

# Eubiose et dysbiose: où sont les signatures ? De corrélation à causalité...



Pr Philippe Sansonetti



Leçon #5  
24 janvier 2018



24 janvier 2018

Leçon#4:

"Eubiose et dysbiose: où sont les signatures ?"

Séminaire:

"Le poids du microbiote dans l'obésité et le diabète"

**Karine Clément**

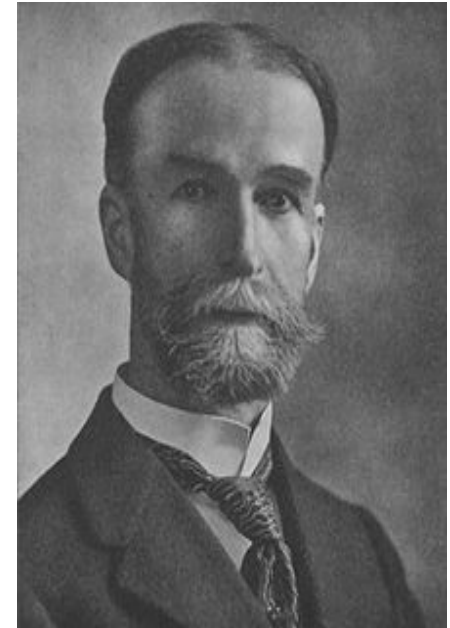
Professeur de Nutrition

Université Pierre et Marie Curie



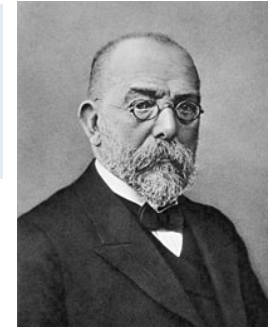
"It is what bacteria do rather than what they are that commands attention, since our interest centers in the host rather than in the parasite"

**Theobald Smith.** Some Problems in the Life-history of Pathogenic Microorganisms, Amer. Med., viii, pp.711-718, 1904."



Theobald Smith  
1859-1934

Une fois établie théorie de l'origine microbienne des maladies, comment passer de corrélation à causalité ?



Robert Koch  
1843-1910

### **Postulats de Koch, version originale (1884): microbes agents étiologiques de maladies**

Le microorganisme doit être retrouvé en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais ne devrait pas être retrouvé dans les organismes sains

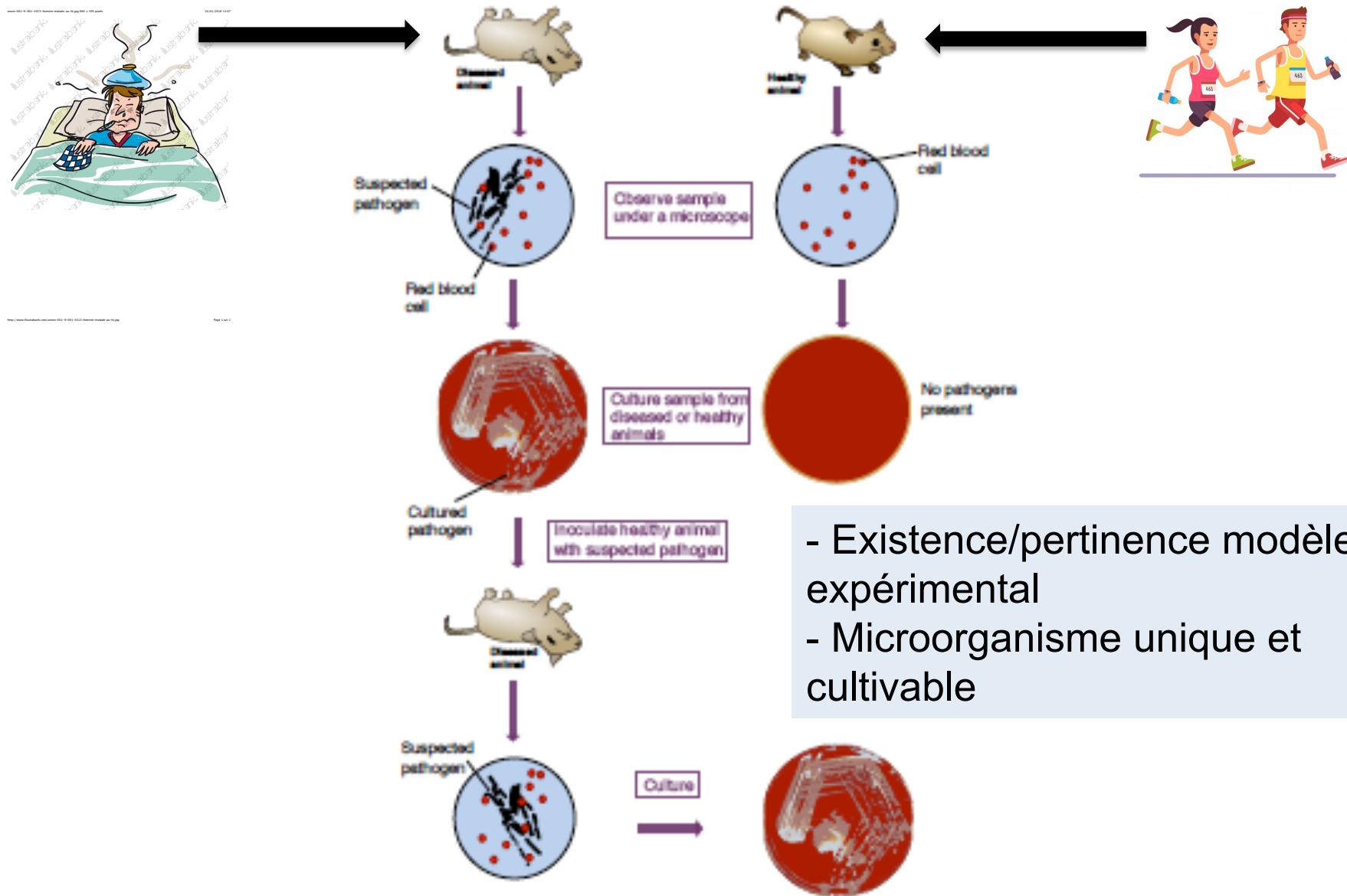
Le microorganisme doit pouvoir être isolé d'un organisme malade et cultivé en culture pure

Le microorganisme cultivé d'un organisme malade devrait causer la maladie chez un organisme sain

Le microorganisme doit être réisolé de l'hôte rendu malade par son inoculation expérimentale et identifié comme étant identique au microorganisme initial

Koch R (1884) Die aetiologie der tuberkulose. Mitth aus dem Kaiserl Gesundheitsamt 2:1–88

# Postulats de Koch, des prérequis exigeants



- Existence/pertinence modèle expérimental
- Microorganisme unique et cultivable

## Controverses...

Postulats de Koch très tôt controversés, particulièrement pour des maladies comme le Choléra qui ne bénéficiaient pas d'un modèle animal contrairement au Charbon (*Bacillus anthracis*) = mouton pour qui la maladie est naturelle

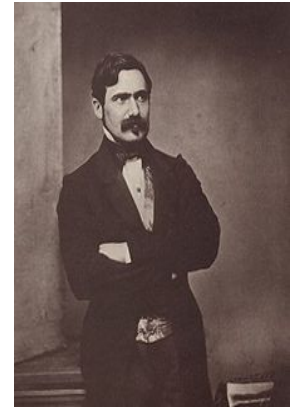
**Max von Pettenkofer** (Munich), épidémiologiste (contemporain Koch), avait avalé en plein cours suspension bacille du choléra (1892)

N'avait pas développé la maladie (ainsi que ses élèves...) et avait conclu que sur la base des postulats de Koch, *V. cholerae* n'était pas l'agent du Choléra = "Théorie tellurique" du Choléra

Plus largement "Théorie du milieu" = conditions environnement et constitution individu qui préparent terrain aux maladies

Von Pettenkofer considéré comme père hygiène et santé publique en Allemagne

Cf. Axel Stefek, *Wasser unter der Stadt. Bäche, Kanäle, Kläranlagen. Stadthygiene in Weimar vom Mittelalter bis zum 20. Jahrhundert.*, Weimar, Abwasserbetrieb Weimar, 2012, « *Das Weimarer Tonnensystem als Maßnahme der Stadthygiene* », p. 75–123, et notamment pp. 88–91.



Max von Pettenkofer  
1818-1901

# Postulats de Koch revisités (1) Bases génétiques et moléculaires de la pathogénicité microbienne



Stanley Falkow

Le phénotype ou la propriété étudiés devraient être associés à des membres pathogènes d'un genre microbien ou à des isolats pathogènes d'une espèce

L'inactivation spécifique du ou des gènes associés au trait de pathogénicité/virulence suspecté devrait donner lieu à une perte mesurable de la pathogénicité/virulence

La réversion ou le remplacement allélique du gène muté devrait restaurer le phénotype de pathogénicité/virulence

Falkow S (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. Rev Infect Dis 10(Suppl 2):S274–S276

## Débat dans les années 90...

Le VIH ne répond pas aux postulats de Koch

Certains – Peter Duesberg en particulier - vont arguer de ce fait pour mettre en doute le lien de causalité du VIH et du SIDA

(Duesberg PH. 1992. AIDS acquired by drug consumption and other noncontagious risk factors. *Pharmac Ther*, 55:201-277

Weiss, Robin A.; Jaffe, Harold W. (1990). "Duesberg, HIV and AIDS". *Nature*. 345 (6277): 659–60)

Même souci pour l'établissement d'un lien de causalité entre "virus oncogènes" et oncogénèse

(Moore, Patrick S.; Chang, Yuan (2013). "The conundrum of causality in tumor virology: The cases of KSHV and MCV". *Seminars in Cancer Biology*. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.11.001)

Ou HPV et cancer du col

Roden R & Wu tc. 1992. *Nat Rev Cancer*

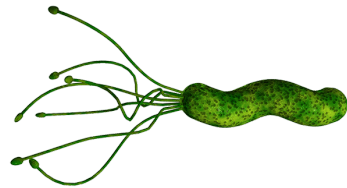
Maladie animale équivalente (HPV) G Orth, H Zur Hausen...



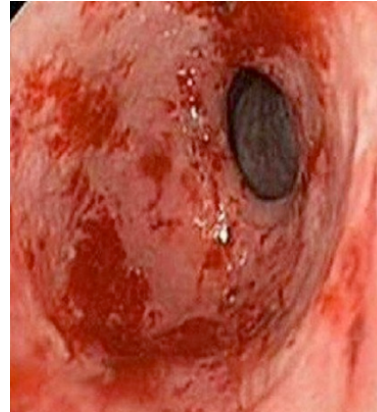
## Evolution des postulats de Koch: version héroïque "à la von Pettenkofer"

Certains décidèrent de franchir la barrière des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> postulats de Koch en s'auto-inoculant le microorganisme suspect et en le recultivant à partir de l'organe infecté

# Mon Nobel pour une gastrite !



*Helicobacter pylori*



Barry Marshall

Robin Warren

Barry Marshall s'auto-administre *H. pylori*, développe une gastrite, se fait endoscooper et biopsier et réisole *H. pylori* associé à des signes de gastrite alors qu'il était absent d'une muqueuse saine lors de l'endoscopie précédant l'inoculation = **4 postulats de Koch remplis !**

Nobel acceptance lecture, 8 décembre 2005,  
["Barry J. Marshall – Biographical"](#). *Nobelprize.org*. Nobel Media AB

Prix Nobel 2005 en Physiologie ou Médecine pour "la découverte de la bactérie *Helicobacter pylori* et son rôle dans la gastrite et la maladie ulcéreuse

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5

Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric Campylobacter. *Med J Aust* 1985; 142: 436-9

## Evolution des postulats de Koch: version moléculaire "à la Falkow"

On prend avantage des méthodes de diagnostic moléculaire (permet de couvrir les microorganismes incultivables ou difficilement cultivables (virus en particulier))

On travaille directement à partir d'études humaines chez des patients infectés et leurs contrôles non infectés

**Irruption diagnostic moléculaire et études cliniques dans établissement du lien de causalité**

Un air de modernité, mais plus de complexité et moins de "pureté expérimentale", donc espace persistant pour discussions/controverses

## Postulats de Koch revisités pour 21<sup>ème</sup> siècle (2) A une techniques diagnostic moléculaire



David Relman

Une séquence acides nucléiques appartenant à possible pathogène présente dans plupart des cas d'une maladie infectieuse. Séquences retrouvées préférentiellement dans organes affectés par maladie et pas dans organes non affectés

Beaucoup moins (pas du tout) de copies de la séquence détectés dans hôtes non malades et/ou tissus non infectés

Avec régression maladie, nombre copies séquence devrait considérablement diminuer, voire s'annuler. Inversement en cas de rechute

Quand détection séquence précède maladie ou nombre de copies séquence corrèle avec la sévérité de la maladie, un lien de causalité est plus probable

Nature microorganisme identifié par séquence devrait être cohérente avec caractéristiques connues microorganisme

Corrélat tissus/organe-séquence à rechercher au niveau cellulaire, par exemple par hybridation in situ séquences microbiennes dans zones de tissus affectés, au niveau où microorganismes suspects observés ou dans des zones où ils sont attendus

Observations reproduites sur plusieurs individus malades et contrôles

## Vue élargie de l'interface hôte-microbes à l'homéostasie (santé) et dans la maladie

Séquençage nouvelle génération (NGS) et bioinformatique ont permis de revisiter le microbiote et de l'établir comme un acteur incontournable de la santé et de la maladie chez l'homme

Changement paradigme d'une vision focalisée interaction entre une espèce pathogène et une cellule (tissus/organe), à interaction plus large impliquant communautés bactériennes complexes en interaction avec hôte à homéostasie (résultat longue co-évolution) ou dans conditions pathologiques:

- En réponse directe à **dysbiose**
- Secondaire à rupture barrière de colonisation microbiote par un pathogène ou à **dysbiose** facilitant émergence pathobio

**Nature de la dysbiose (signatures) ?**

**Lien de causalité dysbiose-pathologie ?**

## Fonctions homéostatiques

### Influences

Barrière contre les "intrus" (pathogènes)  
Maturation et homéostasie du système immunitaire  
Régénération épithéliale  
Angiogénèse/maturation BHH  
Signalisation neurologique  
Fonctions endocrines intestinales  
Densité osseuse  
Bioénergétique

...

