

De la flore au microbiote, de nouvelles perspectives en médecine

Jacques Croizé

Ancien MCU-PH Bactériologie

UFR Médecine-CHU Grenoble Alpes

Veillée conférence Culture et Montagne

Salle Giono Clelles 26 avril 2023

Ce document présente les textes figurant dans la présentation projetée par Jacques Croizé pendant la conférence.

Un autre document PDF reprenant textes, tableaux graphiques, photographies, articles, est disponible également sur le site de *Culture et Montagne* :

<https://www.culture-et-montagne-trieves.org/accueil>

Un livre indispensable :

« **L'HOMME MICROBIOTIQUE** »

les secrets de l'intestin

de Patrice Debré

éditions Odile Jacob

Une référence : Philippe Sansonetti

Chercheur à l'[Institut Pasteur](#) et professeur au [Collège de France](#), directeur de l'unité [INSERM](#)

De flore au microbiote ... Pourquoi ce changement?

Flore bactérienne: Sa composition était fondée sur les cultures aérobies et anaérobies (10 à 20% de la flore seulement analysées, soit 10 milliards), mais en utilisant la métagénomique 100 000 milliards !!! Et 1000 espèces différentes

• La question fondamentale...Quels rôles jouent ces bactéries ? Arrivera-t-on à les isoler?

Définitions

• **Les « Microbes »** : *Charles Sédillot* en 1878 a donné ce nom à tous les êtres vivants vus au microscope du plus petit au plus grand : les virus, bactéries, champignons,

vers ... terme accepté par Académie de Médecine et approuvé par Littré.

- Selon leur structure cellulaire (*Stanier et Van Niel*) le monde vivant est divisé en procaryotes (cellules sans noyau) et eucaryotes (cellules avec noyau)

- **Les bactéries sont dans le groupe des procaryotes**

- Puis secondairement en fonction de l'étude de ARN16S, les bactéries sont divisées en bacteria et archebacteria

- Microbes : être petit / vivant

- Flore ou Ecosystème : ensemble de bactéries vivant dans un même environnement

- Microbiote : ensemble de micro-organismes (bactéries, amibes, virus)

- Microbiome : ensemble des micro-organismes selon leur génome

- Dysbiose : perturbation du microbiote (changement alimentation, antibiotiques..)

Rappel Historique

- Découvertes des **bactéries pathogènes** années 1860

- Découvertes des **sulfamides puis antibiotiques** 1939

- Découvertes **bactéries commensales, saprophytes**, de l'environnement 1930-1950

- Statut de **flore reconnue dans les années 50**

- A la fois découverte de nouveaux outils, notamment en biologie moléculaire (Génome, PCR, métagénomique,) et nouvelle procédure d'identification des bactéries par spectrométrie de masse (technique rapide)

Grandes étapes de l'évolution des connaissances en bactériologie

- **XIX siècle : Pasteur et Koch et leurs élèves** : découverte du **monde microbien** (pathogène surtout ; commensal avec Metchnikoff). **Traquent les bactéries pathogènes** : *M. leprae* 1873, *B. anthracis* 1876, *S. typhi*, 1880 *M. tuberculosis* 1882, *V cholerae* 1883, *C. tetani* 1884, *E coli* 1885, *S. pneumoniae* 1886, *C. Botulinum* 1896 etc...

- **XX siècle : Domagk sulfamides/ Fleming- Florey -Chain pénicilline / Waskman Streptomycine**

- **XXè siècle** : Dernières bactéries pathogènes majeures : ***B. burgdorferi* 1975, *L.pneumophila* 1976 et *H. pylori* 1984** puis Analyse des génomes complets des bactéries et autres découvertes : acides nucléiques ; PCR ; spectrométrie de masse ; Toll récepteur

•**XXI siècle** : Etude approfondie du microbiome : complète la culture (découverte de « nouvelles » espèces incriminées dans des phénomènes non infectieux)

Techniques de colorations

- Appliquées universellement
- Fondamentales pour visualiser le prélèvement au microscope optique
- Deux colorations fondamentales
- **Coloration de Gram (Hans Christian Gram 1853-1938 (inventé en 1894).**
- **Coloration de Ziehl – Neelsen (l’un médecin allemand, le second) coloration des mycobactéries BK**
- Autres méthodes :
- Immunofluorescence
- Examen de la mobilité

Particularités des prélèvements

- Prélèvements « stériles » provenant de **sphères ou zones elles-mêmes stériles** à l'état physiologique: sang, LCR, urines..(eh oui!!), liquide pleural
- Prélèvements venant de **sphères ou zones colonisées par des bactéries commensales** : selles, sphère rhino-pharyngée, ORL expectoration, prélèvement vaginal

