

Diss. ETH No. 25941

**Role of *Cutibacterium avidum* during gut colonization and in the alleviation of
Infant Colic**

A thesis submitted to attain in the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
VANESA NATALIN ROCHA MARTIN

Erasmus Mundus Master in Animal Derived Foods,
University of Copenhagen/Swedish University of Agricultural Sciences
born on 27.10.1987
citizen of Argentina

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner
Prof. Dr. Christian Braegger, co-examiner
PD Dr. Clarissa Schwab, co-examiner
Dr. Annick Bernalier-Donadille, co-examiner
Dr. Christophe Chassard, co-examiner

Summary

Infant colic (IC) affects 5-19% of infants younger than five months of age and is characterized by crying, fussing or irritability that last more than three hours per day, during three or more days a week and occur without obvious cause. Several studies have identified an altered fecal microbiota in colic infants, a status of low-grade inflammation and high breath hydrogen (H₂) excretion compared to healthy infants and different mechanisms have been hypothesized, but causality remains unclear.

A newborn's diet is based on breast milk or formula, with high content of lactose and for the former of human milk oligosaccharides (HMO), which could serve as substrate for microbial metabolism in the colon. The infant gut microbiota is characterized by high abundance of lactate-producing bacteria and consequently, to prevent accumulation and toxic effect, lactate must be concomitant metabolized by lactate-utilizing bacteria (LUB). The LUB community in infants until 4 months of age is mainly composed of propionate-producing bacteria, *Bacteroides* spp., *Propionibacterium/Cutibacterium* (former *Propionibacterium* spp.) and *Veillonella* spp., with lower numbers of butyrate-producing bacteria, *Anaerostipes* spp., *Eubacterium hallii* and *Eubacterium limosum*, and sulphide-reducing bacteria (SRB) like *Desulfovibrio*. Concomitantly with lactate utilization, there is formation of H₂ and hydrogen sulphide (H₂S) by some LUB members, gases associated with pain and intestinal discomfort in humans. The theoretical model sustaining this thesis states that the over-production of detrimental lactate, H₂ and H₂S is a contributing factor causing IC. *Propionibacterium/Cutibacterium* convert lactate into propionate, acetate and CO₂, without H₂. In doing so, they could prevent lactate accumulation and divert lactate from the production of harmful metabolites, thus potentially alleviating colic symptoms in infants. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the role of *Propionibacterium/Cutibacterium* during gut colonization and in the alleviation of IC.

We first characterized the abundance, diversity and persistence of *Propionibacterium/Cutibacterium* in a small infant cohort at 2 (n=19), 4 (n=37), 8 (n=38) and 12 (n=32) weeks of age. For this purpose, we developed and validated a quantitative PCR method to enumerate *Propionibacterium/Cutibacterium* in infant feces that we used together with culture-based enumeration to investigate colonization dynamic in infants. The prevalence of *Propionibacterium/Cutibacterium* was high (84%) at 2 weeks of age and decreased to 41% by 12 weeks of age. Persistence of *Propionibacterium/Cutibacterium* was dependent on colonization levels at 2 weeks and decreased simultaneously with introduction of milk-formula in the diet and increasing abundance of butyrate-producing bacteria. The development of a selective medium with lactate as sole carbon source and supplemented with antibiotics allowed for the isolation of 87 *C. avidum* isolates from infant feces (n=10; age range: 1.5-26 weeks). Colonization potential and metabolic effects of non-hemolytic *C. avidum* isolates were tested in an *in vitro* continuous intestinal fermentation model mimicking infant proximal colon conditions. *C. avidum* spiked daily at 10⁸ or 10⁹ cells mL⁻¹ colonized,

decreased formate, and persisted during the washout period. We identified correlations between *Propionibacterium/Cutibacterium* and lactate-producers in two reactors as well as in infant feces.

To gain further insights on the evolutionary adaption of *C. avidum*, we used novel phylogenetic markers to explore the relationship of infant *C. avidum* to *C. avidum* strains from other body sites. We described a subpopulation *C. avidum* depicting specific phenotypic characteristics (negative hemolysis, α -galactosidase and β -glucuronidase activity), which suggest adaptation to the infant gut. We further observed ability to utilize *in vitro* an array of energy sources (D- and L-lactate, glycerol, glucose, galactose, N-acetyl-D-glucosamine and maltodextrins) normally available in the infant gut, which could support their colonization. In addition, we observed increased growth and propionate production by *C. avidum* P279 in co-culture with infant *Bifidobacterium* strains further indicating their role as lactate-utilizers.

