes de *P. distasonis* (Bank et al., 2022). L'ajout de données a modifié la classification avec l'identification d'un cinquième type et une nouvelle répartition des gènes *rfaA* au sein des cinq types. Le type I dont fait partie la souche type ATCC 8503^T semble néanmoins prédominant chez *P. distasonis*.

La comparaison des structures de surface et des différents types de *rfaA* en fonction des souches, de leur comportement bénéfique ou délétère et du statut de leur hôte dont elles ont été isolées n'a pas permis d'identifier un ou plusieurs marqueurs de surface pouvant expliquer le comportement pathogène ou probiotique des souches de *P. distasonis*. Cependant, la présence/absence de certains marqueurs de surface couplé à l'organisation des loci/clusters et aux variations des séquences génétiques pourraient expliquer le comportement de *P. distasonis*

très vraisemblablement souche-dépendant. De plus, la synthèse de ces structures semble dépendre de plusieurs facteurs, y compris des régulateurs tel que l'Up_xY dont l'expression dépend potentiellement des conditions environnementales dans lesquelles évoluent les bactéries (Fletcher et al., 2007; Patrick et al., 2003; Pruzzo et al., 1984).

III. Propriétés de *P. distasonis* liées à la sélection de nouveaux produits biothérapeutiques

Parabacteroides distasonis properties linked to the selection of new biotherapeutics

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Nadine Pavlov, Corentine Alauzet, Catherine Cailliez-Grimal

Nutrients, 2022, 14, 4176

III. Propriétés de *P. distasonis* liées à la sélection de nouveaux produits biothérapeutiques

III.1. Introduction

Un déséquilibre du microbiote est lié à l'apparition ou l'aggravation de maladies inflammatoires de l'intestin, à l'obésité ou encore à certains cancers. Des études se sont ainsi concentrées sur la découverte et la caractérisation de NPB afin de combattre ces pathologies.

P. distasonis et ses propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et son implication dans la diminution de la prise de poids, de l'hyperglycémie et de la stéatose hépatique chez le modèle murin semble être un candidat prometteur (Cuffaro et al., 2021, 2020; Hiippala et al., 2020; Kverka et al., 2011; K. Wang et al., 2019). Ces travaux portent cependant souvent sur l'étude d'une à quelques souches de *P. distasonis* dont les propriétés ont été précédemment décrites comme étant souche-dépendantes (Chamarande et al., 2021, 2022a; Cuffaro et al., 2020; Hiippala et al., 2020).

La sélection de NPB tels que les probiotiques repose sur la validation de critères généraux et spécifiques. Les critères généraux portent sur la caractérisation phénotypique et génotypique, la non-pathogénicité, la résistance aux conditions gastriques ainsi que l'implantation efficace de la souche dans l'intestin, tandis que les caractères spécifiques correspondent aux effets bénéfiques pour l'hôte (Hill et al., 2014).

Concernant l'utilisation de *P. distasonis* comme potentiel NPB, la capacité de coloniser l'intestin via l'étude des propriétés d'adhésion et de formation de biofilm sur support abiotique a déjà été validée pour 14 souches de *P. distasonis* génétiquement distinctes (Chamarande et al., 2021).

L'étude a ensuite été poursuivie sur ces mêmes souches par l'analyse d'autres propriétés liées à la sélection de NPB incluant les capacités d'adhérence sur support biotique, de résistance aux conditions gastriques, de renforcement de la barrière épithéliale et d'immunomodulation. L'effet immunomodulateur de *P. distasonis* a été examiné sur les modèles cellulaires eucaryotes HT-29 (barrière épithéliale) et PBMC (système immunitaire).

Le choix des cytokines à étudier pour évaluer l'effet l'immunomodulateur de *P. distasonis* sur les cellules PBMC a été défini par des expériences préliminaires réalisées sur la souche ATCC 8503^T (Figure 21A) et la souche clinique (CS) 1 (Figure 21B). Ces souches sont en effet relativement différentes génétiquement et en termes de capacité d'adhésion/formation de biofilm. Un criblage des cytokines a été réalisé afin de déterminer celles dont la production était modifiée lors d'une stimulation par le LPS d'*E. coli* et/ou par *P. distasonis*.

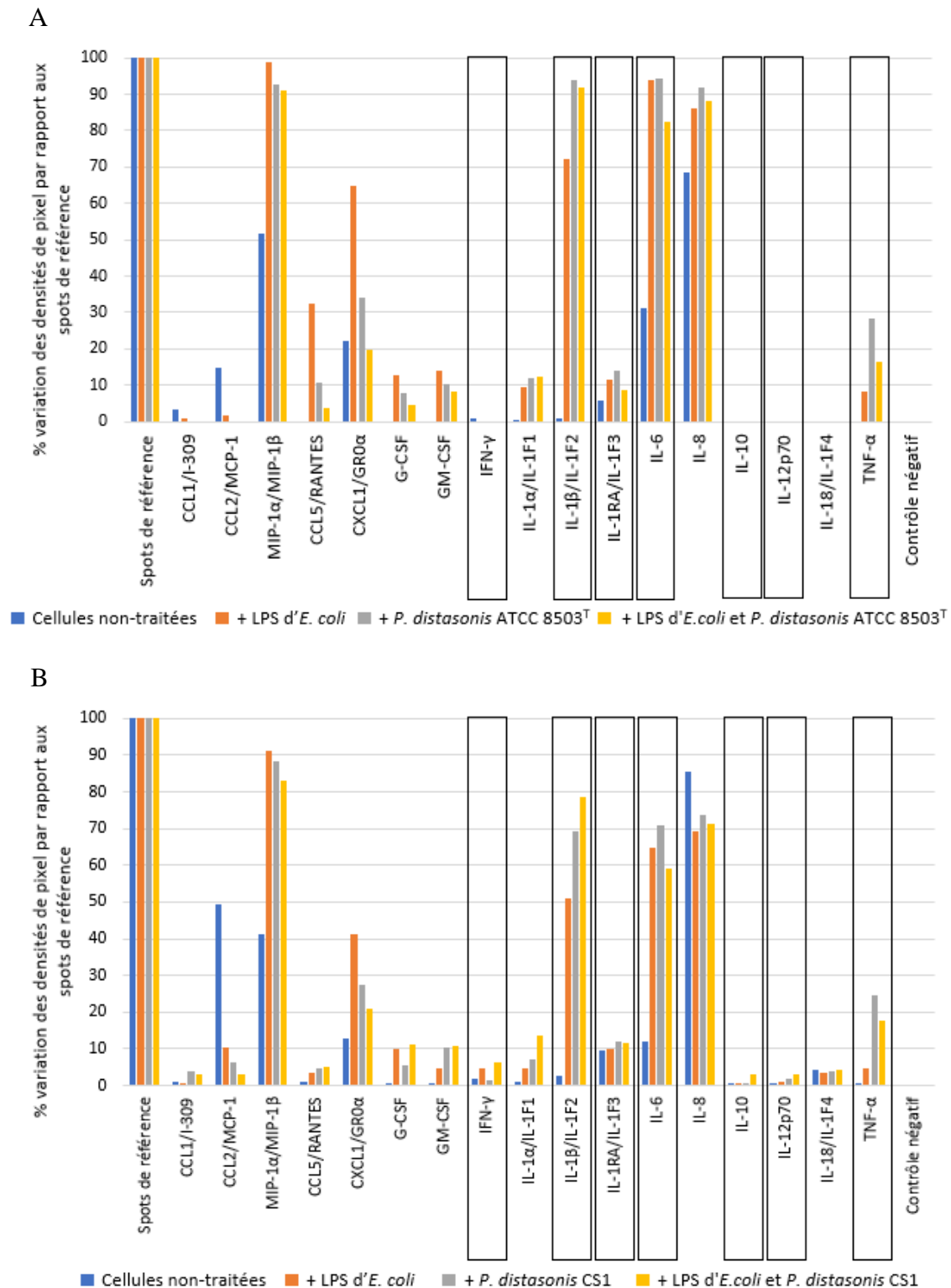




Figure 21. Propriétés immunomodulatrices de (A) *P. distasonis* ATCC 8503^T et (B) *P. distasonis* CS1 sur PBMC non stimulées et stimulées par le LPS d'*E. coli* (18h ; 100 ng/mL). Les quantités de cytokines ont été mesurées par Cytokine Array. Bleu : PBMC non traitées ; orange : PBMC stimulées par le LPS d'*E. coli* ; gris : PBMC stimulées par *P. distasonis* et jaune : PBMC stimulées par le LPS d'*E. coli* et *P. distasonis*. Seules les cytokines ayant été détectées pour au moins une des conditions ont été représentées. Les cytokines choisies pour l'étude sont encadrées en noir.

Concernant les cytokines pro-inflammatoires, l'IFN- γ , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12p70 et le TNF- α ont été sélectionnées pour leurs réponses au LPS et à *P. distasonis* ainsi que pour leurs rôles bien décrits dans la réponse immunitaire. Concernant les cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10 a été sélectionnée pour son rôle central dans la réduction de l'inflammation. L'IL-1RA a également été choisi pour sa production qui semble légèrement accentuée en présence de *P. distasonis*.

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'une publication publiée dans *Nutrients* (2022, 14, 4176) : « ***Parabacteroides distasonis* Properties Linked to the Selection of New Biotherapeutics** ».

Article

Parabacteroides distasonis Properties Linked to the Selection of New Biotherapeutics

Jordan Chamarande ¹ , Lisiane Cunat ¹, Nadine Pavlov ², Corentine Alauzet ^{1,3} 
and Catherine Cailliez-Grimal ^{1,2,*}

¹ SIMPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

² Institut Universitaire de Technologie Nancy-Brabois, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

³ CHRU de Nancy, Service de Microbiologie, F-54000 Nancy, France

* Correspondence: catherine.cailliez@univ-lorraine.fr

Abstract: Dysbiotic microbiota is often associated with health issues including inflammatory bowel disease or ulcerative colitis. In order to counterbalance host disorder caused by an alteration in the gut composition, numerous studies have focused on identifying new biotherapeutic products (NBPs). Among the promising NBPs is *Parabacteroides distasonis*, a gut microbiota member part of the core microbiome that recently has received much attention due to the numerous beneficial properties it brings to its host. In this study, the properties linked to the selection of NBPs were screened in 14 unrelated *P. distasonis* strains, including resistance to gastric conditions, adherence (Caco-2 model), transepithelial resistance (Caco-2 model), and immunomodulation, on nontreated and LPS-stimulated cells (HT-29 and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)). This approach allowed for the identification of five strains that combined almost all the in vitro biotherapeutic properties tested. However, all the *P. distasonis* strains induced the overproduction of proinflammatory cytokines on PBMCs, which was counteracted by the overproduction of the anti-inflammatory cytokines. Among these five strains, two particularly retained our attention as a potential NBP, by showing strong health-promoting function, the lowest overproduction of proinflammatory cytokines on PBMCs, and no detrimental effect on the host.

Keywords: gut microbiota; *Parabacteroides distasonis*; dysbiosis; immunomodulation; new biotherapeutic product (NBP)



Citation: Chamarande, J.; Cunat, L.; Pavlov, N.; Alauzet, C.; Cailliez-Grimal, C. *Parabacteroides distasonis* Properties Linked to the Selection of New Biotherapeutics. *Nutrients* **2022**, *14*, 4176. <https://doi.org/10.3390/nu14194176>

Academic Editor: Jennifer M. Monk

Received: 26 August 2022

Accepted: 29 September 2022

Published: 7 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The human digestive tract gathers approximately 100 trillion bacteria that are part of the gut microbiota (GM; [1]). The genetic information encompassed in this ecosystem is 150 times more important than that of the human genome with around 10 million nonredundant genes described [2]. The important roles played by both humans and bacteria in this symbiotic relation have led to the rising popularity of concepts such as superorganism or holobiont, i.e., the sum of a metazoan host organism and its associated microbes functioning as an inextricably intertwined single unit [3,4].

The progression of sequencing methods allowed for the characterization and understanding of the contribution of the GM to the host's well-being. Many lines of evidence show that the cooperation between the GM and its host is essential to regulate the development and function of the immune, metabolic, and nervous systems. In addition, the intestinal microbiota also creates a protective barrier against external pathogens and participates in maintaining the structure and integrity of the gastrointestinal tract [3,5,6]. On the other hand, the immune system has to control and preserve its relationships with the GM. In the long run, the GM can modulate host behavior and the nervous system's functions through dynamic and bidirectional communication along the gut–brain axis [7].

Many factors can influence gut composition, including diet, environmental exposure, antimicrobial therapies, or also physical/psychological stress [8]. Alterations in the gut

microbiota composition, the so-called dysbiosis, often lead to chronic disorders, including Crohn's disease and ulcerative colitis, which are the most prevalent forms of inflammatory bowel diseases (IBDs; [9]). Other pathologies such as autism spectrum disorders, type I diabetes, or even a change in social behavior are correlated with an alteration in the GM [3,8].

To overcome the problems related to microbiota imbalance, many studies focused on the discovery and characterization of new biotherapeutic products (NBPs; [10]). In addition to the traditional probiotic organism, defined as a "live organism that when administrated in adequate amount confer a health benefit on the host" [11,12], and prebiotic organism, defined as "a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit" [13], new therapeutic approaches such as fecal microbial transplantation (FMT) have emerged as putative microbiota-targeting therapies [14,15]. Another approach consists of the identification and selection of novel and disease-specific health-promoting bacteria [16–19].

Parabacteroides distasonis, a Gram-negative strictly anaerobic bacterium belonging to the *Tannerellaceae* family in the *Bacteroidetes* phylum, has recently received considerable attention for showing anti-inflammatory properties and activities in decreasing weight gain, hyperglycemia, and hepatic steatosis in ob/ob and high-fat-diet-fed mice [17–21]. This species has also been shown to display anticancer properties and attenuates tumorigenesis mediated by a reduction in TLR4, MYD88, and Akt signaling and the stimulation of apoptosis [22,23]. In addition, *P. distasonis* harbors a small but specific repertoire of degrading enzymes, making it a specialist fibrolytic bacterium [24,25].

In this study, we investigated the properties linked to the selection of NBPs of 14 unrelated strains of *P. distasonis*. For this purpose, we characterized the adhesion, resistance to gastric conditions, epithelial barrier strengthening, and immunomodulation capacities of *P. distasonis* strains. Immunomodulation was investigated in both the epithelial barrier and immune system cell models.

2. Materials and Method

2.1. Bacterial Strains and Culture Conditions

A total of 14 *P. distasonis* strains, including 13 nonredundant clinical and clonally unrelated (as described in [26]) isolates collected by the clinical microbiology laboratory of the University Hospital of Nancy, France, and the type strain *P. distasonis* DSM 20701^T were tested.

Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103 (LGG) was used as a positive control for the adhesion capacity assays [27].

Escherichia coli ATCC 25922 was used as a positive control for the transepithelial electrical resistance [28].

The strains were stored at -80°C in an appropriate broth supplemented with 15% glycerol. Prior to assay, *P. distasonis* strains were streaked onto Brucella agar plates supplemented with 5% of defibrinated sheep blood (BBA; Oxoid, Thermo Fisher Diagnostics, Dardilly, France), 1% of hemin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and 1% of vitamin K1 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). After incubation at 37°C for 48 h in anaerobic conditions, the strains were subcultured in a Schaedler broth for 24 h in anaerobic conditions. LGG and *E. coli* were streaked onto De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) or Luria–Bertani (LB) agar, respectively, and incubated at 37°C for 24 h in aerobic conditions. Further subcultures were performed in a Schaedler broth for 24 h in aerobic conditions.

2.2. Cell Lines and Culture Conditions

The human intestinal cell lines Caco-2 and HT-29 were obtained from Pr. Isabelle Chevalot (UMR 7274, Reactions and Chemical Engineering Laboratory, CNRS, Lorraine University, Nancy, France) and Dr. Henri-Pierre Lassalle (Lorraine Institute of Oncology, Nancy, France), respectively. Caco-2 cells were grown in a Dulbecco's modified Eagle medium—

high glucose (HG-DMEM with 4500 mg/L glucose and L-Glutamine; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% heat-inactivated (56 °C, 30 min) fetal bovine serum (FBS; Gibco, Evry, France), 100 U/mL penicillin–0.1 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, France), and 10 µM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). HT-29 cells were grown in a McCoy 5A medium (Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 µM HEPES buffer, and 100 U/mL penicillin–0.1 mg/mL streptomycin.

The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were extracted from the blood samples of five healthy donors following the density gradient separation method using a lymphocyte separation medium (Eurobio scientific, Les Ulis, France) and a Leucosep tube (Greiner bio-one, Les Ulis, France). The obtained PBMCs were then washed and resuspended in an RPMI-1640 medium (Gibco, Evry, France) supplemented with L-glutamine (2 mM; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), pyruvate (1 mM; Gibco, Evry, France), and 10% heat-inactivated FBS.

2.3. Tolerance to Gastric Conditions

The survival kinetics of the strains in simulated gastric juice (SGJ) were measured during 2 h of incubation, as previously described by [29]. The SGF was prepared with KCL 6.9 mM, HCl 15.6 mM, KH₂PO₄ 0.9 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaCl 47.2 mM, MgCl₂ 0.1 mM, (NH₄)₂CO₃ 0.5 mM (all from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and sterilized through filtration. The pH was then adjusted to 3 using HCl 1 M, and CaCl₂ and porcine pepsin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were added to achieve a final concentration of 0.075 mM and 2.000 U/mL, respectively, in the final digestion mixture. The bacterial suspension was centrifugated (2000 rpm, 10 min), washed twice with PBS, and standardized at 10⁹ CFU/mL. Then, 950 µL of SGF (with pepsin and at pH 3) was inoculated with 50 µL of the bacterial suspension to reach a final concentration of 5 × 10⁷ CFU/mL and incubated at 37 °C for 2 h with sampling at 0 and 120 min. Bacterial viability was measured by the numeration of a serial dilution plated on BBA plates after 48 h incubation in anaerobiosis. The death rate was calculated by dividing the number of CFU/mL at 120 min by the CFU/mL measured at time zero, as the 14 studied strains have been previously shown to survive under aerobic conditions without any indication of mortality for 6 h [26].

2.4. Bacterial Adhesion to Caco-2 Cell Line

For epithelial adherence assay, 12-well tissue culture microplates were seeded with 6 × 10⁴ Caco-2 cells per well for 21 days in order to have a homogeneous and polarized cell monolayer. After 21 days, the cells were washed twice with PBS and inoculated with *P. distasonis* suspension (HG-DMEM without antibiotic) at 10⁹ CFU/mL. The plates were then incubated for 3 h at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere and washed 4 times with PBS to remove nonadherent bacteria. Caco-2 cells and the adhered bacteria were resuspended in 1 mL of 0.1% Triton 100X (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) with a cell scraper. The DNA was then extracted, and a specific region of the 16S rRNA of *P. distasonis* was amplified and quantified using qPCR as previously described [26].

2.5. Transepithelial Electrical Resistance

The intestinal epithelial barrier permeability was evaluated by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) with a Millicell ERS-2 system (Millipore, Burlington, USA). Briefly, Caco-2 cells were seeded in a 24-well Transwell® insert filter (polycarbonate membrane with 0.4 µm pore size; Sarstedt, Germany) at a density of 10⁵ cells/cm² in HG-DMEM supplemented as previously described in cell culture conditions. The medium was renewed every two days during the first week and every day during the second week, followed by a measurement of the TEER until day 14 when constant and optimal transepithelial resistance was reached (TEER > 300 Ω/cm²). *P. distasonis* strains were prepared with HG-DMEM and added to the apical side of the membrane at a bacteria-to-cell ratio of

10:1. The TEER was measured just after adding the bacteria (T0) and after 24 h of incubation at 37 °C, 5% CO₂ (T24). The TEER variation was measured by comparing the electrical resistance obtained after 24 h of incubation with the initial resistance.

2.6. Immunomodulation Assay on HT-29 and PBMC Cells

Briefly, 24-well microplates were inoculated with 5×10^4 HT-29 cells/mL. The plates were then incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere until reaching confluence. HT-29 cells were then washed two times with PBS and stimulated with *E. coli* LPS (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and *P. distasonis* at a final concentration of 10^7 CFU/mL. To define *E. coli* LPS concentration to use, assays ranging from 1 ng/mL to 100 ng/mL were performed. The final concentration selected was 1 ng/mL, which induced the same response as other concentrations (data not shown). After a 4 h incubation with LPS and bacteria, the supernatants were collected and stored at −20 °C until cytokine (IL-8) measurement, performed with an IL-8 human ELISA kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).

For PBMC stimulation, 24-well microplates were inoculated with 1×10^6 of the extracted cells/mL. PBMCs were stimulated with 100 ng/mL of *E. coli* LPS (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and *P. distasonis* at a final concentration of 10^7 CFU/mL. After 18 h incubation with LPS and bacteria, the supernatants were collected and stored at −20 °C until cytokines' (IFN- γ , IL-1 β , IL-1, IL-12p70, TNF- α , IL-1RA, and IL-10) measurement with a Milliplex Luminex[®] 200™ System (Merck Millipore, Molsheim, France) using the Luminex™ Xmap (Multi-Analyte Profiling) technology.

2.7. Statistical Analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to group the samples according to their adhesion capacities and to determine the strains that significantly impact Caco-2 TEER or HT-29/PBMC cytokine production. The *p* values < 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were carried out with the XLSTATs program version 2022.2.1 (Addinsoft, Paris, France).

3. Results

3.1. Survival Capacity of *P. Distasonis* to Gastric Conditions

None of the 14 *P. distasonis* strains tested totally resisted after 2 h in gastric conditions (Figure 1). Among them, a two-log decrease in viability was observed for CS1 and between two- and four-log for CS2, 4, 7, 8, 12, 13, 15, 17, and 20. Other strains, namely DSM and CS5, 6, and 18, seemed more sensitive to gastric conditions, as no colony was counted after 2 h in SGJ.

3.2. Adhesion Capacities of *P. Distasonis* Strains to Caco-2 Cells

The results obtained for the adhesion of *P. distasonis* strains on Caco-2 cells revealed three groups that were significantly different (Figure 2). The first one was denoted as (a) with the positive control LGG, the second one was denoted as (b) with CS5 and CS8, and the third one (c) included 12 of the 14 *P. distasonis* strains. All the tested strains showed the capacity to adhere to biotic support after 3 h of incubation. The adhesion capacity of the 10^9 inoculated bacteria/mL ranged from 2.84×10^2 adherent bacteria/cm² (CS7) to 1.51×10^6 adherent bacteria/cm² (with CS8 showing an adhesion capacity relatively close to the one of the positive control LGG).

3.3. Effect of *P. Distasonis* on Caco-2 Monolayer Integrity

Among the 14 *P. distasonis* tested, only CS13 significantly modified the TEER values of the Caco-2 monolayer after 24 h of incubation by inducing a diminution of the TEER of approximately 8% (Figure 3). CS18 was the only strain that tended to increase the monolayer integrity with a TEER augmentation of 2%. The 12 other strains neither significantly reinforced nor damaged the Caco-2 monolayer junctions.

