

Le microbiote intestinal

Claire Janoir– UEL 337

Plan

- ▶ **Définitions – Généralités**
- ▶ **Moyens d'étude et composition du MI**
- ▶ **Variations du MI**
- ▶ **Principales fonctions du MI**
- ▶ **Dysbiose et pathologies**

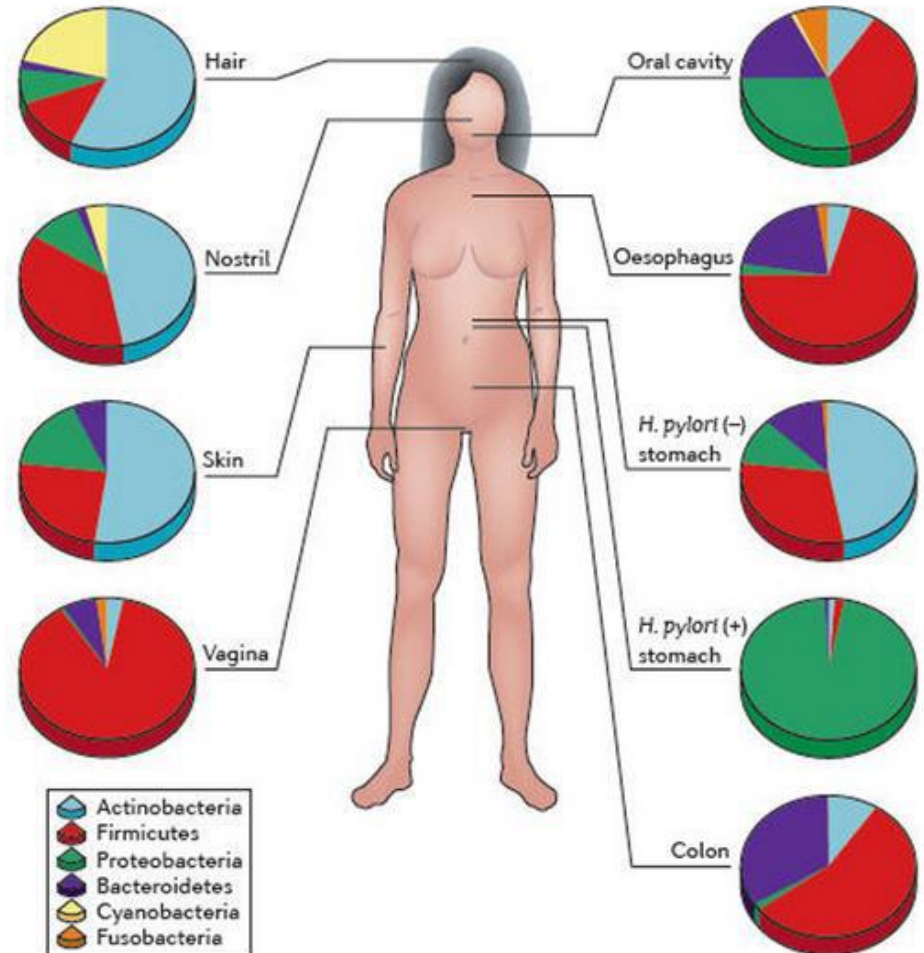
Généralités – Définitions

- ▶ **Microbiote** : l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique, en accord avec cet environnement (**symbiose ou commensalisme**)
 - Microbiome : microbiote + environnement
 - Génome du microbiote = métagénome
 - Capacités métaboliques du microbiote = métabolome
- ▶ La **dysbiose** est un état où l'équilibre du microbiote est perturbé
 - Possibilité de développement d'un micro-organisme pathogène
 - Altérations de fonctions intestinales liées au microbiote

Les différents microbiotes

- ▶ Les microbiotes de l'environnement
 - Microbiote des sols
 - Microbiote des océans,...
- ▶ Les microbiotes humains

L'homme est un écosystème pour les bactéries qu'il héberge



Le microbiote intestinal

Moyens d'étude
Composition

Généralités

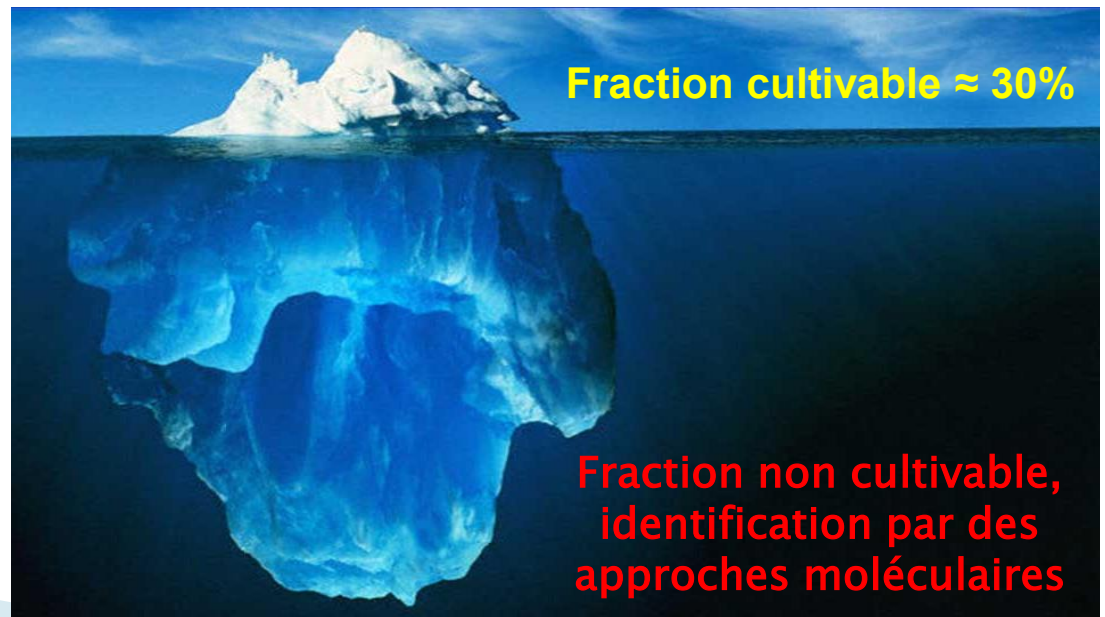
▶ Microbiote résident

- **Adaptation** à l'environnement → **persistance** possible
- Stabilité des populations dominantes dans le temps
- Notion de niches écologiques

▶ Bactéries en transit

Modalités d'étude (1)

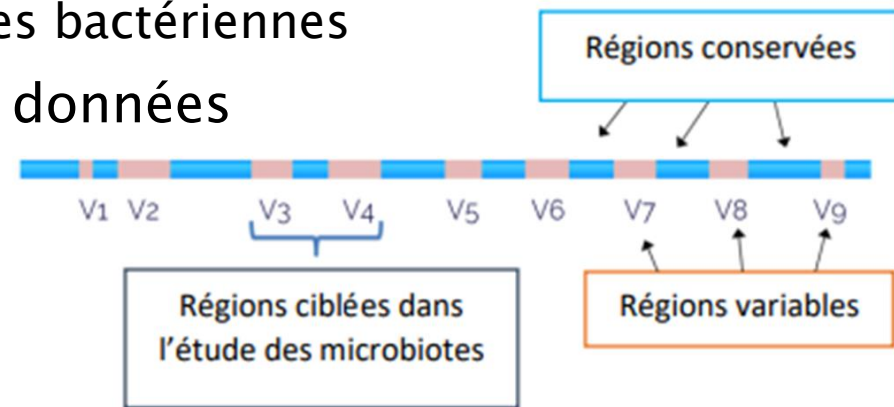
- ▶ **Méthode microscopique après colorations**
 - Numération : $2,7 \times 10^{11}$ ($\pm 0,3 \times 10^{11}$) cellules/g feces
- ▶ **Méthode classique de culture : bactéries cultivables**
 - Cultures en conditions aérobies & anaérobies
 - Analyse quantitative sur milieux sélectifs et non sélectifs
 - Numération : $3,9 \times 10^{10}$ ($\pm 0,5 \times 10^{10}$) UFC/g (*Langendijk et al.*)