For the last step, we developed a gnotobiotic animal model of germ-free rats inoculated with fecal slurries from two- to three-month-old infants, either healthy (n=2) or colicky (n=2). Quantitative PCR and 16S rRNA gene amplicon sequencing revealed engraftment of dominant fecal microbiota in infant-microbiota associated rats (IMA) independently of the dominant taxa in donors. We identified an altered functionality, with high H₂ excretion compared to previous gnotobiotic experiments using fecal microbiota from healthy adults and irritable bowel syndrome patients in IMA rats. We used this new model to investigate the effect of *C. avidum* P279, selected for its colonization ability observed in *in vitro* colonic fermentations, on metabolism, especially on levels of H₂ production and on microbial composition in IMA rats. In line with our hypothesis, colic IMA rats supplemented with *C. avidum* P279 excreted significantly lower levels of H₂ after intervention compared to animals assigned to placebo treatment.

Overall, our findings provide novel scientific data regarding infant gut colonization by *C. avidum* and their role as lactate-degraders and propionate-producers in the infant gut. Our data showed increased microbial production of H₂ by the infant GM and potential ability of *C. avidum* P279 to reduce it. Based on our observations, we propose a new mechanistic model with intestinal production of H₂ as key factor for IC development. Future research focusing on the relationship between H₂ metabolism and the inflammatory and nociceptive response of the host may help to further elucidate the mechanism behind IC.

Zusammenfassung

Die Kinderkolik (IC) betrifft 5-19% der Säuglinge unter fünf Monaten und ist gekennzeichnet durch Schrei-/Wein-, Aufgeregtheits- oder Reizbarkeitsperioden. Diese dauern mehr als drei Stunden pro Tag an und treten an drei oder mehr Tagen pro Woche ohne offensichtliche Ursache auf. Mehrere Studien an gesunden und kranken Kleinkindern, haben eine veränderte fäkale Mikrobiota, eine leichte Entzündungen des Darmepithels und die Ausscheidung von Wasserstoff (H_2) über den Atem, bei von Koliken betroffenen Kindern festgestellt. Trotz zahlreicher Hypothesen zum Auftreten von Kinderkoliken bleibt die Kausalität vorerst unklar.

Die Ernährung eines Neugeborenen basiert auf Muttermilch oder Muttermilchersatz, welche beide einen hohen Laktosegehalt aufweisen und im Fall von Muttermilch zusätzlich humane Milcholigosaccharide (HMO) enthalten. Diese Substrate können unter anderem auch für den mikrobiellen Stoffwechsel im Dickdarm dienen. Die Mikrobiota des Säuglingsdarms zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Laktat produzierenden Bakterien aus. Um eine Anreicherung und damit toxische Wirkung von Laktat zu verhindern muss dieses gleichzeitig von Laktat verwertenden Bakterien (LUB) metabolisiert werden. Die LUB-Mikrobengemeinschaft bei Säuglingen bis zum Alter von 4 Monaten besteht hauptsächlich aus Propionat produzierenden Bakterien, *Bacteroides* spp., *Propionibacterium/Cutibacterium* und *Veillonella* spp. mit wenigen Butyrat produzierenden Bakterien, *Anaerostipes* spp., *Eubacterium hallii* und *Eubacterium limosum* sowie Sulfid reduzierenden Bakterien (SRB) wie *Desulfovibrio*. Parallel zur Laktatverwertung kommt es bei einigen LUB-Mitgliedern zur Bildung von H_2 und Schwefelwasserstoff (H_2S), welche mit Schmerzen und Darmbeschwerden beim Menschen in Verbindung gebracht werden. Das theoretische Modell, dass diese Doktorarbeit stützt, besagt, dass die Überproduktion von schädlichem Laktat, H_2 und H_2S ein wichtiger IC verursachender Faktor ist. *Propionibacterium/Cutibacterium* wandelt Laktat in Propionat, Acetat und CO_2 um, ohne dabei H_2 zu produzieren. Auf diese Weise könnte die Anreicherung und schädliche Weiterverwendung von Laktat umgangen werden um so die Kolik-Symptome bei Säuglingen zu lindern. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von *Propionibacterium/Cutibacterium* während der Darmkolonisation und bei der Linderung und Behandlung von IC zu untersuchen.

Wir haben zunächst die Häufigkeit, Vielfalt und Persistenz von *Propionibacterium/Cutibacterium* in einer Kinderkohorte im Alter von 2 (n=19), 4 (n=37), 8 (n=38) und 12 (n=32) Wochen charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative PCR-Methode (qPCR) entwickelt und validiert, um *Propionibacterium/Cutibacterium* im Säuglingskot zu quantifizieren. Zusammen mit der klassischen, kulturbasierten Quantifizierung mittels Agarplatten wurden die qPCR Daten zur Untersuchung der Kolonisationsdynamik bei Säuglingen verwendet. Die Prävalenz von *Propionibacterium/Cutibacterium* war im Alter von 2 Wochen hoch (84%) und sank auf 41% im Alter von 12 Wochen. Die Persistenz von *Propionibacterium/Cutibacterium* war abhängig von der