### Biosynthèses

Vitamines (A, B1, Folates, B12, K)  
Hormones stéroïdes  
Neurotransmetteurs

### Metabolisme

Réduction / fermentation de polysides complexes / branchés (exogènes / mucines)  
Dégradation aa aromatiques (tryptophane, sels biliaires, xénobiotiques, médicaments)

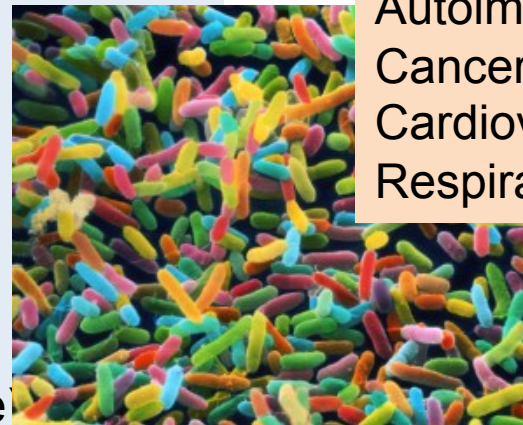
Microbiote intestinal:  
fonctions & dysfonctions

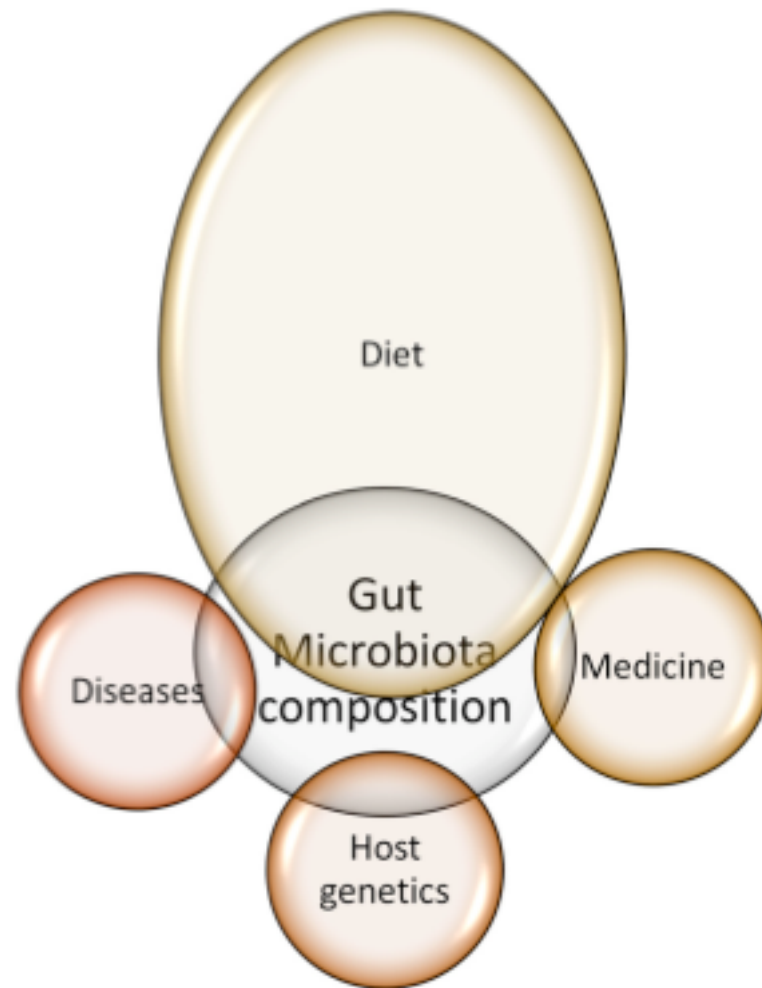
## Dysbiose



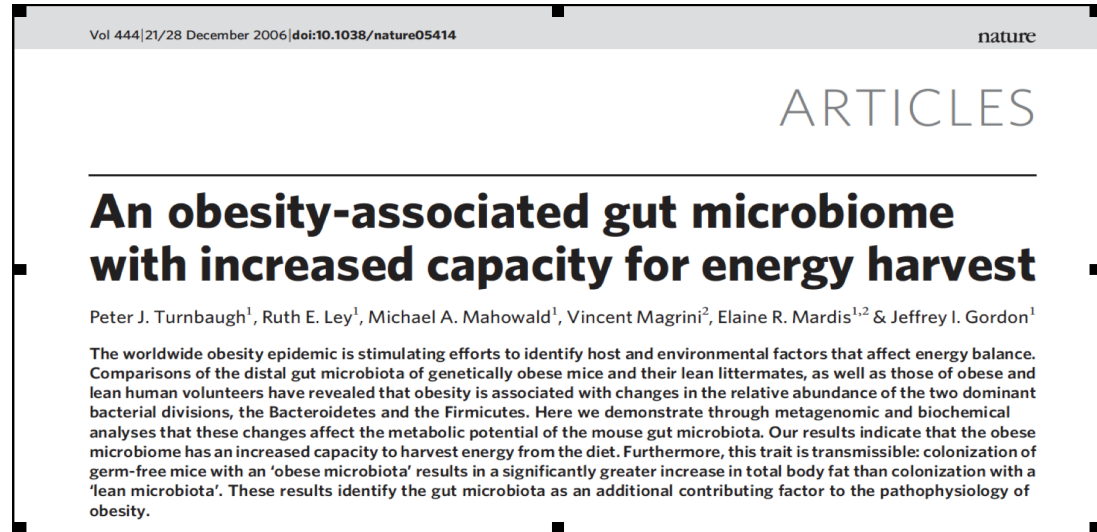
## Maladies en rapport avec le microbiote

Gastrointestinales / hépatiques  
Métaboliques  
Neuro-psychiatriques  
Autoimmunes  
Cancer  
Cardiovasculaires  
Respiratoires





# Dysbiose & Obésité



Turnbaugh et al. 2006. Nature

La "collecte" excessive d'énergie par le microbiote au cours de l'obésité a été étudiée/démontrée chez des souris conventionnelles génétiquement obèses ob/ob qui présentent une augmentation de SCFAs dans leur caecum et une diminution de la quantité d'énergie dans leurs selles en comparaison de souris conventionnelles wild type.

L'analyse métagénomique du microbiote caecal a montré un enrichissement en gènes/fonctions en rapport avec la dégradation des polysides alimentaires chez les souris ob/ob





# La rencontre avec le microbiote, un événement clé pour la santé future de l'enfant ?

- Des nourrissons exposés aux antibiotiques dans les premiers six mois de leur existence montrent une augmentation de 22 % du risque d'obésité à un âge plus avancé, possiblement car antibiothérapie élimine espèces bactériennes essentielles à l'équilibre nutritionnel (Cox et coll. 2014. Cell; Trasande L et coll. 2013. Int J Obes)
- Traitement antibiotique (Péni+Vanco ou Chlortétracycline) à doses subthérapeutiques (STAT) chez souriceaux pendant 7 semaines .

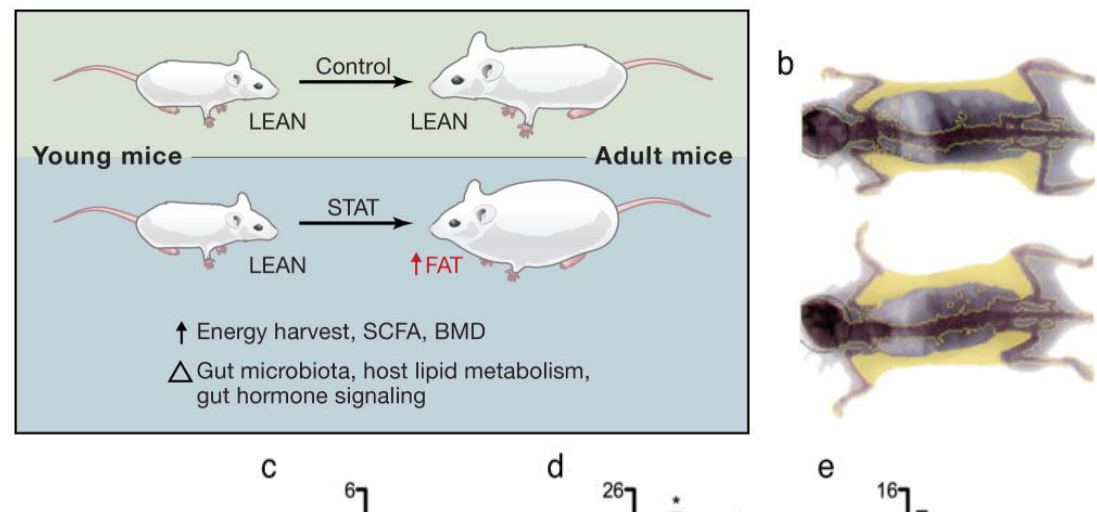
Augmentation ratio

Firmicutes/Bacteroidetes

Augmentation masse  
graisseuse

Augmentation hormones  
métabolisme lipides

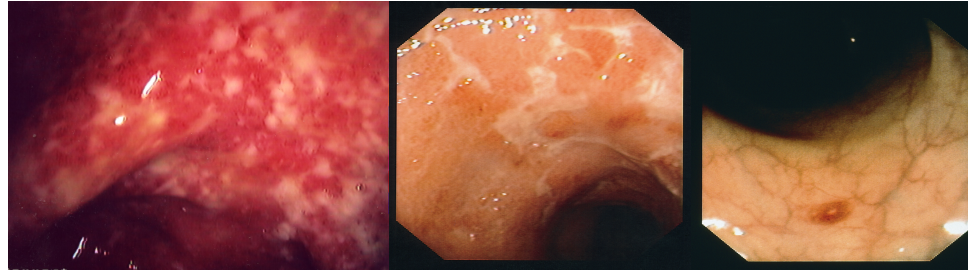
Cho E et al. 2013. Cell Metab



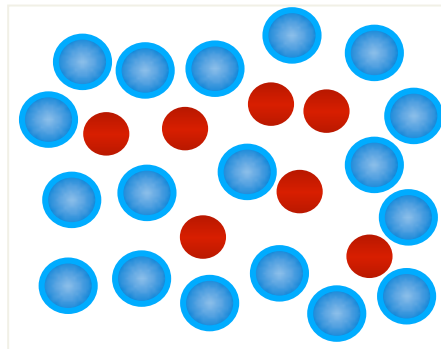
# MICI - Dysbiose

Rectocolite hémorragique

Maladie de Crohn

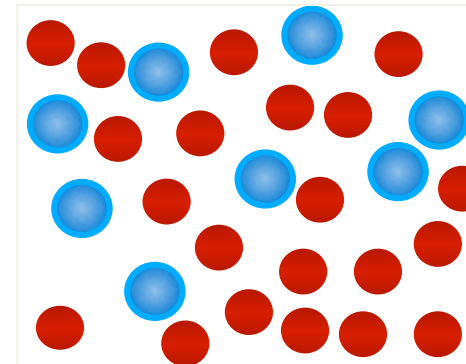


Perte de bactéries  
immunorégulatrices



*Faecalibacterium prauznitzii*  
autres...