Modalités d'étude (2) : méthodes moléculaires

► Analyse des ADNr et ARNr

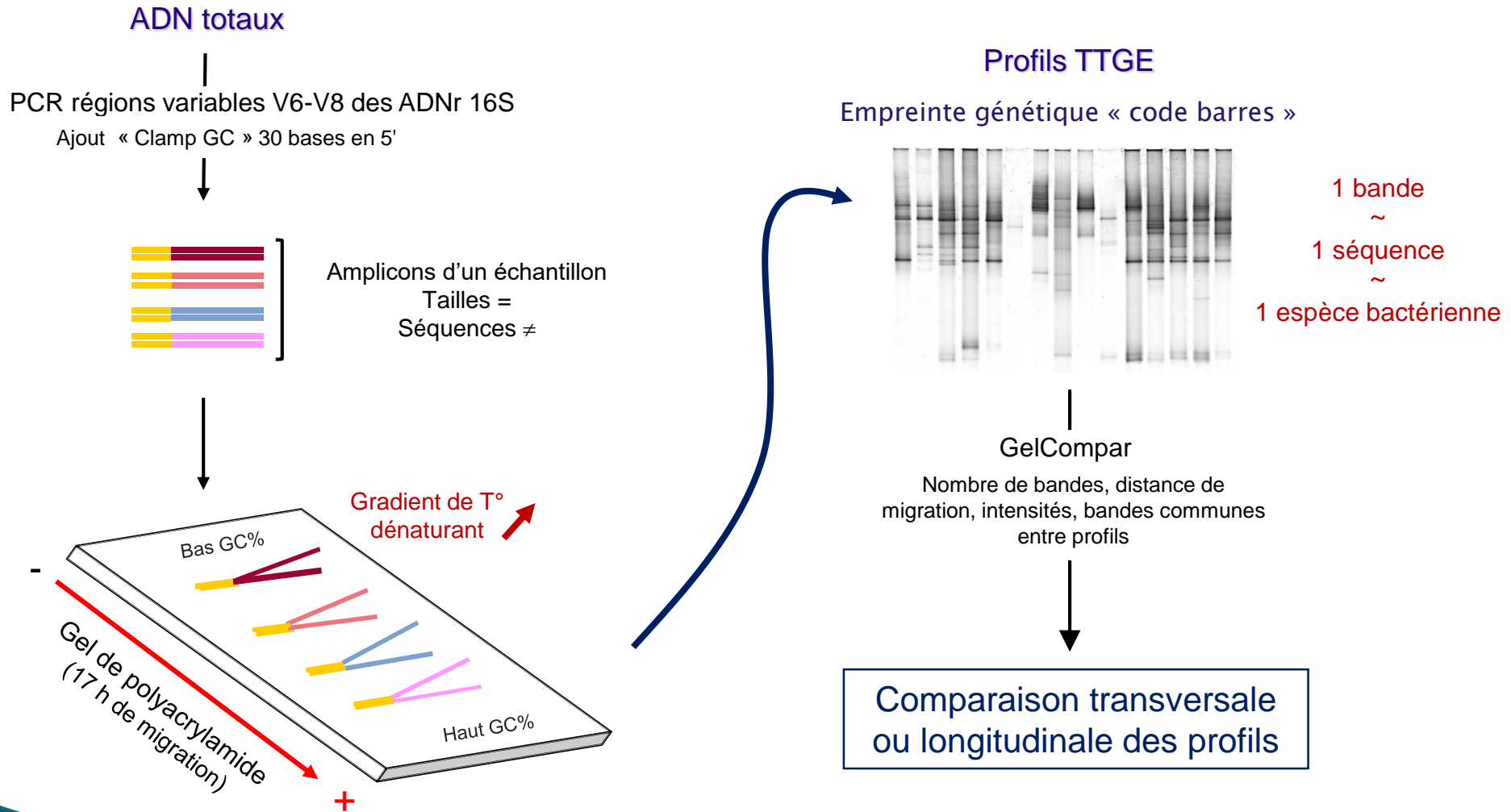
- ARNr : molécules ubiquitaires, homologie structurelle et fonctionnelle
- ADNr : structure primaire mosaïque :
 - Régions conservées → domaine Bacteria
 - Régions variables → groupes bactériens
 - Régions hypervariables → espèces bactériennes
- Comparaison avec les bases de données



► Métagénomique

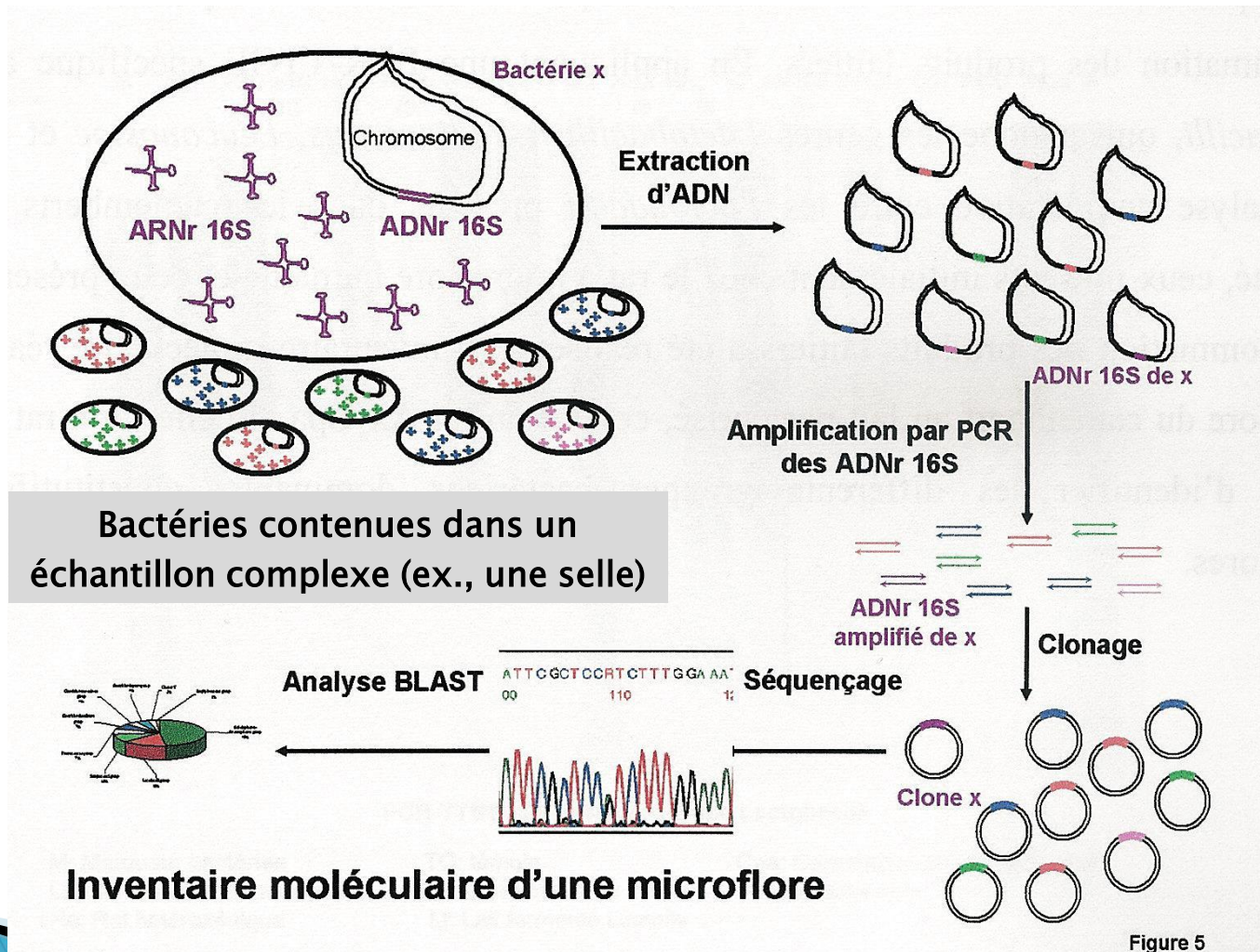
- Séquençage de l'ensemble des gènes du microbiote ($\approx 100\ 000$ gènes)
- NGS

▶ Méthodes – culture indépendante : analyse dynamique par électrophorèse dénaturante (DDGE, TTGE)



Electrophorèse en gradient dénaturant de température (TTGE)

► L'inventaire moléculaire : analyse des séquences ADNr 16S



Modalités d'étude (7)

▶ **La métagénomique :**

Le métagénome correspond à l'ensemble des gènes de la communauté du microbiote (estimé à 100 000 gènes)