Kolonisation nach 2 Wochen und verringerte sich gleichzeitig mit der Ernährungsumstellung auf Muttermilchersatzprodukte und der zunehmenden Abundanz von Butyrat produzierenden Bakterien. Die Entwicklung eines selektiven, antibiotikahaltigen Mediums mit Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle, ermöglichte die Isolierung von 87 *C. avidum* Isolaten aus Säuglingskot (n=10; Altersbereich: 1,5-26 Wochen). Das Kolonisationspotenzial und die metabolischen Effekte von nicht-hämolytischen *C. avidum* Isolaten wurden in einem kontinuierlichen *in vitro* Darmfermentationsmodell getestet. Dieses Modell repräsentiert die Bedingungen des proximalen Dickdarms des Säuglings. Der täglich injizierte Anteil von *C. avidum*, mit einer Anzahl von 10^8 oder 10^9 Zellen mL^{-1} pro Injektion konnte die Reaktoren kolonisieren, verminderte den Formiat Anteil und war auswasch-beständig. Eine Korrelation zwischen dem Auftreten von *Propionibacterium/Cutibacterium* und Laktatproduzenten wurde in zwei Reaktoren sowie im Säuglingskot festgestellt.

Um weitere Erkenntnisse über die evolutionäre Adaption von *C. avidum* an den Darm zu gewinnen, wurden neuartige phylogenetische Marker verwendet. So konnte die Beziehung von Säuglings-*C. avidum* zu *C. avidum*-Stämmen von anderen Körperstellen erforscht werden. Dadurch haben wir ein phylogenetische Klasse von Säuglings *C. avidum* identifiziert, welche spezifische phänotypische Merkmale (negative Hämolyse, α -Galaktosidase und β -Glukuronidase-Aktivität) aufweist, die eine Anpassung an den Säuglingsdarm nahelegen. Um Aufschluss über eine potentielle Kolonisation zu erlangen, wurden die Isolate *in vitro* auf die Fähigkeit eine Reihe von typische Säuglingsdarm-Substraten (D- und L-Laktat, Glycerin, Glukose, Galaktose, N-Acetyl-D-Glukosamin und Maltodextrine) nutzen zu können, getestet. Zudem wurde ein erhöhtes Wachstum und eine erhöhte Propionat Produktion beim Isolat *C. avidum* P279 in Co-Kultur mit typischen Säuglings-Bifidobakterien beobachtet, was auf ihre Rolle als Laktatverwerter hinweist.

Für den letzten Schritt der Arbeit wurde ein gnotobiotisches Tiermodell mit keimfreien Ratten entwickelt. Dafür wurden die Ratten mit Fäkalbakterienstämme von gesunden (n = 2) oder kranken (n = 2) Säuglingen im Alter von zwei bis drei Monaten beimpft. Die qPCR und 16S rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung bestätigte die Etablierung der fäkalen Mikrobiota bei den beimpften Ratten (IMA) unabhängig von den dominanten Genera der Spender. Im Vergleich zu früheren Experimenten mit IMA-Ratten, die mit der fäkalen Mikrobiota von gesunden Erwachsenen oder von Patienten mit Reizdarmsyndrom beimpft wurden, konnte eine veränderte Funktionalität mit hoher H_2 -Ausscheidung identifiziert werden. Dieses neue Tiermodell wurde verwendet, um die Wirkung von *C. avidum* P279, welcher wegen seiner Kolonisationsfähigkeit in *in vitro* Fermentationsversuchen ausgewählt wurde, zu untersuchen. Im Einklang mit unserer Hypothese, schieden IMA Ratten, welche fäkale Mikrobiota von Kolik-Kindern erhalten hatten, nach der Zugabe von *C. avidum* P279 signifikant niedrigere H_2 Werte aus als Tiere, die eine Placebo-Behandlung erhielten.

Insgesamt lieferten unsere Ergebnisse neue wissenschaftliche Daten zur Kolonisation des Säuglingsdarms durch *C. avidum* und dessen Rolle als laktatabbauendes und propionatproduzierendes

Bakterium im Säuglingsdarm. Unsere Daten zeigten, dass ein Anstieg der mikrobiellen H₂ Produktion durch die Behandlung mit *C. avidum* P279 reduziert werden kann.

Basierend auf unseren Beobachtungen bezeichnen wir die H₂ Produktion als Schlüsselfaktor für die Kolik-Entwicklung. Zukünftige Forschung, die sich auf den Zusammenhang zwischen dem H₂-Stoffwechsel und der entzündlichen und nozizeptiven Reaktion des Patientendarms konzentriert, kann zum weiteren Verständnis des Mechanismus hinter dem IC beitragen.