Emergence de bactéries plus agressives  
= pathobiotés



Protéobactéries (Entérobactéries)  
AIEC...

Réduction de la diversité du microbiote du colon des malades atteints de MICI au site de l'inflammation

Réduction allant jusqu'à 50 % chez les patients atteints de Maladie de Crohn attribuée en partie à la perte de *Bacteroides*, *Eubacterium* et *Lactobacillus* (Ott SJ et al. 2003. Gut)

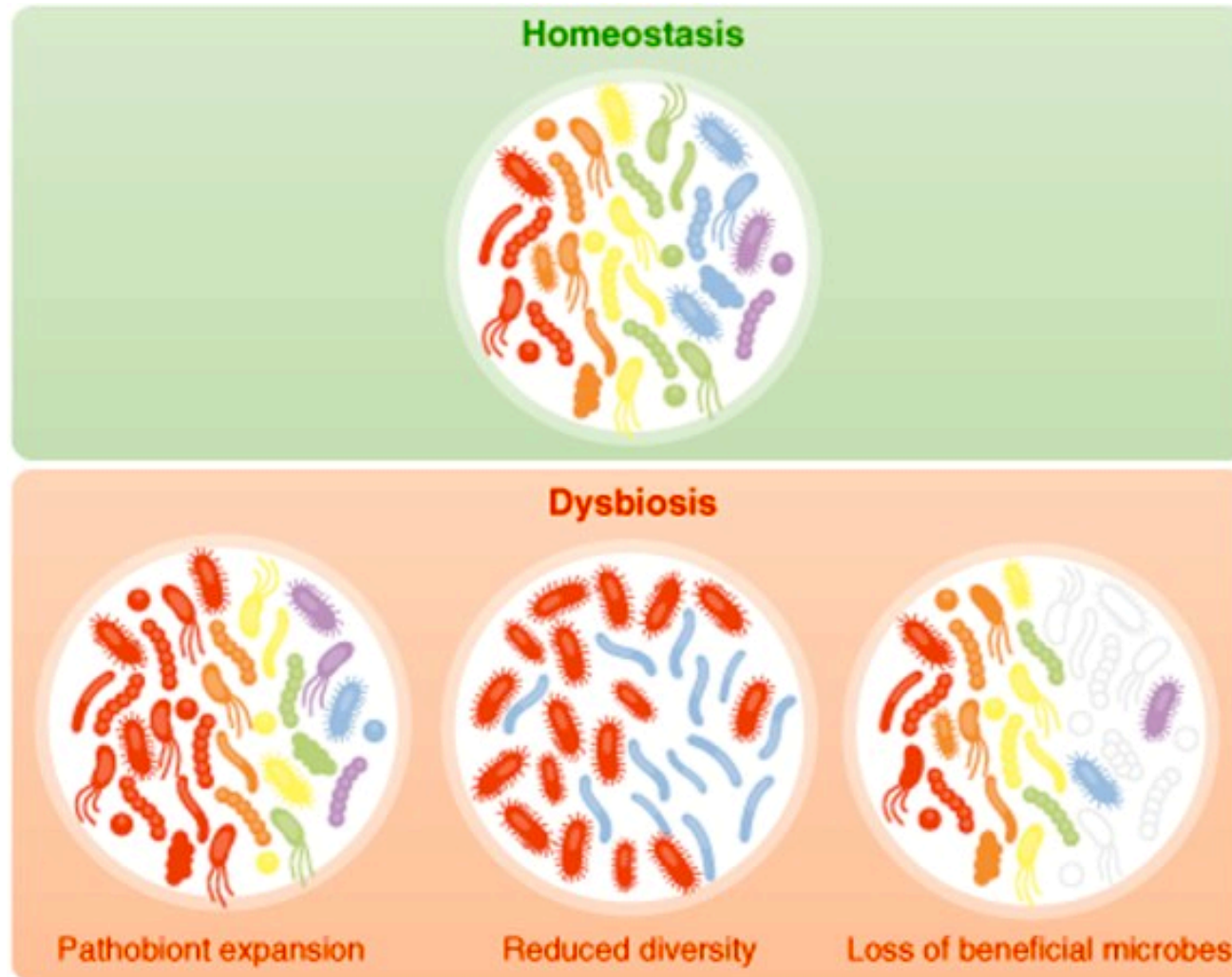
# Définition dysbiose

Souvent = réduction de diversité en taxa (microbiologie classique/ métataxonomie) et/ou réduction en diversité et richesse génique (métagénomique) et/ou excès un ou plusieurs pathobiotés (Round & Mazmanian. 2009. Nat Rev Immunol)  
Recherche croissante de signatures métabolomiques

Difficultés pour définir dysbiose:

- Toutes dysbioses pas nécessairement pathogènes (état écologique alternatif pas obligatoirement état pathologique)
- Grandes variations individuelles/interindividuelles et médiocre définition du "coeur bactérien/génique" assurant symbiose mutualiste = homéostatique
- Composition métataxonomique ne donne pas nécessairement données solides sur fonctions car les mêmes voies métaboliques peuvent être partagées par plusieurs espèces
- Localisation non prise en compte: globale ? locale (3D...)

# Définition de la dysbiose



## Définition dysbiose

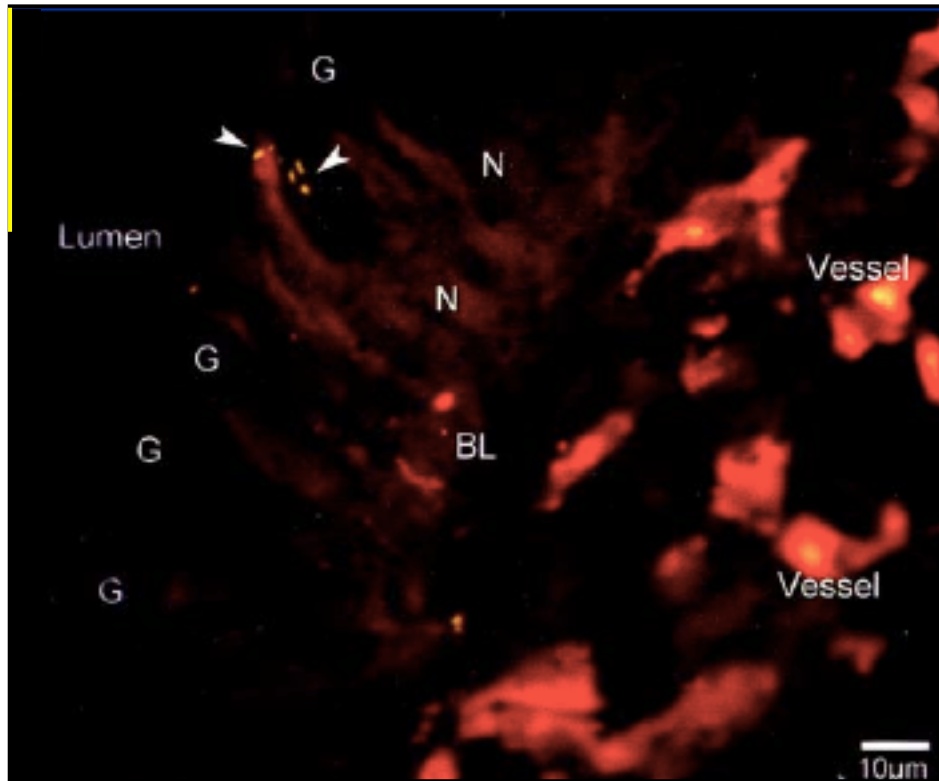
3D = certaines espèces bactériennes résidant dans la couche de mucus agissent comme moteurs états normaux ou pathologiques soit par contact direct avec muqueuse, soit par communication indirecte via PAMPs et/ou métabolites bactériens (Cho & Blaser. 2012. Nat Rev Genet; Petersen & Round. 2014. Cell Microbiol)

Excès ou insuffisance peut faire pencher balance homéostasie vers inflammation ou autre état pathologique:

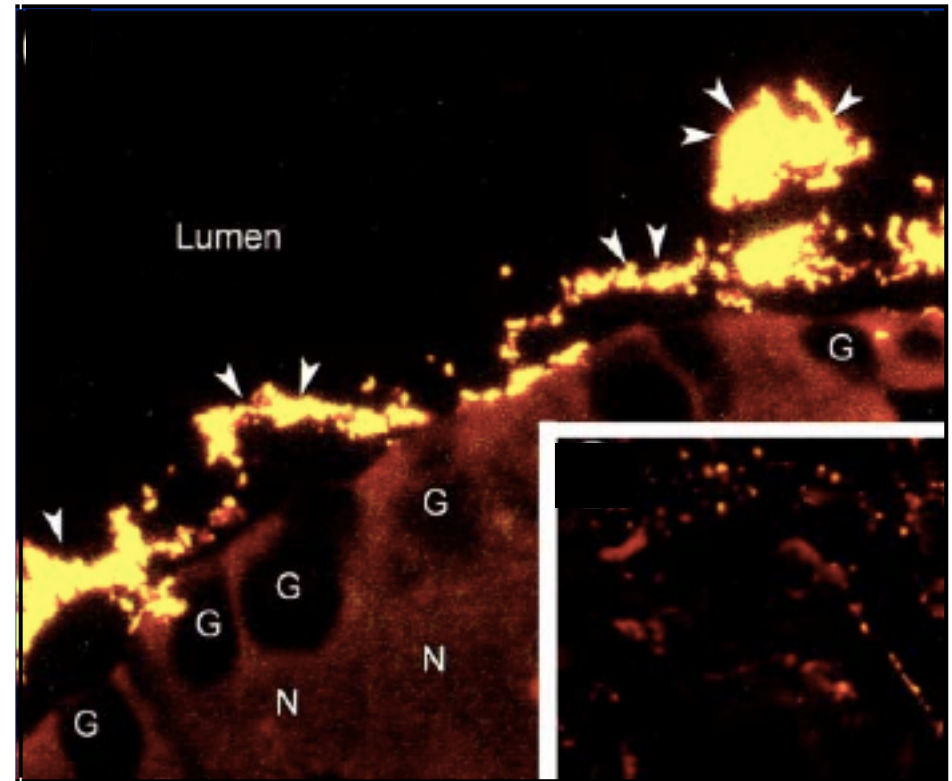
- SFB/autres vs Lactobacillus / Bifidobacterium dans la période de maturation du système immunitaire post-sevrage sevrage(Schnupf et al. 2013. Semin Immunol; Tan et al. 2016. PNAS)
- Fusobacterium / Protéobactéries vs *Faecalibacterium prauznitzii* dans MICI, cancer colorectal (Castellarin et al. 2012. Genome Res; Sokol et al. 2009. Inflamm Bowel Dis) ?