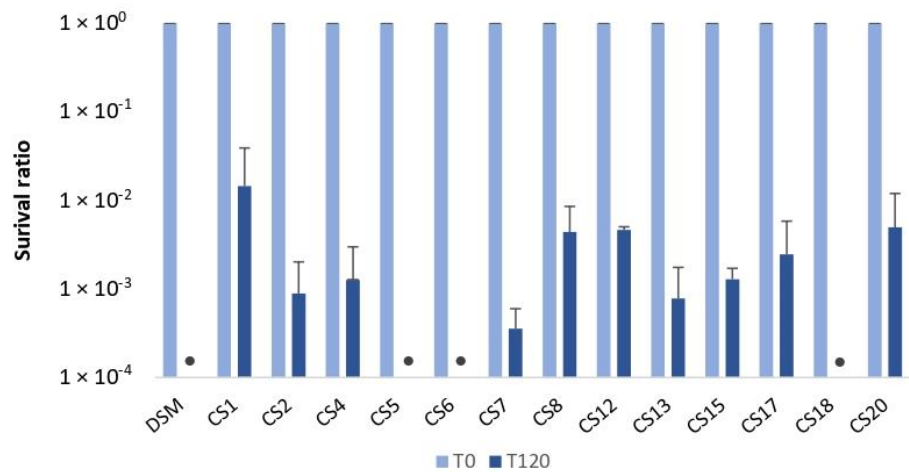


Figure 1. Bacterial survival of 14 *P. distasonis* strains to gastric stress after 120 min of incubation. The survival is shown as the ratio of the CFU/mL at T120 to the CFU/mL at T0. DSM: *P. distasonis* DSM 20701^T; CS: clinical strains; • indicates the samples in which the CFU/mL reached the detection threshold (<10). All the data represent mean \pm standard error from at least two independent experiments performed with each strain in triplicate ($n = 2 \times 3$).

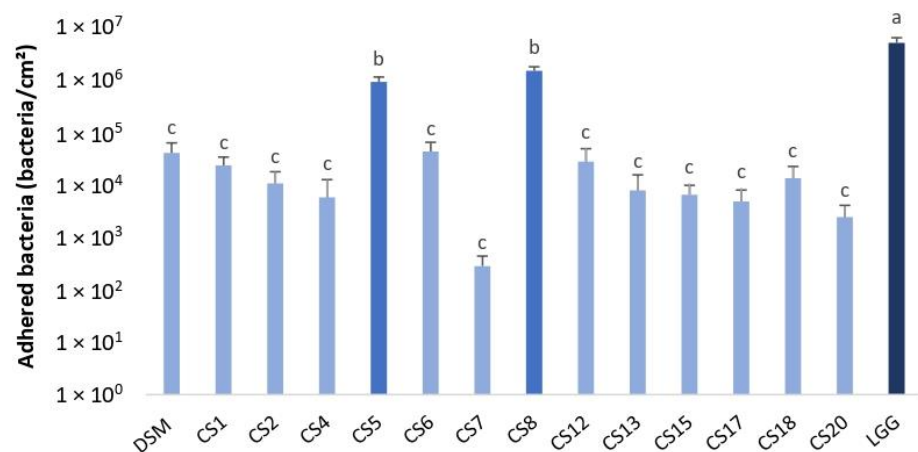


Figure 2. Adhesion capacity of 14 strains of *P. distasonis* and LGG (positive control) on Caco-2 cells after 3 h of incubation at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. DSM: *P. distasonis* DSM 20701^T; CS: clinical strains. Colors coupled with a, b and c indicate the significantly different groups after ANOVA, $p < 0.05$. All the data represent mean \pm standard error or observations from triplicate ($n = 3$).

3.4. Effect of *P. Distasonis* on IL-8 Production by Untreated and LPS-Stimulated HT-29 Cells

The LPS-stimulated HT-29 cells were distinguished from the nonstimulated HT-29 cells by their overexpression of IL-8 (Figure 4). Among the 14 *P. distasonis* tested, none of them induced a response similar to that of LPS from *E. coli*. The co-stimulation of HT-29 cells with *E. coli* LPS and *P. distasonis* strains induced several responses that seemed to be strain-dependent. DSM, CS1, 7, 8, 12, and 15 significantly reduced the inflammation generated by LPS. By contrast, CS2, 4, 5, 6, 13, 17, and 20 did not modify the IL-8 produced in response to *E. coli* LPS. CS18 was the only strain that significantly increased the inflammatory response of LPS.

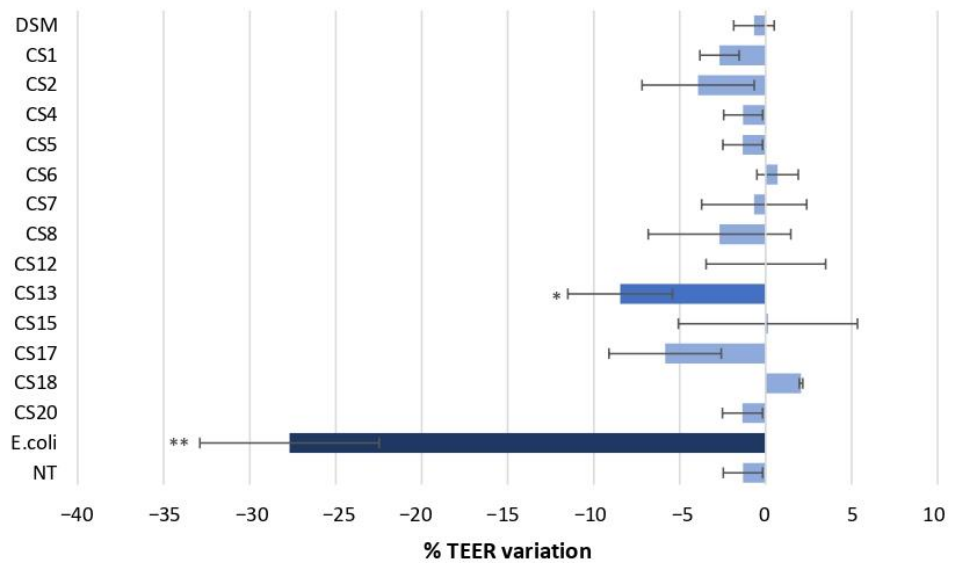


Figure 3. Effect of *P. distasonis* strains on Caco-2 monolayer TEER. *E. coli* ATCC 25922 was used as positive control. The results are shown as % of TEER variation after 24 h of incubation. DSM: *P. distasonis* DSM 20701^T; CS: clinical strains. Statistical analysis was performed using an ANOVA test in comparison with % variation in nontreated (NT) Caco-2 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). All the data represent mean \pm standard error from triplicate (n = 3).

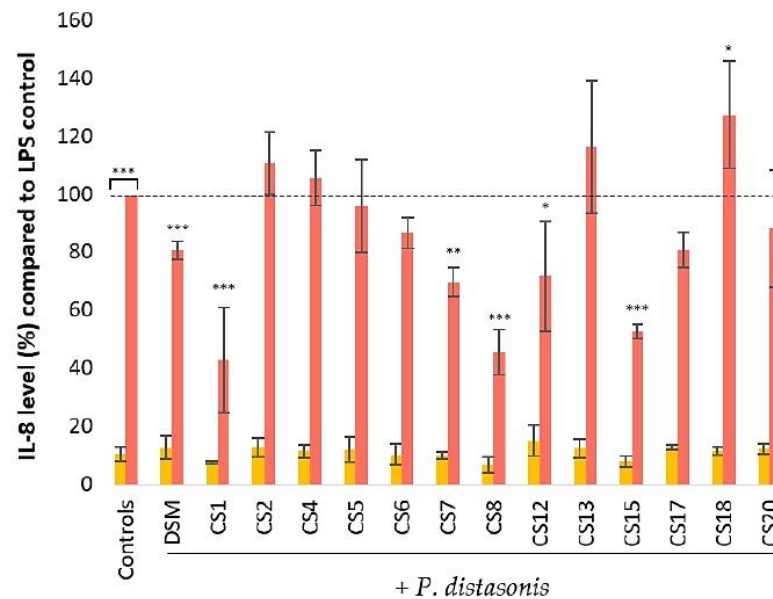


Figure 4. Effect of 14 strains of *P. distasonis* on IL-8 production by nonstimulated and LPS-stimulated (4 h; 1 ng/mL) HT-29 cells. The IL-8 levels were measured using ELISA. DSM: *P. distasonis* DSM 20701^T; CS: clinical strains. Controls: untreated and *E. coli* LPS-stimulated HT-29; yellow: no LPS stimulation; red: HT-29 stimulated with *E. coli* LPS. Dotted line represents 100% equal to HT-29 responses to *E. coli* LPS stimulation. Statistical analyses were performed using an ANOVA test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The nontreated HT-29 control and all co-stimulation with *E. coli* LPS and *P. distasonis* assays were compared with the LPS-stimulated HT-29 control, which represents 100% of IL-8 released. The single stimulations of HT-29 with *P. distasonis* were compared with the nontreated HT-29 control. All the data represent mean \pm standard error from triplicate (n = 3).

3.5. Immunomodulation of *P. Distasonis* on Untreated and LPS-Stimulated PBMC

The immunomodulation of *P. distasonis* on PBMCs was investigated via the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, namely IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and TNF- α (pro-), as well as IL-1RA and IL-10 (anti-) (Figure 5).

Concerning the proinflammatory cytokines, *E. coli* LPS stimulation caused the overproduction of each of them except IL-12p70.

IFN- γ production by PBMCs (Figure 5A) also increased in the presence of all the tested *P. distasonis* strains with notably 250% overproduction when stimulated with CS1 compared with *E. coli* LPS. However, LPS caused only a slight increase (about 50%) in the IFN- γ production, compared with the untreated cells. No significant difference was observed for stimulation with both LPS and *P. distasonis*, compared with individual stimulations.

For IL-1 β production (Figure 5B), all the *P. distasonis* strains provoked the overproduction of the cytokine similar to that observed for LPS with CS13, which induced a level of overproduction significantly more important than *E. coli* LPS. The co-stimulation tended to display IL-1 β overproduction compared with untreated PBMCs, as shown for individual stimulations with the LPS control and *P. distasonis*.

All but two *P. distasonis* strains increased IL-6 production (Figure 5C) similarly to the LPS control stimulation. Strains CS6 and CS15 also increased the production of IL-6 by PBMCs but significantly less than *E. coli* LPS. The results obtained for the co-stimulation correspond to the *P. distasonis* single stimulation with a strain-dependent increase in IL-6 production. IL-12p70 (Figure 5D) production was only modified by CS5, which significantly increased the production by approximately 600% in both nonstimulated and LPS-stimulated PBMCs.

Finally, TNF- α production (Figure 5E) increased by *P. distasonis*, compared with the LPS control, which only caused a slight increase in TNF- α production, compared with nontreated PBMCs. Indeed, although strain-dependent, all tested strains provoked a PBMC response at least 300% superior to that of *E. coli* LPS including five responses significantly higher. The co-stimulation was strain-dependent, but three strains (DSM, CS15 and CS17) seemed to potentialize TNF- α production with an important increase in production compared with the single stimulation.

As regards the anti-inflammatory cytokines, PBMC IL-1RA production (Figure 5F) was not influenced by *E. coli* LPS, while IL-10 production (Figure 5G) increased.

Furthermore, 5 of the 14 *P. distasonis* strains (DSM, CS1, CS6, CS15, and CS17) engendered the overproduction of IL-1RA, up to 200%, compared with the LPS control, but not significantly. The co-stimulation did not modify IL-1RA production in comparison with individual stimulations.

As observed for the LPS stimulation, all *P. distasonis* strains tended to increase the IL-10 production of PBMCs. Among them, only CS15 engendered IL-10 production significantly more important than the LPS control. The co-stimulation seemed to amplify the response but not significantly, compared with the LPS control. However, one response was surprisingly different with an augmentation of the IL-10 production by 600%, compared with *E. coli* LPS (CS17).

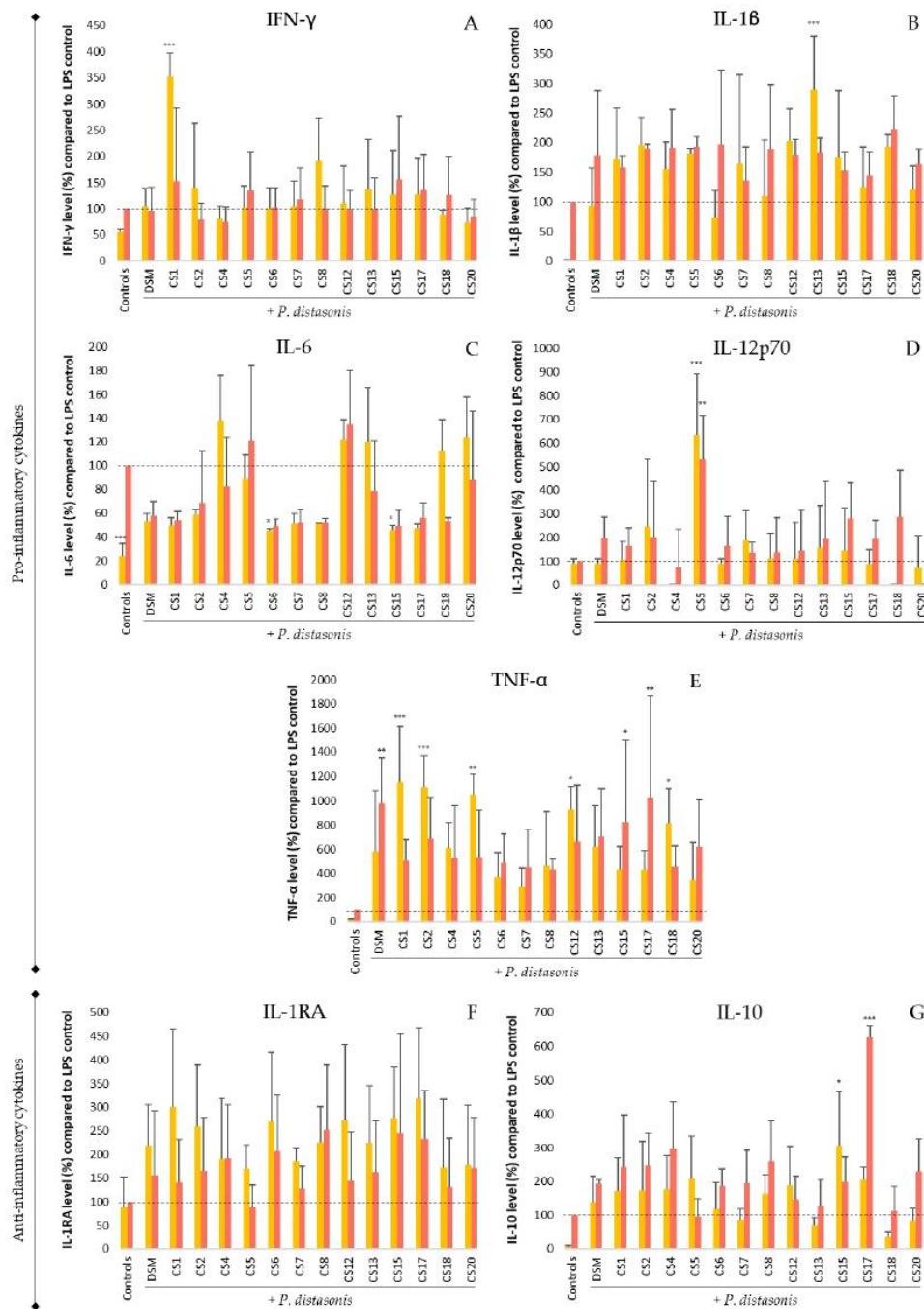


Figure 5. Immunomodulation properties of *P. distasonis* on nonstimulated and LPS-stimulated (18 h; 100 ng/mL) PBMCs. The cytokine levels were measured using Luminex technology. (A): IFN- γ ; (B): IL-1 β ; (C): IL-6; (D): IL-12p70; (E): TNF- α ; (F): IL-1RA; (G): IL-10. DSM: *P. distasonis* DSM 20701^T; CS: clinical strains. Controls: nontreated and *E. coli* LPS-stimulated PBMC; yellow: no LPS stimulation; red: *E. coli* LPS stimulation. Dotted line represents 100% equal to PBMC responses to *E. coli* LPS stimulation. Statistical analyses were performed using ANOVA in comparison with the LPS-stimulated PBMC assay that represents 100% of cytokines released (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). All the data represent mean \pm standard error from at least three samples ($n \geq 3$).

4. Discussion

The predominant role of GM in the health and disease of its host is now well-defined. A disequilibrium in its composition can lead to the development of many chronic diseases. Thus, the gut microbiota has become a prime target in treatments in which the first objective is to return to a more balanced microbial community. For this purpose, many studies focus on performing deeper research into both classical probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and identifying new candidates for NBPs [17,18,30–32]. Numerous studies identified *P. distasonis* as a promising candidate, showing anti-inflammatory and anticancer properties and displaying beneficial activities for its host [17–23]. In all these studies, only a few strains of *P. distasonis* have been investigated including strains isolated from mice GM, and anti-inflammatory properties are often associated with the investigation of the production of only a few cytokines. However, some of these results and previous work performed in our laboratory have shown the significant inter-strain variability of *P. distasonis* in terms of response.

In the present study, we investigated the properties of 14 clinical strains of *P. distasonis* linked to the selection of new biotherapeutics. The selected properties were the resistance of *P. distasonis* to gastric conditions, its in vitro adherence capacity to the intestinal epithelial cell model, its effect on the epithelial monolayer integrity, and its immunomodulation on both the epithelial and immune system cell models with and without stimulation with *E. coli* LPS. The investigation of such characteristics allows for the discovery of a range of abilities from the intake of bacteria to its potential benefits for the host.

In vitro models that simulate digestion processes are widely used to study the gastrointestinal behavior of pharmaceuticals to ensure the good (bio)delivery of the studied element despite gastric conditions, i.e., low pH and peptidases. Among the 14 *P. distasonis* strain tested, none of them completely resisted the gastric conditions, and 10 out of the 14 strains showed gastric resistance properties. These results coincide with those of previous studies that highlighted the resistance of two *P. distasonis* strains among the five tested, also displaying an inter-strain variability [18,19]. However, the acidic conditions of the stomach can be neutralized by the addition of sodium bicarbonate to the bacterial pellets, allowing for the potential use of nonresistant *P. distasonis* strains as NBPs.

After passing through the rough conditions of the upper gastrointestinal tract and reaching the small and large intestine, bacteria have to colonize it. The adherence capacities of *P. distasonis* on Caco-2 cells were investigated. All the tested strains had the capacity to adhere to the epithelial cells. However, an inter-strain variability was observed with notably two strains showing an adhesion capacity as important as the positive control LGG. These differences could be explained by the presence of diverse external proteinaceous structures at the surface of each strain, the expression of which was potentially controlled by the inversions of the promoter region, leading to phase variable synthesis. Among these structures are pili-like and fimbriae-like structures from the Mfa and Fim systems, respectively, as well as capsular polysaccharides [33].

The epithelial layer of the gastrointestinal tract forms a physical and biochemical barrier against all external bacteria, including pathogens. The integrity of this barrier is critical for the well-being of the host, and its alteration is often linked with IBDs [34]. The effect of *P. distasonis* on the Caco-2 cell integrity was investigated. As expected from a commensal bacterium, 13 of the 14 *P. distasonis* strains did not impact the monolayer integrity compared with the positive control *E. coli* ATCC 25922, as previously described for three strains [17]. The last strain, CS13, significantly altered the Caco-2 monolayer integrity (8% compared with nontreated Caco-2), although less than the positive control (by 28%). Contrarywise, CS18 slightly reinforced the epithelial monolayer by approximately 2%. This result could be explained by the stimulation of the expression of protein-encoding genes Occludin and ZO-1, which are part of a tight junction multiprotein complex, as previously described for two *P. distasonis* strains [19]. This complex is composed of at least 40 different transmembrane and cytoplasmic proteins with expressions that can be modulated by active factors released by the gut microbiota members [28,34].

P. distasonis has also been shown to display anti-inflammatory capacities in both in vitro and in vivo models. In our in vitro experiments, none of the tested strains induced the overproduction of IL-8 in HT-29 cells, and 6 of the 14 strains statistically reduced the LPS-induced IL-8 inflammation, as previously observed [17,22]. These results put forward the potential anti-inflammatory activity of *P. distasonis* on the intestinal epithelium barrier model.

In PBMCs, the production levels of the proinflammatory cytokines IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased by almost all the *P. distasonis* strains as well as *E. coli* LPS. Moreover, the *P. distasonis* treatment during *E. coli* LPS-induced inflammation did not reduce the proinflammatory cytokine production of PBMCs. These results, contrary to HT-29 results, suggest a proinflammatory response of the immune system cells due to *P. distasonis* stimulation, although with strain variability. These results do not agree with the findings of previous works performed in mice models, where *P. distasonis* was shown to counteract acute TNBS-induced colitis by modulating the expressions of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , and a decrease in the expression of IL-6 in DSS-induced chronic colitis was also highlighted [19,21]. However, these results, as well as the results shown in this work, exposed an important inter-strain variability that could explain these differences in terms of immunomodulation.

P. distasonis also provoked the overproduction of anti-inflammatory cytokines IL-1RA and IL-10. The lack of modification in IL-12p70 production by almost all the *P. distasonis* strains and the overproduction of IL-10 induced by *P. distasonis* coincide with previous works [18,19]. IL-1RA is a specific IL-1 receptor antagonist that competitively binds to the same receptor as IL-1 β without inducing a cellular signal, thereby blocking IL-1 β -mediated cellular changes [35]. Consequently, the IL-1 β production induced by *P. distasonis* could be possibly countered by the production of IL-1RA. In the same way, IL-10 is a cytokine that represses the expression of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF- α by activating macrophages and downregulating the proinflammatory cytokine receptors [36].

The integration of the data generated here and in a previous study [26] highlighted five strains (CS1, CS7, CS8, CS12 and CS15) that combined 10 of the 12 in vitro biotherapeutic properties tested (Table 1). CS1, although possessing the strongest adhesion capacity and resistance to gastric conditions, caused significant overproduction of proinflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α by PBMCs. In the same way, the CS12 significantly increased TNF- α production. CS15 was the only strain, along with CS6, to increase IL-6 production significantly less than *E. coli* LPS, but this strain and CS17 tended to strongly increase TNF- α production, especially with *E. coli* LPS. CS7 and CS8 for their part only caused slight overproduction of IL-6 and were among the strains that never induced the overproduction of proinflammatory cytokines compared with *E. coli* LPS. Moreover, these strains, and mainly CS8, showed strong adhesion and biofilm formation capacities and were among the strains that significantly reduced IL-8 production by LPS-stimulated HT-29 cells.

Table 1. Summary of the beneficial and nondetrimental properties of the 14 strains of *P. distasonis* investigated in this study. Color code: beneficial/ nondetrimental (green) or detrimental (red) properties.