Particularités de la culture bactérienne

- Utilisation de milieux de culture gélosés spécifiques ou non ou milieux liquides (Boite de Pétri)
- Trois paramètres fondamentaux
- Température (37°C)
- Rapport avec oxygène : en milieu aérobie, sous CO₂ ou en anaérobose
- Temps incubation variable
- Conséquence : une bactérie donne un clone bactérien matérialisé par une colonie
- Température de croissance variable selon espèces**
(entre -10 et +110 °C)

Technique d'identification

- Recherche de caractères phénotypiques à partir des cultures (caractères

biochimiques) à deux à 10 jours

- Recherche par spectrométrie de masse à partir des cultures, des protéines ribosomales: à 10 minutes.
- Diagnostic par PCR (Polymérase Chain reaction)

De l'examen direct (microscope x 500 ou 1000) à la culture (gélose différente selon les bactéries recherchées)

Objectifs du diagnostic

- Diagnostic d'une maladie infectieuse bactérienne :
 - Identification** bactérienne : différentes approches
 - Antibiogramme** : quels antibiotiques sont actifs? diffusion, dilution, CMI, biologie moléculaire

Rapport bactérie/hôte

- Bactérie commensale** : bactérie vivant en symbiose avec son hôte et lui apportant des propriétés bénéfiques (défense, production de vitamines, stimulation de l'immunité) rarement pathogène sauf en cas d'affaiblissement de l'immunité de l'hôte, de pénétration dans un site stérile, d'acquisition de nouveaux facteurs de virulence.
- Bactérie saprophyte** : bactérie nécessitant des conditions de croissance différentes de celles trouvées chez l'homme, les rendant peu aptes à se multiplier et possédant peu ou pas de facteurs de virulence
- Bactérie pathogène** : bactérie entraînant des infections par des facteurs de virulence spécifiques.

Les portes d'entrée de la maladie

- Voie respiratoire
- Voie digestive
- Voie sexuelle
- Voie cutanée
- Vectorielle : puces, tiques, moustiques

FLORES : l'acquis - Les six flores humaines

- Flore buccale

- Flore intestinale
- Flore vaginale
- Flore cutanée
- Flore ORL
- Flore urinaire

Rôle bénéfique du microbiote

- Diffusion sanguine de produits bactériens comme Vitamines (notamment B12 et K)
- Stimulation du système nerveux entérique (neurones) qui communique avec le cerveau par le nerf vague (par production bactérienne de neuro-médiateurs) 200 millions de neurones au niveau beaucoup plus nombreux que dans le cerveau intestinal. Rôle de la sérotonine. D'où le nom de deuxième cerveau!!!!
- Stimulation du système immunitaire

Les Bifidus

En naissant l'enfant quitte son environnement stérile et rencontre les flores vaginale et fécale qui se multiplieront dans une atmosphère aéro-anaérobie. C'est Henri Tissier qui observera en 1899, cette flore « bleue ». comportant essentiellement à la naissance des **bactéries bifides Gram positive qu'il appellera Bifidus**.

Elles se développeront surtout chez les enfants nourris au sein, le lait maternel comportant des facteurs de croissance. Elles seront en place durant cette nourriture au sein.

Microbiote vaginal

- Encore appelée *Flore de Doderlein* (découverte en 1892), Doderlein les apparente aux Lactobacillus. Ils viennent du rectum d'où ils colonisent le vagin. Ils entraînent une acidité vaginale protectrice des infections (au moins 20 espèces différentes)
- Sous influence hormonale
- Flore peut changer selon le pH (degré d'acidité) vaginal ou après des lavages vaginaux.
- Lors d'infection vaginale apparition de nouvelle flore.

Nouvelle approche complétant la flore : le microbiote

Nouvelle technologie à nouvelle définition (début année 2005)

- La métagénomique est un procédé méthodologique qui vise à étudier le microbiome.
- L'analyse métagénomique peut être réalisée par le séquençage d'un ou plusieurs gènes particuliers, notamment le gène ribosomal 16S ARN
- Analyse informatique des résultats

Ré-définition du Rôle du microbiote

- Stimulation du système nerveux entérique (neurones) qui communique avec le cerveau par le nerf vague (production bactérienne de neuro-médiateurs)
- Diffusion sanguine de produits bactériens à distinguer de la translocation bactérienne (bactéries entières)
- Stimulation du système immunitaire

Les quatre groupes (ou phylum) bactériens du microbiote intestinal

Poids : 1,5 kg, 500 à 1000 espèces, 100 000 milliards bactéries, **60 à 70% d'espèces non cultivées**. Stable vers deux /trois ans et puis se modifie avec l'âge.