Cependant microbiote pourrait surtout répondre au régime alimentaire qui serait le moteur essentiel de l'état pathologique par l'intermédiaire de l'altération du microbiote = régime riche en graisses, protides & cancer colique (Martinez et al. 2017. Gut Microbes)

# Accroissement massif de la population des Entérobactéries chez les patients atteints de CD



Contrôle normal



Maladie de Crohn active

G = cellules caliciformes, BL = Lamina basale, N = Noyau

# Dysbiose et études cliniques

Etudes d'association chez l'homme ont identifié dysbioses corrélées à états pathologiques, essentiellement chroniques:

**Maladies métaboliques** (Turnbaugh et coll. 2009. Nature; Le Chatelier et coll. 2013. Nature; Quin et coll. 2012. Nature; Karlsson et coll. 2013. Nature, Ridaura et coll. 2013. Science)

**Augmentation adiposité grossesse** (Koren et coll. 2012. Cell)

**Athérosclérose** (Wang et coll. 2011. Nature; Koeth et al. 2013. Nat Med)

**Asthme** (Arrieta et coll. 2015. Sci Transl Med)

Certaines études ont exploré l'existence d'un lien de causalité

1 – Expérimentation animale: en général transfert de microbiote fécal dans la souris axénique

2 – Intervention clinique

## Lien de causalité: souris axéniques



Souris axéniques utilisées afin de phénotypier par transfert fécal les pathologies humaines corrélées à une dysbiose intestinale  
Approche logique afin d'établir un lien de causalité en référence aux postulats de Koch

**Obésité:** microbiotes de sujets obèses transplantés à souris axéniques (Ridaura et coll. 2013. Science)

**Augmentation adiposité grossesse:** microbiotes femmes enceintes transplantés souris axéniques (Koren et coll. 2012. Cell)

**Malnutrition:** microbiotes enfants malnutris (Blanton et coll. 2016. Science)

**Asthme:** microbiotes enfants à risque d'asthme transplanté à souriceaux nouveau-nés (Arrieta et coll. 2015. Sci Transl Med)



## Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice

Vanessa K. Ridaura<sup>1</sup>, Jeremiah J. Faith<sup>1</sup>, Federico E. Rey<sup>1</sup>, Jiye Cheng<sup>1</sup>, Alexis E. Duncan<sup>2,3</sup>, Andrew L. Kau<sup>1</sup>, Nicholas W. Griffin<sup>1</sup>, Vincent Lombard<sup>4</sup>, Bernard Henrissat<sup>4,5</sup>, James R. Bain<sup>6,7,8</sup>, Michael J. Muehlbauer<sup>6</sup>, Olga Ilkayeva<sup>6</sup>, Clay F. Semenkovich<sup>9</sup>, Katsuhiko Funai<sup>9</sup>, David K. Hayashi<sup>10</sup>, Barbara J. Lyle<sup>11</sup>, Margaret C. Martini<sup>11</sup>, Luke K. Ursell<sup>12</sup>, Jose C. Clemente<sup>12</sup>, William Van Treuren<sup>12</sup>, William A. Walters<sup>13</sup>, Rob Knight<sup>12,14,15</sup>, Christopher B. Newgard<sup>6,7,8</sup>, Andrew C. Heath<sup>2</sup>, and Jeffrey I. Gordon<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Center for Genome Sciences and Systems Biology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63108 USA

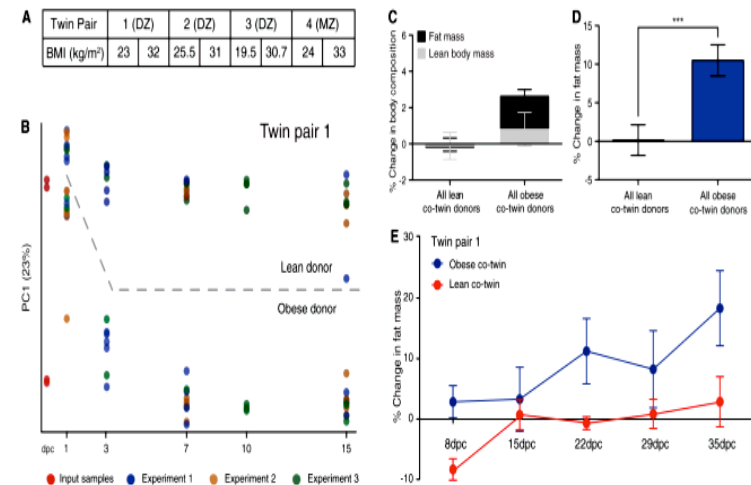
Transplantation microbiote intestinal jumelles discordantes pour obésité chez souris axéniques sous régime pauvre en graisse et régimes avec différents niveaux graisses saturées, fruits et légumes (=US)

Augmentation masse corporelle totale & masse grasseuse et phénotypes associés à obésité transmissibles par transplantation fécale directe et par transplantation flore fécale après culture

"Co-housing" souris réceptrices microbiote jumelles obèses (Ob) avec souris réceptrices microbiote de sa jumelle mince (Ln) prévient installation phénotype obèse chez souris Ob

Prévention phénotype obèse corrèle avec invasion microbiote souris Ob par Bacteroidetes, dépendante régime

Ridaura VK et coll. 2013. Science



**Fig. 1. Reliable replication of human donor microbiota in gnotobiotic mice**

(A) Features of the four discordant twin pairs (B) Assembly of bacterial communities in

## Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy

Omry Koren,<sup>1</sup> Julia K. Goodrich,<sup>1</sup> Tyler C. Cullen der,<sup>1</sup> Ayme' Spor,<sup>1,11</sup> Kirsi Laitinen,<sup>3,4</sup> Helene Kling Backhed,<sup>5,7</sup> Antonio Gonzalez,<sup>8</sup> Jeffrey J. Werner,<sup>2,3</sup> Langu T. Angenent,<sup>9</sup> Rob Knight,<sup>8,10</sup> Fredrik Backhed,<sup>4,7</sup> Erik Saloauri,<sup>6</sup> Seppo Salminen,<sup>4</sup> and Ruth E. Ley<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>Department of Microbiology and Department of Molecular Biology and Genetics

Caractérisation bactéries fécales 91 femmes enceintes différant en BMI pré-gestationnel et survenue diabète gestationnel  
Similarités microbiote mère-enfant croît avec âge mais état de santé maternel n'affecte pas composition microbiote enfant

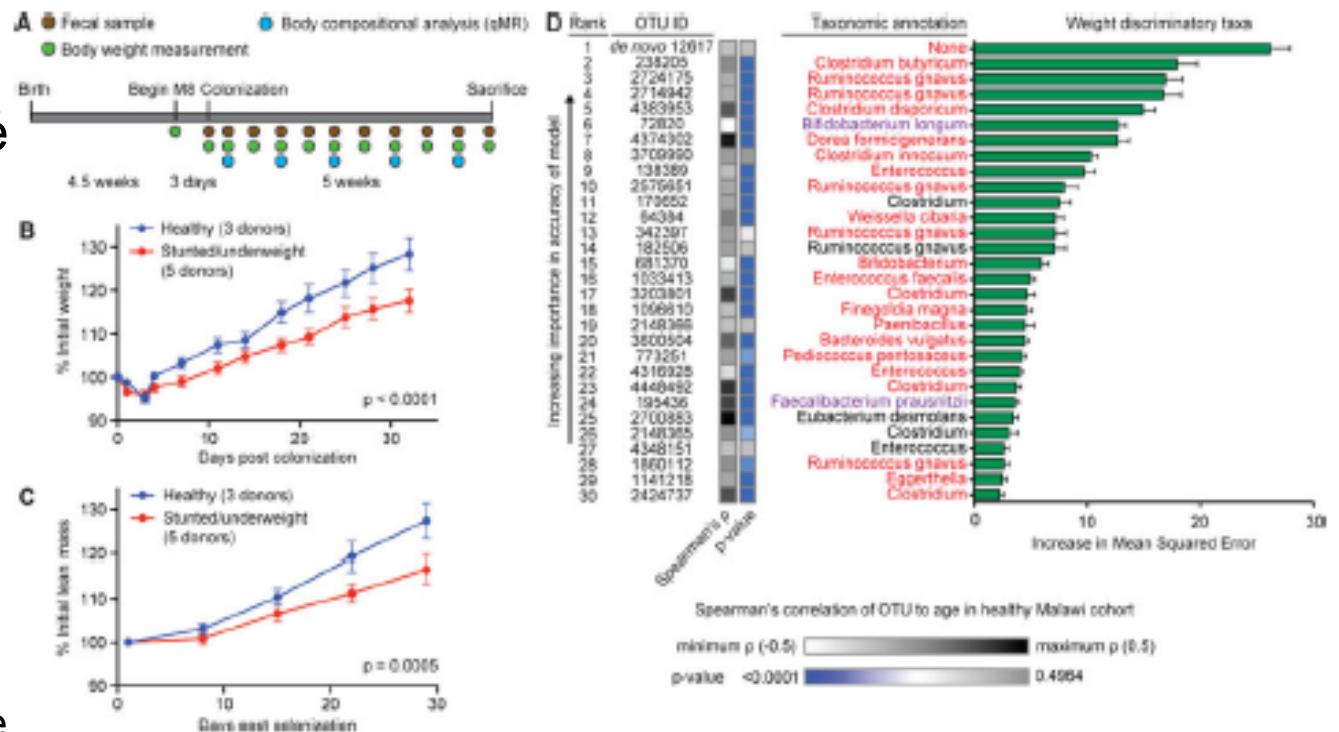
Microbiote intestinal maternel se modifie considérablement entre trimestre 1 (T1) et trimestre 3 (T3)  
Elargissement diversité entre mères, accroissement global en Protéobactéries et Actinobactéries  
Diminution en richesse  
Feces T3 = fortes signatures inflammatoires et perte énergie bien que répertoire gènes microbiome inchangé T1/T3  
Transfert de microbiote T3 à souris axéniques entraîne plus grande adiposité et résistance à l'insuline par rapport à transfert microbiote T1

## Gut bacteria that rescue growth Impairments transmitted by Immature microbiota from undernourished children

Laura V. Blanton<sup>1,2</sup>, Mark R. Charbonneau<sup>1,2</sup>, Tarek Salih<sup>1,2</sup>, Michael J. Barratt<sup>1,2</sup>, Siddarth Venkatesh<sup>1,2</sup>, Olga Ilkaveya<sup>3,4</sup>, Sathish Subramanian<sup>1,2</sup>, Mark J. Manary<sup>7,8</sup>, Indi Trehan<sup>7,9</sup>, Josh M. Jorgensen<sup>10</sup>, Yue-mei Fan<sup>11</sup>, Bernard Henrissat<sup>12,13</sup>, Semen A. Leyn<sup>14</sup>, Dmitry A. Rodionov<sup>14,15</sup>, Andrei L. Osterman<sup>15</sup>, Kenneth M. Maleta<sup>8</sup>, Christopher B. Newgard<sup>3,4,5,6</sup>, Per Ashorn<sup>11,16</sup>, Kathryn G. Dewey<sup>10</sup>, and Jeffrey Gordon<sup>1,2</sup>

Enfants malnutris = altération développement de leur microbiote intestinal  
 Transplantation microbiote enfants de 6 et 18 mois normo- et malnutris (Malawi) dans souris axéniques recevant régime "malawien" montre que microbiote immature nourrissons/enfants malnutris transmet phénotype croissance altérée

Représentation taxa caractéristiques maturité microbiote corrèle avec gain masse corporelle, métabolisme hépatique, musculaire cérébral et morphologie osseuse



Blanton et coll. 2016. Science

Fig. 2. Transplantation of microbiota from 6- and 18-month old donors to young germ-free mice provides evidence of a causal relationship between gut microbiota maturity and growth

## Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma

Marie-Claire Arrieta<sup>1,2\*</sup>, Leah T. Stiemsma<sup>2,3\*</sup>, Pedro A. Dimitriu<sup>2</sup>, Lisa Thorson<sup>1</sup>, Shannon Russell<sup>1,2</sup>, Sophie Yurist-Doutsch<sup>1,2</sup>, Boris Kuzeljevic<sup>3</sup>, Matthew J. Gold<sup>4</sup>, Heidi M. Britton<sup>1</sup>, Diana L. Lefebvre<sup>5</sup>, Padmaja Subbarao<sup>6,7</sup>,

• See all authors and affiliations

Science Translational Medicine 30 Sep 2015;  
Vol. 7, Issue 307, pp. 307ra152

Fenêtre précoce dans constitution microbiote intestinal nourrisson (dysbiose précoce) essentielle pour déclenchement asthme expérimental souris (Russell et coll. 2012. EMBO Rep)

Apparition dysbiose précède, voire cause survenue asthme ?

319 enfants cohorte "Canadian Healthy Infant Longitudinal Development" (CHILD):

Enfants à risque asthme présentent dysbiose transitoire (100 premiers jours de vie)

Métataxonomique: Lachnospira, Veillonella, Faecalibacterium, Rothia diminués chez enfants à risque asthme

Métabolomique: diminution concentration acétate, dysfonction cycle entérohépatique

Administration quatre espèces manquantes dans signature dysbiose à souris sensibles asthme améliore inflammation respiratoire âge adulte

Mais pas accentuation inflammation respiratoire chez souris adultes quand souriceaux axéniques colonisés par flore enfants à risque

Limitations modèle transfert fécal homme-souris axénique dans démonstration lien de causalité dysbiose-maladie

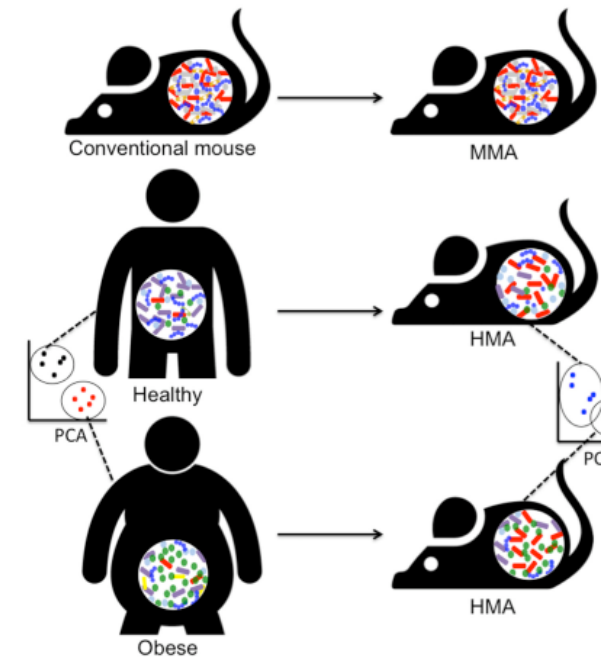
Partenariat homme-microbiote établi par longue co-évolution = probabilité spécificité d'espèce avec double composante génétique et environnementale (alimentation, etc...)