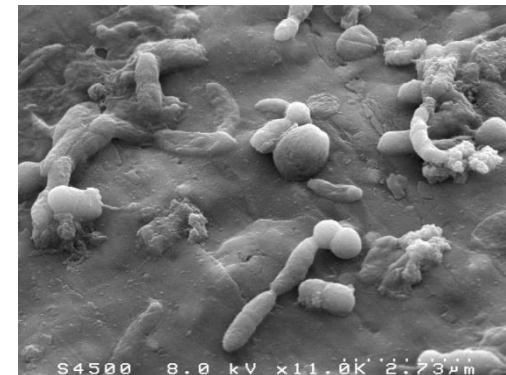
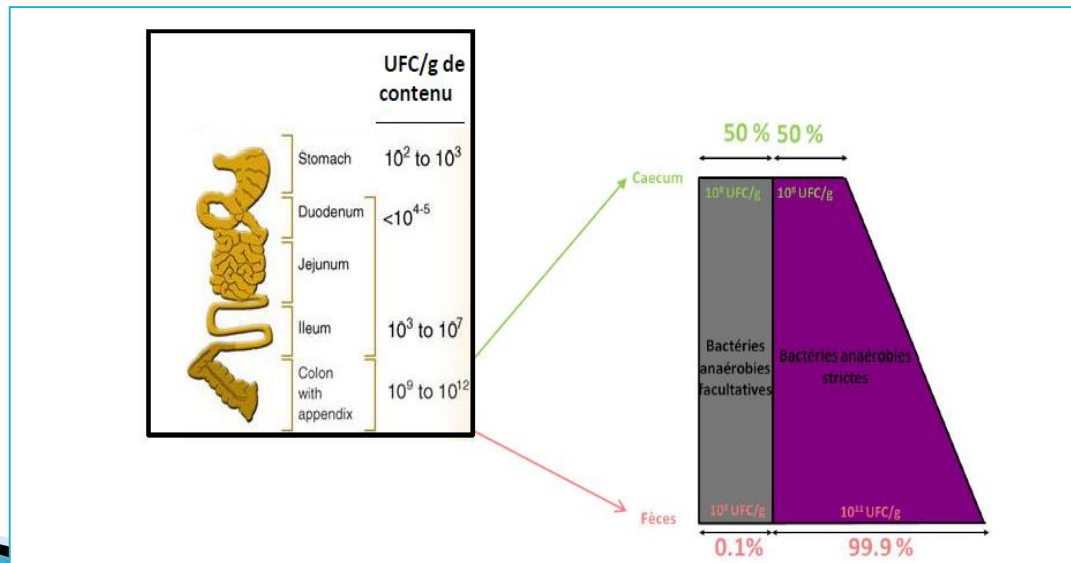
- Métagénomique classique (séquençage (très) haut-débit)
- Métagénomique fonctionnelle

▶ **La métabolomique**

Le métabolome correspond à l'ensemble des métabolites produits par le microbiote

Composition (1) : aspects quantitatifs

- ▶ 10^{14} (100 000 milliards) bactéries dans le tractus digestif de l'homme : 10 fois le nombre de cellules de l'organisme
- ▶ 40% du poids des selles = micro-organismes



Composition (2) : aspects qualitatifs

- ▶ **Composition quantitative :**
exemple du microbiote d'un adulte occidental sain
 - 3 phylas majoritaires
 - \approx 200 à 300 espèces différentes

Bacillota
(Firmicutes)
 \approx 75%

Bacteroidota
(Bacteroidetes)
 \approx 20-25%

Actinomycetota
(Actinobacteria)
 \approx 3%

Pseudomonadota
(Proteobacteria)
< 1%

Verrucomicrobiota
(Verrucomicrobia)
< 1%

Composition (3) : critères descriptifs

- ▶ La « qualité » d'un microbiote peut être définie par :
 - **La diversité** : nombre d'espèces différentes présentes au sein du microbiote. Globalement, la diversité du microbiote intestinal est un des indicateurs de bonne santé.
 - **La richesse** : quantité globale de micro-organismes présents.

Composition (5) : conclusion

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

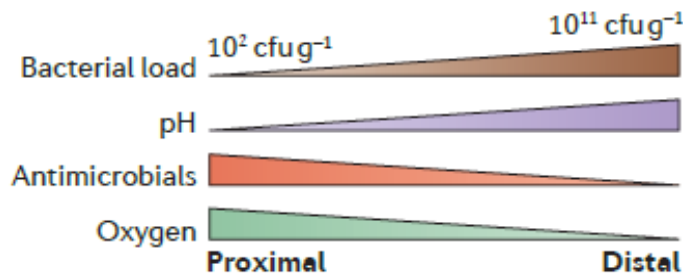
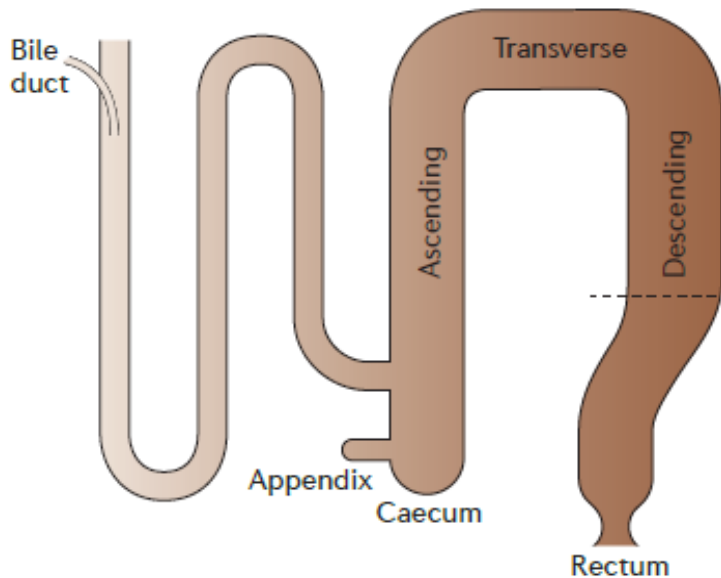
Predominant families in the:

Small intestine

Lactobacillaceae,
Enterobacteriaceae

Colon

Bacteroidaceae, Prevotellaceae,
Rikenellaceae, Lachnospiraceae,
Ruminococcaceae



Le microbiote intestinal, c'est aussi :

- des virus (bactériophages)
- des Eucaryotes (fungi)
- des Archea

Le microbiote intestinal

Variations

Généralités

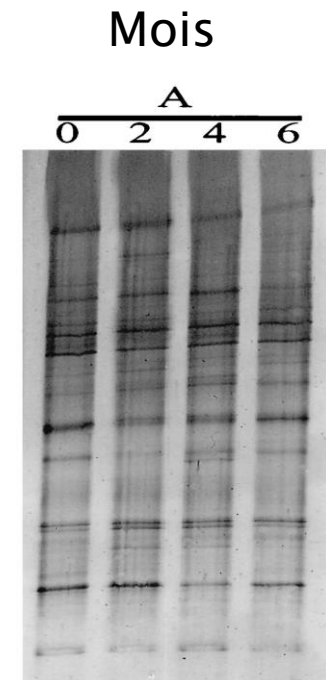
- ▶ **Variations du microbiote**
 - À la naissance, en fonction du mode d'accouchement
 - Au cours du temps
 - En fonction de l'alimentation
 - En fonction d'évènement extérieur (antibiotiques)

Acquisition des microbiotes

- ▶ **Pendant la grossesse, le foetus est stérile**
- ▶ **À la naissance, il est « contaminé »**
 - Par les micro-organismes de sa mère (flore vaginale et fécale) lors d'un accouchement par voie basse
 - Par les micro-organismes de l'environnement ou de la flore cutanée de la mère lors d'un accouchement par césarienne
 - Développement de bactéries aéro-tolérantes/anaérobies facultatives puis aérobies strictes
 - Les différences du microbiote liées au mode d'accouchement s'estompent mais conséquences à long terme possibles

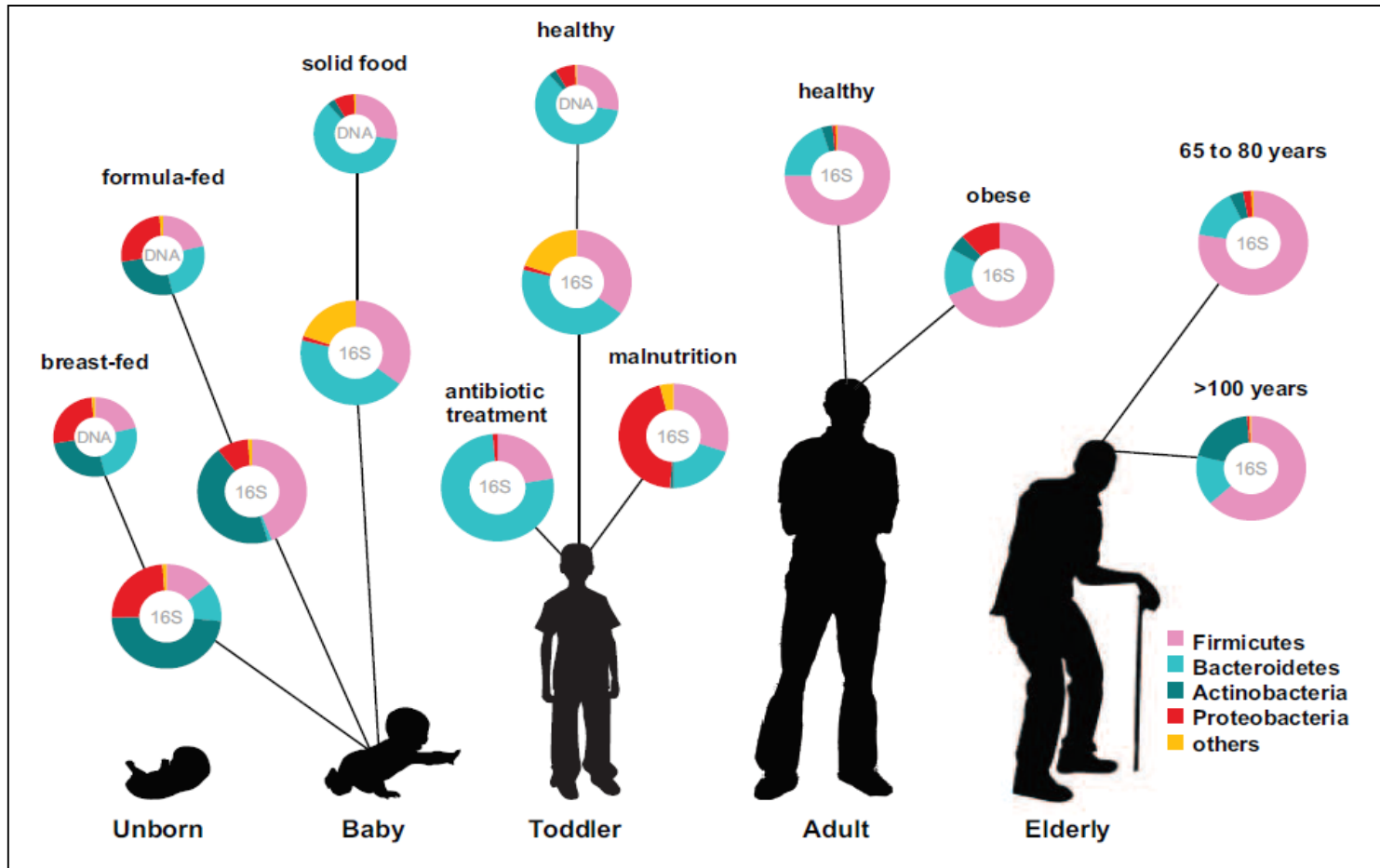
Variations au cours du temps (3)