		<i>P. distasonis</i>														
		DSM 20701 ^T	C1	C2	C4	C5	C6	C7	C8	C12	C13	C15	C17	C18	C20	
Abiotic	Homo-aggregation															
	Adhesion															
Caco-2	Biofilm formation															
	SCJ tolerance															
HT-29	Adhesion															
	maintain TEER															
FBMC	IL-8 production (NT)															
	Decrease IL-8 production (LPS)															
	Pro-inf. production (NT)															
	Anti-inf. production (NT)															
FBMC	Decrease pro-inf. production (LPS)															
	Increase anti-inf. production (LPS)															
NT: non-treated; LPS: LPS-stimulated cells																

5. Conclusions

Numerous studies provide evidence of the beneficial roles of *P. distasonis* within GM. However, only few strains are studied, although important inter-strain variability has been observed. In this study, we investigated the properties linked to the selection of the NBPs of a wide diversity of *P. distasonis* strains. Although almost all the tested strains had the ability to adhere and not damage the Caco-2 monolayer, an important inter-strain variability was observed for SGJ tolerance and immunomodulation on nontreated and LPS-stimulated HT-29 cells and PBMCs. None of the tested strains induced the overproduction of proinflammatory cytokines on the epithelial cell model, and 6 of the 14 strains significantly reduced the inflammation induced by *E. coli* LPS. However, all the strains induced the overproduction of proinflammatory cytokines in the immune system cell model, which could be counteracted by the increased production of anti-inflammatory cytokines, although further study is required. Such data confirmed the promising use of *P. distasonis* as a biotherapeutic product. However, further investigations have to be performed in order to better understand its strain variability and the absence of pernicious side effects.

Author Contributions: Conceptualization, C.C.-G., C.A., J.C. and L.C.; methodology, J.C., C.C.-G., L.C. and N.P.; formal analysis, J.C.; investigation, J.C., C.C.-G. and L.C.; writing—original draft preparation, J.C.; writing—review and editing, J.C., C.C.-G., L.C., C.A. and N.P.; supervision, C.C.-G. and C.A.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported partly by the French PIA project “Lorraine Université d’Excellence”, reference ANR-15-IDEX-04-LUE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the technical assistance of I. Fries (Université de Lorraine, CITHEFOR, Nancy, France), S. Ghislin (Université de Lorraine, SIMPA, Nancy, France), V. Pottier, and L. Retzmanick. The authors are also grateful to I. Chevalot (LRGP, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France) and H-P. Lassalle (Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy, France) for providing Caco-2 and HT-29 cell lines. The authors thank J-P. Frippiat (Université de Lorraine, SIMPA, Nancy, France) and M. Lind (Université de Lorraine, Institut Universitaire de Technologie Nancy-Brabois, Nancy, France) for useful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Doré, J.; Multon, M.-C.; Béhier, J.-M.; Affagard, H.; Andreumont, A.; Barthélémy, P.; Batitsa, R.; Bonneville, M.; Bonny, C.; Boyaval, G.; et al. The Human Gut Microbiome as Source of Innovation for Health: Which Physiological and Therapeutic Outcomes Could We Expect? *Therapies* **2017**, *72*, 21–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, J.; Jia, H.; Cai, X.; Zhong, H.; Feng, Q.; Sunagawa, S.; Arumugam, M.; Kultima, J.R.; Prifti, E. An Integrated Catalog of Reference Genes in the Human Gut Microbiome. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 834–841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lynch, J.B.; Hsiao, E.Y. Microbiomes as Sources of Emergent Host Phenotypes. *Science* **2019**, *365*, 1405–1409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1823–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Talham, G.L.; Jiang, H.-Q.; Bos, N.A.; Cebra, J.J. Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 1992–2000. [[CrossRef](#)]
- Jandhyala, S.M. Role of the Normal Gut Microbiota. *WJG* **2015**, *21*, 8787. [[CrossRef](#)]
- Morais, L.H.; Schreiber, H.L.; Mazmanian, S.K. The Gut Microbiota–Brain Axis in Behaviour and Brain Disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 241–255. [[CrossRef](#)]
- Sekirov, I.; Russell, S.L.; Antunes, L.C.M.; Finlay, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 46. [[CrossRef](#)]
- Carding, S.; Verbeke, K.; Vipond, D.T.; Corfe, B.M.; Owen, L.J. Dysbiosis of the Gut Microbiota in Disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*. [[CrossRef](#)]
- Youssef, M.; Ahmed, H.Y.; Zongo, A.; Korin, A.; Zhan, F.; Hady, E.; Umair, M.; Shahid Riaz Rajoka, M.; Xiong, Y.; Li, B. Probiotic Supplements: Their Strategies in the Therapeutic and Prophylactic of Human Life-Threatening Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11290. [[CrossRef](#)]

11. McFarland, L.V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, S85–S90. [[CrossRef](#)]
12. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)]
13. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fang, H.; Fu, L.; Wang, J. Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 8941340. [[CrossRef](#)]
15. Papanicolaou, L.E.; Choo, J.M.; Wang, Y.; Leong, L.E.X.; Costello, S.P.; Gordon, D.L.; Wesselingh, S.L.; Rogers, G.B. Bacterial Viability in Faecal Transplants: Which Bacteria Survive? *EBioMedicine* **2019**, *41*, 509–516. [[CrossRef](#)]
16. Yang, J.-Y.; Lee, Y.-S.; Kim, Y.; Lee, S.-H.; Ryu, S.; Fukuda, S.; Hase, K.; Yang, C.-S.; Lim, H.S.; Kim, M.-S.; et al. Gut Commensal *Bacteroides Acidifaciens* Prevents Obesity and Improves Insulin Sensitivity in Mice. *Mucosal. Immunol.* **2017**, *10*, 104–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hiippala, K.; Kainulainen, V.; Suutarinen, M.; Heini, T.; Bowers, J.R.; Jasso-Selles, D.; Lemmer, D.; Valentine, M.; Barnes, R.; Engelthaler, D.M.; et al. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing *Bacteroides* and *Parabacteroides* spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients* **2020**, *12*, 935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cuffaro, B.; Assouhoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Peucelle, V.; Desramaut, J.; Boudebouze, S.; Croyal, M.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Rhimi, M.; Grangette, C.; et al. Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms* **2021**, *9*, 565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cuffaro, B.; Assouhoun, A.L.W.; Boutillier, D.; Súkeníková, L.; Desramaut, J.; Boudebouze, S.; Salomé-Desnoulez, S.; Hrdý, J.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Maguin, E.; et al. In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of *Parabacteroides distasonis* Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* **2020**, *9*, 2104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wang, K.; Liao, M.; Zhou, N.; Bao, L.; Ma, K.; Zheng, Z.; Wang, Y.; Liu, C.; Wang, W.; Wang, J.; et al. *Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 222–235.e5. [[CrossRef](#)]
21. Kverka, M.; Zakostelska, Z.; Klimesova, K.; Sokol, D.; Hudcovic, T.; Hrnčir, T.; Rossmann, P.; Mrazek, J.; Kopečný, J.; Verdu, E.F.; et al. Oral Administration of *Parabacteroides distasonis* Antigens Attenuates Experimental Murine Colitis through Modulation of Immunity and Microbiota Composition. *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, *163*, 250–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Koh, G.Y.; Kane, A.; Lee, K.; Xu, Q.; Wu, X.; Roper, J.; Mason, J.B.; Crott, J.W. *Parabacteroides distasonis* Attenuates Toll-like Receptor 4 Signaling and Akt Activation and Blocks Colon Tumor Formation in High-fat Diet-fed Azoxymethane-treated Mice. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 1797–1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Koh, G.Y.; Kane, A.V.; Wu, X.; Crott, J.W. *Parabacteroides distasonis* Attenuates Tumorigenesis, Modulates Inflammatory Markers and Promotes Intestinal Barrier Integrity in Azoxymethane-Treated A/J Mice. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 909–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, X.; Conway, P.L.; Brown, I.L.; Evans, A.J. In Vitro Utilization of Amylopectin and High-Amylose Maize (Amylo maize) Starch Granules by Human Colonic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4848–4854. [[CrossRef](#)]
25. Xu, J.; Mahowald, M.A.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; Hamady, M.; Martens, E.C.; Henrissat, B.; Coutinho, P.M.; Minx, P.; Latreille, P.; et al. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chamarande, J.; Cunat, L.; Caillet, C.; Mathieu, L.; Duval, J.F.L.; Lozniewski, A.; Fripiat, J.-P.; Alauzet, C.; Cailliez-Grimal, C. Surface Properties of *Parabacteroides distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1602. [[CrossRef](#)]
27. Polak-Berecka, M.; Waško, A.; Paduch, R.; Skrzypek, T.; Sroka-Bartnicka, A. The Effect of Cell Surface Components on Adhesion Ability of *Lactobacillus Rhamnosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2014**, *106*, 751–762. [[CrossRef](#)]
28. Playford, R.J.; Choudhry, N.; Kelly, P.; Marchbank, T. Effects of Bovine Colostrum with or without Egg on In Vitro Bacterial-Induced Intestinal Damage with Relevance for SIBO and Infectious Diarrhea. *Nutrients* **2021**, *13*, 1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Minekus, M.; Alvinger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A Standardised Static In Vitro Digestion Method Suitable for Food—An International Consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [[CrossRef](#)]
30. Saez-Lara, M.J.; Gomez-Llorente, C.; Plaza-Diaz, J.; Gil, A. The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 505878. [[CrossRef](#)]
31. Vitellio, P.; Celano, G.; Bonfrate, L.; Gobetti, M.; Portincasa, P.; De Angelis, M. Effects of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus* on Gut Microbiota in Patients with Lactose Intolerance and Persisting Functional Gastrointestinal Symptoms: A Randomised, Double-Blind, Cross-Over Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 886. [[CrossRef](#)]

32. Edebol Carlman, H.M.T.; Rode, J.; König, J.; Repsilber, D.; Hutchinson, A.N.; Thunberg, P.; Persson, J.; Kiselev, A.; Pruessner, J.C.; Brummer, R.J. Probiotic Mixture Containing *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* and *Lactiplantibacillus plantarum* Affects Brain Responses to an Arithmetic Stress Task in Healthy Subjects: A Randomised Clinical Trial and Proof-of-Concept Study. *Nutrients* **2022**, *14*, 1329. [[CrossRef](#)]
33. Chamarande, J.; Cunat, L.; Alauzet, C.; Cailliez-Grimal, C. In Silico Study of Cell Surface Structures of *Parabacteroides distasonis* Involved in Its Maintenance within the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9411. [[CrossRef](#)]
34. Alvarez, C.-S.; Badia, J.; Bosch, M.; Giménez, R.; Baldomà, L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, J.-M.; An, J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **2007**, *45*, 27–37. [[CrossRef](#)]
36. Moore, K.W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L.; O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 683–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

III.3. Contributions de l'article

L'ingestion d'un produit biothérapeutique et notamment d'un probiotique, nécessite que celui-ci soit en capacité de résister à son passage dans le tractus gastro-intestinal pour arriver sur son lieu de colonisation : l'intestin. Parmi les 14 souches de *P. distasonis*, seulement 4 souches ne semblent pas en capacité de résister aux conditions gastriques. Ces résultats coïncident avec ceux d'études précédentes qui ont mis en évidence la résistance de 2 souches de *P. distasonis* parmi les 5 testées, démontrant ainsi également une variabilité inter-souche (Cuffaro et al., 2021, 2020).

Une fois l'estomac traversé, il faut que les bactéries puissent coloniser l'intestin afin d'exercer leurs propriétés bénéfiques. Cette colonisation se fait notamment via l'adhésion à l'épithélium intestinal. Cette étude a démontré que les 14 souches de *P. distasonis* sont capables d'adhérer aux cellules Caco-2 utilisées comme modèle de la barrière intestinale.

Une fois l'épithélium colonisé, il est important de s'assurer que les NPB utilisés n'engendrent aucun dommage des jonctions serrées situées entre les cellules épithéliales. Les résultats ont montré que seulement une des 14 souches testées impacte négativement la résistance transépithéliale des cellules Caco-2. Les 13 autres souches n'ont eu aucun effet sur l'intégrité de la barrière épithéliale comme précédemment décrit pour 3 souches de *P. distasonis* (Hiippala et al., 2020).

L'effet immunomodulateur de *P. distasonis* a alors été analysé sur cellules HT-29 et PBMC non-traitées et stimulées par du LPS d'*E. coli*. Cette étude a mis en évidence un effet anti-inflammatoire de 6 souches de *P. distasonis* sur HT-29 stimulées mais un effet pro-inflammatoire de l'ensemble des souches testées sur PBMC. Les résultats obtenus avec les PBMC ne correspondent pas aux conclusions de travaux antérieurs réalisés sur des modèles murins où *P. distasonis* semblait atténuer les colites induites via la modulation de l'expression de IL-1 β , de l'IL-6 et de TNF- α (Cuffaro et al., 2020; Kverka et al., 2011). Les souches testées n'étaient cependant pas les mêmes dans ces différents travaux. Cet effet pro-inflammatoire semble cependant contrecarré par la surproduction des cytokines anti-inflammatoires IL-1RA et IL-10 lors de la stimulation par *P. distasonis*. L'absence de modification de la production d'IL-12p70 et la surproduction d'IL-10 induites par *P. distasonis* coïncident cependant avec des résultats obtenus lors de précédentes études (Cuffaro et al., 2021, 2020).

L'ensemble de ces résultats couplés aux résultats obtenus lors de nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence 5 souches (CS1, CS7, CS8, CS12 et CS15) combinant 10 des 12 propriétés biothérapeutiques testées *in vitro*. Parmi ces souches, la CS7 et la CS8 semblent les plus intéressantes de par leur importante capacité d'adhésion et de formation de biofilm,

leur effet anti-inflammatoire sur cellules HT-29 stimulées par le LPS, et leur faible effet pro-inflammatoire sur PBMC.

Ces données ont confirmé l'utilisation prometteuse de *P. distasonis* comme produit biothérapeutique. Toutefois, des recherches supplémentaires, notamment *in vivo*, doivent être menées afin de mieux comprendre la variabilité inter-souche et de s'assurer de l'absence d'effets secondaires tels que des troubles digestifs ou infections notamment chez des individus souffrant d'un déficit immunitaire.

Chapitre III :

Conclusion et Perspectives

Parabacteroides distasonis est une bactérie aux multiples facettes dont les mécanismes régissant son interaction avec son hôte restent inconnus. Cette étude a permis de mettre en évidence des propriétés et capacités d'un panel de souches de *P. distasonis* permettant de mieux comprendre comment cette bactérie colonise le MI et interagit avec son hôte. Deux souches ont également été identifiées comme potentiel NPB de par les effets bénéfiques qu'elles pourraient apporter à leur hôte (Figure 27). Certaines questions relatives à son utilisation en tant que NPB, exposées ci-après, restent à élucider.

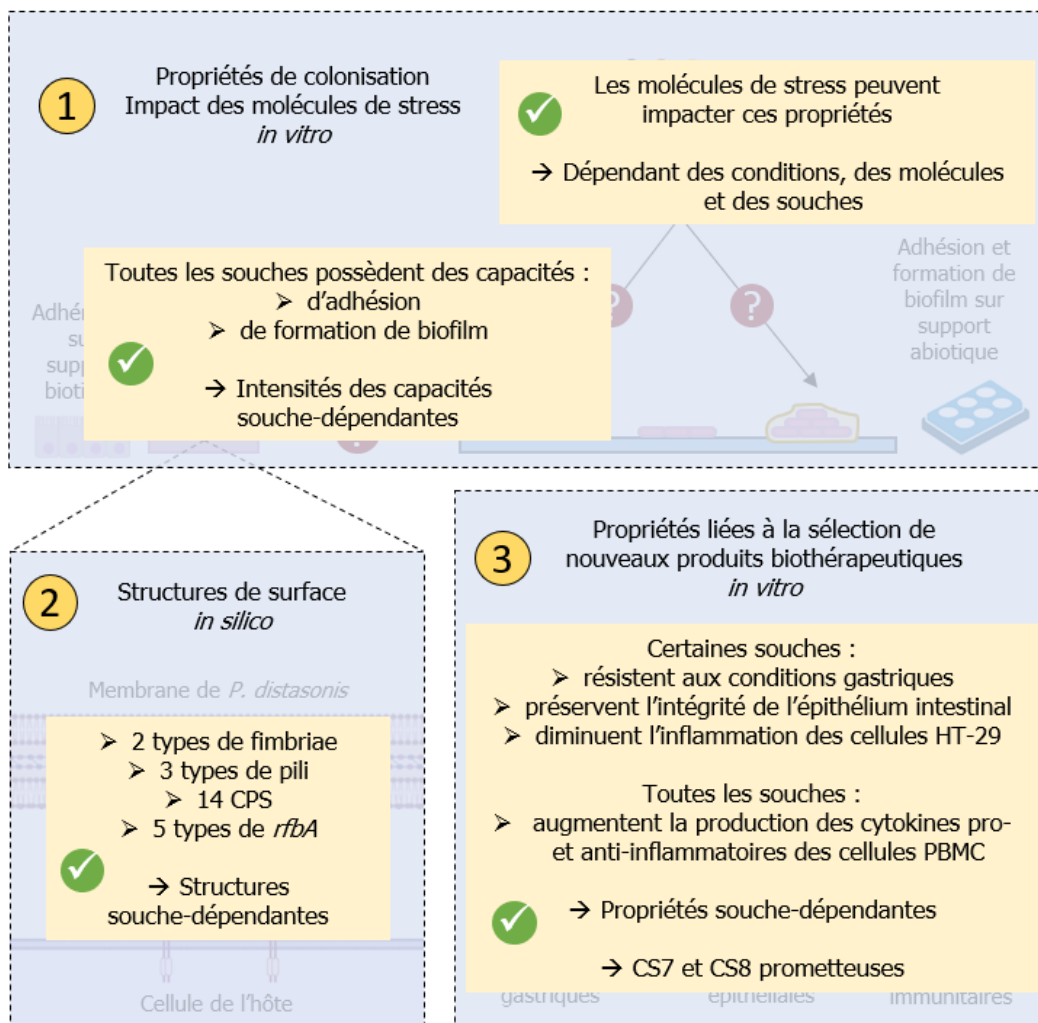


Figure 27. Résumé des principaux résultats obtenus dans ce projet.

De la colonisation à l'interaction de P. distasonis avec son hôte, quels sont les éléments impliqués ?

Ce travail a permis de démontrer les capacités de *P. distasonis* à adhérer à un support abiotique et biotique et de former un biofilm. Ces capacités lui permettraient ainsi de coloniser l'épithélium intestinal et de s'y maintenir. Bien que toutes les souches testées dans cette étude possèdent des capacités d'adhésion et de formation de biofilm, l'intensité des propriétés observées est souche-dépendante et celle-ci pourrait être influencées par la présence de mucus.

L'un des paramètres pouvant expliquer cette importante variabilité inter-souche est la présence de différentes structures impliquées dans l'adhésion et la formation de biofilm à la surface des souches de *P. distasonis*. Parmi celles-ci, deux types de fimbriae et trois types de pili ont été identifiés. 24 souches portent les gènes impliqués dans la synthèse des fimbriae de type 1 tandis que seulement 2 portent ceux pour les fimbriae de type 2. Concernant les pili, respectivement 8, 5 et 2 souches possèdent les gènes permettant la synthèse des pili de type 1, 2 et 3. En plus de cette variabilité de structure, la séquence des gènes impliqués dans leur synthèse varie également d'un génome à l'autre. Un quatorzième cluster impliqué dans la synthèse d'un exopolysaccharide de surface a également été identifié chez la souche de référence. Ces données coïncident avec les valeurs de perméabilité et de charge de surface obtenues lors de la première étude qui suggéraient la présence d'une capsule chez *P. distasonis*. L'expression de ces clusters, inégalement repartis au sein des génomes étudiés, semble de plus sujet à des variations de phase. La présence d'insertion de phages dans plusieurs de ces loci pourrait également moduler leur expression. L'ensemble de ces paramètres peut ainsi expliquer les différences observées en termes d'adhésion et de formation de biofilm.

Ces appendices protéiques sont également impliqués dans l'interaction des bactéries avec leur hôte. Leur identification permet ainsi de faire un premier pas dans l'étude des mécanismes sous-jacents à l'interaction hôte-*P. distasonis* et de mieux comprendre ses effets parfois bénéfiques, parfois délétères pour l'hôte. Dans cette étude, la séquence du gène *rfaA* impliqué dans la synthèse de l'antigène-O du LPS a également été analysée dans différents génomes de *P. distasonis*. L'identification des différentes structures de surface couplée à l'analyse de la séquence du gène *rfaA* n'a cependant pas permis d'expliquer la diversité des effets observés concernant cette espèce. La notion de pathogénicité de *P. distasonis* peut cependant être discutée de par son appartenance au MI et la localisation de la plupart des infections humaines impliquant cette espèce. En effet, sur les 13 souches cliniques isolées dans des prélèvements au Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Nancy, 12

pouvaient avoir une porte d'entrée intestinale (bactériémie, péritonite, abcès abdominal, infection ostéoarticulaire, infection génitale). La présence d'une bactérie initialement commensale de l'intestin dans un site censé en être dépourvu suffit à déclencher un processus infectieux, même avec une souche non pathogène. Ceci peut donc expliquer l'impossibilité de différencier des souches isolées de fèces de souches isolées de prélèvements infectieux.

Par ailleurs, ces découvertes restent génomiques et aucunement protéomiques. Il serait ainsi intéressant d'étudier le niveau d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de ces structures et ceci dans différentes conditions. Lors de ce projet, il a en effet été démontré *in vitro* que les hormones et neurotransmetteurs synthétisés habituellement par l'hôte lors d'un stress, et libérés dans la lumière intestinale, peuvent impacter les capacités d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis*. Ces résultats pourraient ainsi s'expliquer par la variation du niveau d'expression de ces gènes en fonction des conditions dans lesquelles *P. distasonis* se développe. En plus du niveau d'expression, les méthodes d'observation microscopique telle que la microscopie électronique en transmission permettraient également d'observer directement les structures présentes à la surface des bactéries.

De plus, les structures étudiées pendant ce projet ne reflètent pas entièrement la diversité des structures bactériennes impliquées dans leur colonisation et interaction avec l'hôte. Parmi celles-ci, des systèmes de sécrétion (SS) de type 1 à 9 ou autres adhésines existent. Les SS de type 1 (SST1), 2, 3, 4 et 6, qui font partie des SS inclus dans la membrane interne et externe de la paroi bactérienne, sont retrouvés chez les bactéries à Gram négatif. Les SST3, 4 et 6 sont de plus capables de traverser la membrane des cellules eucaryotes pour y transporter des molécules induisant des modifications physiologiques souvent favorables à la bactérie sécrétrice (Bocian-Ostrzycka et al., 2017; Costa et al., 2015). Les fimbriae de type chaperone-usher, les pili de type IV ou bien d'autres adhésines non-fimbriales (e.g. diversité des exopolysaccharides de surface) existent également au sein des bactéries à Gram négatif (Berne et al., 2015). Leur étude chez *P. distasonis* serait ainsi indispensable à une meilleure compréhension des éléments impliqués dans son adhésion et dans son interaction avec son hôte.