En dépit de ces considérations, 85% des taxa du microbiote humain efficacement transférés et maintenus dans souris axéniques (Turnbaugh et coll. 2009. *Sci Transl Med*)

Mais: certains taxa prédominants ne peuvent pas coloniser la souris après transfert (Chung et coll. 2012. *Cell*)

Tendance structure générale prene progressivement profil similaire au microbiote murin (Rawls et coll. 2006. *Cell*)

**Attention !**



# Démonstration lien causalité par interventions cliniques

Peu de démonstration d'un lien de causalité dysbiose-maladie par interventions cliniques:

- Obésité/transfert fécal: sensibilité à l'insuline partiellement restaurée, tendance vers profil métabolomique sérique sujet à jeun (en association avec transplantation microbiote chez souris axénique)

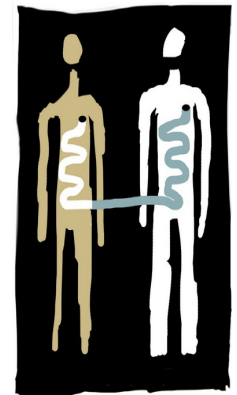
Bactérie responsables de l'induction résistance à l'insuline

- Kwashiorkor (Subramanian et coll. 2014. Nature)
- Asthme enfant (Fujimura et al. 2016. Nat Med)
- Perte poids suivant chirurgie baryatrique (Tremaroli et al. 2015. Cell Metab)
- Insuline-résistance dans troisième trimestre de grossesse (Koren et al. 2012. Cell)
- Transplantation de microbiote fécal de sujet mince à sujets obèses = augmentation sensibilité à l'insuline (Vrieze et coll. 2012. Gastroenterology)

*Clostridium difficile* colitis = miracle transfert fécal

(Van Nood et al. 2013. N Engl J Med Lo Vecchio & Cohen. 2014. Curr Opin Gastroenterol

Robles-Alonso & Guamer. 2013. Brit J Nutr)



## Postulats de Koch revisités (3)

### Equivalents métagénomiques appliqués aux pathologies (a priori) non contagieuses associées à pathobiotiques/dysbioses

Une seule souche, espèce, genre, phylum ou des combinaisons variées, ou des fonctions génomiquement codées significativement corrélés à phénotype pathologique

Transfert flore sujet malade à animal gnotoxénique cause tout ou partie des symptômes de la maladie ou modification correspondante métabolome ou réponse immunitaire

Variations qualitatives et quantitatives microbiotes retrouvées dans hôte devenu malade après transfert

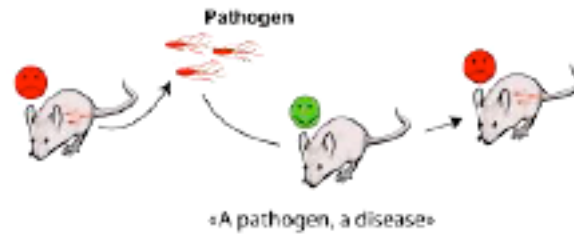
Déplétion taxa ou fonctions identifiés par interventions pertinentes (antibiotiques, expansion microorganismes bénéfiques par probiotiques, prébiotiques, transfert fécal, ou régime réduit progression ou améliore maladie

Transmissibilité pas obligatoirement requise car maladies en cause souvent résultat modification induite à échelle individu, abondance et nature espèces composant son microbiote ou capacités fonctionnelles associées

Autenrieth IB et coll. 2017. J Mol Med  
Neville et coll. 2017. Curr Opin Microbiol  
Vonäsch et coll. 2018. FEMS Microbiol Rev

# Postulats écologiques de Koch

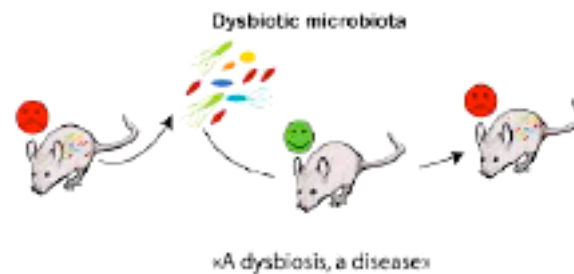
## Koch's postulate



## Molecular Koch's postulate



## Ecological Koch's postulate





# Démonstration du lien de causalité

*De la descriptomique à l'expérimentomique...*

Les études métataxonomiques/métagénomiques des dysbioses demeurent rares en clinique, d'autant que le potentiel d'intervention est limité...

Nécessité de développer des approches expérimentales dans des systèmes modèles pour identifier et résoudre en éléments fonctionnels le dialogue symbiotique microbes-cellules/tissus

Sorte de "microbiologie cellulaire" de la symbiose, particulièrement des dysbioses pathologiques

Nécessité développer des approches expérimentales dans

Intégration des approches cliniques et expérimentales essentielles

# Colorectal Cancer (CRC)

Third cause of cancer-related mortality (industrialized world)

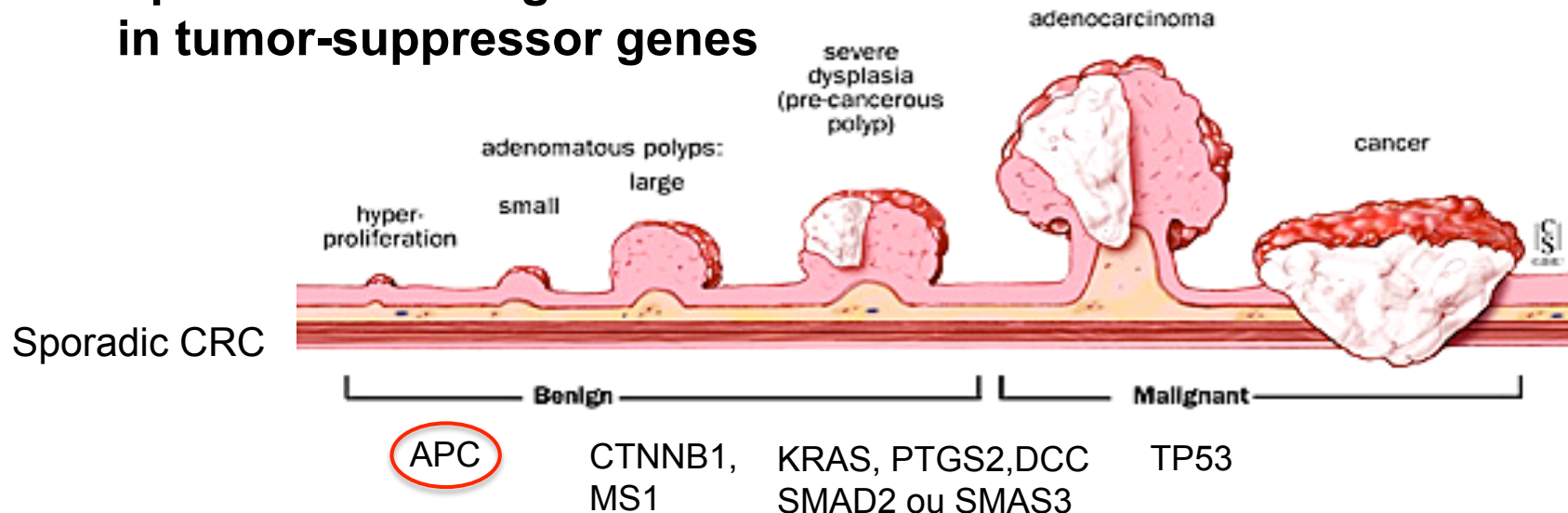
Risk factors in sporadic forms (> 80%):

- Environmental and food-borne mutagens
- Diet (high fat), aging
- Chronic, low-grade intestinal inflammation
- Dysbiosis and / or specific intestinal "pathobionts" / pathogens

Incidence steadily increases (economically-emerging countries)

= "Post-modern" disease

**Sporadic CRC = genetic disease with cumulative somatic mutations in tumor-suppressor genes**



# CRC and microbes...

**Metagenomics show global dysbiosis in CRC** (Zeller G et al. 2014. Mol Syst Biol)

Dysbiosis = loss of balance of microbiota composition, collectively expressing oncogenic potential:

- Gain of proinflammatory species / loss of antiinflammatory species
- Gain of species producing oncogenic metabolites / loss of species biodegrading oncogenic endogenous metabolites and xenobiotics

**Bacteria enriched in colon cancer microbiota** (Viljoen KS, 2015, PloS One)

- Proliferation of bacterial species with *bona fide* oncogenic properties, possibly facilitated by loss of colonization barrier capacity of microbiota = **guilty** (cancer driver)
- Proliferation of bacterial species taking advantage of oncogenic / cancer environment = **not guilty** (cancer biomarker)

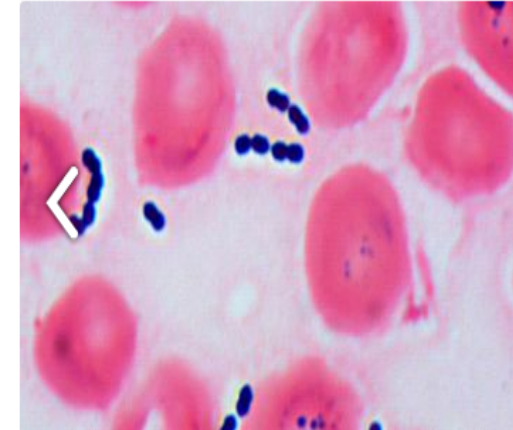
**Examples:**

- *Fusobacterium nucleatum* (Kostic AD et al. 2012. Genome Res)
- Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (Boleij A et al. 2014. Clin Infect Dis)
- Cyclomodulin +, genotoxin + *Escherichia coli* (Cognoux A et al. 2014. Gut)
- ***Streptococcus gallolyticus*** (Abdulmir AS et al. 2010. Mol Cancer)

# *Streptococcus gallolyticus*: commensal ? pathobiont ? opportunist ? pathogen ?

- *S. bovis*

- Group D *Streptococcus*
- Gut commensal
- Infectious (meningitis, septicemia, endocarditis)



- **Classification**

- Biotypes: 4 species (*S. infantarius*, *S. gallolyticus*, *S. macedonicus*, *S. waius*)
- Molecular classification: SodA gene (Poyart C et al, 2002)

- *S. gallolyticus subspecies gallolyticus* (SGG)

- 14% of infectious endocarditis in humans (11-27%)
- Association with colon cancer (77% in one series)
- Healthy carriage ?

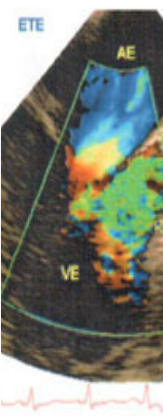
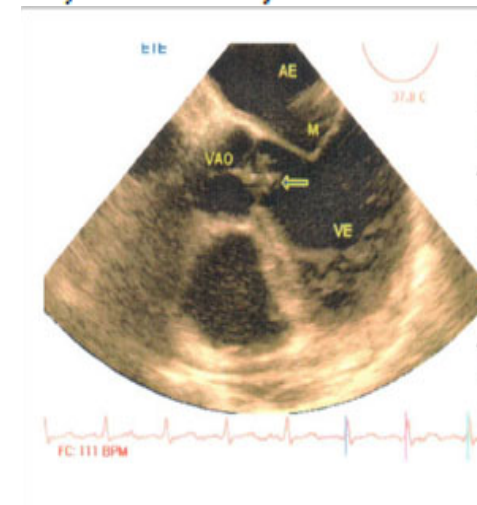
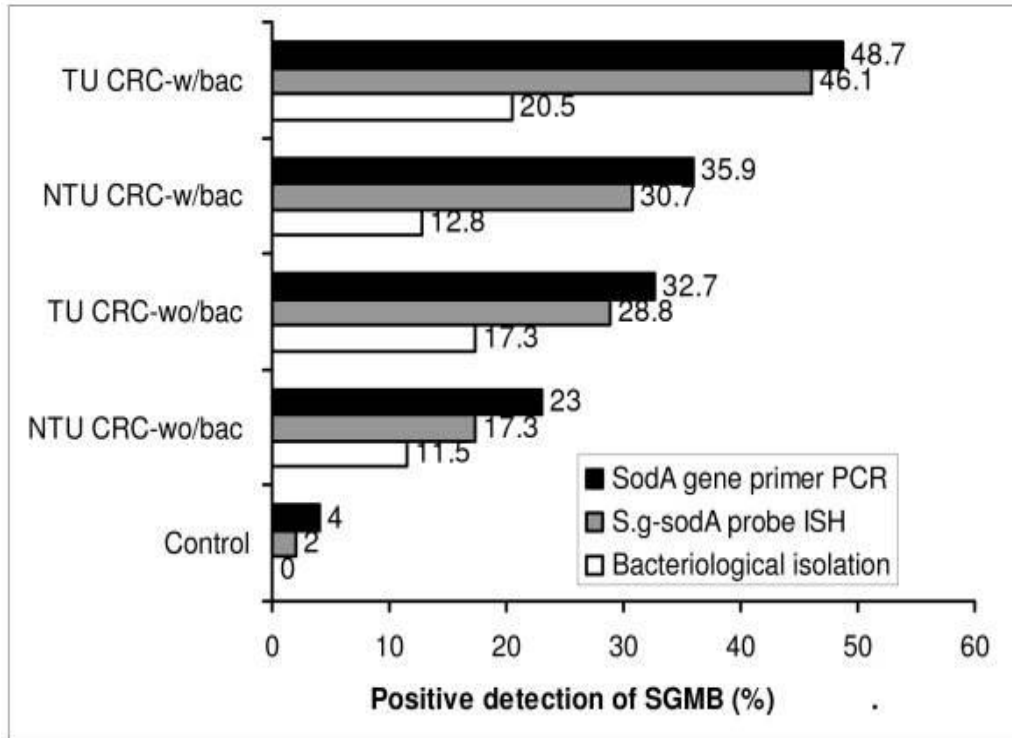


Figure 1 - Vegetation in the aortic valve and aortic regurgitation.