- ▶ Le microbiote des enfants < 1 an est moins complexe que celui des adultes
- ▶ Augmentation de la diversité des espèces composantes, dirigée par la diversification alimentaire, le sevrage, et le contact croissant avec l'environnement.
- ▶ Stabilisation vers 2-3 ans du microbiote, similaire à celui de l'adulte
- ▶ **Chez l'adulte, hors évènement particulier, le microbiote dominant est stable**
- ▶ Chez les personnes âgées, diminution du ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes*
- ▶ Signature microbienne des centenaires ?



Sujet sain

Pour résumer...

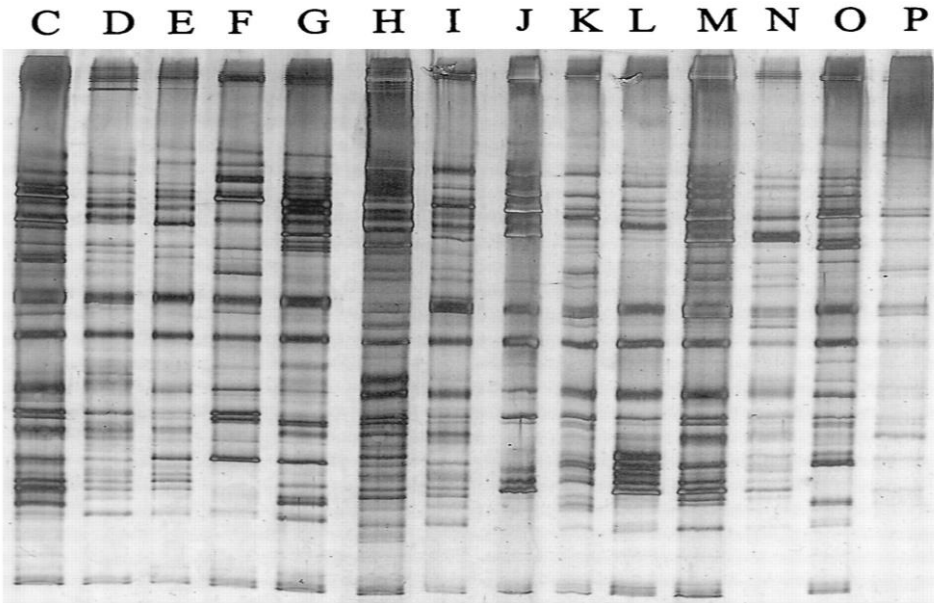


Facteurs environnementaux (alimentation, hygiène,...)
Facteurs génétiques

Variations entre individus

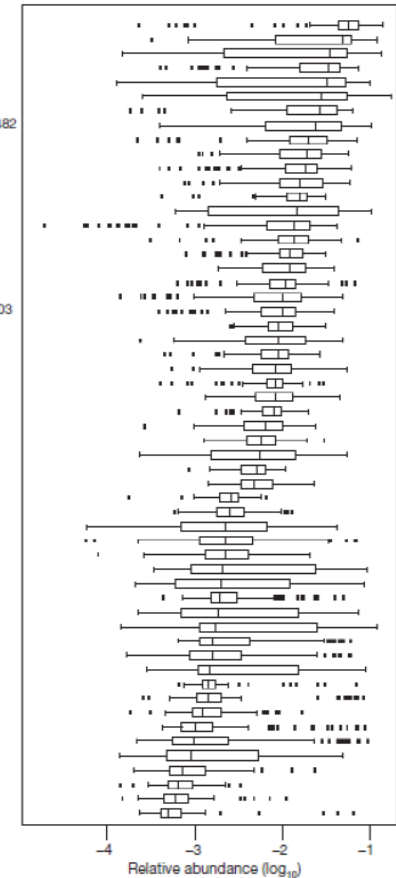
- Le microbiote dominant est **spécifique** à chaque individu

- Un petit nombre d'OTU est conservé entre les individus : “core génome” ($\approx 15-20$)



Empreinte électrophorétique de 14 sujets sains (TGGE)

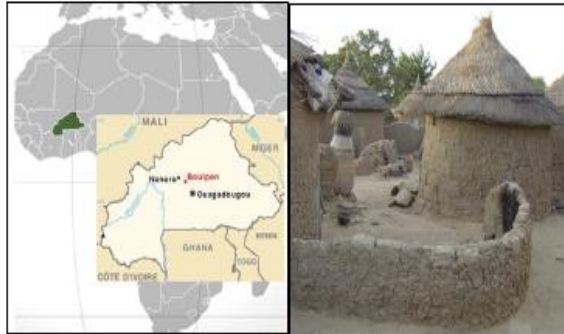
Bacteroides uniformis
Alistipes putredinis
Parabacteroides merdae
Dorea longicatena
Ruminococcus bromii L2-63
Bacteroides caccae
Clostridium sp. SS2-1
Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482
Eubacterium hallii
Ruminococcus torques L2-14
Unknown sp. SS3 4
Ruminococcus sp. SR1 5
Faecalibacterium prausnitzii SL3 3
Ruminococcus lactaris
Collinsella aerofaciens
Dorea formicigenerans
Bacteroides vulgatus ATCC 8482
Roseburia intestinalis M50 1
Bacteroides sp. 2_1_7
Eubacterium siraeum 70 3
Parabacteroides distasonis ATCC 8503
Bacteroides sp. 9_1_42FAA
Bacteroides ovatus
Bacteroides sp. 4_3_47FAA
Bacteroides sp. 2_2_4
Eubacterium rectale M104 1
Bacteroides xylosoxydans XB1A
Coprococcus comes SL7 1
Bacteroides sp. D1
Bacteroides sp. D4
Eubacterium ventriosum
Bacteroides dorei
Ruminococcus obeum A2-162
Subdoligranulum varabile
Bacteroides capillosus
Streptococcus thermophilus LMD-9
Clostridium leptum
Holdemanella filiformis
Bacteroides stercoris
Coprococcus eulactis
Clostridium sp. M62 1
Bacteroides eggerthii
Butyrivibrio crossotus
Bacteroides fingoldii
Parabacteroides johnsonii
Clostridium sp. L2-50
Clostridium nexile
Bacteroides pectinophilus
Anaerotruncus colthornis
Ruminococcus gnavus
Bacteroides intestinalis
Bacteroides fragilis 3_1_12
Clostridium asparagiforme
Enterococcus faecalis TX0104
Clostridium scindens
Blautia hansenii



Co-évolution hôte/microbiote

- **Variation des microbiotes en fonction de la nutrition animale**
 - Microbiote des ruminants : bactéries cellulolytiques
 - Microbiote des termites : bactéries hydrolysant la cellulose et les xylanes
- Bénéfice pour les bactéries : source de nutriments sûre et continue

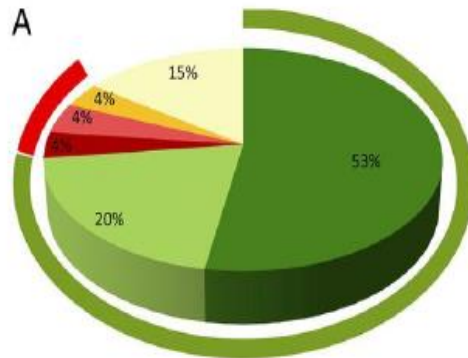
Modulation par des facteurs environnementaux : l'alimentation