De plus, l'épithélium intestinal, *in vivo*, est recouvert d'une couche de mucus représentant la première ligne de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Les cellules HT-29-MTX qui sont différenciées en cellules caliciformes matures à l'aide de méthotrexate sont capables de sécréter du mucus. Bien que non décrite comme ayant des propriétés mucinolytiques, il serait ainsi intéressant d'étudier les propriétés de colonisation de *P. distasonis* sur ce modèle. Des éléments extrinsèques à l'organisme, tels que les émulsifiants retrouvés dans les aliments industriels endommagent cette couche de mucus et réduisent son

épaisseur (Chassaing et al., 2015; Lock et al., 2018). Il arrive ainsi que les bactéries commensales du MI interagissent directement avec l'épithélium de l'hôte.

*Le stress de l'hôte, une émotion partagée par *P. distasonis* ?*

De précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré que *P. distasonis* était négativement impacté en condition de stress gravitaire et socio-environnemental (Alauzet et al., 2020, 2019). Lors de cette thèse, nous nous sommes ainsi intéressés à l'impact des molécules produites par l'hôte lors d'un stress sur les capacités de colonisation de *P. distasonis*.

Cette étude a permis de mettre en évidence que les catécholamines (adrénaline, dopamine, noradrénaline), les glucocorticoïdes (cortisol) et la sérotonine modifient les propriétés d'adhésion et de formation de biofilm de *P. distasonis*. L'impact observé, bien que majoritairement négatif, ne semblait pas suivre de schéma particulier et paraissait souche et condition-dépendant. Cependant, toutes les souches, à l'exception de la souche type, ont montré au moins une réponse (positive ou négative) aux marqueurs de stress sur leurs propriétés d'adhésion (35 % des tests) ou de formation de biofilm (23 % des tests).

Cette réponse pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un système type QS par *P. distasonis*. Ce système, qui permet aux bactéries de communiquer entre-elles, utilise parfois des récepteurs adrénériques-like décrits comme pouvant être stimulés par les molécules de l'hôte (Freestone and Lyte, 2008; Roberts et al., 2002). Un système de QS a été décrit chez des espèces bactériennes proches de *P. distasonis* dont *B. fragilis* et *P. gingivalis* (Burgess et al., 2002; He et al., 2022; Peixoto et al., 2014; Pumbwe et al., 2008).

L'exploitation des génomes séquencés de *P. distasonis* permettra ainsi d'identifier si cette bactérie possède la machinerie génomique nécessaire à l'utilisation de ce système. A cette fin, des études préliminaires nous ont permis d'identifier un gène présent chez *P. distasonis* ATCC 8503^T possédant 39,7 % de similarité avec l'un des 9 *luxR* orthologues putatifs identifiés chez *B. fragilis* ATCC 25285^T (BF0552 ; Figure 28). La comparaison avec un deuxième gène *luxR* (BF3901) n'a cependant donné aucun résultat.

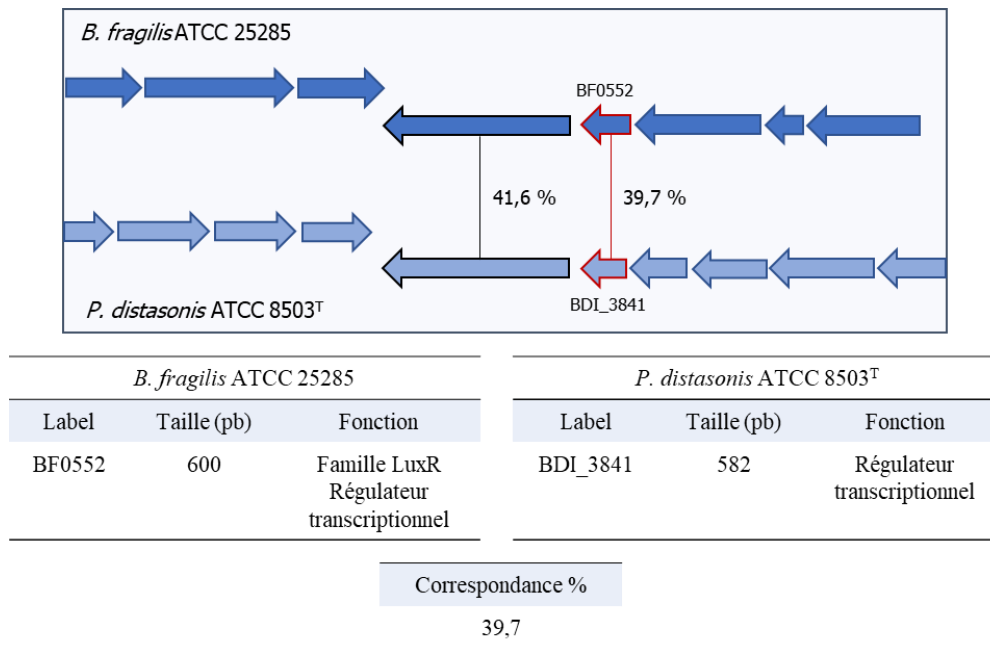


Figure 28. Analyse génomique comparative d'un gène *luxR* de *B. fragilis* ATCC 25285^T chez *P. distasonis* ATCC 8503^T. Les deux gènes comparés, identifiés comme *luxR* putatifs, sont encadrés en rouge. Les gènes encadrés en noirs, identifiés comme récepteurs TonB putatifs (récepteurs transmembranaires qui permettent la transmission de signaux extra-cellulaires entraînant la transcription des gènes cibles), possèdent également une certaine similarité.

La perte de P. distasonis, un préjudice pour l'hôte ?

L'abondance de *P. distasonis* est modifiée en conditions de stress, que celui-ci soit gravitaire ou socio-environnemental. Son abondance est également diminuée dans certaines pathologies aggravées par le stress. La question de la conséquence de cette perte pour l'hôte se pose donc. En effet, plusieurs études ont démontré les effets bénéfiques que *P. distasonis* peut avoir pour son hôte dont des capacités anti-inflammatoires et anti-cancéreuses (Cuffaro et al., 2020; Koh et al., 2020, 2018). Cependant, d'autres résultats suggèrent que *P. distasonis* pourrait être davantage délétère que bénéfique à l'hôte (Blacher et al., 2019; Dziarski et al., 2016; Gomez-Nguyen et al., 2021; Moreno-Arrones et al., 2020). Si l'on prend l'exemple des travaux de Gomez-Nguyen et al. (2021), ils montrent que, malgré sa capacité à produire du GABA, *P. distasonis* induit un comportement dépressif dans un modèle murin de MC. Ces résultats contredisent de précédents travaux qui ont notamment montré que le modèle de stress chronique « chronic unpredictable mild stress » (CUMS) entraînait des modifications de la composition du MI liées au développement d'un phénotype dépressif, phénotype transférable par TMF (Siopi et al., 2020). D'autre part, des travaux effectués au laboratoire a montré dans ce même modèle de CUMS une baisse de l'abondance relative de *P. distasonis* dans le MI des souris stressées (Alauzet et al., 2020). Cette discordance pourrait s'expliquer soit par le modèle d'évaluation de la dépression, soit par la souche de souris qui diffère dans l'étude de Gomez-

Nguyen et al. (2021).

Un autre élément pouvant expliquer ces différentes réponses, bénéfiques ou délétères, est l'importante variabilité inter-souche observée pour l'ensemble des expériences réalisées sur *P. distasonis*. Ces expériences utilisent en effet bien souvent des souches propres aux laboratoires qui les étudient. Dans l'étude de Gomez-Nguyen et al. (2021), l'origine de la souche de *P. distasonis* utilisée en gavage n'est pas identifiée. Pouvoir réaliser ces expériences sur un large panel de souches dans des conditions similaires permettrait ainsi de mieux comprendre la différence de réponse obtenue.

Les aspects bénéfiques de *P. distasonis* semblent cependant prédominants et mieux décrits que les aspects néfastes. Deux brevets dont l'un spécifique à deux souches de *P. distasonis* ont d'ailleurs été déposés. Ce dernier concerne le traitement et la prévention des maladies gastro-intestinales et des troubles associés à ces maladies via l'utilisation de *P. distasonis*. Le dépôt d'un brevet ne permet cependant pas la commercialisation du produit décrit. Il faut notamment s'assurer que ces souches, en plus des aspects bénéfiques qu'elles peuvent apporter à leur hôte, respectent le statut GRAS ou QPS. Le statut QPS est accordé par l'EFSA. Pour obtenir ce statut, un micro-organisme doit répondre aux critères suivants :

- Son identité taxonomique doit être clairement définie ;
- Le corpus de connaissances disponibles doit être suffisant pour établir sa sécurité ;
- L'absence de propriétés pathogènes doit être établie et justifiée ;
- L'utilisation prévue doit être clairement décrite.

Si son utilisation requiert qu'il soit vivant, il est également indispensable de s'assurer qu'il survive au processus de fabrication du probiotique (lyophilisation, encapsulation, ...) et au cheminement lui permettant d'atteindre et de coloniser l'épithélium intestinal. Une première partie de réponse est déjà accessible étant donné qu'il est possible d'obtenir *P. distasonis* ATCC 8503^T sous forme de culot lyophilisé (achat commercial auprès des soucheotèques). Plusieurs études montrent également la résistance de certaines souches aux conditions gastriques (Chamarande et al., 2022b; Cuffaro et al., 2020).

Deux souches cliniques étudié dans ce projet (CS7 et CS8) semblent particulièrement prometteuses de par leurs propriétés bénéfiques. Outre leur capacité de résister aux conditions gastriques, d'adhérer aux cellules épithéliales et de ne pas modifier leur intégrité, ces souches sont en effet capables de réduire l'inflammation induite par le LPS d'*E. coli* des cellules HT-29. Il serait intéressant de poursuivre l'analyse des propriétés anti-inflammatoires de ces souches *in vivo* notamment via l'utilisation du modèle murin de colite induite au TNBS (Cuffaro et al., 2020; Foligné et al., 2006). L'intensité de l'inflammation de ce modèle peut être

mesurée via le score de Wallace. Ce score, allant de 0 à 10, se détermine via l'examen macroscopique des lésions du côlon telles que l'hyperémie, l'épaississement de l'intestin, l'étendue et le nombre de sites d'inflammation/ulcérations (Wallace et al., 1989).

L'abondance relative de *P. distasonis* est notamment réduite en condition de stress socio-environnemental et hyper-gravitaire, deux types de stress rencontrés par les astronautes lors des vols spatiaux. Durant ces vols, les astronautes subissent en effet des modifications du cycle circadien, un isolement social ainsi que des changements gravitaires générant un stress pour l'organisme. Il a été démontré que l'ensemble de ces stress avaient des effets délétères dont l'augmentation du risque de cancers et des troubles du système immunitaire (Guéguinou et al., 2009; Hariom et al., 2021). Les causes peuvent être directement liées au vol spatial (microgravité, radiations, ...) ou indirectement via la modification du MI, du métabolisme osseux, de la nutrition ou de l'état psychologique (anxiété, dépression) des astronautes (Turroni et al., 2020). A l'inverse de l'hypergravité, la microgravité, correspondant à une absence de gravité ressentie (gravité inférieure à 0,01 xg mais différant de l'apesanteur où la gravité est nulle), fait également partie des changements gravitaires pouvant modifier la physiologie des astronautes (Crucian et al., 2018). Il serait ainsi intéressant d'étudier l'impact de la microgravité sur les propriétés de colonisation et de croissance de *P. distasonis* et de voir si ce changement de condition environnementale modifie son interaction avec son hôte.

Pour ce faire, il existe différents modèles d'étude de la microgravité dont certains plus accessibles techniquement et financièrement que d'autres. L'un de ces modèles repose sur l'utilisation de la « Random Positioning Machine » (RPM), qui permet de simuler une microgravité de $10^{-3} xg$ *in vitro*. Son utilisation serait envisageable étant donné que la plateforme expérimentale gravitationnelle pour les modèles animaux (GEPAM), créée en 2019 par le laboratoire SIMPA, comprend une RPM. Un second modèle, cette fois-ci *in vivo*, requiert l'utilisation de rongeurs. Ces rongeurs sont alors suspendus par la queue de façon à ce que seuls les membres antérieurs puissent toucher le fond de la cage. Cette position engendre une hypokinésie des membres postérieurs et une redistribution des fluides corporels vers la tête comme observés en microgravité. Ce modèle, validé à l'Animalerie du Campus Biologie Santé (ACBS) de l'Université de Lorraine, est communément appelé modèle de suspension anti-orthostatique ou hindlimb unloading (HU). Un dernier modèle également *in vivo* mais cette fois-ci chez l'être humain repose sur le même principe que celui du modèle HU. Dans ce modèle dit de Bed Rest, les individus volontaires sont en effet alités pendant 60 à 90 jours avec une inclinaison du lit de 6° . Cette position permet alors, comme pour le modèle HU, de redistribuer les fluides corporels. Ce modèle bien que très intéressant est cependant bien moins accessible

que les deux modèles cités précédemment.

Il pourrait donc être envisagé à plus long terme de tester dans nos différents modèles de stress (socio-environnemental, hyper- et microgravitaire, si ce dernier modèle entraîne également une perte de ce taxon), l'effet d'une complémentation en *P. distasonis* à la fois sur la composition du MI, sur le niveau de stress des rongeurs et sur d'éventuels effets délétères. Ceci nous permettrait d'évaluer l'intérêt de cette espèce en tant que NPB. Cette utilisation en tant que NPB ne concernerait pas que les astronautes car le modèle de stress socio-environnemental utilisé (CUMS) est un modèle murin mimant un stress chronique engendré par les contrariétés de la vie quotidienne et pouvant mener à un phénotype dépressif. Les résultats obtenus auront donc une application sociétale plus large que le domaine spatial, avec un intérêt pour une grande partie de la société.

En conclusion, ce travail a permis de caractériser les principales propriétés de surface de l'espèce *P. distasonis* permettant d'appréhender son maintien dans le MI. Il confirme par ailleurs que certaines souches de *P. distasonis* semblent prometteuses en tant que nouveau produit biothérapeutique. Cependant leur utilisation nécessite de mieux définir les mécanismes sous-jacents à leurs interactions avec l'hôte, de s'assurer de leur survie jusqu'à la colonisation de leur lieu d'action et de l'absence d'effet indésirable pour l'hôte.

Références bibliographiques

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J., 2014. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6, 237. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Adak, A., Khan, M.R., 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 701–721.e70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Alam, M., Midtvedt, T., Uribe, A., 1994. Differential Cell Kinetics in the Ileum and Colon of Germfree Rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 29, 445–451. <https://doi.org/10.3109/00365529409096836>
- Alauzet, C., Cunat, L., Wack, M., Lanfumey, L., Legrand-Frossi, C., Lozniewski, A., Agrinier, N., Cailliez-Grimal, C., Fripiat, J.-P., 2020. Impact of a Model Used to Simulate Chronic Socio-Environmental Stressors Encountered during Spaceflight on Murine Intestinal Microbiota. *Int. J. Mol. Med.* 21, 7863. <https://doi.org/10.3390/ijms21217863>
- Alauzet, C., Cunat, L., Wack, M., Lozniewski, A., Busby, H., Agrinier, N., Cailliez-Grimal, C., Fripiat, J.-P., 2019. Hypergravity disrupts murine intestinal microbiota. *Sci. Rep.* 9, 9410. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45153-8>
- Allam-Ndoul, B., Castonguay-Paradis, S., Veilleux, A., 2020. Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. *Int. J. Mol. Med.* 21, 6402. <https://doi.org/10.3390/ijms21176402>
- Alvarez, C.-S., Badia, J., Bosch, M., Giménez, R., Baldomà, L., 2016. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01981>
- Anderson, J.W., Baird, P., Davis Jr, R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., Williams, C.L., 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nut. Rev.* 67, 188–205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- Anwar, H., Irfan, S., Hussain, G., Naeem Faisal, M., Muzaffar, H., Mustafa, I., Mukhtar, I., Malik, S., Irfan Ullah, M., 2020. Gut Microbiome: A New Organ System in Body, in: Antonio Bastidas Pacheco, G., Ali Kamboh, A. (Eds.), *Parasitology and Microbiology Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89634>
- Arias, N., Arboleya, S., Allison, J., Kaliszewska, A., Higarza, S.G., Gueimonde, M., Arias, J.L., 2020. The Relationship between Choline Bioavailability from Diet, Intestinal Microbiota Composition, and Its Modulation of Human Diseases. *Nutrients* 12, 2340. <https://doi.org/10.3390/nu12082340>
- Aron-Wisnewsky, J., Prifti, E., Belda, E., Ichou, F., Kayser, B.D., Dao, M.C., Verger, E.O., Hedjazi, L., Bouillot, J.-L., Chevallier, J.-M., Pons, N., Le Chatelier, E., Levenez, F., Ehrlich, S.D., Dore, J., Zucker, J.-D., Clément, K., 2019. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut* 68, 70–82. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316103>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2017. Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Baba, Y., Iwatsuki, M., Yoshida, N., Watanabe, M., Baba, H., 2017. Review of the gut microbiome and esophageal cancer: Pathogenesis and potential clinical implications. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 1, 99–104. <https://doi.org/10.1002/ags3.12014>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 979–984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>

- Bai, X., Wei, H., Liu, W., Coker, O.O., Gou, H., Liu, C., Zhao, L., Li, C., Zhou, Y., Wang, G., Kang, W., Ng, E.K., Yu, J., 2022. Cigarette smoke promotes colorectal cancer through modulation of gut microbiota and related metabolites. *Gut* 0, 1–12. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325021>
- Bailey, M.T., Dowd, S.E., Galley, J.D., Hufnagle, A.R., Allen, R.G., Lyte, M., 2011. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav. Immun.* 25, 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
- Bakken, J.S., Borody, T., Brandt, L.J., Brill, J.V., Demarco, D.C., Franzos, M.A., Kelly, C., Khoruts, A., Louie, T., Martinelli, L.P., Moore, T.A., Russell, G., Surawicz, C., 2011. Treating *Clostridium difficile* Infection With Fecal Microbiota Transplantation. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 1044–1049. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.08.014>
- Banasaz, M., Norin, E., Holma, R., Midtvedt, T., 2002. Increased Enterocyte Production in Gnotobiotic Rats Mono-Associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3031–3034. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3031-3034.2002>
- Bank, N.C., Singh, V., Rodriguez-Palacios, A., 2022. Classification of *Parabacteroides distasonis* and other *Bacteroidetes* using O- antigen virulence gene: *RfbA* -Typing and hypothesis for pathogenic vs. probiotic strain differentiation. *Gut Microbes* 14, 1997293. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1997293>
- Baquero, F., Nombela, C., 2012. The microbiome as a human organ. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 2–4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>
- Bastiaanssen, T.F.S., Cowan, C.S.M., Claesson, M.J., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2019. Making Sense of ... the Microbiome in Psychiatry. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 22, 37–52. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy067>
- Bechon, N., Mihajlovic, J., Vendrell-Fernández, S., Chain, F., Langella, P., Beloin, C., Ghigo, J.-M., 2020. Capsular polysaccharides cross-regulation modulates *Bacteroides thetaiotaomicron* biofilm formation (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.25.005728>
- Behjati, S., Tarpey, P.S., 2013. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 98, 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Belkaid, Y., Hand, T.W., 2014. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157, 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
- Benítez-Páez, A., Hess, A.L., Krautbauer, S., Liebisch, G., Christensen, L., Hjorth, M.F., Larsen, T.M., Sanz, Y., MyNewGut consortium, 2021. Sex, Food, and the Gut Microbiota: Disparate Response to Caloric Restriction Diet with Fiber Supplementation in Women and Men. *Mol. Nutr. Food Res.* 65, 2000996. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000996>
- Berlanga, M., Guerrero, R., 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb. Cell Fact.* 15, 165. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G., Brun, Y.V., 2015. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol. Spectr.* 3, 3.4.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015>
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., Retetangos, C., 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Dev.* 86, 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>
- Bircher, L., Schwab, C., Geirnaert, A., Greppi, A., Lacroix, C., 2020. Planktonic and Sessile Artificial Colonic Microbiota Harbor Distinct Composition and Reestablish Differently upon Frozen and Freeze-Dried Long-Term Storage. *mSystems* 5, e00521-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00521-19>
- Blacher, E., Bashiardes, S., Shapiro, H., Rothschild, D., Mor, U., Dori-Bachash, M., Kleimeyer, C., Moresi, C., Harnik, Y., Zur, M., Zabari, M., Brik, R.B.-Z., Kviatcovsky, D., Zmora, N., Cohen, Y., Bar, N., Levi, I., Amar, N., Mehlman, T., Brandis, A., Biton, I., Kuperman, Y., Tsoory, M., Alfahel, L., Harmelin, A., Schwartz, M., Israelson, A., Arike, L., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C., Gotkine, M., Segal, E., Elinav, E., 2019. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature* 572, 474–480. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1443-5>
- Bocian-Ostrzycka, K.M., Grzeszczuk, M.J., Banaś, A.M., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2017. Bacterial thiol oxidoreductases — from basic research to new antibacterial strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 3977–3989. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8291-8>
- Boente, R.F., Ferreira, L.Q., Falcão, L.S., Miranda, K.R., Guimarães, P.L.S., Santos-Filho, J., Vieira, J.M.B.D., Barroso, D.E., Emond, J.-P., Ferreira, E.O., Paula, G.R., Domingues, R.M.C.P., 2010. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe* 16, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.02.003>