## Molecular detection, quantification, isolation of *Streptococcus gallolyticus* associated with colorectal tumors



Tumor and adjacent tissue, not feces  
(Abdulmir et al. 2010. Mol Cancer)

Anti-*S. bovis* Abs: 11/12 CRC, 3/4 polyps, 0/8 controls  
(Tjalsma et al. 2006. 2006. Int J Cancer)  
- Appearance of colonic lesions two to four years after occurrence of SGG bacteremia/endocarditis  
(Wentling et al. 2006. Dis Colon Rectum)  
- Association of SGG with preneoplastic adenomas  
(Abdulmir et al. 2009. BMC Cancer)



**Laetitia Aymeric**  
 Pathogénie  
 Microbienne  
 Moléculaire



**Shaynoor Dramsi**  
 Laurence Du Merle  
 Biologie des pathogènes  
 gram positifs



Sylvie Robine  
 Institut Curie



INSTITUT PASTEUR

Giulia Nigro  
 Aline Stedman  
 Thierry Pédron  
 Céline Mulet  
 Pathogénie  
 Microbienne  
 Moléculaire



Iradj Sobhani  
 Aurélien Amiot  
 Gastroentérologie  
 Unité de Recherche EC2M3  
 Hôpital Henri Mondor et  
 Université Paris-Est, Créteil,  
 Val de Marne  
 Laboratoire Mixte ONCOMIX

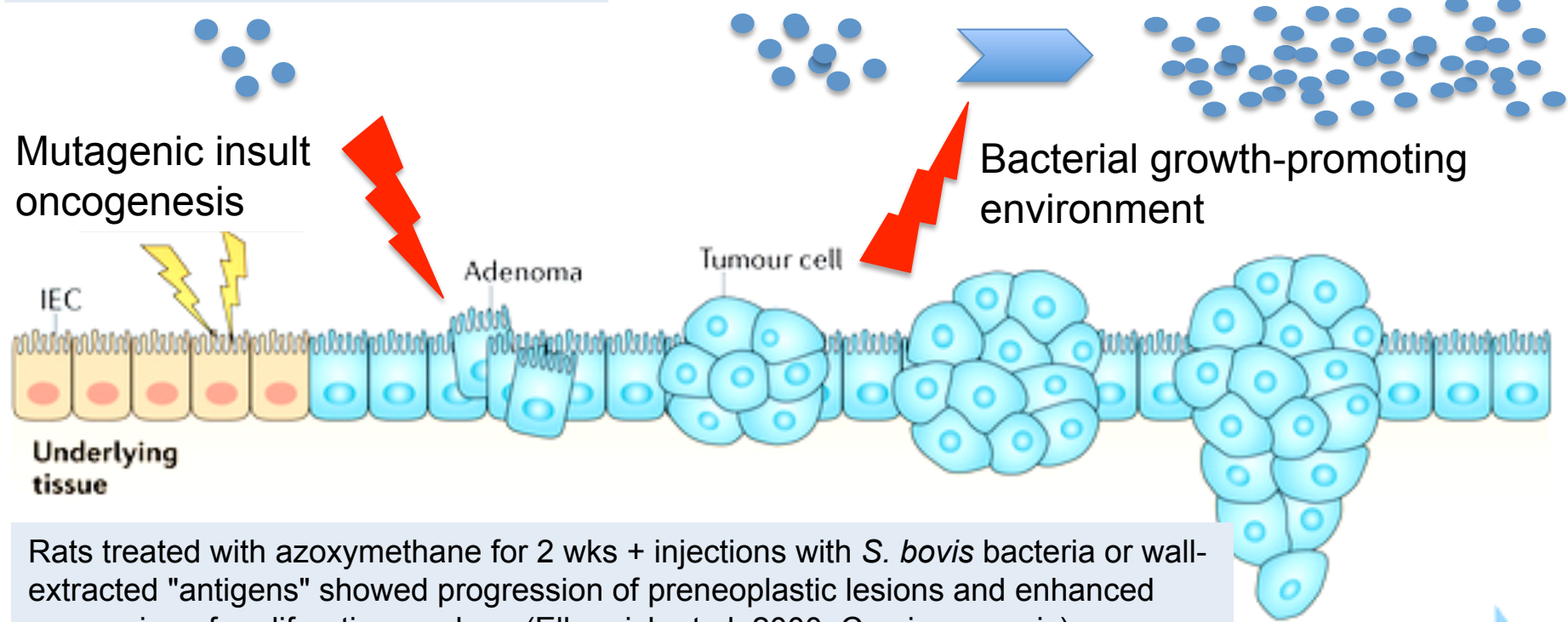
# Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization

Laetitia Aymeric<sup>a,b,1</sup>, Françoise Donnadieu<sup>a,b</sup>, Céline Mulet<sup>a,b</sup>, Laurence du Merle<sup>c,d</sup>, Giulia Nigro<sup>a,b</sup>, Azadeh Saffarian<sup>a,b</sup>, Marion Bérard<sup>e</sup>, Claire Poyart<sup>f,g</sup>, Sylvie Robine<sup>h</sup>, Béatrice Regnault<sup>i</sup>, Patrick Trieu-Cuot<sup>c,d</sup>, Philippe J. Sansonetti<sup>a,b,j,2,3</sup>, and Shaynoor Dramsi<sup>c,d,2,3</sup>

<sup>a</sup>Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; <sup>b</sup>INSERM U1202, 75015 Paris, France; <sup>c</sup>Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram-positif, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; <sup>d</sup>CNRS Equipe de Recherche Labellisée 3526, 75015 Paris, France; <sup>e</sup>Animalerie Centrale, Centre d'Innovation et Recherche Technologique, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; <sup>f</sup>Centre National de Référence des Streptocoques, site Cochin, Assistance publique-Hôpitaux de Paris, 75014 Paris, France; <sup>g</sup>Équipe Barrières et Pathogènes, Institut Cochin, INSERM 1016, CNRS UMR 8104, 75014 Paris, France; <sup>h</sup>Institut Thématique Multi-Organisme Biologie cellulaire, développement et évolution, Alliance pour les sciences de la vie et de la santé, 75013 Paris, France; <sup>i</sup>Plateforme de Génotypage des Eucaryotes, Centre d'Innovation et Recherche Technologique (CITECH), Institut Pasteur, 75015 Paris, France; and <sup>j</sup>Chaire de Microbiologie et Maladies Infectieuses, Collège de France, 75005 Paris, France

*Streptococcus gallolyticus*:  
oncogenic microbe ?

*Streptococcus gallolyticus*:  
polyp / tumor companion ?

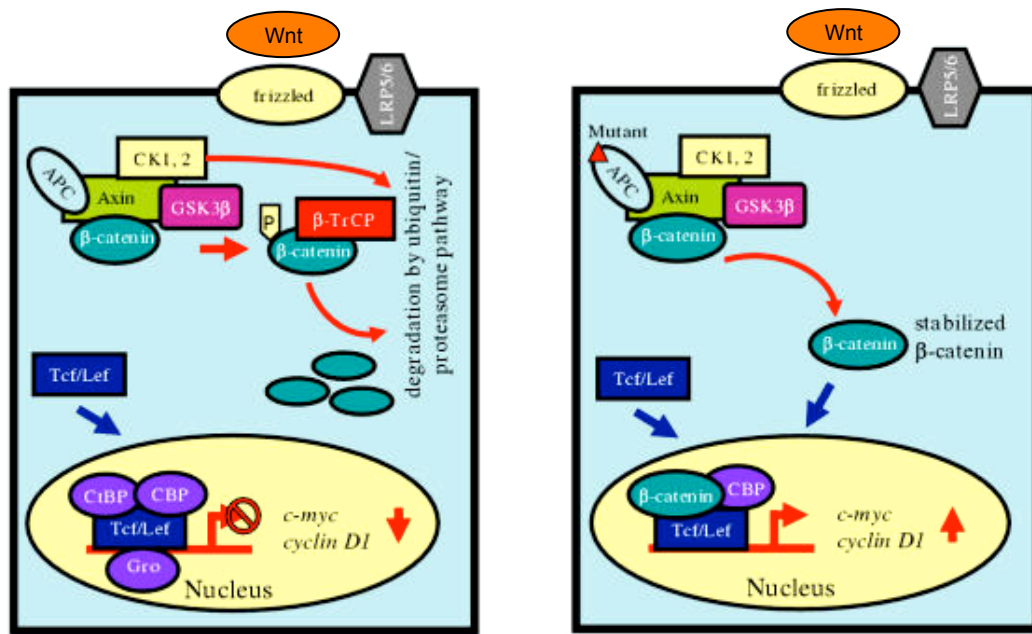


Rats treated with azoxymethane for 2 wks + injections with *S. bovis* bacteria or wall-extracted "antigens" showed progression of preneoplastic lesions and enhanced expression of proliferation markers (Ellmerich et al. 2000. Carcinogenesis)

# Wnt-APC- $\beta$ -catenin pathway controls epithelial proliferation, APC KO mice

## Apc<sup>+/-</sup> mice:

- Heterozygous LOF allele of the *Apc* gene
- Predisposed to constitutive Wnt pathway activation



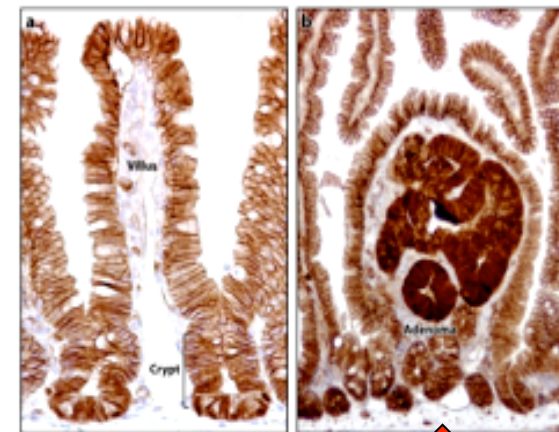
controlled cell proliferation

uncontrolled cell proliferation

## Small intestine

Apc<sup>+/+</sup>

Apc<sup>+/-</sup>



van der Flier LG, Clevers H. 2009. *Annu. Rev. Physiol.* 71:241-60

Polyp

Wnt  
Notch



# The Notch-APC model of colonic polyps in mice

## 1/ *Apc*<sup>+/-</sup>

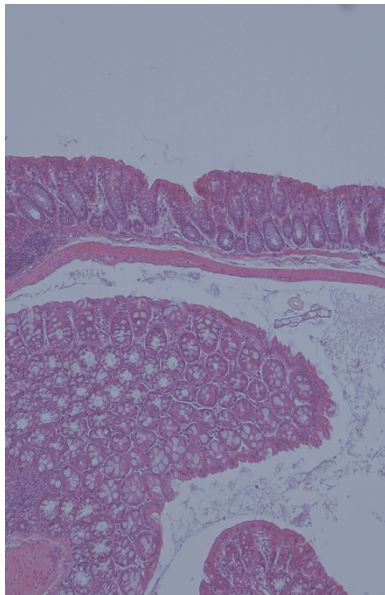
- Heterozygous LOF allele of the *Apc* gene
- Predisposed to constitutive Wnt pathway activation