- **Firmicutes** le plus abondant (60 à 80% du microbiote), (BGP) avec 250 genres dont *Lactobacilles*, *Streptocoques*, *Clostridium*, *Faecalibacteria*.
- **Bacteroidetes** (10 à 40% du microbiote) 50 genres dont *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*.
- **Actinobacteria** : (1% du microbiote) Bifidobacteria
- **Proteobacteria** : entérobactéries

Etude des populations de Microbiote intestinal

- Les individus seraient répartis en trois groupes ou entérotypes selon la signature bactérienne caractérisée par un genre prépondérant :
 - Bacteroidetes : graisses animales, protéines
 - Prevotella : hydrates de carbone
 - Clostridiales
- Exemple d'une peuplade (« Hadza ») ne consommant jamais de produits laitiers : absence de Bifidobacterium dans leur intestin

Microbiote intestinal

- **Bouche** : 320 espèces différentes, plusieurs millions par millilitre de salive; celles qui adhèrent surtout : le streptocoque. Attention aux caries, lysozyme enzyme salivaire détruit des bactéries. Production d'anticorps.
- **Estomac**. L'acidité détruit des bactéries mais pas toutes notamment *Helicobacter* qui peut s'installer, résistant à l'acidité gastrique, provoquant l'ulcère.

Nouveaux regards sur ces nouvelles bactéries

Akkermansia muciniphila
renforce la barrière intestinale

***Akkermansia muciniphila*, TLR2 et barrière intestinale**

Les *Toll-like receptors* (TLR) interviennent dans la reconnaissance des constituants bactériens par le système immunitaire. Ils participent ainsi aux interactions entre l'hôte et son microbiote, et peuvent également moduler l'homéostasie intestinale et le métabolisme de l'hôte. Nous avons évalué le potentiel d'*A. muciniphila* à activer différents TLR, et avons montré que la bactérie pouvait spécifiquement interagir avec le TLR2..

De nombreux résultats montrent que l'activation du TLR2 au niveau intestinal permet de renforcer la fonction de barrière de l'intestin, en modulant des protéines de jonction serrée. Nous avons pu observer qu'*A. muciniphila* et Amuc_1100* augmentent l'expression de plusieurs de ces protéines, telles que l'occludine et la claudine 3, indiquant ainsi une nouvelle voie **contribuant au renforcement de la barrière intestinale par la bactérie.**

Akkermansia

- Surpoids et obésité problème de santé publique.
- Obésité prédispose au diabète de type 2 et maladies cardiovasculaires encore appelées maladies métaboliques.
- *A. mucinophila* diminue chez ces patients et leur administration dans les premiers essais chez l'homme montre une efficacité.

Pathologies ou troubles associés à des dysbioses du microbiote intestinal

Diabète de type 2

- Une alimentation déséquilibrée **est associée à un dérèglement du microbiote**

intestinal qui favorise les maladies métaboliques comme le diabète.

- Des chercheurs de l'Inserm, de Sorbonne Université, de l'AP-HP et d'INRAE en collaboration avec une équipe suédoise, montrent que des changements dans la composition du microbiote intestinal entraînent une augmentation des niveaux sanguins d'une molécule appelée le propionate d'imidazole*, au sein d'une large cohorte européenne.
- Cette molécule est connue pour rendre les cellules de l'organisme résistantes à l'insuline et augmenter le risque de diabète de type 2. Les résultats sont publiés dans le journal Nature 2020

MICI et Microbiote intestinal

- MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) regroupe maladie de Crohn et Rectocolite hémorragique (RCH)
- Inflammation due à l'interaction prédisposition génétique et facteurs environnementaux dont le microbiote.
- Après un traitement antibiotique, *Ruminococcus*, en faible quantité se multiplie et dégrade le mucus

Métabolisme du tryptophane et microbiote intestinal

[Le tryptophane est un des 20 acides aminés qui entre dans la composition des protéines]

Dégradation du tryptophane

- Trois voies essentielles de son métabolisme
- Intervient dans Crohn, colites
 - Soit voie en dérivés indole capables d'activer un récepteur des hydrocarbures aromatiques présent sur des cellules immunitaires et cellules épithéliales intestinales ; activation inter-leukine 22
 - Soit celle de la sérotonine : 80% de sa production vient de l'intestin, impliquée dans de nombreuses pathologies.
 - Soit voie de la kynurénine impliquée dans le processus immunitaire

Des bactéries résident à l'intérieur de cellules tumorales

article dans la revue *Science* 29 mai 2020

Microbiote dans tumeurs malignes du sein

L'étude a révélé que le microbiote des tumeurs malignes du sein est significativement plus riche et divers que celui associé à d'autres cancers. En moyenne, plus de 14 espèces bactériennes différentes ont été dénombrées dans les échantillons de tumeurs mammaires, contre moins de 9 dans d'autres types de cancer.