- Borody, T.J., Warren, E.F., Leis, S.M., Surace, R., Ashman, O., Siarakas, S., 2004. Bacteriotherapy Using Fecal Flora: Toying With Human Motions. *J. Clin. Gastroenterol.* 38, 475–483. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128988.13808.dc>
- Bostanci, N., Belibasakis, G.N., 2012. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 333, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x>
- Bowers, S.J., Summa, K.C., Thompson, R.S., González, A., Vargas, F., Olker, C., Jiang, P., Lowry, C.A., Dorrestein, P.C., Knight, R., Wright, K.P., Fleshner, M., Turek, F.W., Vitaterna, M.H., 2022. A Prebiotic Diet Alters the Fecal Microbiome and Improves Sleep in Response to Sleep Disruption in Rats. *Front. Neurosci.* 16, 889211. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.889211>
- Boyanova, L., 2017. Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. *Anaerobe* 44, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.01.003>
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B.T., Diamond, B., Pettersson, S., 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* 6, 263ra158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Brat, D.J., Bellail, A.C., Van Meir, E.G., 2005. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoralangiogenesis. *Neuro-Oncology* 7, 122–133. <https://doi.org/10.1215/S1152851704001061>
- Bravo, J.A., Julio-Pieper, M., Forsythe, P., Kunze, W., Dinan, T.G., Bienenstock, J., Cryan, J.F., 2012. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.09.010>
- Brennan, K., Zheng, J., 2007. Interleukin 8, in: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, pp. 1–4. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61916-6>
- Browne, H.P., Forster, S.C., Anonye, B.O., Kumar, N., Neville, B.A., Stares, M.D., Goulding, D., Lawley, T.D., 2016. Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 533, 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature17645>
- Burgess, N.A., Kirke, D.F., Williams, P., Winzer, K., Hardie, K.R., Meyers, N.L., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.A., Cámara, M., 2002. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology* 148, 763–772. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-3-763>
- Burtseva, O., Baulina, O., Zaytseva, A., Fedorenko, T., Chekanov, K., Lobakova, E., 2021. In vitro Biofilm Formation by Bioluminescent Bacteria Isolated from the Marine Fish Gut. *Microb. Ecol.* 81, 932–940. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01652-0>
- Caballero, S., Kim, S., Carter, R.A., Leiner, I.M., Sušac, B., Miller, L., Kim, G.J., Ling, L., Pamer, E.G., 2017. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host Microbe* 21, 592–602.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.002>
- Cammarota, G., Ianiro, G., Kelly, C.R., Mullish, B.H., Allegretti, J.R., Kassam, Z., Putignani, L., Fischer, M., Keller, J.J., Costello, S.P., Sokol, H., Kump, P., Satokari, R., Kahn, S.A., Kao, D., Arkkila, P., Kuijper, E.J., Vehreschild, M.J.G., Pintus, C., Lopetuso, L., Masucci, L., Scaldaferri, F., Terveer, E.M., Nieuwdorp, M., López-Sanromán, A., Kupcinskis, J., Hart, A., Tilg, H., Gasbarrini, A., 2019. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 68, 2111–2121. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319548>
- Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W.M., Högenauer, C., Malferteiner, P., Mattila, E., Milosavljević, T., Nieuwdorp, M., Sanguinetti, M., Simren, M., Gasbarrini, A., 2017. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 66, 569–580. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017>
- Cantarel, B.L., Lombard, V., Henrissat, B., 2012. Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome. *PLoS ONE* 7, e28742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., Severi, C., 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol.* 28, 203–209.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D.T., Corfe, B.M., Owen, L.J., 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26191. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191>
- Castro, F., Cardoso, A.P., Gonçalves, R.M., Serre, K., Oliveira, M.J., 2018. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* 9, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>

- Cekanaviciute, E., Yoo, B.B., Runia, T.F., Debelius, J.W., Singh, S., Nelson, C.A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y.K., Hauser, S.L., Crabtree-Hartman, E., Sand, I.K., Gacias, M., Zhu, Y., Casaccia, P., Cree, B.A.C., Knight, R., Mazmanian, S.K., Baranzini, S.E., 2017. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 10713–10718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114>
- Chaffanel, F., Charron-Bourgoin, F., Soligot, C., Kebouchi, M., Bertin, S., Payot, S., Le Roux, Y., Leblond-Bourget, N., 2018. Surface proteins involved in the adhesion of *Streptococcus salivarius* to human intestinal epithelial cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2851–2865. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8794-y>
- Chamarande, J., Cunat, L., Alauzet, C., Cailliez-Grimal, C., 2022a. In Silico Study of Cell Surface Structures of *Parabacteroides distasonis* Involved in Its Maintenance within the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9411. <https://doi.org/10.3390/ijms23169411>
- Chamarande, J., Cunat, L., Caillet, C., Mathieu, L., Duval, J.F.L., Lozniewski, A., Fripiat, J.-P., Alauzet, C., Cailliez-Grimal, C., 2021. Surface Properties of *Parabacteroides distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities. *Microorganisms* 9, 1602. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081602>
- Chamarande, J., Cunat, L., Pavlov, N., Alauzet, C., Cailliez-Grimal, C., 2022b. *Parabacteroides distasonis* Properties Linked to the Selection of New Biotherapeutics. *Nutrients* 14, 4176. <https://doi.org/10.3390/nu14194176>
- Chang, P.V., Hao, L., Offermanns, S., Medzhitov, R., 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 2247–2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chapman, M., Amulvey, M., Jhultgren, S., 2002. Fimbriae and Pili, in: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 177–197. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50228-2>
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., Gewirtz, A.T., 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature14232>
- Chatzidaki-Livanis, M., Weinacht, K.G., Comstock, L.E., 2010. *Trans* locus inhibitors limit concomitant polysaccharide synthesis in the human gut symbiont *Bacteroides fragilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11976–11980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005039107>
- Chen, C., Brown, D.R., Xie, Y., Green, B.T., Lyte, M., 2003. Catecholamines Modulate *Escherichia coli* O157:H7 Adherence to Murine Cecal Mucosa. *Shock* 20, 183–188. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000073867.66587.e0>
- Chen, J., Vitetta, L., 2020. The Role of Butyrate in Attenuating Pathobiont-Induced Hyperinflammation. *Immune Netw.* 20, e15. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e15>
- Chen, Y., Zhou, J., Wang, L., 2021. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 625913. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625913>
- Chen, Z., Radjabzadeh, D., Chen, L., Kurilshikov, A., Kavousi, M., Ahmadizar, F., Ikram, M.A., Uitterlinden, A.G., Zhernakova, A., Fu, J., Kraaij, R., Voortman, T., 2021. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis From Population Studies. *JAMA Netw. Open* 4, e2118811. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.18811>
- Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., Sperandio, V., 2006. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10420–10425. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604343103>
- Cobo, F., Pérez-Carrasco, V., Franco-Acosta, A., García-Salcedo, J.A., Navarro-Marí, J.M., 2022. Bacteremia due to *Parabacteroides distasonis*: Experience with 4 cases. *Anaerobe* 76, 102608. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102608>
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Coquant, G., Aguanno, D., Brot, L., Belloir, C., Delugeard, J., Roger, N., Pham, H.-P., Briand, L., Moreau, M., de Sordi, L., Carrière, V., Grill, J.-P., Thenet, S., Seksik, P., 2022. 3-oxo-C12:2-HSL, quorum sensing molecule from human intestinal microbiota, inhibits pro-inflammatory pathways in immune cells via bitter taste receptors. *Sci. Rep.* 12, 9440. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13451-3>
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., Waksman, G., 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>

- Costerton, J., 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7)
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 35. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., Gougis, S., Rizkalla, S., Batto, J.-M., Renault, P., ANR MicroObes consortium, Doré, J., Zucker, J.-D., Clément, K., Ehrlich, S.D., ANR MicroObes consortium members, Blottière, H., Leclerc, M., Juste, C., de Wouters, T., Lepage, P., Fouqueray, C., Basdevant, A., Henegar, C., Godard, C., Fondacci, M., Rohia, A., Hajduch, F., Weissenbach, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Gauchi, J.-P., Gibrat, J.-F., Loux, V., Carré, W., Maguin, E., van de Guchte, M., Jamet, A., Boumezeur, F., Layec, S., 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588. <https://doi.org/10.1038/nature12480>
- Coyne, M.J., Kalka-Moll, W., Tzianabos, A.O., Kasper, D.L., 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, 6. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.11.6176-6181.2000>
- Coyne, M.J., Weinacht, K.G., Krinos, C.M., Comstock, L.E., 2003. Mpi recombinase globally modulates the surface architecture of a human commensal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10446–10451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832655100>
- Crucian, B.E., Choukèr, A., Simpson, R.J., Mehta, S., Marshall, G., Smith, S.M., Zwart, S.R., Heer, M., Ponomarev, S., Whitmire, A., Frippiat, J.P., Douglas, G.L., Lorenzi, H., Buchheim, J.-I., Makedonas, G., Ginsburg, G.S., Ott, C.M., Pierson, D.L., Krieger, S.S., Baecker, N., Sams, C., 2018. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front. Immunol.* 9, 1437. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01437>
- Cuffaro, B., Assouhoun, A.L.W., Boutillier, D., Peucelle, V., Desramaut, J., Boudebouze, S., Croyal, M., Waligora-Dupriet, A.-J., Rhimi, M., Grangette, C., Maguin, E., 2021. Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms* 9, 565. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030565>
- Cuffaro, B., Assouhoun, A.L.W., Boutillier, D., Súkeníková, L., Desramaut, J., Boudebouze, S., Salomé-Desnoulez, S., Hrdý, J., Waligora-Dupriet, A.-J., Maguin, E., Grangette, C., 2020. In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of *Parabacteroides distasonis* Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* 9, 2104. <https://doi.org/10.3390/cells9092104>
- De Biase, D., Pennacchietti, E., 2012. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon: Role of *gadBC* operon in orally acquired bacteria. *Mol. Microbiol.* 86, 770–786. <https://doi.org/10.1111/mmi.12020>
- De La Cochetière, M.F., Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J.P., Doré, J., 2005. Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5588–5592. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5588-5592.2005>
- de Sá Almeida, J.S., de Oliveira Marre, A.T., Teixeira, F.L., Boente, R.F., Domingues, R.M.C.P., de Paula, G.R., Lobo, L.A., 2020. Lactoferrin and lactoferricin B reduce adhesion and biofilm formation in the intestinal symbionts *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe* 64, 102232. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102232>
- De Spiegeleer, A., Elewaut, D., Van Den Noortgate, N., Janssens, Y., Debonne, N., Van Langenhove, S., Govindarajan, S., De Spiegeleer, B., Wynendaele, E., 2020. Quorum sensing molecules as a novel microbial factor impacting muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* 1866, 165646. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165646>
- Declercq, A.M., Cai, W., Naranjo, E., Thongda, W., Eeckhaut, V., Bauwens, E., Arias, C., De La Fuente, L., Beck, B.H., Lange, M.D., Peatman, E., Haesebrouck, F., Aerts, J., Decostere, 2019. Evidence that the stress hormone cortisol regulates biofilm formation differently among *Flavobacterium columnare* isolates. *Vet. Res.* 50, 24. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0641-3>
- DeFilipp, Z., Bloom, P.P., Torres Soto, M., Mansour, M.K., Sater, M.R.A., Huntley, M.H., Turbett, S., Chung, R.T., Chen, Y.-B., Hohmann, E.L., 2019. Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. *N. Engl. J. Med.* 381, 2043–2050. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910437>
- Demirci, M., Bahar Tokman, H., Taner, Z., Keskin, F.E., Çağatay, P., Ozturk Bakar, Y., Özyazar, M., Kiraz, N., Kocazeybek, B.S., 2020. *Bacteroidetes* and *Firmicutes* levels in gut microbiota and effects of hosts TLR2/TLR4 gene expression levels in

- adult type 1 diabetes patients in Istanbul, Turkey. *J. Diabetes Complicat.* 34, 107449. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.107449>
- Deutsch, S.-M., Mariadassou, M., Nicolas, P., Parayre, S., Le Guellec, R., Chuat, V., Peton, V., Le Maréchal, C., Burati, J., Loux, V., Briard-Bion, V., Jardin, J., Plé, C., Foligné, B., Jan, G., Falentin, H., 2017. Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium freudenreichii* by means of a multi-strain study. *Sci. Rep.* 7, 46409. <https://doi.org/10.1038/srep46409>
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G., 2016. Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab.* 24, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.013>
- Dicks, L.M.T., 2022a. Gut Bacteria and Neurotransmitters. *Microorganisms* 10, 1838. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091838>
- Dicks, L.M.T., 2022b. How does Quorum Sensing of Intestinal Bacteria Affect Our Health and Mental Status? *Microorganisms* 10, 1969. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101969>
- Dogra, S.K., Doré, J., Damak, S., 2020. Gut Microbiota Resilience: Definition, Link to Health and Strategies for Intervention. *Front. Microbiol.* 11, 572921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572921>
- Donelli, G., Vuotto, C., Cardines, R., Mastrantonio, P., 2012. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 318–325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x>
- Doré, J., Multon, M.-C., Béhier, J.-M., Affagard, H., Andremont, A., Barthélémy, P., Batitsa, R., Bonneville, M., Bonny, C., Boyaval, G., Chamailard, M., Chevalier, M.-P., Cordaillat-Simmons, M., Cournarie, F., Diaz, I., Guillaume, E., Guyard, C., Jouvin-Marche, E., Martin, F.-P., Petiteau, D., 2017. The human gut microbiome as source of innovation for health: Which physiological and therapeutic outcomes could we expect? *Therapies* 72, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2016.12.007>
- Drekonja, D., Reich, J., Gezahegn, S., Greer, N., Shaukat, A., MacDonald, R., Rutks, I., Wilt, T.J., 2015. Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. *Ann. Intern. Med.* 162, 630–638. <https://doi.org/10.7326/M14-2693>
- Durmus, S., Çakır, T., Guthke, R. (Eds.), 2016. Computational Systems Biology of Pathogen-Host Interactions, *Frontiers Research Topics*. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/978-2-88919-821-4>
- Duval, J.F.L., Gaboriaud, F., 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.002>
- Dziarski, R., Park, S.Y., Kashyap, D.R., Dowd, S.E., Gupta, D., 2016. Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. *PLoS ONE* 11, e0146162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146162>
- Edebol Carlman, H.M.T., Rode, J., König, J., Repsilber, D., Hutchinson, A.N., Thunberg, P., Persson, J., Kiselev, A., Pruessner, J.C., Brummer, R.J., 2022. Probiotic Mixture Containing *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* and *Lactiplantibacillus plantarum* Affects Brain Responses to an Arithmetic Stress Task in Healthy Subjects: A Randomised Clinical Trial and Proof-of-Concept Study. *Nutrients* 14, 1329. <https://doi.org/10.3390/nu14071329>
- Eggerth, A.H., Gagnon, B.H., 1933. The *Bacteroides* of Human Feces. *J. Bacteriol.* 25, 389–413. <https://doi.org/10.1128/jb.25.4.389-413.1933>
- Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., Thompson, R.C., 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343, 341–346. <https://doi.org/10.1038/343341a0>
- El-Zayat, S.R., Sibaii, H., Mannaa, F.A., 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* 43, 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>
- Evans, J.M., Morris, L.S., Marchesi, J.R., 2013. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J. Endocrinol.* 218, 37–47. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0131>
- Ezeji, J.C., Sarikonda, D.K., Hopperton, A., Erkkila, H.L., Cohen, D.E., Martinez, S.P., Cominelli, F., Kuwahara, T., Dichosa, A.E.K., Good, C.E., Jacobs, M.R., Khoretchenko, M., Veloo, A., Rodriguez-Palacios, A., 2021. *Parabacteroides distasonis*: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health. *Gut Microbes* 13, 1922241. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1922241>
- Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A.L., Clemente, J.C., Knight, R., Heath, A.C., Leibel, R.L., Rosenbaum, M., Gordon, J.I., 2013. The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science* 341, 1237439. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>

- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R.Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Lima-Mendez, G., D'hoë, K., Jonckheere, K., Homola, D., Garcia, R., Tighelaar, E.F., Eeckhaut, L., Fu, J., Henckaerts, L., Zhernakova, A., Wijmenga, C., Raes, J., 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352, 560–564. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
- Fan, W., Huo, G., Li, X., Yang, L., Duan, C., 2014. Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative Study in Infants During the Six Months of Life. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 133–143. <https://doi.org/10.4014/jmb.1309.09029>
- Fan, Y., Pedersen, O., 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Fang, H., Fu, L., Wang, J., 2018. Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/8941340>
- Farré-Maduell, E., Casals-Pascual, C., 2019. The origins of gut microbiome research in Europe: From Escherich to Nissle. *Hum. Microbiome J.* 14, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2019.100065>
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., Ouwehand, A., 2019. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms* 7, 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- Fernández-Veledo, S., Vendrell, J., 2019. Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 20, 439–447. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09513-z>
- Fijan, S., 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11, 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>
- Fletcher, C.M., Coyne, M.J., Bentley, D.L., Villa, O.F., Comstock, L.E., 2007. Phase-variable expression of a family of glycoproteins imparts a dynamic surface to a symbiont in its human intestinal ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2413–2418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608797104>
- Fogliano, V., Corollaro, M.L., Vitaglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., Travaglia, F., Arlorio, M., Costabile, A., Klinder, A., Gibson, G., 2011. *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, S44–S55. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000360>
- Foligné, B., Nutten, S., Steidler, L., Dennin, V., Goudercourt, D., Mercenier, A., Pot, B., 2006. Recommendations for Improved Use of the Murine TNBS-Induced Colitis Model in Evaluating Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Technical and Microbiological Aspects. *Dig. Dis. Sci.* 51, 390–400. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-3143-x>
- Francius, G., Polyakov, P., Merlin, J., Abe, Y., Ghigo, J.-M., Merlin, C., Beloin, C., Duval, J.F.L., 2011. Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLoS ONE* 6, e20066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020066>
- Freestone, P.P.E., Lyte, M., 2008. Microbial Endocrinology: Experimental Design Issues in the Study of Interkingdom Signalling in Infectious Disease. *Microbial Endocrinology* 64, 75–105. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00402-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00402-4)
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D., Cerf-Bensussan, N., 2009. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* 31, 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>
- Galley, J.D., Parry, N.M., Ahmer, B.M.M., Fox, J.G., Bailey, M.T., 2017. The commensal microbiota exacerbate infectious colitis in stressor-exposed mice. *Brain Behav. Immun.* 60, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.09.010>
- Galley, J.D., Yu, Z., Kumar, P., Dowd, S.E., Lyte, M., Bailey, M.T., 2014. The structures of the colonic mucosa-associated and luminal microbial communities are distinct and differentially affected by a prolonged murine stressor. *Gut Microbes* 5, 748–760. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.972241>
- Gao, G., Ma, T., Zhang, T., Jin, H., Li, Y., Kwok, L.-Y., Zhang, H., Sun, Z., 2021. Adjunctive Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 Administration Enhances the Effect of Anti-PD-1 Antitumor Therapy via Restoring Antibiotic-Disrupted Gut Microbiota. *Front. Immunol.* 12, 772532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.772532>
- Garber, J.M., Hennet, T., Szymanski, C.M., 2021. Significance of fucose in intestinal health and disease. *Mol. Microbiol.* 115, 1086–1093. <https://doi.org/10.1111/mmi.14681>

- García-Bayona, L., Coyne, M.J., Comstock, L.E., 2021. Mobile Type VI secretion system loci of the gut *Bacteroidales* display extensive intra-ecosystem transfer, multi-species spread and geographical clustering. *PLoS Genet* 17, e1009541. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009541>
- Garrett, W.S., Lord, G.M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S.K., Ito, S., Glickman, J.N., Glimcher, L.H., 2007. Communicable Ulcerative Colitis Induced by T-bet Deficiency in the Innate Immune System. *Cell* 131, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.017>
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., Gramenzi, A., 2016. Probiotics History. *J. Clin. Gastroenterol.* 50, S116–S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Gaudier, E., Rival, M., Buisine, M.-P., Robineau, I., Hoebler, C., 2009. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol. Res.* 58, 111–119. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931271>
- Gay, N.J., Gangloff, M., 2007. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318>
- Gerits, E., Verstraeten, N., Michiels, J., 2017. New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J. Oral. Microbiol.* 9, 1300366. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1300366>
- Ghoshal, U.C., Ghoshal, U., 2017. Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Other Intestinal Disorders. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 46, 103–120. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.008>
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125, 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gilbert, J.A., Blaser, M.J., Caporaso, J.G., Jansson, J.K., Lynch, S.V., Knight, R., 2018. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.* 24, 392–400. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
- Girdhar, K., Huang, Q., Chow, I.-T., Vatanen, T., Brady, C., Raisingani, A., Autissier, P., Atkinson, M.A., Kwok, W.W., Kahn, C.R., Altindis, E., 2022. A gut microbial peptide and molecular mimicry in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2120028119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2120028119>
- Gomez-Nguyen, A., Basson, A.R., Dark-Fleury, L., Hsu, K., Osme, A., Menghini, P., Pizarro, T.T., Cominelli, F., 2021. *Parabacteroides distasonis* induces depressive-like behavior in a mouse model of Crohn’s disease. *Brain Behav. Immun.* 98, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.218>
- Gordon, H.A., Bruckner-Kardoss, E., 1961. Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Am. J. Physiol.-Legacy Content* 201, 175–178. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.201.1.175>
- Gordon, J., Knowlton, N., Relman, D.A., Rohwer, F., Youle, M., 2013. Superorganisms and Holobionts. *Microbe* 8, 152–153. <https://doi.org/10.1128/microbe.8.152.1>
- Gosselin, F., Duval, J.F.L., Simonet, J., Ginevra, C., Gaboriaud, F., Jarraud, S., Mathieu, L., 2011. Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of *Legionella pneumophila* sg1: An issue to explain infection potential? *Colloids Surf. B.* 82, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.08.040>
- Gregory, E.M., Kowalski, J.B., Holdeman, L.V., 1977. Production and some properties of catalase and superoxide dismutase from the anaerobe *Bacteroides distasonis*. *J. Bacteriol.* 129, 1298–1302. <https://doi.org/10.1128/jb.129.3.1298-1302.1977>
- Gu, S., Zaidi, S., Hassan, M.I., Mohammad, T., Malta, T.M., Noushmehr, H., Nguyen, B., Crandall, K.A., Srivastav, J., Obias, V., Lin, P., Nguyen, B.-N., Yao, M., Yao, R., King, C.H., Mazumder, R., Mishra, B., Rao, S., Mishra, L., 2020. Mutated CEACAMs Disrupt Transforming Growth Factor Beta Signaling and Alter the Intestinal Microbiome to Promote Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 158, 238–252. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.09.023>
- Gubatan, J., Holman, D.R., Puntasecca, C.J., Polevoi, D., Rubin, S.J., Rogalla, S., 2021. Antimicrobial peptides and the gut microbiome in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 27, 7402–7422. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i43.7402>
- Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J.-L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C., Fripiat, J.-P., 2009. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth’s orbit? *J. Leukoc. Biol.* 86, 1027–1038. <https://doi.org/10.1189/jlb.0309167>
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., He, P., 2020. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J. Animal Sci. Biotechnol.* 11, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>