Boulpon, Burkina Faso

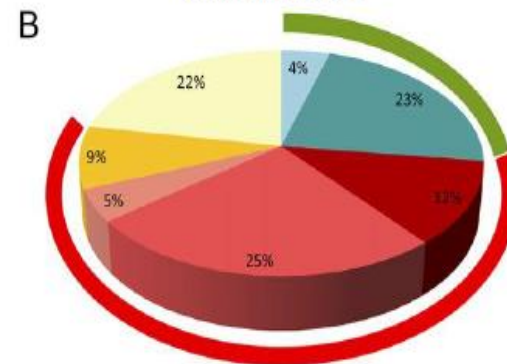


Florence, Italie



BF

- *Prevotella* } Bacteroidetes
- *Xylanibacter* } Bacteroidetes
- *Acetitomaculum* } Firmicutes
- *Faecalibacterium* } Firmicutes
- *Subdoligranulum* } Firmicutes
- Others



EU

- *Allistipes* } Bacteroidetes
- *Bacteroides* } Bacteroidetes
- *Acetitomaculum* } Firmicutes
- *Faecalibacterium* } Firmicutes
- *Roseburia* } Firmicutes
- *Subdoligranulum* } Firmicutes
- Others

Variations du microbiote

- ▶ **Variations non physiologiques, liées à des évènements extérieurs**
 - Prise de médicaments (antibiotiques +++)
 - Modification brutale d'alimentation

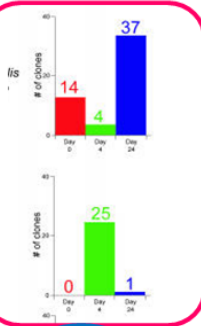
 **Dysbiose...**

Dysbiose : état où l'équilibre du microbiote est perturbé avec un risque d'altération de ses fonctions physiologiques

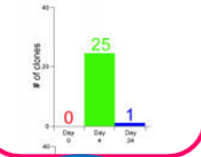
Les antibiotiques exercent leur activité sur les bactéries pathogènes pour lesquelles ils sont prescrits, mais également sur la totalité des bactéries commensales de nos microbiotes qui y sont sensibles

Impact des antibiotiques : exemple de l'Augmentin®

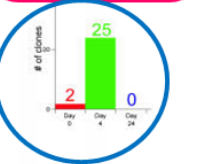
Groupe *B. fragilis*



Groupe *B. distasonis*



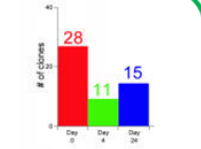
Enterobacteriaceae



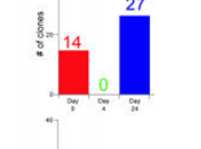
Changements dans le
phylum des Bacteroidetes

Augmentation des
entérobactéries

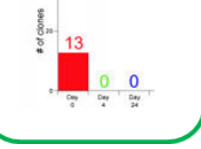
Groupe Clostridies
cluster IV



Groupe Clostridies
cluster XIVa



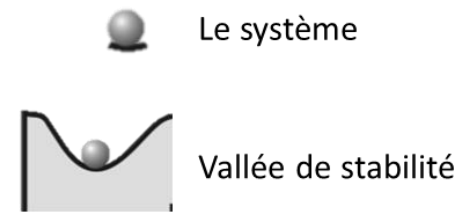
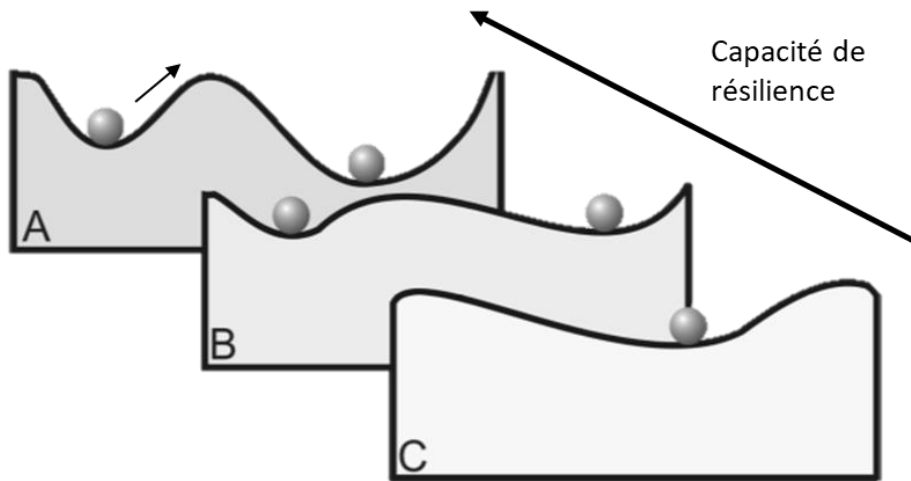
Bifidobacteria



Diminution de nombreux
groupes des phyla Firmicutes
et Actinobacteria

Young, *J Clin Microbiol*, 2004

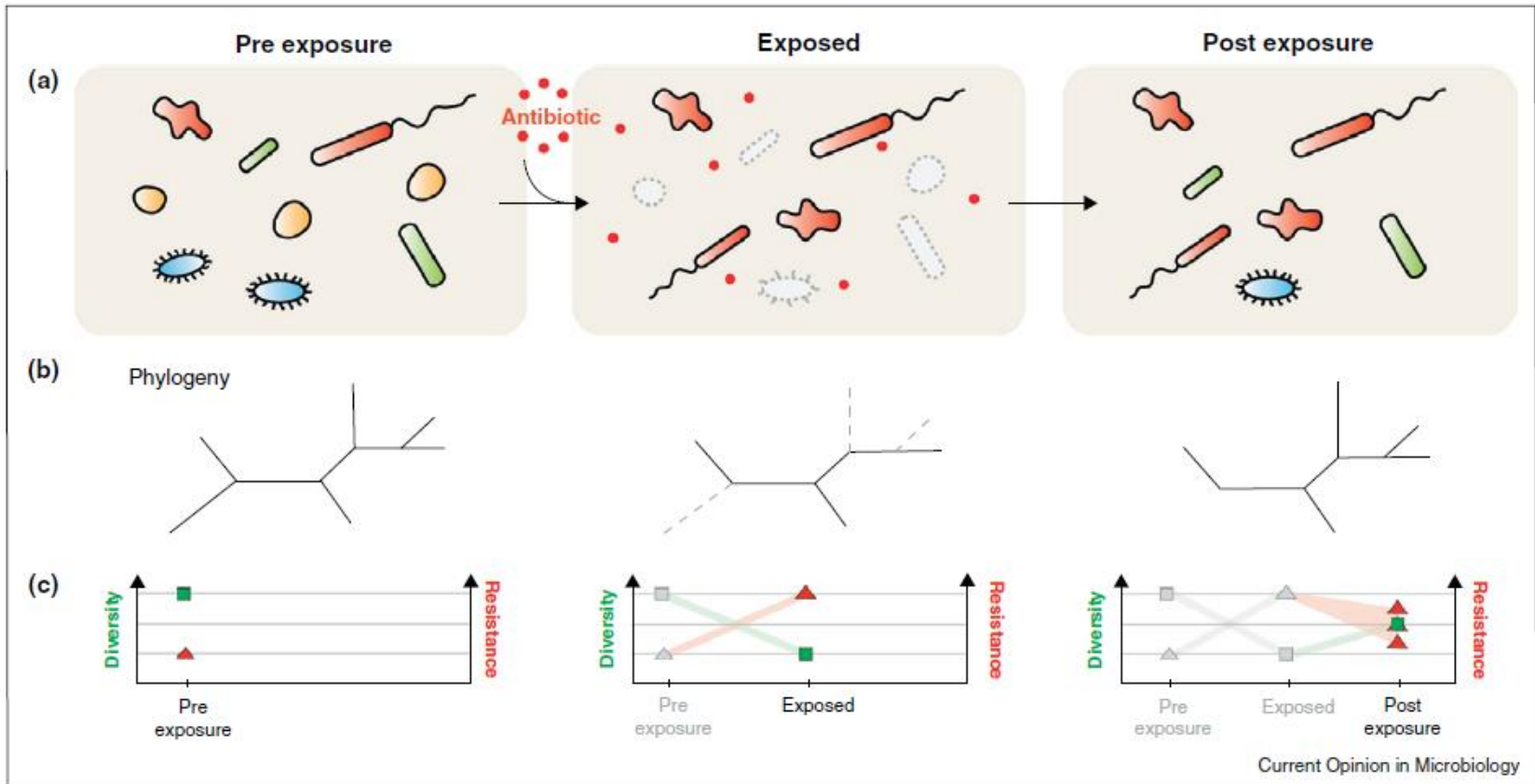
Après arrêt de l'antibiotique, le microbiote récupère progressivement un état d'équilibre, qui peut être identique ou proche de l'équilibre initial : résilience



Capacité de résilience

Retour à l'état initial du système après un événement perturbateur

Modulation par des facteurs environnementaux : les antibiotiques (2)