Des bactéries vivantes

Tumeurs provenant de cinq femmes ayant été opérées pour un cancer du sein. Plus d'un millier de colonies bactériennes ont poussé à partir de chacune de ces tumeurs. L'analyse génétique a montré que ces colonies représentaient au total 37 espèces bactériennes différentes. Ces bactéries vivantes appartenaient principalement aux groupes des Protéobactéries, des Firmicutes et des Actinobactéries.

Un composant entrant dans la composition de la paroi bactérienne a été détecté dans chacun des quatre échantillons tumoraux analysés. Un résultat qui, selon les auteurs, « *plaide en faveur de l'hypothèse selon laquelle les tumeurs hébergent des bactéries vivantes intracellulaires* ».

L'observation de bactéries intracellulaires associées à une tumeur soulève néanmoins une autre hypothèse, non exclusive de la précédente, à *savoir que certaines bactéries aient pu parvenir à l'intérieur de la tumeur, intactes ou sous forme de fragments, par des cellules immunitaires ou cancéreuses ayant migré jusqu'au site tumoral.*

Un microbiote spécifique de la variété de cancer

- L'étude montre surtout un microbiote distinct selon le type de cancer. Il a ainsi été montré que les bactéries présentes dans les tumeurs colorectales appartiennent aux groupes des Firmicutes et des Bacteroidetes.
- En revanche, dans le cancer du pancréas, le groupe bactérien prédominant est composé de Protéobactéries, largement présentes dans le microbiote au niveau du duodénum (partie initiale de l'intestin grêle). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que des bactéries migrent dans le pancréas en remontant dans le conduit pancréatique qui débouche dans le duodénum.

Transfert du Microbiote Fécal (TMF)

dans les colites pseudo-membraneuses à *Clostridium difficile* résistant aux antibiotiques - **Rapport ANSM mars 2014**

Les probiotiques

Historique : le yaourt premier probiotique alimentaire

Arrivée de **Metchnikoff** savant ukrainien (1845-1916), naturalisé français, travaillant à Institut Pasteur, Prix Nobel de Médecine en 1908 pour ses recherches en immunologie, avait constaté les effets bénéfiques du yaourt sur la longévité des montagnards du Caucase et des Balkans. Il est à la base du développement du yaourt en Europe occidentale.

1917 : **Isaac Carasso** (1874-1939) médecin espagnol teste sur la base des hypothèses de Metchnikoff le lait fermenté chez des enfants souffrant de troubles digestifs. Il les vend en pharmacie.

1919 : production yaourt industriel à Barcelonne

1929 : son fils Daniel (né en 1905) lance la production en France, sous le nom de Danone (Danon petit Daniel).

Probiotique : définition

« C'est un **microorganisme vivant** qui, lorsqu'il est consommé en quantité adéquate, produit un bénéfice pour la santé de l'hôte » . (FAO/OMS 2001).

Les principaux microorganismes classés comme probiotiques sont des **lactobacilles**, **des bifidobactéries**, et la levure *Saccharomyces boulardii*.

Historique du lait fermenté au Bifidus : de Tessier à « Activia »

Deux fabricants de « Probiotiques » complément alimentaire

Probiotiques « compléments alimentaires »

- Comportent différentes espèces de lactobacillus et/ou de Bifidus, associés parfois à des prébiotiques (inuline comportant du fructose)
- Indications variées sans preuves scientifiques manifestes

Probiotiques médicamenteux appoint du traitement contre la diarrhée

- **Ultra-levure** : *Saccharomyces boulardii*. Traitement d'appoint de la diarrhée. Il transite vivant dans le tube digestif sans le coloniser. Disparaît 2 à 5 jours après arrêt du traitement.
- **Lactéol** : *Lactobacillus inactivés* par la chaleur 10 milliards (*L. fermentum* et *L. delbrueckii*) En complément de la réhydratation, traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée.
- **Carbolevure** : charbon activé + *Saccharomyces cerevisiae* 10.8 par gramme. Traitement symptomatique des manifestations intestinales avec météorisme.

Probiotiques médicamenteux vaginaux

• **Trophigil** : gélule vaginale contenant cultures lyophilisées de *L. casei variété rhamnosus* Doderleini, Oestriol, progestérone.

Indications sécheresse vaginale.

• **Florgynal** : gélule vaginale contenant cultures lyophilisées de *L. casei variété rhamnosus* Doderleini, Oestriol, progestérone..