- Gutiérrez-Repiso, C., Molina-Vega, M., Bernal-López, M.R., Garrido-Sánchez, L., García-Almeida, J.M., Sajoux, I., Moreno-Indias, I., Tinahones, F.J., 2021. Different Weight Loss Intervention Approaches Reveal a Lack of a Common Pattern of Gut Microbiota Changes. *J. Pers. Med.* 11, 109. <https://doi.org/10.3390/jpm11020109>
- Guven-Maiorov, E., Tsai, C.-J., Nussinov, R., 2016. Pathogen mimicry of host protein-protein interfaces modulates immunity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 58, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.004>
- Gwak, M.-G., Chang, S.-Y., 2021. Gut-Brain Connection: Microbiome, Gut Barrier, and Environmental Sensors. *Immune Netw.* 21, e20. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e20>
- Hamada, N., Sojar, H.T., Cho, M.I., Genco, R.J., 1996. Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 64, 4788–4794. <https://doi.org/10.1128/iai.64.11.4788-4794.1996>
- Hariom, S.K., Ravi, A., Mohan, G.R., Pochiraju, H.D., Chattopadhyay, S., Nelson, E.J.R., 2021. Animal physiology across the gravity continuum. *Acta Astronautica* 178, 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.09.044>
- Hasegawa, Y., Iwami, J., Sato, K., Park, Y., Nishikawa, K., Atsumi, T., Moriguchi, K., Murakami, Y., Lamont, R.J., Nakamura, H., Ohno, N., Yoshimura, F., 2009. Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2. *Microbiology* 155, 3333–3347. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028928-0>
- Hasegawa, Y., Nagano, K., 2021. *Porphyromonas gingivalis* FimA and Mfa1 fimbriae: Current insights on localization, function, biogenesis, and genotype. *Jpn Dent. Sci. Rev.* 57, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.003>
- He, Z., Jiang, W., Jiang, Y., Dong, J., Song, Z., Xu, J., Zhou, W., 2022. Anti-biofilm activities of coumarin as quorum sensing inhibitor for *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral. Microbiol.* 14, 2055523. <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2055523>
- Heijtz, R.D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., Pettersson, S., 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Hiiippala, K., Kainulainen, V., Suutarinen, M., Heini, T., Bowers, J.R., Jasso-Selles, D., Lemmer, D., Valentine, M., Barnes, R., Engelthaler, D.M., Satokari, R., 2020. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing *Bacteroides* and *Parabacteroides* Spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients* 12, 935. <https://doi.org/10.3390/nu12040935>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hiller, C.C., Lucca, V., Carvalho, D., Borsoi, A., Borges, K.A., Furian, T.Q., do Nascimento, V.P., 2019. Influence of catecholamines on biofilm formation by *Salmonella Enteritidis*. *Microb. Pathog.* 130, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.032>
- Ho, H., Bunyavanich, S., 2018. Role of the Microbiome in Food Allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 18, 27. <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0780-z>
- Hoban, A.E., Stilling, R.M., Ryan, F.J., Shanahan, F., Dinan, T.G., Claesson, M.J., Clarke, G., Cryan, J.F., 2016. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Transl. Psychiatry* 6, e774. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.42>
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C.E., Stanley-Wall, N.R., 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 649–669. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
- Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J., 2012. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* 336, 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Hossain, K.S., Amarasena, S., Mayengbam, S., 2022. B Vitamins and Their Roles in Gut Health. *Microorganisms* 10, 1168. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061168>
- Hu, H., Pan, H., Li, R., He, K., Zhang, H., Liu, L., 2022. Increased Circulating Cytokines Have a Role in COVID-19 Severity and Death With a More Pronounced Effect in Males: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Pharmacol.* 13, 802228. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.802228>
- Huang, J., Liu, D., Wang, Y., Liu, L., Li, J., Yuan, J., Jiang, Zhihong, Jiang, Zebo, Hsiao, W.W., Liu, H., Khan, I., Xie, Ying, Wu, J., Xie, Yajia, Zhang, Y., Fu, Y., Liao, J., Wang, W., Lai, H., Shi, A., Cai, J., Luo, L., Li, R., Yao, X., Fan, X., Wu, Q., Liu, Z., Yan, P., Lu, J., Yang, M., Wang, L., Cao, Y., Wei, H., Leung, E.L.-H., 2022. Ginseng polysaccharides alter the gut microbiota and kynurenine/tryptophan ratio, potentiating the antitumour effect of antiprogrammed cell death 1/programmed cell death ligand 1 (anti-PD-1/PD-L1) immunotherapy. *Gut* 71, 734–745. <https://doi.org/10.1136/gutjnl->

- 2020-321031
- Huang, Y., Li, S.-C., Hu, J., Ruan, H.-B., Guo, H.-M., Zhang, H.-H., Wang, X., Pei, Y.-F., Pan, Y., Fang, C., 2018. Gut microbiota profiling in Han Chinese with type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 141, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.04.032>
- Husebye, E., Hellström, P.M., Midtvedt, T., 1994. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Digest. Dis. Sci.* 39, 946–956. <https://doi.org/10.1007/BF02087542>
- Hyono, A., Gaboriaud, F., Mazda, T., Takata, Y., Ohshima, H., Duval, J.F.L., 2009. Impacts of Papain and Neuraminidase Enzyme Treatment on Electrohydrodynamics and IgG-Mediated Agglutination of Type A Red Blood Cells. *Langmuir* 25, 10873–10885. <https://doi.org/10.1021/la900087c>
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D.R., 2009. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 139, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Jacquot, A., Sakamoto, C., Razafitianamahavo, A., Caillet, C., Merlin, J., Fahs, A., Ghigo, J.-M., Duval, J.F.L., Beloin, C., Francius, G., 2014. The dynamics and pH-dependence of Ag43 adhesins' self-association probed by atomic force spectroscopy. *Nanoscale* 6, 12665–12681. <https://doi.org/10.1039/C4NR03312D>
- Jakobsson, H.E., Abrahamsson, T.R., Jenmalm, M.C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., Andersson, A.F., 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* 63, 559–566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>
- Jandhyala, S.M., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jha, R., Mishra, P., 2021. Dietary fiber in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, performance, gut health, and on the environment: a review. *J. Animal Sci. Biotechnol.* 12, 51. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00576-0>
- Kang, M.-J., Baek, K.-R., Lee, Y.-R., Kim, G.-H., Seo, S.-O., 2022. Production of Vitamin K by Wild-Type and Engineered Microorganisms. *Microorganisms* 10, 554. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030554>
- Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., Bäckhed, F., 2013. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature12198>
- Kayama, H., Okumura, R., Takeda, K., 2020. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 23–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115104>
- Keiran, N., Ceperuelo-Mallafré, V., Calvo, E., Hernández-Alvarez, M.I., Ejarque, M., Núñez-Roa, C., Horrillo, D., Maymó-Masip, E., Rodríguez, M.M., Fradera, R., de la Rosa, J.V., Jorba, R., Megia, A., Zorzano, A., Medina-Gómez, G., Serena, C., Castrillo, A., Vendrell, J., Fernández-Veledo, S., 2019. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. *Nat. Immunol.* 20, 581–592. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0372-7>
- Khoruts, A., Sadowsky, M.J., 2016. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 508–516. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.98>
- Knecht, L.D., O'Connor, G., Mittal, R., Liu, X.Z., Daftarian, P., Deo, S.K., Daunert, S., 2016. Serotonin Activates Bacterial Quorum Sensing and Enhances the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the Host. *EBioMedicine* 9, 161–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.037>
- Koh, G.Y., Kane, A., Lee, K., Xu, Q., Wu, X., Roper, J., Mason, J.B., Crott, J.W., 2018. *Parabacteroides distasonis* attenuates toll-like receptor 4 signaling and Akt activation and blocks colon tumor formation in high-fat diet-fed azoxymethane-treated mice. *Int. J. Cancer* 143, 1797–1805. <https://doi.org/10.1002/ijc.31559>
- Koh, G.Y., Kane, A.V., Wu, X., Crott, J.W., 2020. *Parabacteroides distasonis* attenuates tumorigenesis, modulates inflammatory markers and promotes intestinal barrier integrity in azoxymethane-treated A/J mice. *Carcinogenesis* 41, 909–917. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa018>
- Konduri, R., Saiabhilash, C.R., Shivaji, S., 2021. Biofilm-Forming Potential of Ocular Fluid *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on Ex Vivo Human Corneas from Attachment to Dispersal Phase. *Microorganisms* 9, 1124. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061124>
- Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Sokol, D., Hudcovic, T., Hrnčir, T., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopečný, J., Verdu, E.F., Tlaskalova-Hogenova,

- H., 2011. Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical and Experimental Immunology* 163, 250–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x>
- Lagier, J.-C., Khelaifia, S., Alou, M.T., Ndongo, S., Dione, N., Hugon, P., Caputo, A., Cadoret, F., Traore, S.I., Seck, E.H., Dubourg, G., Durand, G., Mourembou, G., Guilhot, E., Togo, A., Bellali, S., Bachar, D., Cassir, N., Bittar, F., Delerce, J., Mailhe, M., Ricaboni, D., Bilen, M., Dangui Nieko, N.P.M., Dia Badiane, N.M., Valles, C., Mouelhi, D., Diop, K., Million, M., Musso, D., Abrahão, J., Azhar, E.I., Bibi, F., Yasir, M., Diallo, A., Sokhna, C., Djossou, F., Vitton, V., Robert, C., Rolain, J.M., La Scola, B., Fournier, P.-E., Levasseur, A., Raoult, D., 2016. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat. Microbiol.* 1, 16203. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.203>
- Lamont, R.J., El-Sabaeny, A., Park, Y., Cook, G.S., Costerton, J.W., Demuth, D.R., 2002. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology* 148, 1627–1636. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1627>
- Landman, C., Grill, J.-P., Mallet, J.-M., Marteau, P., Humbert, L., Le Balc'h, E., Maubert, M.-A., Perez, K., Chaara, W., Brot, L., Beaugerie, L., Sokol, H., Thenet, S., Rainteau, D., Seksik, P., Quévrain, E., on behalf of the Saint Antoine IBD Network, 2018. Inter-kingdom effect on epithelial cells of the N-Acyl homoserine lactone 3-oxo-C12:2, a major quorum-sensing molecule from gut microbiota. *PLoS ONE* 13, e0202587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202587>
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., Altier, C., 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA: Short-chain fatty acids and *Salmonella* invasion. *Mol. Microbiol.* 46, 1451–1464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H.B., Juncker, A.S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E.G., Brunak, S., Clément, K., Doré, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., de Vos, W.M., Zucker, J.-D., Raes, J., Hansen, T., MetaHIT consortium, Guedon, E., Delorme, C., Layec, S., Khaci, G., van de Guchte, M., Vandemeulebrouck, G., Jamet, A., Dervyn, R., Sanchez, N., Maguin, E., Haimet, F., Winogradski, Y., Cultrone, A., Leclerc, M., Juste, C., Blottière, H., Pelletier, E., LePaslier, D., Artiguenave, F., Bruls, T., Weissenbach, J., Turner, K., Parkhill, J., Antolin, M., Manichanh, C., Casellas, F., Boruel, N., Varela, E., Torrejon, A., Guarner, F., Denariáz, G., Derrien, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Veiga, P., Oozeer, R., Knol, J., Rescigno, M., Brechot, C., M'Rini, C., Mérieux, A., Yamada, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S.D., Pedersen, O., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- Lederberg, J., McCray, A.T., 2001. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 17, 8.
- Lee, B., Moon, K.M., Kim, C.Y., 2018. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J. Immunol. Res.* 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
- Leiva-Gea, I., Sánchez-Alcoholado, L., Martín-Tejedor, B., Castellano-Castillo, D., Moreno-Indias, I., Urda-Cardona, A., Tinahones, F.J., Fernández-García, J.C., Queipo-Ortuño, M.I., 2018. Gut Microbiota Differs in Composition and Functionality Between Children With Type 1 Diabetes and MODY2 and Healthy Control Subjects: A Case-Control Study. *Diabetes Care* 41, 2385–2395. <https://doi.org/10.2337/dc18-0253>
- Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A.-S., Dagorn, A., Connil, N., Chevalier, S., Orange, N., Feuilletoy, M., 2009. Gram-Negative Bacterial Sensors for Eukaryotic Signal Molecules. *Sensors* 9, 6967–6990. <https://doi.org/10.3390/s90906967>
- Letunic, I., Bork, P., 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Leung, T.L.F., Poulin, R., 2008. Parasitism, Commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie Milieu* 52, 107–115.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, A.L., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 102, 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A.S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, Juan, Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J.Y., Edris, S., Yang, H., Wang, Jian, Hansen, T., Nielsen, H.B., Brunak, S.,

- Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Doré, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., Wang, Jun, 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 32, 834–841. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>
- Li, M., Wang, S., Li, Y., Zhao, M., Kuang, J., Liang, D., Wang, J., Wei, M., Rajani, C., Ma, X., Tang, Y., Ren, Z., Chen, T., Zhao, A., Hu, C., Shen, C., Jia, Weiping, Liu, P., Zheng, X., Jia, Wei, 2022. Gut microbiota-bile acid crosstalk contributes to the rebound weight gain after calorie restriction in mice. *Nat. Commun.* 13, 2060. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29589-7>
- Li, Q., Chang, Y., Zhang, K., Chen, H., Tao, S., Zhang, Z., 2020. Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China. *Sci. Rep.* 10, 5450. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62224-3>
- Liang, S., Wu, X., Hu, X., Wang, T., Jin, F., 2018. Recognizing Depression from the Microbiota–Gut–Brain Axis. *Int. J. Mol. Med.* 19, 1592. <https://doi.org/10.3390/ijms19061592>
- Ligthart, K., Belzer, C., de Vos, W.M., Tytgat, H.L.P., 2020. Bridging Bacteria and the Gut: Functional Aspects of Type IV Pili. *Trends Microbiol.* 28, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.003>
- Liu, R., Hong, J., Xu, Xiaoqiang, Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., Shi, J., Zhao, S., Liu, W., Wang, Xiaokai, Xia, H., Liu, Z., Cui, B., Liang, P., Xi, L., Jin, J., Ying, X., Wang, Xiaolin, Zhao, X., Li, W., Jia, H., Lan, Z., Li, F., Wang, R., Sun, Y., Yang, M., Shen, Y., Jie, Z., Li, J., Chen, X., Zhong, H., Xie, H., Zhang, Y., Gu, W., Deng, X., Shen, B., Xu, Xun, Yang, H., Xu, G., Bi, Y., Lai, S., Wang, Jian, Qi, L., Madsen, L., Wang, Jiqiu, Ning, G., Kristiansen, K., Wang, W., 2017. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat. Med.* 23, 859–868. <https://doi.org/10.1038/nm.4358>
- Lock, J.Y., Carlson, T.L., Wang, C.-M., Chen, A., Carrier, R.L., 2018. Acute Exposure to Commonly Ingested Emulsifiers Alters Intestinal Mucus Structure and Transport Properties. *Sci. Rep.* 8, 10008. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27957-2>
- Long, S.L., Gahan, C.G.M., Joyce, S.A., 2017. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 56, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.002>
- Lopetuso, L.R., Petito, V., Graziani, C., Schiavoni, E., Paroni Sterbini, F., Poscia, A., Gaetani, E., Franceschi, F., Cammarota, G., Sanguinetti, M., Masucci, L., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, A., 2018. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig. Dis.* 36, 56–65. <https://doi.org/10.1159/000477205>
- Louis, P., Duncan, S.H., Sheridan, P.O., Walker, A.W., Flint, H.J., 2022. Microbial lactate utilisation and the stability of the gut microbiome. *Gut Microbes* 3, e3. <https://doi.org/10.1017/gmb.2022.3>
- Lu, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Shang, C., Xiang, M., Li, L., Cui, X., 2022. Microbiota-derived short-chain fatty acids: Implications for cardiovascular and metabolic disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 9, 900381. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.900381>
- Lv, K., Yuan, Q., Li, H., Li, T., Ma, H., Gao, C., Zhang, S., Liu, Y., Zhao, L., 2022. *Chlorella pyrenoidosa* Polysaccharides as a Prebiotic to Modulate Gut Microbiota: Physicochemical Properties and Fermentation Characteristics In Vitro. *Foods* 11, 725. <https://doi.org/10.3390/foods11050725>
- Lynch, J.B., Hsiao, E.Y., 2019. Microbiomes as sources of emergent host phenotypes. *Science* 365, 1405–1409. <https://doi.org/10.1126/science.aay0240>
- Lyte, M., Ernst, S., 1992. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sciences* 50, 203–212. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90273-R](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90273-R)
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Poeso, S., Navarrete, P., Balamurugan, R., 2020. The *Firmicutes/Bacteroidetes* Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 12, 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Maioli, T.U., Borrás-Nogues, E., Torres, L., Barbosa, S.C., Martins, V.D., Langella, P., Azevedo, V.A., Chatel, J.-M., 2021. Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders. *Front. Pharmacol.* 12, 740636. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.740636>
- Marchesi, J.R., Ravel, J., 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F., 2015. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/905215>
- Matijašić, M., Meštrović, T., Čipčić Paljetak, H., Perić, M., Barešić, A., Verbanac, D., 2020. Gut Microbiota beyond Bacteria—Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2668. <https://doi.org/10.3390/ijms21082668>
- Matos, J., Matos, I., Calha, M., Santos, P., Duarte, I., Cardoso, Y., Faleiro, M.L., 2021. Insights from *Bacteroides* Species in Children with Type 1 Diabetes. *Microorganisms* 9, 1436.

- <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071436>
- McFarland, L.V., 2015. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* 60, S85–S90. <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>
- Merenstein, D., El-Nachef, N., Lynch, S.V., 2014. Fecal Microbial Therapy: Promises and Pitfalls. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59, 157–161. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000415>
- Metzker, M.L., 2005. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.* 15, 1767–1776. <https://doi.org/10.1101/gr.3770505>
- Mihajlovic, J., Bechon, N., Ivanova, C., Chain, F., Almeida, A., Langella, P., Beloin, C., Ghigo, J.-M., 2019. A Putative Type V Pilus Contributes to *Bacteroides thetaiotaomicron* Biofilm Formation Capacity. *J. Bacteriol.* 201. <https://doi.org/10.1128/JB.00650-18>
- Mills, E.L., Pierce, K.A., Jedrychowski, M.P., Garrity, R., Winther, S., Vidoni, S., Yoneshiro, T., Spinelli, J.B., Lu, G.Z., Kazak, L., Banks, A.S., Haigis, M.C., Kajimura, S., Murphy, M.P., Gygi, S.P., Clish, C.B., Chouchani, E.T., 2018. Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* 560, 102–106. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0353-2>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodtkorb, A., 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O’Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., 1974. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology* 27, 961–979. <https://doi.org/10.1128/am.27.5.961-979.1974>
- Morais, L.H., Schreiber, H.L., Mazmanian, S.K., 2021. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Moreno-Arrones, O.M., Serrano-Villar, S., Perez-Brocal, V., Saceda-Corralo, D., Morales-Raya, C., Rodrigues-Barata, R., Moya, A., Jaen-Olasolo, P., Vano-Galvan, S., 2020. Analysis of the gut microbiota in alopecia areata: identification of bacterial biomarkers. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 34, 400–405. <https://doi.org/10.1111/jdv.15885>
- Mukherjee, S., Bassler, B.L., 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Nagano, K., Hasegawa, Y., Abiko, Y., Yoshida, Y., Murakami, Y., Yoshimura, F., 2012. *Porphyromonas gingivalis* FimA Fimbriae: Fimbrial Assembly by fimA Alone in the fim Gene Cluster and Differential Antigenicity among fimA Genotypes. *PLoS ONE* 7, e43722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043722>
- Nagano, K., Hasegawa, Y., Yoshida, Y., Yoshimura, F., 2015. A Major Fimbriin Variant of Mfa1 Fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.* 94, 1143–1148. <https://doi.org/10.1177/0022034515588275>
- Nakano, V., Piazza, R.M.F., Cianciarullo, A.M., Bueris, V., Santos, M.F., Menezes, M.A., Mendes-Ledesma, M.R.B., Szulczewski, V., Elias, W.P., Pumbwe, L., Wexler, H., Avila-Campos, M.J., 2008. Adherence and invasion of *Bacteroidales* isolated from the human intestinal tract. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 955–963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02069.x>
- Namsolleck, P., Thiel, R., Lawson, P., Holmstrøm, K., Rajilic, M., Vaughan, E.E., Rigottier-Gois, L., Collins, M.D., de Vos, W.M., Blaut, M., 2004. Molecular methods for the analysis of gut microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* 16, 71–85. <https://doi.org/10.1080/08910600410032367>
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 390, 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Nicco, C., Paule, A., Konturek, P., Edeas, M., 2020. From Donor to Patient: Collection, Preparation and Cryopreservation of Fecal Samples for Fecal Microbiota Transplantation. *Diseases* 8, 9. <https://doi.org/10.3390/diseases8020009>
- Nie, L., Cai, S.-Y., Shao, J.-Z., Chen, J., 2018. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. *Front. Immunol.* 9, 1523. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01523>
- Nikolaev, Yu.A., Plakunov, V.K., 2007. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76, 125–138. <https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>

- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J., Abe, F., Osawa, R., 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 16, 90. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>
- O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Ohshima, H., 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 62, 47. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00279-Y](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00279-Y)
- O'Keefe, S.J.D., 2016. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 691–706. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.165>
- O'Toole, P.W., Marchesi, J.R., Hill, C., 2017. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* 2, 17057. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
- Ott, S.J., Waetzig, G.H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J.A., Cassidy, L., Tholey, A., Fickenscher, H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Schreiber, S., 2017. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* 152, 799–811.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010>
- Ouyang, M.-Z., Zhou, D., Zhu, Y., Zhang, M., Li, L., 2017. The inhibition of MyD88 and TRIF signaling serve equivalent roles in attenuating myocardial deterioration due to acute severe inflammation. *Int. J. Mol. Med.* <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3239>
- Pagnout, C., Sohm, B., Razafitianamaharavo, A., Caillet, C., Offroy, M., Leduc, M., Gendre, H., Jomini, S., Beaussart, A., Bauda, P., Duval, J.F.L., 2019. Pleiotropic effects of rfa-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Sci. Rep.* 9, 9696. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46100-3>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S.C., Colombel, J.-F., 2018. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 67, 574–587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Papanicolas, L.E., Choo, J.M., Wang, Y., Leong, L.E.X., Costello, S.P., Gordon, D.L., Wesselingh, S.L., Rogers, G.B., 2019. Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine* 41, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.023>
- Papenfort, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Paracer, S., Ahmadjian, V., Ahmadjian, V., 2000. Symbiosis: an introduction to biological associations, 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Parker, K.D., Maurya, A.K., Ibrahim, H., Rao, S., Hove, P.R., Kumar, D., Kant, R., Raina, B., Agarwal, R., Kuhn, K.A., Raina, K., Ryan, E.P., 2021. Dietary Rice Bran-Modified Human Gut Microbial Consortia Confers Protection against Colon Carcinogenesis Following Fecal Transfaunation. *Biomedicines* 9, 144. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020144>
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F., Manichanh, C., 2017. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 66, 813–822. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313235>
- Patrick, S., Blakely, G.W., Houston, S., Moore, J., Abratt, V.R., Bertalan, M., Cerdeño-Tárraga, A.M., Quail, M.A., Corton, N., Corton, C., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Bentley, S.D., Parkhill, J., 2010. Twenty-eight divergent polysaccharide loci specifying within- and amongst-strain capsule diversity in three strains of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* 156, 3255–3269. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042978-0>
- Patrick, S., Parkhill, J., McCoy, L.J., Lennard, N., Larkin, M.J., Collins, M., Sczaniecka, M., Blakely, G., 2003. Multiple inverted DNA repeats of *Bacteroides fragilis* that control polysaccharide antigenic variation are similar to the hin region inverted repeats of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 149, 915–924. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26166-0>
- Peixoto, R.J.M., Miranda, K.R., Ferreira, E.O., de Paula, G.R., Rocha, E.R., Lobo, L.A., Domingues, R.M.C.P., 2014. Production of AI-2 is mediated by the *S*-ribosylhomocystein lyase gene *lux S* in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides vulgatus*: Quorum sensing via *lux S* in *B. fragilis* and *B. vulgatus*. *J. Basic Microbiol.* 54, 644–649. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300311>
- Pena, R.T., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernández-García, L., López, M., Bleriot, I., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T.K., Tomás, M., 2019. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front. Microbiol.* 10, 1100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01100>
- Peng, L., Li, Z.-R., Green, R.S., Holzman, I.R., Lin, J., 2009. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J. Nutr.* 139, 1619–1625. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>