Modélisation de la modulation par les ATB
(Sommer *et al.*, Curr Opin Microbiol, 2011)

Le microbiote intestinal

Fonctions

Moyens d'étude des fonctions du microbiote intestinal

- ▶ Modèle animaux
- ▶ Comparaison des fonctions intestinales dans différents modèles
 - Animaux **axéniques**
 - Animaux **gnotoxéniques**
 - À flore connue et contrôlée
 - À flore « humaine »
 - À flore simplifiée



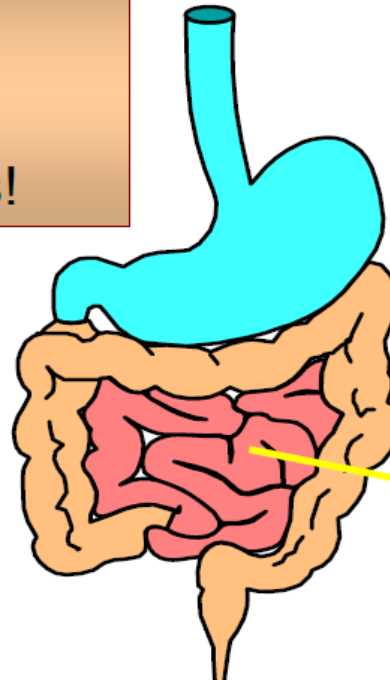
- ▶ Essais cliniques chez l'homme

Fonctions du tube digestif

Digestion et assimilation
des aliments

Premier organe
immunitaire
60 à 70% de nos
cellules immunitaires!

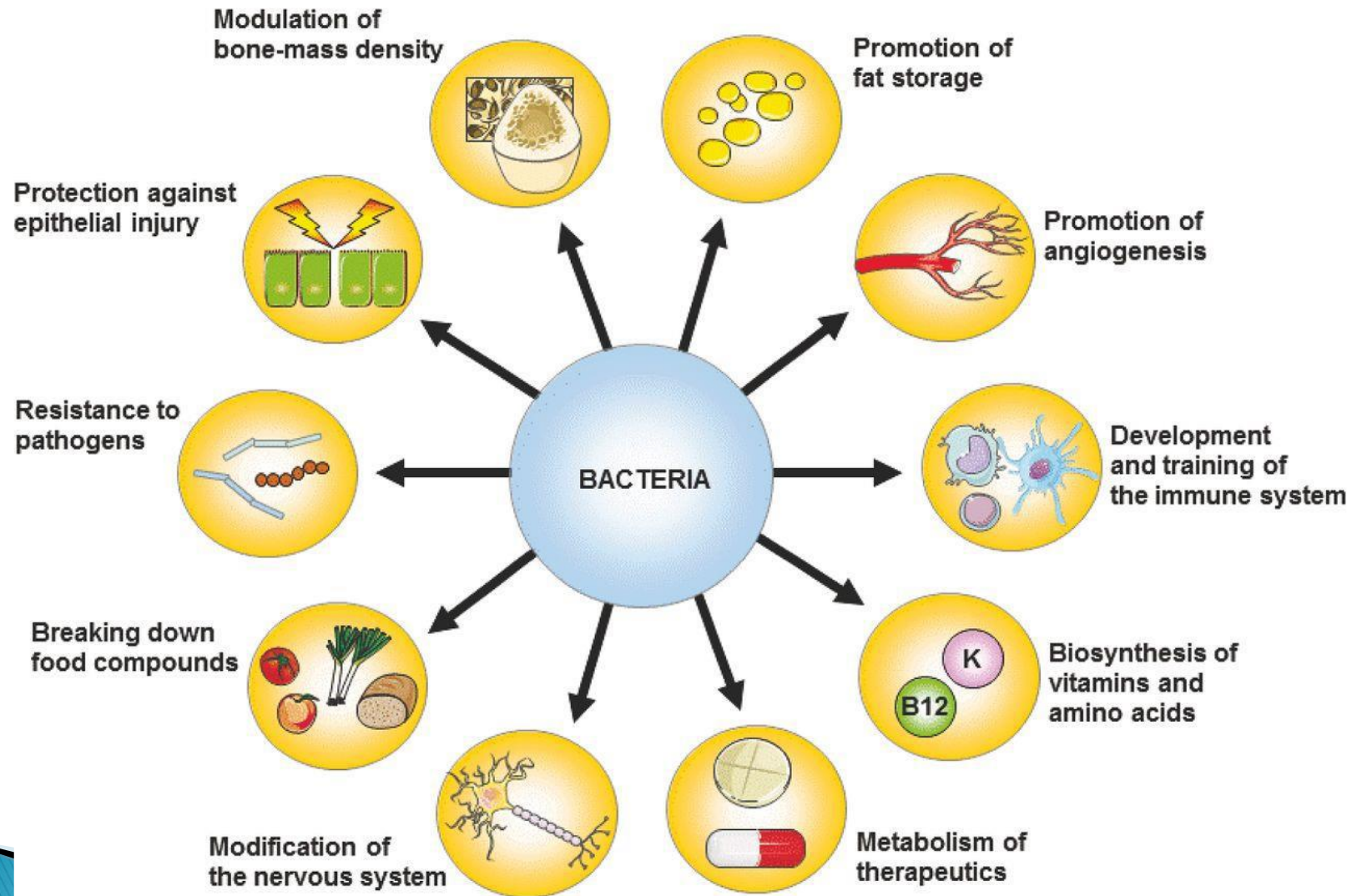
Deuxième cerveau
100 millions de
neurones!



Microbiote intestinal
100 000 milliards
de bactéries !

→ Dialogue permanent hôte-bactéries

Des compositions différentes mais des fonctions conservées



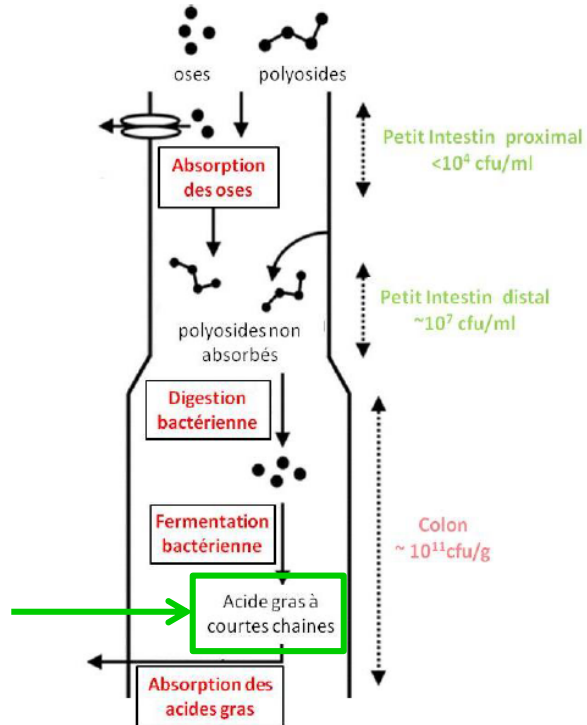
Rôles du microbiote digestif (1)

▶ **Premières observations : les animaux axéniques présentent :**

- Une vascularisation plus faible de l'intestin
- Une couche de mucus plus fine
- Des activités enzymatiques digestives réduites
- Des besoins caloriques supérieurs de 20 à 30%
- Une susceptibilité accrue aux infections

Fonctions métaboliques (1)