## 2/ Notch (Cre)

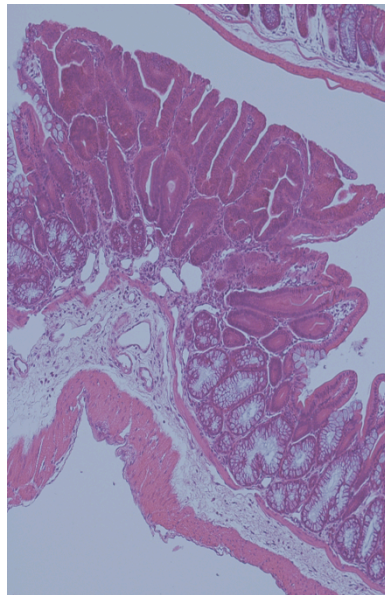
- Notch activation by Tamoxifen-induced Cre recombinase
- **Polyps develop faster (2 months) and in the colon in *Apc*<sup>+/-</sup> background**

Fre S,  
PNAS, 2009

Notch

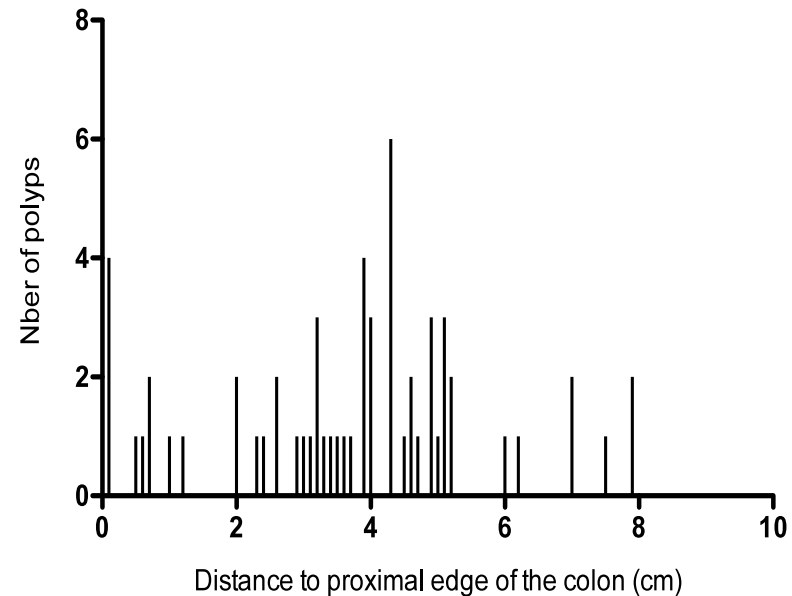


Notch/APC

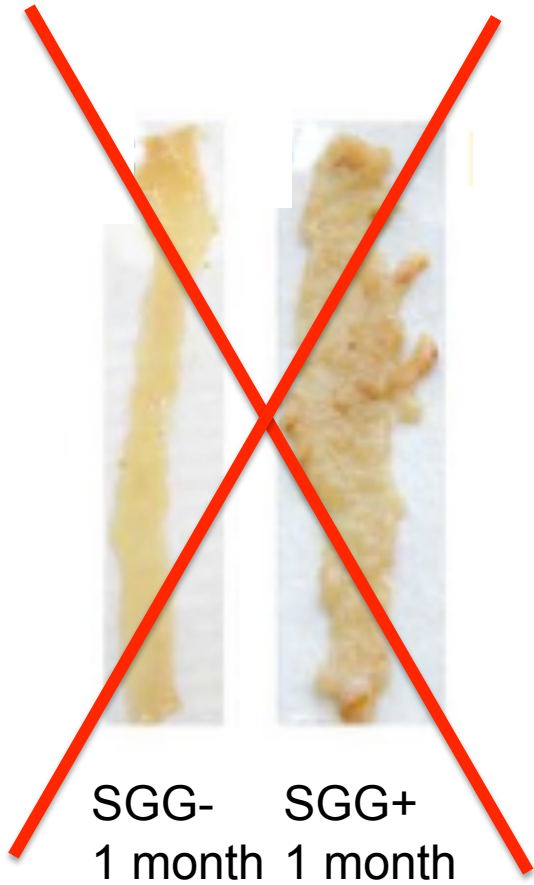


Caecum

Rectum



Does SGG UCN34 accelerate occurrence of colonic polyps ???



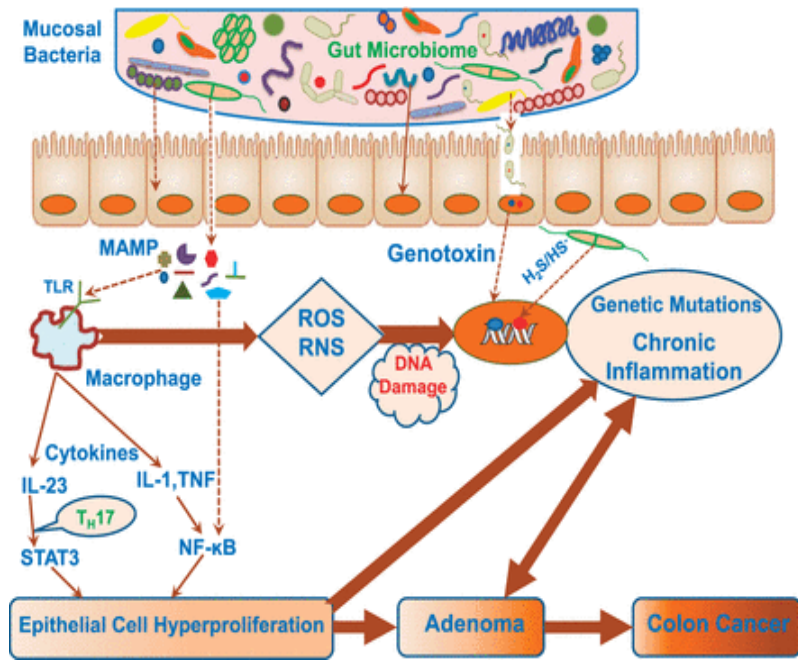
# Does SGG UCN34 accelerate occurrence of colonic polyps ???



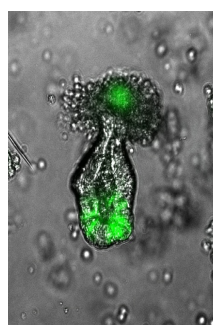
Or oncogenic transformation of polyps into tumors ???



Parag Gundu  
Sven Pettersson

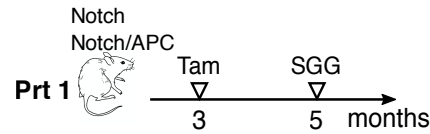


From Keku et al. 2012.  
Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol

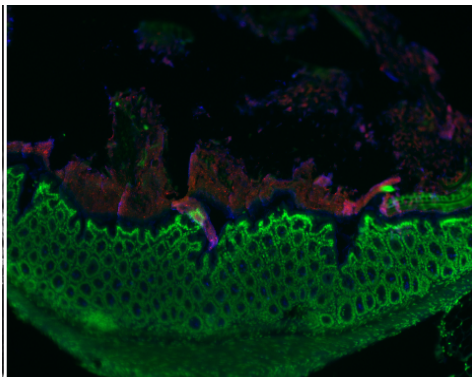


Intestinal stem cells as primary targets of genotoxic stress

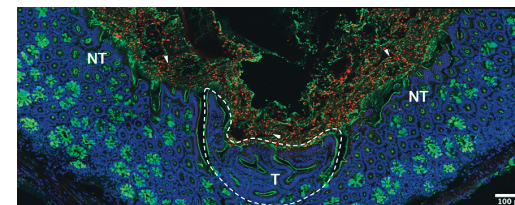
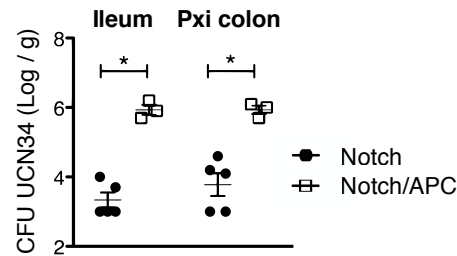
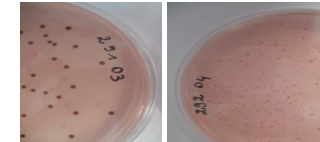
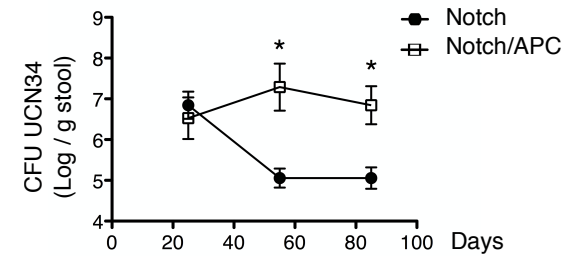
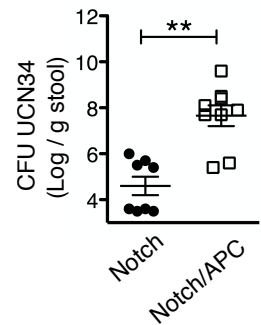
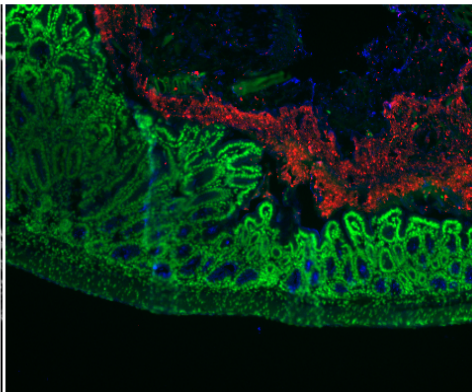
# Presence of colonic polyps required for gut colonization by SGG UCN34 and its translocation



Notch (Tamoxifen +)

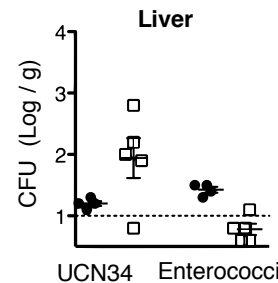
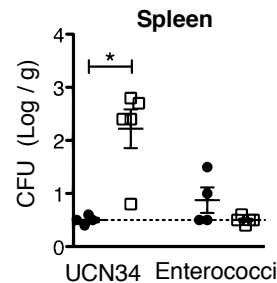


Notch/APC (Tamoxifen +)



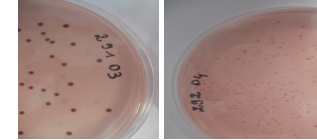
■ Nuclei  
■ SGG  
■ Mucus

No increased density of *S. gallolyticus* in and around tumors

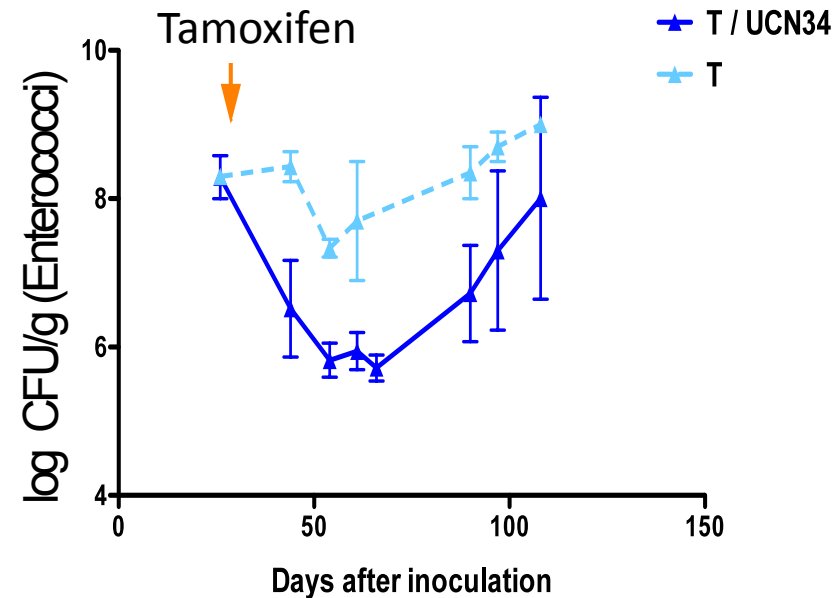
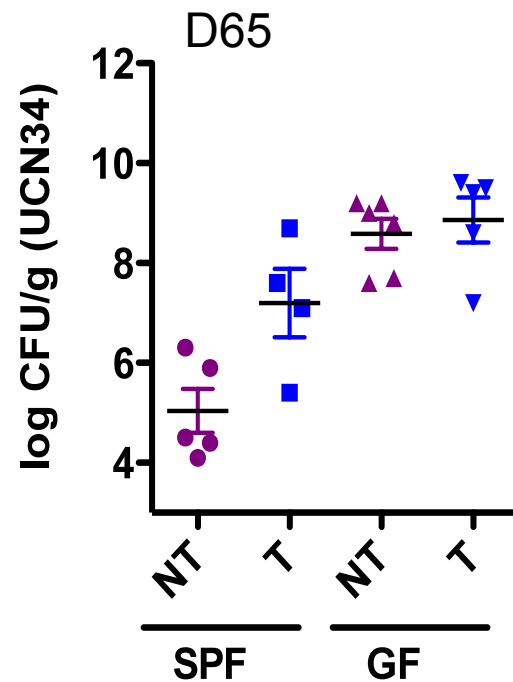