- Pérez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A., De Antoni, G.L., 1998. Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 21–26. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.21-26.1998>
- Peroni, D.G., Nuzzi, G., Trambusti, I., Di Cicco, M.E., Comberiati, P., 2020. Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases. *Front. Immunol.* 11, 700. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00700>
- Peterson, G., Kumar, A., Gart, E., Narayanan, S., 2011. Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microb. Pathog.* 51, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.03.002>
- Pfalzer, A.C., Nesbeth, P.-D.C., Parnell, L.D., Iyer, L.K., Liu, Z., Kane, A.V., Chen, C.-Y.O., Tai, A.K., Bowman, T.A., Obin, M.S., Mason, J.B., Greenberg, A.S., Choi, S.-W., Selhub, J., Paul, L., Crott, J.W., 2015. Diet- and Genetically-Induced Obesity Differentially Affect the Fecal Microbiome and Metabolome in Apc1638N Mice. *PLoS ONE* 10, e0135758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135758>
- Pickard, J.M., Zeng, M.Y., Caruso, R., Núñez, G., 2017. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol. Rev.* 279, 70–89. <https://doi.org/10.1111/immr.12567>
- Pizarroso, N., Fuciños, P., Gonçalves, C., Pastrana, L., Amado, I., 2021. A Review on the Role of Food-Derived Bioactive Molecules and the Microbiota–Gut–Brain Axis in Satiety Regulation. *Nutrients* 13, 632. <https://doi.org/10.3390/nu13020632>
- Playford, R.J., Choudhry, N., Kelly, P., Marchbank, T., 2021. Effects of Bovine Colostrum with or without Egg on In Vitro Bacterial-Induced Intestinal Damage with Relevance for SIBO and Infectious Diarrhea. *Nutrients* 13, 1024. <https://doi.org/10.3390/nu13031024>
- Plé, C., Breton, J., Richoux, R., Nurdin, M., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Hervé, C., Chuat, V., Lemée, R., Maguin, E., Jan, G., Van de Guchte, M., Foligné, B., 2016. Combining selected immunomodulatory *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus delbrueckii* strains: Reverse engineering development of an anti-inflammatory cheese. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 935–948. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500580>
- Polak-Berecka, M., Waško, A., Paduch, R., Skrzypek, T., Sroka-Bartnicka, A., 2014. The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 751–762. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0245-x>
- Prazdnova, E.V., Gorovtsov, A.V., Vasilchenko, N.G., Kulikov, M.P., Statsenko, V.N., Bogdanova, A.A., Refeld, A.G., Brislavskiy, Y.A., Chistyakov, V.A., Chikindas, M.L., 2022. Quorum-Sensing Inhibition by Gram-Positive Bacteria. *Microorganisms* 10, 350. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020350>
- Pruzzo, C., Dainelli, B., Ricchetti, M., 1984. Piliated *Bacteroides fragilis* Strains Adhere to Epithelial Cells and Are More Sensitive to Phagocytosis by Human Neutrophils Than Nonpiliated Strains. *Infect. Immun.* 43, 189–194. <https://doi.org/10.1128/iai.43.1.189-194.1984>
- Pumbwe, L., Skilbeck, C.A., Wexler, H.M., 2008. Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb. Ecol.* 56, 412–419. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9358-3>
- Pumbwe, L., Skilbeck, C.A., Wexler, H.M., 2006. The *Bacteroides fragilis* cell envelope: Quarterback, linebacker, coach—or all three? *Anaerobe* 12, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.09.004>
- Qin, D., Bai, Y., Li, Y., Huang, Y., Li, L., Wang, G., Qu, Y., Wang, J., Yu, L.-Y., Hou, X., 2022. Changes in Gut Microbiota by the *Lactobacillus casei* Anchoring the K88 Fimbrial Protein Prevented Newborn Piglets From Clinical Diarrhea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 842007. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.842007>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, Shengting, Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., Wang, Jian, Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, Jun, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quaiser, A., Dufresne, A., Ballaud, F., Roux, S., Zivanovic, Y., Colombet, J., Sime-Ngando, T., Francez, A.-J., 2015. Diversity and comparative genomics of *Microviridae* in Sphagnum- dominated peatlands. *Front. Microbiol.* 6, 375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00375>
- Quesada-Gómez, C., Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., 2013. Scarce detection of mobile erm genes associated with tetQ in *Bacteroides* and *Parabacteroides* from Costa Rica. *Anaerobe* 21, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.006>

- Raetz, C.R.H., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Ranaivo, H., Thirion, F., Béra-Maillet, C., Guilly, S., Simon, C., Sothier, M., Van Den Berghe, L., Feugier-Favier, N., Lambert-Porcheron, S., Dussous, I., Roger, L., Roume, H., Galleron, N., Pons, N., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., Laville, M., Doré, J., Nazare, J.-A., 2022. Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. *Gut Microbes* 14, 2044722. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044722>
- Rehman, Z.U., Leiknes, T., 2018. Quorum-Quenching Bacteria Isolated From Red Sea Sediments Reduce Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 9, 1354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01354>
- Reygnier, J., Charrueau, C., Delannoy, J., Mayeur, C., Robert, V., Cuinat, C., Meylheuc, T., Mauras, A., Augustin, J., Nicolis, I., Modoux, M., Joly, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Thomas, M., Kapel, N., 2020. Freeze-dried fecal samples are biologically active after long-lasting storage and suited to fecal microbiota transplantation in a preclinical murine model of *Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes* 11, 1405–1422. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1759489>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., Mele, M., 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salazar, N., 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front. Microbiol.* 7, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Roberts, A., Matthews, J.B., Socransky, S.S., Freestone, P.P.E., Williams, P.H., Chapple, I.L.C., 2002. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*. *Oral microbiol. immunol.* 17, 296–303. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2002.170506.x>
- Rocha, E.R., Smith, C.J., 1995. Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 177, 3111–3119. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3111-3119.1995>
- Rolfe, R.D., 1984. Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 45, 185–191. <https://doi.org/10.1128/iai.45.1.185-191.1984>
- Romerio, A., Peri, F., 2020. Increasing the Chemical Variety of Small-Molecule-Based TLR4 Modulators: An Overview. *Front. Immunol.* 11, 1210. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01210>
- Roy, U., Gálvez, E.J.C., Iljazovic, A., Lesker, T.R., Błażejowski, A.J., Pils, M.C., Heise, U., Huber, S., Flavell, R.A., Strowig, T., 2017. Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells. *Cell Rep.* 21, 994–1008. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.097>
- Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., Gil, A., 2015. The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/505878>
- Saito, T., Inagaki, S., Sakurai, K., Okuda, K., Ishihara, K., 2011. Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity. *Arch. Oral Biol.* 56, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.09.014>
- Sakamoto, M., Benno, Y., 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1599–1605. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64192-0>
- Salonen, A., Salojärvi, J., Lahti, L., de Vos, W.M., 2012. The adult intestinal core microbiota is determined by analysis depth and health status. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 16–20. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03855.x>
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Santhakumari, S., Ravi, A.V., 2019. Targeting quorum sensing mechanism: An alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. *S. Afr. J. Bot.* 120, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.028>
- Sarkodie, E.K., Zhou, S., Baidoo, S.A., Chu, W., 2019. Influences of stress hormones on microbial infections. *Microb. Pathog* 131, 270–276.

- <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.013>
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M.J., Rhodes, R.G., Nakayama, K., 2010. A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 276–281. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912010107>
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., Hardt, P.D., 2010. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* 18, 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 90, 46. <https://doi.org/doi:10.1152/physrev.00045.2009>
- Senan, S., Prajapati, J.B., Joshi, C.G., 2015. Feasibility of Genome-Wide Screening for Biosafety Assessment of Probiotics: A Case Study of *Lactobacillus helveticus* MTCC 5463. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 249–258. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9199-1>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164, 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Sethi, J.K., Hotamisligil, G.S., 2021. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat. Metab.* 3, 1302–1312. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00470-z>
- Sichtig, H., Minogue, T., Yan, Y., Stefan, C., Hall, A., Tallon, L., Sadzewicz, L., Nadendla, S., Klimke, W., Hatcher, E., Shumway, M., Aldea, D.L., Allen, J., Koehler, J., Slezak, T., Lovell, S., Schoepp, R., Scherf, U., 2019. FDA-ARGOS is a database with public quality-controlled reference genomes for diagnostic use and regulatory science. *Nat. Commun.* 10, 3313. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11306-6>
- Silva, Y.P., Bernardi, A., Frozza, R.L., 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front. Endocrinol.* 11, 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Simon, J.-C., Marchesi, J.R., Mougél, C., Selosse, M.-A., 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7, 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
- Siopi, E., Chevalier, G., Katsimpardi, L., Saha, S., Bigot, M., Moigneu, C., Eberl, G., Lledo, P.-M., 2020. Changes in Gut Microbiota by Chronic Stress Impair the Efficacy of Fluoxetine. *Cell Rep.* 30, 3682–3690. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.099>
- Sivaprakasam, S., Prasad, P.D., Singh, N., 2016. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* 164, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.007>
- Sohn, M.B., An, L., Pookhao, N., Li, Q., 2014. Accurate genome relative abundance estimation for closely related species in a metagenomic sample. *BMC Bioinform.* 15, 242. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-242>
- Song, H., Shen, X., Chu, Q., Zheng, X., 2022. Pomegranate fruit pulp polyphenols reduce diet-induced obesity with modulation of gut microbiota in mice. *J. Sci. Food Agric.* 102, 1968–1977. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11535>
- Strandwitz, P., 2018. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 1693, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>
- Strandwitz, P., Kim, K.H., Terekhova, D., Liu, J.K., Sharma, A., Levering, J., McDonald, D., Dietrich, D., Ramadhar, T.R., Lekbua, A., Mroue, N., Liston, C., Stewart, E.J., Dubin, M.J., Zengler, K., Knight, R., Gilbert, J.A., Clardy, J., Lewis, K., 2019. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat. Microbiol.* 4, 396–403. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0307-3>
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.-J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999>
- Sun, Y., O’Riordan, M.X.D., 2013. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 93–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00003-4>
- Talham, G.L., Jiang, H.-Q., Bos, N.A., Cebra, J.J., 1999. Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System. *Infect Immun* 67, 1992–2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.4.1992-2000.1999>
- Tasse, J., Cara, A., Saglio, M., Villet, R., Laurent, F., 2018. A steam-based method to investigate biofilm. *Sci. Rep.* 8, 13040. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31437-y>
- Terveer, E.M., van Beurden, Y.H., Goorhuis, A., Seegers, J.F.M.L., Bauer, M.P., van Nood, E., Dijkgraaf, M.G.W., Mulder, C.J.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Verspaget, H.W., Keller, J.J., Kuijper, E.J., 2017. How to: Establish and run a stool bank. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 924–930. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.015>

- Thewes, N., Loskill, P., Jung, P., Peisker, H., Bischoff, M., Herrmann, M., Jacobs, K., 2014. Hydrophobic interaction governs unspecific adhesion of *staphylococci*: a single cell force spectroscopy study. *Beilstein J. Nanotechnol.* 5, 1501–1512. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.163>
- Thirion, F., Da Silva, K., Plaza Oñate, F., Alvarez, A., Thabuis, C., Pons, N., Berland, M., Le Chatelier, E., Galleron, N., Levenez, F., Vergara, C., Chevallier, H., Guérin-Deremau, L., Doré, J., Ehrlich, S.D., 2022. Diet Supplementation with NUTRIOSE, a Resistant Dextrin, Increases the Abundance of *Parabacteroides distasonis* in the Human Gut. *Mol. Nutr. Food Res.* 66, 2101091. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202101091>
- Thomas, C.M., Hong, T., van Pijkeren, J.P., Hemarajata, P., Trinh, D.V., Hu, W., Britton, R.A., Kalkum, M., Versalovic, J., 2012. Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PLoS ONE* 7, e31951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031951>
- Thompson, R.S., Gaffney, M., Hopkins, S., Kelley, T., Gonzalez, A., Bowers, S.J., Vitaterna, M.H., Turek, F.W., Foxx, C.L., Lowry, C.A., Vargas, F., Dorrestein, P.C., Wright, K.P., Knight, R., Fleshner, M., 2021. *Ruminiclostridium 5*, *Parabacteroides distasonis*, and bile acid profile are modulated by prebiotic diet and associate with facilitated sleep/clock realignment after chronic disruption of rhythms. *Brain Behav. Immun.* 97, 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.07.006>
- Thornton, R.F., Murphy, E.C., Kagawa, T.F., O’Toole, P.W., Cooney, J.C., 2012. The effect of environmental conditions on expression of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* C10 protease genes. *BMC Microbiol.* 12, 190. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-190>
- Thum, C., Cookson, A.L., Otter, D.E., McNabb, W.C., Hodgkinson, A.J., Dyer, J., Roy, N.C., 2012. Can Nutritional Modulation of Maternal Intestinal Microbiota Influence the Development of the Infant Gastrointestinal Tract? *The Journal of Nutrition* 142, 1921–1928. <https://doi.org/10.3945/jn.112.166231>
- Thursby, E., Juge, N., 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Todorov, S.D., Kang, H.-J., Ivanova, I.V., Holzapfel, W.H., 2020. Bacteriocins From LAB and Other Alternative Approaches for the Control of *Clostridium* and *Clostridiodes* Related Gastrointestinal Colitis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 581778. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.581778>
- Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Bossier, P., 2018. Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri* in vitro and an in vivo evaluation in rainbow trout. *J. Fish Dis.* 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfd.12934>
- Turkina, M.V., Vikström, E., 2019. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Innate Immun.* 11, 263–279. <https://doi.org/10.1159/000494069>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Turroni, S., Magnani, M., Kc, P., Lesnik, P., Vidal, H., Heer, M., 2020. Gut Microbiome and Space Travelers’ Health: State of the Art and Possible Pro/Prebiotic Strategies for Long-Term Space Missions. *Front. Physiol.* 11, 553929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.553929>
- Tytgat, H.L.P., van Teijlingen, N.H., Sullan, R.M.A., Douillard, F.P., Rasinkangas, P., Messing, M., Reunanen, J., Satokari, R., Vanderleyden, J., Dufrene, Y.F., Geijtenbeek, T.B.H., de Vos, W.M., Lebeer, S., 2016. Probiotic Gut Microbiota Isolate Interacts with Dendritic Cells via Glycosylated Heterotrimeric Pili. *PLoS ONE* 11, e0151824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151824>
- Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., Le Fèvre, F., Longin, C., Mornico, D., Roche, D., Rouy, Z., Salvignol, G., Scarpelli, C., Thil Smith, A.A., Weiman, M., Médigue, C., 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res.* 41, D636–D647. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1194>
- van Belkum, A., Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., Koeleman, H., 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1537–1547. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.6.1537-1547.1995>
- Vargas García, C.E., Petrova, M., Claes, I.J.J., De Boeck, I., Verhoeven, T.L.A., Dilissen, E., von Ossowski, I., Palva, A., Bullens, D.M., Vanderleyden, J., Lebeer, S., 2015. Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG Promotes Adhesion, Phagocytosis, and Cytokine Modulation in Macrophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2050–2062. <https://doi.org/10.1128/AEM.03949-14>
- Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R., 1991.

- Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Vich Vila, A., Imhann, F., Collij, V., Jankipersadsing, S.A., Gurry, T., Mujagic, Z., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Jiang, X., Tigchelaar, E.F., Dekens, J., Peters, V., Voskuil, M.D., Visschedijk, M.C., van Dullemen, H.M., Keszthelyi, D., Swertz, M.A., Franke, L., Alberts, R., Festen, E.A.M., Dijkstra, G., Masclee, A.A.M., Hofker, M.H., Xavier, R.J., Alm, E.J., Fu, J., Wijmenga, C., Jonkers, D.M.A.E., Zhernakova, A., Weersma, R.K., 2018. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Sci. Transl. Med.* 10, eaap8914. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap8914>
- Vitellio, P., Celano, G., Bonfrate, L., Gobbetti, M., Portincasa, P., De Angelis, M., 2019. Effects of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus* on Gut Microbiota in Patients with Lactose Intolerance and Persisting Functional Gastrointestinal Symptoms: A Randomised, Double-Blind, Cross-Over Study. *Nutrients* 11, 886. <https://doi.org/10.3390/nu11040886>
- Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P., Beck, P.L., 1989. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96, 29–36. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)90760-9](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)90760-9)
- Wang, H.-X., Wang, Y.-P., 2016. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin. Med. J.* 129, 2373–2380. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190667>
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S.-J., Liu, H., 2019. *Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Rep.* 26, 222–235.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028>
- Wang, N., Ma, S., Fu, L., 2022. Gut Microbiota Feature of Senile Osteoporosis by Shallow Shotgun Sequencing Using Aged Rats Model. *Genes* 13, 619. <https://doi.org/10.3390/genes13040619>
- Wang, X., Conway, P.L., Brown, I.L., Evans, A.J., 1999. *In Vitro* Utilization of Amylopectin and High-Amylose Maize (Amylomaize) Starch Granules by Human Colonic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4848–4854. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4848-4854.1999>
- Wang, Y., Liu, B., Grenier, D., Yi, L., 2019. Regulatory Mechanisms of the LuxS/AI-2 System and Bacterial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e01186-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01186-19>
- Weimer, S.B., Matthews, M.R., Caruso, D.M., Foster, K.N., 2017. Retroperitoneal Necrotizing Fasciitis from Fournier’s Gangrene in an Immunocompromised Patient. *Case Rep. Surg.* 2017, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2017/5290793>
- Wexler, H.M., 2007. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>
- Wilson, M., 2004. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*, 1st ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511735080>
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Wong, A.C.N., Vanhove, A.S., Watnick, P.I., 2016. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Dis. Model. Mech.* 9, 271–281. <https://doi.org/10.1242/dmm.023408>
- Wu, H., Tremaroli, V., Schmidt, C., Lundqvist, A., Olsson, L.M., Krämer, M., Gummesson, A., Perkins, R., Bergström, G., Bäckhed, F., 2020. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab.* 32, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.011>
- Xiang, H., Gan, J., Zeng, D., Li, J., Yu, H., Zhao, H., Yang, Y., Tan, S., Li, G., Luo, C., Xie, Z., Zhao, G., Li, H., 2021. Specific Microbial Taxa and Functional Capacity Contribute to Chicken Abdominal Fat Deposition. *Front. Microbiol.* 12, 643025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643025>
- Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S.B., Xia, Z., Qiu, X., Li, X., Long, H., Zhang, J., Zhang, D., Liu, C., Fang, Z., Chou, J., Glanville, J., Hao, Q., Kotowska, D., Colding, C., Licht, T.R., Wu, D., Yu, J., Sung, J.J.Y., Liang, Q., Li, J., Jia, H., Lan, Z., Tremaroli, V., Dworzynski, P., Nielsen, H.B., Bäckhed, F., Doré, J., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., Lin, J.C., Arumugam, M., Wang, J., Madsen, L., Kristiansen, K., 2015. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat. Biotechnol.* 33, 1103–1108. <https://doi.org/10.1038/nbt.3353>
- Xu, J., Mahowald, M.A., Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Martens, E.C., Hénrissat, B., Coutinho, P.M., Minx, P., Latreille, P., Cordum, H., Van Brunt, A., Kim, K., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Clifton, S.W., Wilson, R.K., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2007. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol* 5, e156. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050156>

- Xu, Q., Shoji, M., Shibata, S., Naito, M., Sato, K., Elsliger, M.-A., Grant, J.C., Axelrod, H.L., Chiu, H.-J., Farr, C.L., Jaroszewski, L., Knuth, M.W., Deacon, A.M., Godzik, A., Lesley, S.A., Curtis, M.A., Nakayama, K., Wilson, I.A., 2016. A Distinct Type of Pilus from the Human Microbiome. *Cell* 165, 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.016>
- Yanavich, C., Perazzo, H., Li, F., Tobin, N., Lee, D., Zabih, S., Morata, M., Almeida, C., Veloso, V.G., Grinsztejn, B., Aldrovandi, G.M., 2022. A pilot study of microbial signatures of liver disease in those with HIV mono-infection in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS* 36, 49–58. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003084>
- Yang, F., Kumar, A., Davenport, K.W., Kelliher, J.M., Ezeji, J.C., Good, C.E., Jacobs, M.R., Conger, M., West, G., Fiocchi, C., Cominelli, F., Dichosa, A.E.K., Rodriguez-Palacios, A., 2019. Complete Genome Sequence of a *Parabacteroides distasonis* Strain (CavFT hAR46) Isolated from a Gut Wall-Cavitating Microlesion in a Patient with Severe Crohn's Disease. *Microbiol. Resour. Announc.* 8, e00585-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00585-19>
- Yang, J., Wei, H., Zhou, Y., Szeto, C.-H., Li, C., Lin, Y., Coker, O.O., Lau, H.C.H., Chan, A.W.H., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2022. High-Fat Diet Promotes Colorectal Tumorigenesis Through Modulating Gut Microbiota and Metabolites. *Gastroenterology* 162, 135-149.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.08.041>
- Yang, J.-Y., Lee, Y.-S., Kim, Y., Lee, S.-H., Ryu, S., Fukuda, S., Hase, K., Yang, C.-S., Lim, H.S., Kim, M.-S., Kim, H.-M., Ahn, S.-H., Kwon, B.-E., Ko, H.-J., Kweon, M.-N., 2017. Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice. *Mucosal Immunol* 10, 104–116. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.42>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J., 2019. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *Int. J. Mol. Med.* 20, 3423. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Youssef, M., Ahmed, H.Y., Zongo, A., Korin, A., Zhan, F., Hady, E., Umair, M., Shahid Riaz Rajoka, M., Xiong, Y., Li, B., 2021. Probiotic Supplements: Their Strategies in the Therapeutic and Prophylactic of Human Life-Threatening Diseases. *Int. J. Mol. Med.* 22, 11290. <https://doi.org/10.3390/ijms222011290>
- Yue, S., Shan, B., Peng, C., Tan, C., Wang, Q., Gong, J., 2022. Theabrownin-targeted regulation of intestinal microorganisms to improve glucose and lipid metabolism in Goto-Kakizaki rats. *Food Funct.* 13, 1921–1940. <https://doi.org/10.1039/D1FO03374C>
- Zhang, J.-M., An, J., 2007. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhao, Q., Huang, J.-F., Cheng, Y., Dai, M.-Y., Zhu, W.-F., Yang, X.-W., Gonzalez, F.J., Li, F., 2021. Polyamine metabolism links gut microbiota and testicular dysfunction. *Microbiome* 9, 224. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01157-z>
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Tigchelaar, E.F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A.V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S.A., Joossens, M., Cenit, M.C., Deelen, P., Swertz, M.A., LifeLines cohort study, Weersma, R.K., Feskens, E.J.M., Netea, M.G., Gevers, D., Jonkers, D., Franke, L., Aulchenko, Y.S., Huttenhower, C., Raes, J., Hofker, M.H., Xavier, R.J., Wijmenga, C., Fu, J., 2016. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 352, 565–569. <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>
- Zhou, C., Zhao, H., Xiao, X., Chen, B., Guo, R., Wang, Q., Chen, H., Zhao, L., Zhang, Chen-chen, Jiao, Y., Ju, Y., Yang, H., Fei, Y., Wang, L., Shen, M., Li, H., Wang, X., Lu, X., Yang, B., Liu, J., Li, J., Peng, L., Zheng, W., Zhang, Chun-yan, Zhou, J.-X., Wu, Q., Yang, Y., Su, J., Shi, Q., Wu, D., Zhang, W., Zhang, F., Jia, H., Liu, D., Jie, Z., Zhang, X., 2020a. Metagenomic profiling of the pro-inflammatory gut microbiota in ankylosing spondylitis. *J. Autoimmun.* 107, 102360. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102360>
- Zhou, C., Zhao, H., Xiao, X., Chen, B., Guo, R., Wang, Q., Chen, H., Zhao, L., Zhang, Chen-chen, Jiao, Y., Ju, Y., Yang, H., Fei, Y., Wang, L., Shen, M., Li, H., Wang, X., Lu, X., Yang, B., Liu, J., Li, J., Peng, L., Zheng, W., Zhang, Chun-yan, Zhou, J.-X., Wu, Q., Yang, Y., Su, J., Shi, Q., Wu, D., Zhang, W., Zhang, F., Jia, H., Liu, D., Jie, Z., Zhang, X., 2020b. Metagenomic profiling of the pro-inflammatory gut microbiota in ankylosing spondylitis. *Journal of Autoimmunity* 107, 102360. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102360>
- Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., Pan, J., 2020. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 11, 589640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>
- Zhu, R., Tang, J., Xing, C., Nan, Q., Liang, G., Luo, J., Zhou, J., Miao, Y., Cao, Y., Dai, S., Lan, D., 2022. The Distinguishing Bacterial Features From Active and Remission Stages of Ulcerative Colitis Revealed by Paired Fecal Metagenomes. *Front. Microbiol.* 13, 883495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.883495>