▶ Métabolisation de composés alimentaires



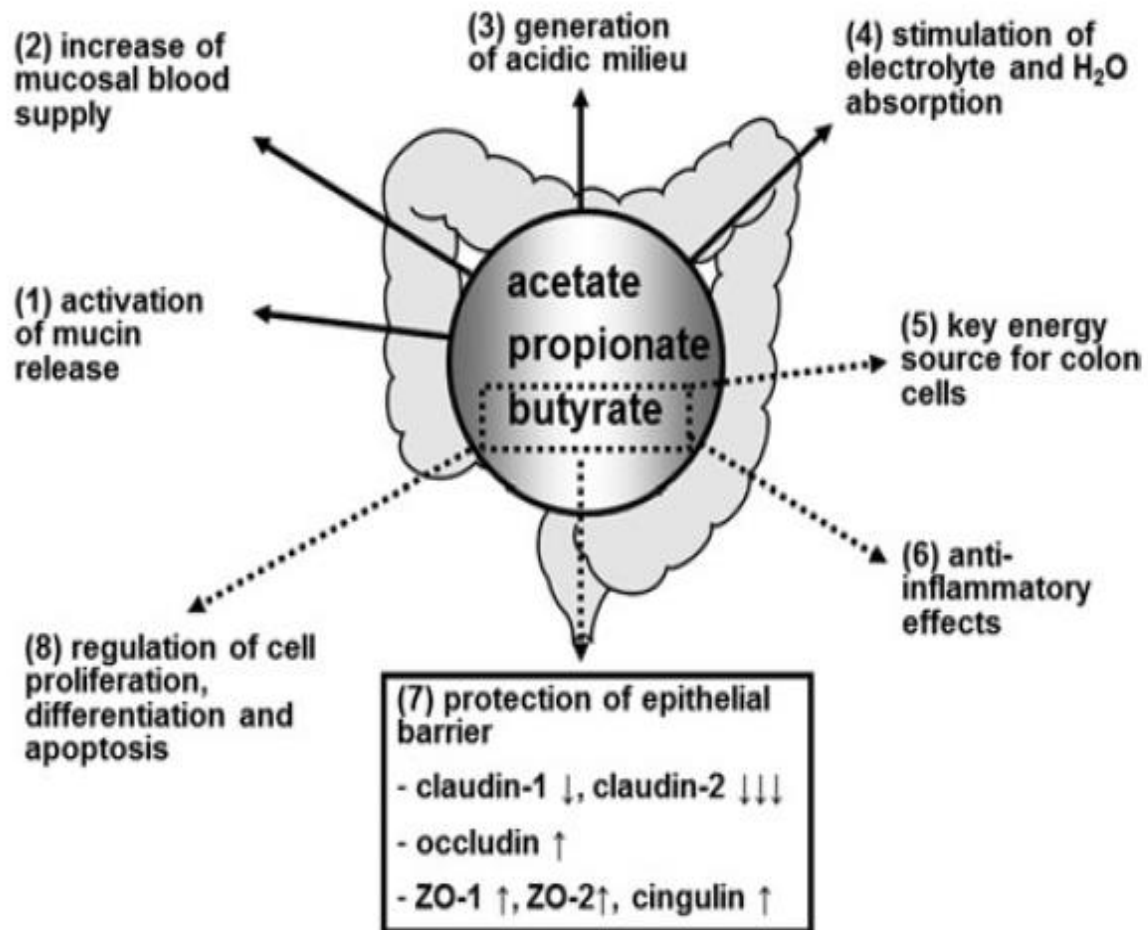
- Le corps humain absorbe les oses simples au niveau du petit intestin proximal.

- Les polysides complexes (ingérés ou relargués par l'hôte) transitent jusqu'au côlon.

- Dans le côlon, les bactéries dégradent et fermentent les polysides complexes.

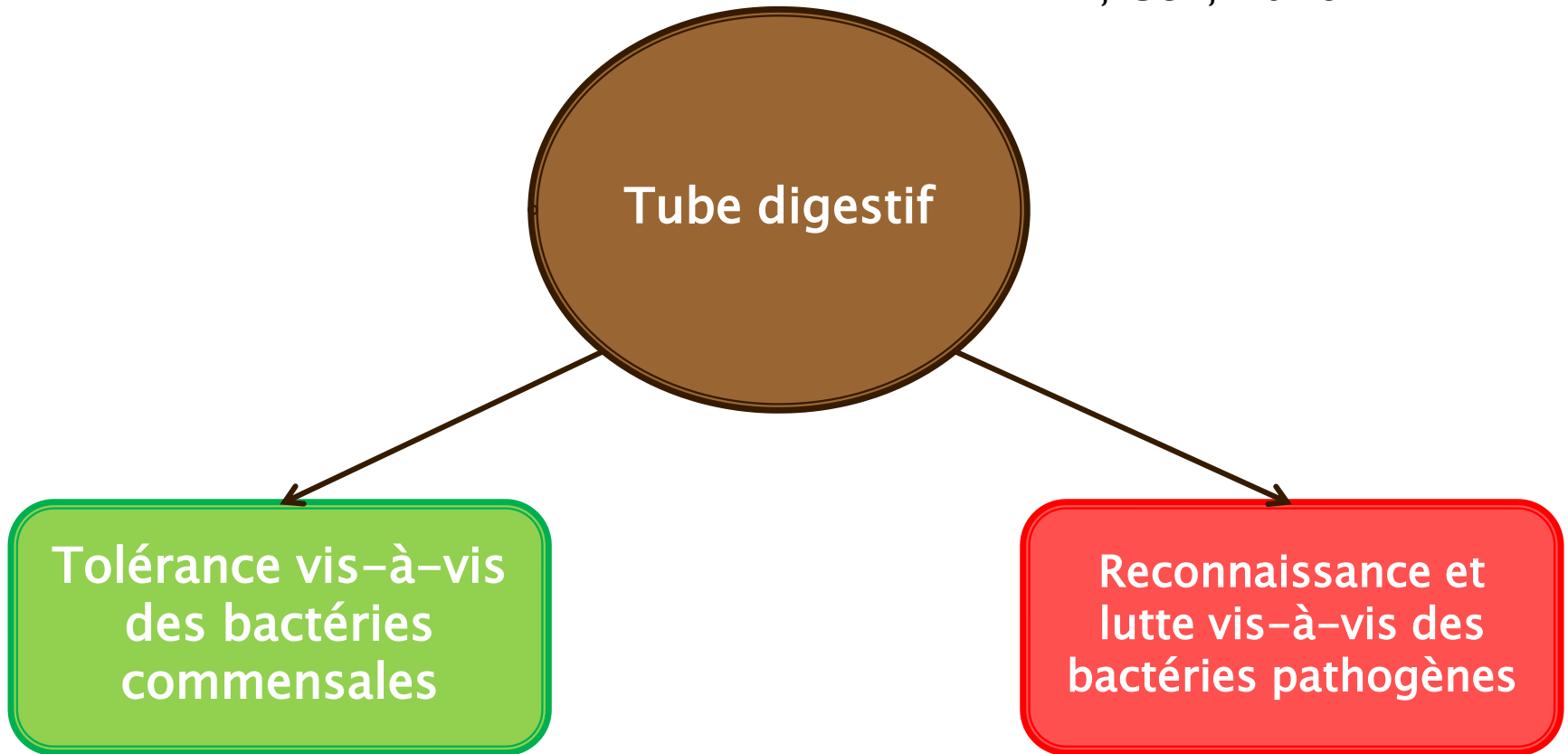
- Les acides gras à courtes chaînes sont ensuite absorbés par l'hôte.

- ▶ Synthèse de vitamines : B12, K
- ▶ Métabolisme des acides biliaires,...



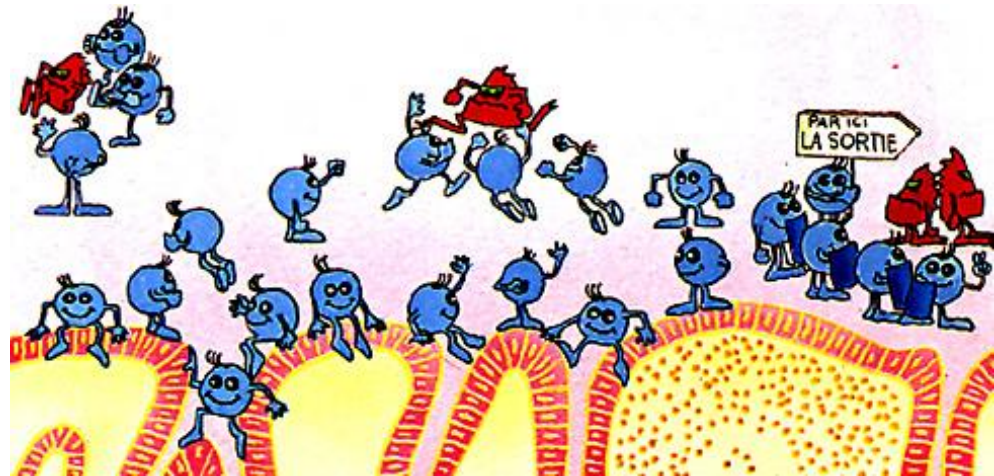
Rôle dans l'homéostasie du système immunitaire (1)

Lire Vatanen
T, Cell, 2016



Effet barrière du microbiote intestinal

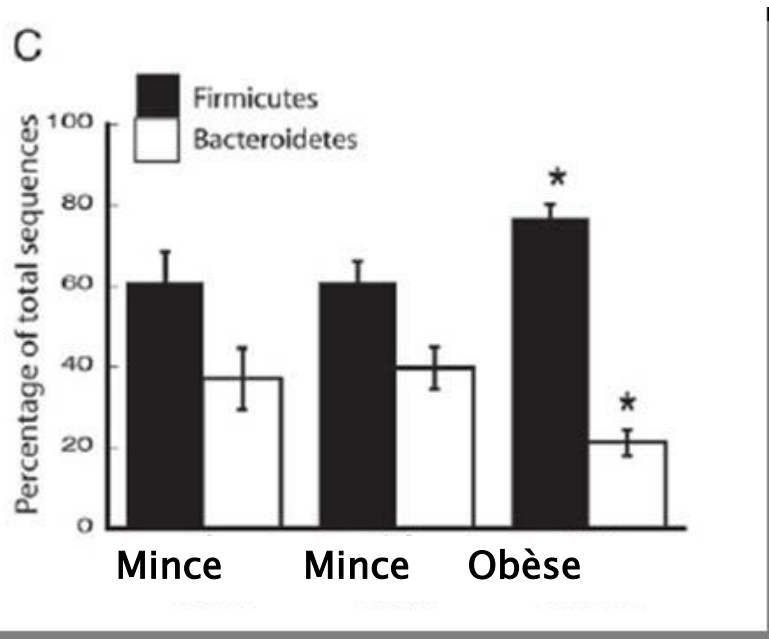
- ▶ **Protection vis-à-vis des micro-organismes entéropathogènes**
- ▶ **Mécanismes complexes synergiques**
 - Modification de l'environnement (pH)
 - Compétition nutritionnelle pour des substrats
 - Compétition pour une niche écologique
 - Synthèse de molécules antibactériennes (bactériocines)



Le microbiote intestinal

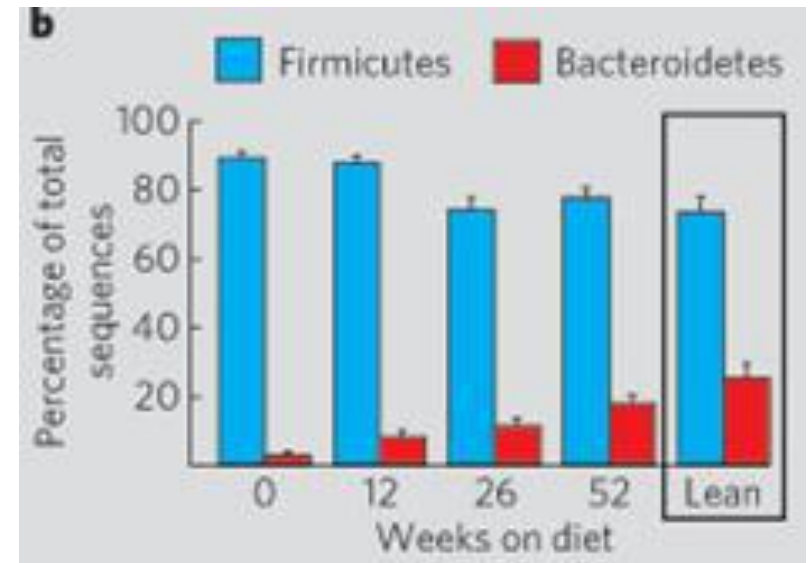
Dysbiose et pathologies :
une modification du dialogue entre
bactéries et hôte ?

Dysbiose et obésité (1)



Analyse de > 5000 séquences de gènes d'ARNr 16S du microbiote de souris minces et obèses

Ley, PNAS, 2005



Analyse du microbiote de patients obèses soumis à un régime hypocalorique

Ley, Nature, 2006

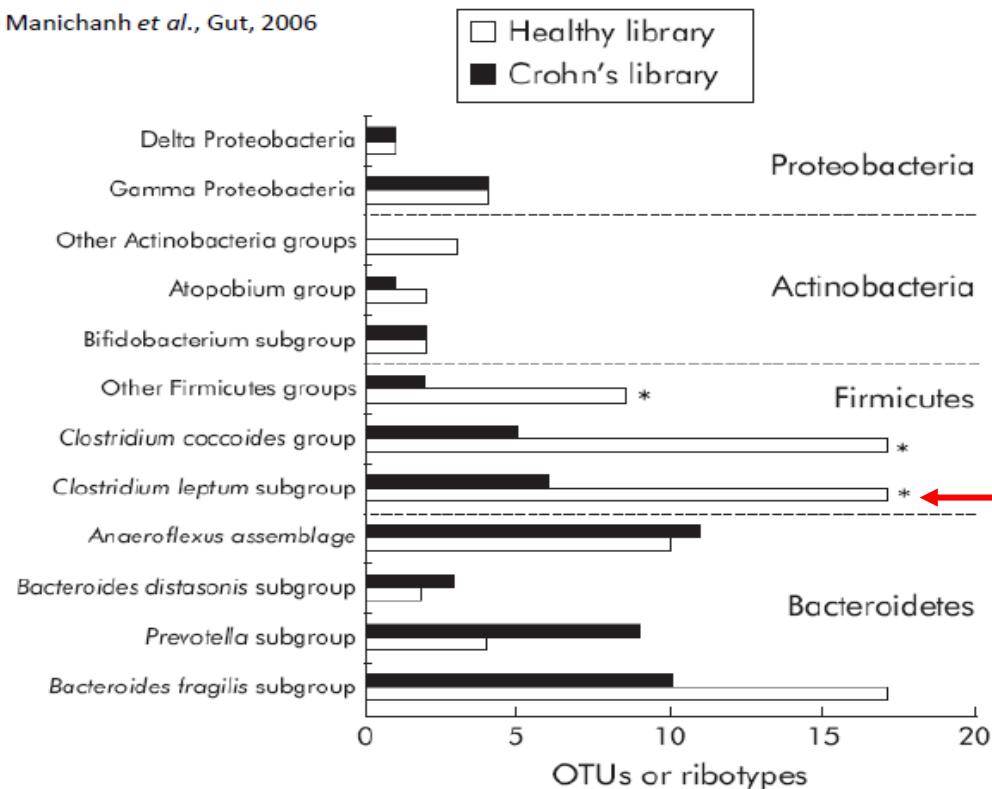
Dysbiose et obésité (2)

- ▶ L'obésité est associée à une modification du microbiote chez l'homme
 - Des premiers résultats qui montraient une augmentation du % de Firmicutes / Bacteroidetes
 - Des résultats plus récents soulignent l'augmentation de *Bacteroides* pro-inflammatoires
 - Toujours une diminution de la diversité bactérienne chez les patients atteints d'obésité

Dysbiose et MICI (1)

- ▶ La diversité du microbiote est réduite chez les patients atteints de la maladie de Crohn

Manichanh *et al.*, Gut, 2006



Espèce dominante du groupe : *F. prausnitzii*

Dysbiose et MICI (2)

- ▶ Diminution de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le microbiote de patients ayant une inflammation intestinale
- ▶ Rôle de cette bactérie ?
 - Propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*
 - En partie liées à des métabolites sécrétés dans le surnageant qui bloquent l'activation de NFκB et la sécrétion d'IL-8



Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn's disease patients

Harry Sokol, B?n?dicte Pigneur, Laurie Watterlot, Omar Lakhdari, Luis Berm?dez-Humar?n, Jean Grataudoux, S?bastien Blugeon, Chantal Bridonneau, Jean-Pierre Furet, Gerard Corthier, Corinne Granette, Nadia Vasquez, Philippe Pochart, Germain Trugnan, Ginette Thomas, Herv? Blotti?re, Jo?l Dore, Philippe Marteau, Philippe Seksik, and Philippe Langella

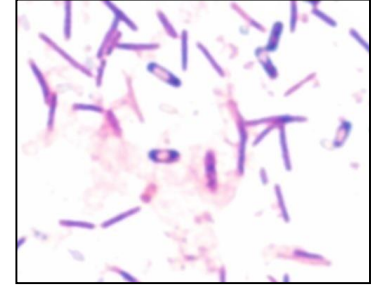
Dysbiose et MICI (3)

- ▶ Rôle potentiel de pathogènes spécifiques
 - *Escherichia coli* enteroadhérents (AIEC)
 - Plus fréquent dans les biopsies de patients atteints de Crohn
 - Rôle proposé :
 - Inflammation liée à la dysbiose → surexpression de récepteurs spécifiques pour ces bactéries à la surfaces des cellules
 - Adhésion des AIEC et rupture de l'intégrité de l'épithélium
 - Passage vers la lame basale
 - Réplication dans les macrophages (→ production TNF α)
 - Entretien de l'inflammation
 - Rôle de Mycobactéries atypiques ?

Dysbiose et perturbation de l'effet barrière :

Exemple des infections à *Clostridium difficile* (1)

- ▶ Bacille à Gram positif, anaérobie strict, sporulant
- ▶ **Responsable d'infections digestives sévères, essentiellement après une antibiothérapie**
- ▶ Contamination oro-fécale
 - **Spores**
 - Manuportage, environnement
- ▶ Altération du microbiote chez les patients atteints d'ICD
 - Diminution de la diversité du microbiote
 - Diminution des *Bacteroides* et *Bifidobacteria*
 - Diminution de bactéries productrices de butyrate
 - Augmentation de pathobiontes (Entérocoques, Enterobactéries)



Dysbiose et ICD (2)

▶ Traitements

- Antibiothérapie spécifique
 - Peu efficace en cas de rechutes multiples
- Essais : **transplantation fécale** par selles de donneurs sains



N Am J Med Sci. 2013 June; 5(6): 339-343.
doi: 10.4103/1947-2714-114163

Fecal Transplantation for the Treatment of Recurrent *Clostridium Difficile* Infection
Zeid Karadshah and Sachin Sule¹

Anaerobe 15 (2009) 285-289



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe



Clinical microbiology

Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection

Johan S. Bakken*

St. Luke's Hospital, Infectious Disease Associates, 1001 East Superior Street, Suite L201 Duluth, MN 55802, United States

- Efficace (rechutes multiples)
- Problèmes sanitaires ?