Zhu, X., Han, Y., Du, J., Liu, R., Jin, K., Yi, W., 2017. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget* 8, 53829–53838. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17754>

Zitomersky, N.L., Atkinson, B.J., Franklin, S.W.,

Mitchell, P.D., Snapper, S.B., Comstock, L.E., Bousvaros, A., 2013. Characterization of Adherent *Bacteroidales* from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* 8, e63686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063686>

Annexe

Application de la méthode vapeur pour l'étude des biofilms des bactéries anaérobies

Application of the steam-washing method to anaerobic bacteria and fungi
biofilms

Jordan Chamarande, Lisiane Cunat, Marie Machouart, Corentine Alauzet, Anne
Debourgogne, Catherine Cailliez-Grimal

Note soumise dans *BMC Research notes*

Application de la méthode vapeur pour l'étude des biofilms des bactéries anaérobies

Abstract

Biofilm is becoming a major topic of interest in many fields including human health. Improving methods of biofilm quantification is essential in order to refine the result. To this purpose, Tasse *et al.*, developed a new technique using the steam as soft washing method to investigate aerobic bacteria biofilm. In this study, we demonstrated the application of this new washing method to a broader range of biofilm including anaerobic bacteria and fungi biofilms, by comparing it with the classical micropipette method described as an aggressive technique leading to a lack of reproducibility.

Results reveals a method that strongly reduce the detrimental effect of washing on measurements for both microorganism types. The steam washing can be coupled with the PBS-turbidity measurement for further investigation of strong-biofilm forming bacteria but does not seems to fit for all bacterial species. In conclusion, the steam-based method, as a soft washing method for biofilm study, is a method that can be easily implemented in every laboratory to study microorganism biofilms.

Keywords: biofilm; steam washing; PBS-turbidity; anaerobic bacteria; fungi

1. Introduction

The predominant mechanism for bacteria to colonize an environment is the formation of a biofilm. Development of a biofilm requires planktonic cells to reach a biotic or abiotic surface on which it can growth. The formation of the biofilm will then start with the adhesion of cells to the surface by the weak van der Waals and London dispersion forces and hydrophobic interactions. Microorganisms can then anchor to the surface using cell adhesion structure such as pili or fimbriae. The biofilm will then grow by cell division, cell recruitment and exopolysaccharide (EPS) matrix synthesis. EPS are mainly composed of polysaccharides, proteins, lipids, and nucleic acids. They allow the retention of water and nutrients and contribute to the overall scaffold and three-dimensional structure of a biofilm. Then, the biofilm enters its last stage corresponding to its degradation and dispersion that allow its propagation (Costerson, 1999; Costerson *et al.*, 1995; Nikolaev & Plakunov, 2007). The most spectacular property of biofilms is certainly the astonishing capacity for resistance that it provides to bacteria against external aggressions (temperature, pH, oxygen...) compared to organisms in planktonic state (Yin *et al.*, 2019). Biofilm is also defined as a virulence factor that provides resistance to

antimicrobials agents and to the host's immune system. Nowadays, studying biofilm is a major concern in many fields including human health.

The conventional technique used to separate planktonic cells from sessile bacteria during biofilm investigation is the micropipette-based method. This technique consists on washing the biofilm by pipetting in and off several times sterile PBS or physiological water from microplates to get rid of non-adherent or non-biofilm forming bacteria. However, this method is considered as an aggressive method leading to a lack of reproducibility (Azeredo et al., 2017). Recently, Tasse *et al.*, described a new method using the steam as soft washing method to study the bacterial biofilm (Tasse et al., 2018). Succinctly, the microplate on which biofilm has been grown are placed upside down above a source of steam and a cooling system is placed in contact with the bottom of the plate in order to favor condensation and maintain an acceptable temperature for bacteria. The vapor generated by the water-bath will then condensate and form water droplets that will accumulate in each well on the biofilm surface before falling down by gravity along with planktonic bacteria.

Intending to validate this promising method on a larger panel of species and organisms, we applied in this short communication the steam-based washing method on biofilm form by several species of anaerobic bacteria and fungi: *Parabacteroides distasonis* DSM 20701^T, *Bacteroides fragilis* 638R, *Clostridium perfringens* CIP 6060 for anaerobic bacteria and *Aspergillus fumigatus* ATCC 3626, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Fusarium solani* CBS 124631 for fungi. *Staphylococcus aureus* SH1000 has been used as control to validate the method.

2. Methods

In order to form biofilm, untreated, pyrogenic and polystyrene 96-wells microplates were inoculated with 10^7 CFU/mL of a bacterial suspension in Brain Heart Infusion (BHI) broth or 10^6 CFU/mL of a fungal suspension in Phosphate Buffer Saline (PBS). For bacterial cells, the cultures were incubated for 48 hours at 37 °C under anaerobic condition. For fungal cells, after a first adhesion step at 37 °C for 90 minutes, the PBS was removed and replaced by RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) complemented with MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid). Plates were then incubated at 37°C for 48 hours. For both type of cells, wells were washed, either three times by conventional pipetting method with PBS, or using the steam-based washing method for 40 minutes. The plates were then dried at 37 °C for 40 minutes and the biofilms stained with crystal violet (CV). A second washing step (pipetting or steam washing) and drying were then carried out in order to remove excess of CV. The stained cells

were then resuspended using 33 % (v/v) glacial acetic acid and analyzed by OD_{620nm} measurement using a plate reader (SpectreMax iD3, Molecular Device, USA). The survivability of cells to the heat generated by the steam washing method was also controlled by enumeration for bacterial cells or XTT staining (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) for fungal cells. For XTT assays, 100 μ l of XTT and menadione mixture (0.5 g/l and 1 mM, respectively) were prepared and added to each well. After 1 hour of incubation at 37 °C, an OD measurement was performed at 450 nm and 630 nm. The conversion of XTT was determined by subtracting the blank and the non-specific absorbance (OD_{630nm}) from the sample measurement (OD_{450nm}). Each experiment was repeated at least 30 times in five independent experiments (n = 5 × 30). These experiments have also been performed on *Staphylococcus aureus* SH1000 to validate the proper functioning of our installation by following the exact same protocol as described in Tasse *et al.*, 2018.

3. Results and discussion

The steam wash installation has been validated by *S. aureus* SH1000 biofilm investigation whose biofilm measurement has been strongly reduced after pipette washing compared to steam-based washing method (Figure 1). Concerning anaerobic bacteria, similar results have been observed with a significant reduction of biofilm amount after the use of the pipetting method compared to steam method for the three species studied. Variations in terms of biofilm formation between strains was expected as previously described (Chamarande *et al.*, 2021; de Sà Almeida *et al.*, 2020). These results confirm the possible use of the steam-washing for the study of anaerobic bacteria biofilms. For fungi biofilm, the pipetting method does not appear to be more aggressive for the biofilm. However, the steam-based washing method considerably reduce the standard deviations of the results that are comprised between 0.16 and 0.22 compared to 0.72 and 0.81 for the micropipette-based method, showing the benefits of using the steam-based washing method for the study of fungi biofilms.

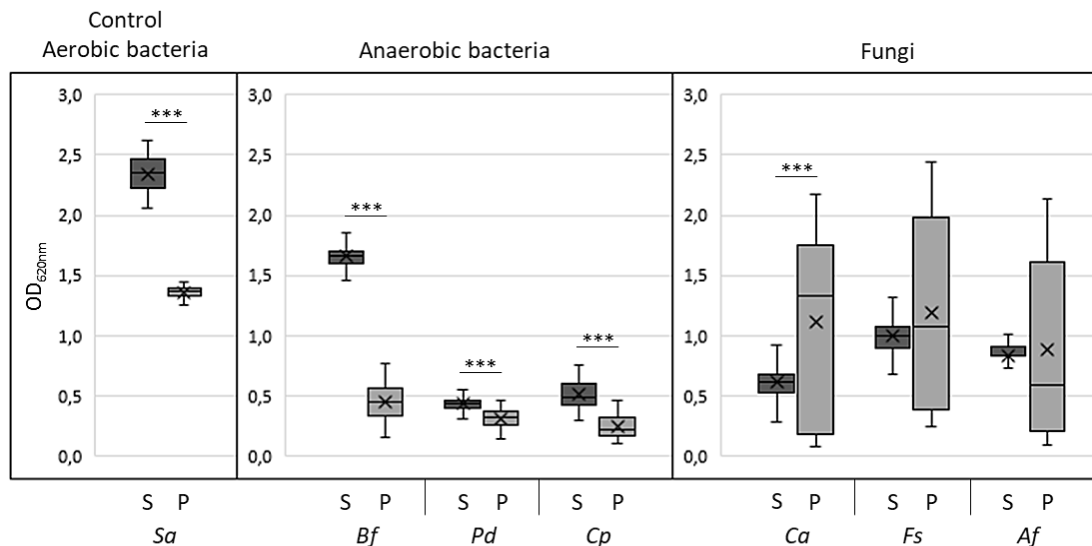


Figure 1. Biofilm quantification by CV (OD_{620nm}) after steam (S) or the pipette based-washing method (P) for *S. aureus* SH1000 (*Sa*), *B. fragilis* 638R (*Bf*), *P. distasonis* DSM 20701^T (*Pd*), *C. perfringens* CIP 6060 (*Cp*), *C. albicans* ATCC 90028 (*Ca*), *F. solani* CBS 124631 (*Fs*) and *A. fumigatus* ATCC 3626 (*Af*). *** represents values of $P < 0.001$, after Mann-Whitney U test.

The survivability of the tested species after the steam-washing was confirmed (Figure 2). Anaerobic bacteria enumeration follows the CV staining with a higher enumeration for *B. fragilis*, revealing the correlation between biofilm quantification and bacterial survival within the biofilm. In the same way, XTT staining for fungi survival revealed an inter-species variability with, as expected, a higher survivability for *F. solani* whose biofilm quantification by CV staining was higher. By consequences, steam-based washing can be used as soft washing method on anaerobic bacteria and fungi biofilms for further investigations requiring viable cells.

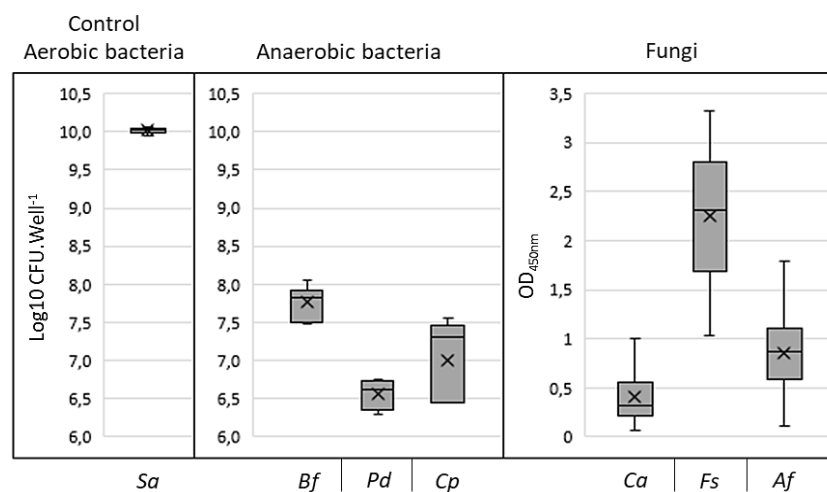


Figure 2. Viable cell quantification by enumeration for bacteria and XTT staining (OD_{450nm}) for fungi after steam-washing. Data are presented in boxplot form after 5 independent experiments performed in 30 replicates ($n = 5 \times 30$).

The measurement of the turbidity after resuspension of the biofilm in PBS, as an alternative to CV staining, was also performed on anaerobic bacteria biofilm. This technique, in addition to require less technical time and to reduce the number of wash needed to one, allow to continue the quantification by counting viable cells by enumeration and/or by qPCR, unlike the dye. This method, although functional, seems more suitable for organisms capable of forming important biofilms (Figure 3). Indeed, the turbidity measurement of *C. perfringens* biofilm appear to be really low compared to *P. distasonis* whose biofilm quantification was equivalent after CV staining and enumeration for both species. Moreover, PBS-turbidity measurement seems to increase the standard deviation as shown by the quantification of *B. fragilis* biofilm.

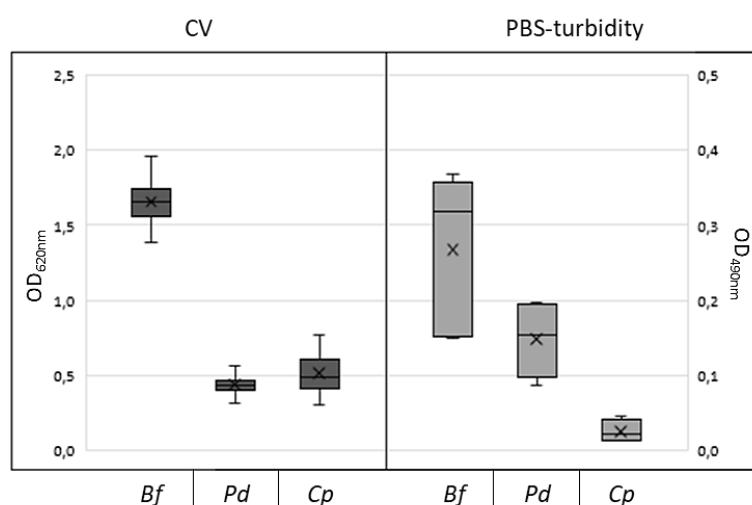


Figure 3. Biofilm quantification by CV staining (OD_{620nm}) or PBS-turbidity (OD_{490nm}) after steam-washing for *B. fragilis* 638R (*Bf*), *P. distasonis* DSM 20701^T (*Pd*) and *C. perfringens* CIP 6060 (*Cp*). Data are presented in boxplot after 5 independent experiments performed in 30 replicas ($n = 5 \times 30$).

4. Conclusion

In conclusion, the steam-based method, as a soft washing method for biofilm study, is a technique that can be easily implemented in every laboratory to study microorganism biofilms with a better repeatability and reproducibility. Moreover, this method reveals to be fully applicable to anaerobic bacteria by reducing detrimental effects of washing on the biofilm and to fungi biofilm by reducing the standard deviation of the results. It can be coupled with PBS-turbidity measurement for further investigation of strong-biofilm forming bacteria but does not seem to be appropriate for weaker-biofilm forming organism.

5. Limitations

While the present study confirms the possible application of the steam-washing method to anaerobic bacteria and fungi biofilm, limitations must be addressed. Although the steam-washing method appear to be fully applicable to the 3 tested bacterial and fungi species, these results does not permit to ensure the application of the steam-based washing method to all anaerobic bacteria and fungi species. Moreover, as highlighted in this study, the PBS-turbidity method seems more suitable for strong-biofilm forming bacteria. Thus, in order to ensure the application of the steam-washing and determine either CV staining or PBS-turbidity is better for a specific organism, additional experiments should be performed prior to the final trials

References

- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2017. Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 313–351.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Chamarande, J., Cunat, L., Caillet, C., Mathieu, L., Duval, J.F.L., Lozniewski, A., Fripiat, J.-P., Alauzet, C., Cailliez-Grimal, C., 2021. Surface Properties of *Parabacteroides distasonis* and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities. *Microorganisms* 9, 1602.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081602>
- Costerton, J., 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221.
[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7)
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 35.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- de Sá Almeida, J.S., de Oliveira Marre, A.T., Teixeira, F.L., Boente, R.F., Domingues, R.M.C.P., de Paula, G.R., Lobo, L.A., 2020. Lactoferrin and lactoferricin B reduce adhesion and biofilm formation in the intestinal symbionts *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe* 64, 102232.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102232>
- Nikolaev, Yu.A., Plakunov, V.K., 2007. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76, 125–138.
<https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>
- Tasse, J., Cara, A., Saglio, M., Villet, R., Laurent, F., 2018. A steam-based method to investigate biofilm. *Sci. Rep.* 8, 13040. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31437-y>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J., 2019. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3423.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143423>

Caractérisation des propriétés de surface, d'adhésion et de formation de biofilm de *Parabacteroides distasonis* et étude de son interaction avec son hôte : du potentiel probiotique au pathogène opportuniste**Résumé :**

Parabacteroides distasonis, bactérie à Gram négatif anaérobie stricte faisant partie du microbiote intestinal (MI), est décrite pour les propriétés bénéfiques qu'elle semble avoir pour son hôte. Parmi celles-ci, cette bactérie présente notamment des capacités anti-inflammatoires via la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires et des propriétés anti-cancéreuses via l'induction de l'apoptose des lignées cellulaires cancéreuses. Or *P. distasonis* est négativement impactée dans le MI par un stress chronique de l'hôte. Son utilisation en tant que nouveau produit biothérapeutique (NPB) semble être une piste intéressante.

Cependant, d'autres données expérimentales décrivent *P. distasonis* davantage comme pathobionte de par son implication dans l'aggravation des pathologies inflammatoires telles que la colite chez la souris ou encore dans l'intensification des symptômes de la maladie de Charcot. Il semblerait donc que *P. distasonis* puisse avoir un rôle dichotomique dépendant du contexte, de l'environnement et possiblement de la souche. La façon dont cette bactérie colonise l'environnement compétitif qu'est l'intestin ainsi que les mécanismes à l'origine de son interaction avec son hôte restent cependant à l'heure actuelle mal connus.

Ce projet a donc porté dans un premier temps sur l'étude des propriétés impliquées dans la colonisation et le maintien de *P. distasonis* au sein du tractus digestif (adhésion, formation de biofilm...). Dans un second temps, les structures de surface impliquées dans son interaction avec son hôte et pouvant expliquer son comportement bénéfique ou délétère ont été analysées *in silico*. Dans une troisième et dernière partie, les caractéristiques liées à la sélection de NPB d'un large panel de souches de *P. distasonis* ont été étudiées afin d'identifier un ou plusieurs candidats démontrant des effets bénéfiques pour l'hôte.

Ce travail a permis de caractériser les principales propriétés de surface de *P. distasonis* impliquées dans son maintien au sein du MI et a confirmé que seules certaines souches de *P. distasonis* semblent prometteuses en tant que NPB. Cependant, leur utilisation nécessite de mieux définir les mécanismes sous-jacents à leurs interactions avec l'hôte, de s'assurer de leur survie jusqu'à la colonisation de leur lieu d'action et de l'absence d'effet indésirable pour l'hôte.

Mots clés : *Parabacteroides distasonis*, microbiote intestinal, adhésion, biofilm, structures de surface, nouveau produit biothérapeutique

Characterization of surface, adhesion and biofilm formation properties of *Parabacteroides distasonis* and study of its interaction with its host: from the potential probiotic to the opportunistic pathogen**Abstract:**

Parabacteroides distasonis, a strict anaerobic Gram-negative bacterium that is part of the gut microbiota (GM), is described for the beneficial properties it seems to have for its host. Among these properties, this bacterium has anti-inflammatory capacities via the suppression of the production of pro-inflammatory cytokines and anti-cancer properties via the induction of apoptosis of cancerous cell lines. However, *P. distasonis* is negatively impacted in the GM by chronic host stress. Its use as a new biotherapeutic product (NBP) seems to be promising.

However, other experimental data describe *P. distasonis* more as a pathobiont because of its involvement in the aggravation of inflammatory pathologies such as colitis in mice or in the intensification of the symptoms of Lou Gehrig's disease. It would thus seem that *P. distasonis* may have a dichotomous role depending on the context, the environment and possibly the strain. However, the way in which this bacterium colonizes the competitive environment that is the intestine as well as the mechanisms at the origin of its interaction with its host remain poorly understood at the present time.

This project focused first on the study of the properties involved in the colonization and maintenance of *P. distasonis* within the digestive tract (adhesion, biofilm formation...). In a second part, the surface structures involved in its interaction with its host and which could explain its beneficial or deleterious behaviour were analysed *in silico*. In a third and final part, the characteristics related to the selection of NBP from a large panel of *P. distasonis* strains were studied to identify one or several candidates showing beneficial effects for the host.

This work allowed to characterize the main surface properties of *P. distasonis* involved in its maintenance within the GM and confirmed that only some strains of *P. distasonis* seem promising as NBP. However, their use requires to better define the mechanisms underlying their interactions with the host, to ensure their survival until colonization of their site of action and the absence of adverse effects for the host.

Keywords: *Parabacteroides distasonis*, gut microbiota, adhesion, biofilm, surface structure, new biotherapeutic product