# Microbiome and *S. gallolyticus* gut colonization

Germ free tumor bearing mice offer no colonization advantage to *S. gallolyticus*



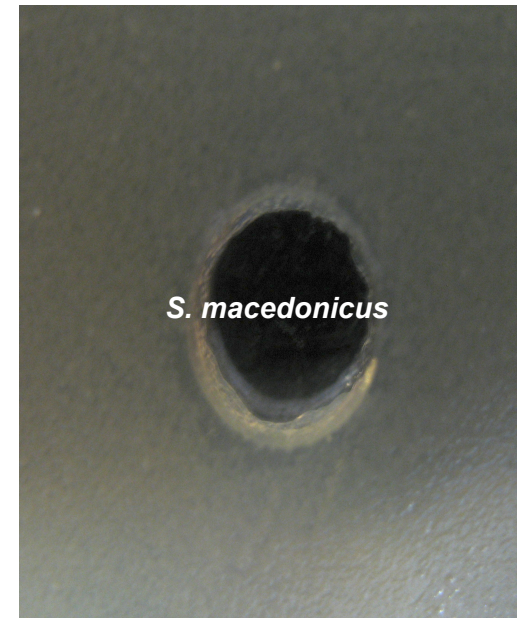
APC/Notch mice  
T = Tamoxifen +  
NT = Tamoxifen -



Long term colonization of *S. gallolyticus* is associated with a decrease of commensal *Enterococci* population

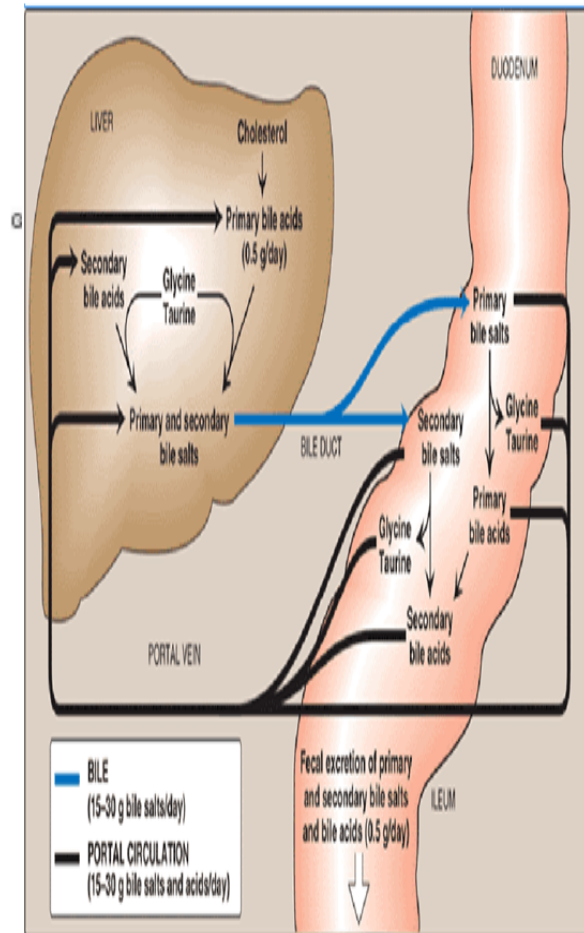
# Competition between SGG and Enterococci *in vitro*

Enterococcus



*S. gallolyticus* produces a diffusible molecule inhibiting the growth of commensal *Enterococci*

# Bile salts metabolism / recycling



*Clostridium*  
*Lactobacillus*  
*Bifidobacterium*  
*Bacteroides*

**Conjugated BA**



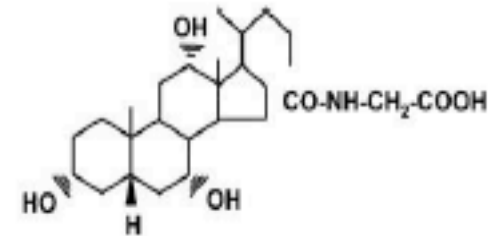
bsh

**Unconjugated BA**

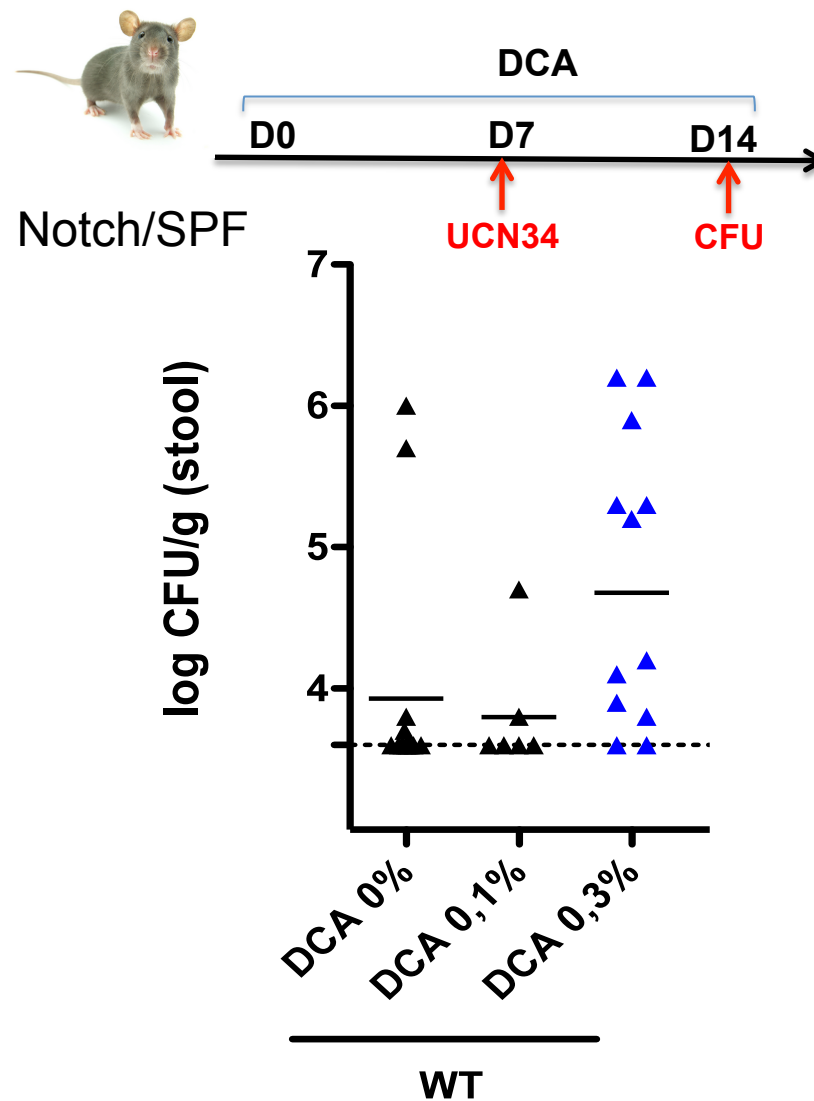
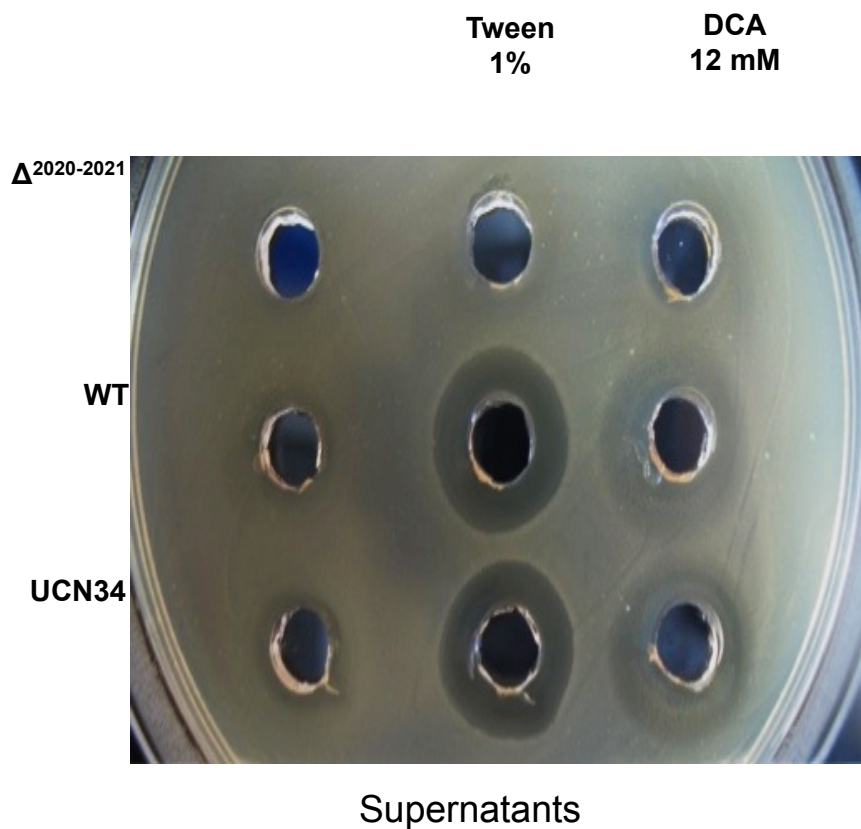


7  $\alpha$  dehydroxylation

**Secondary BA**  
**DCA, LCA**

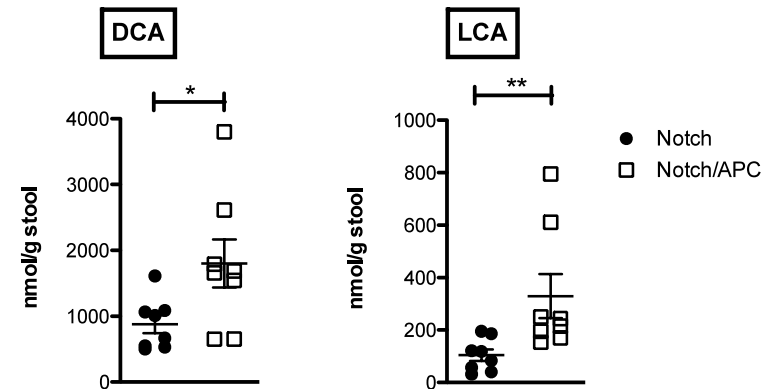
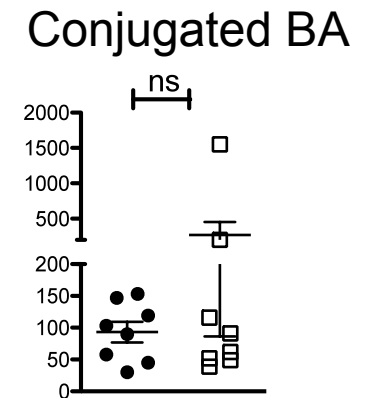
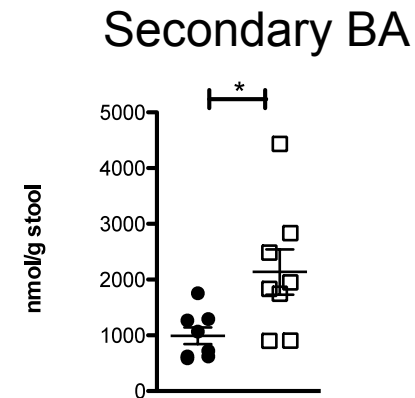
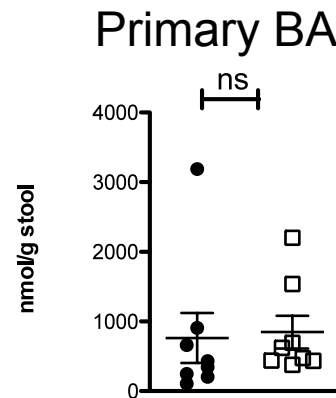
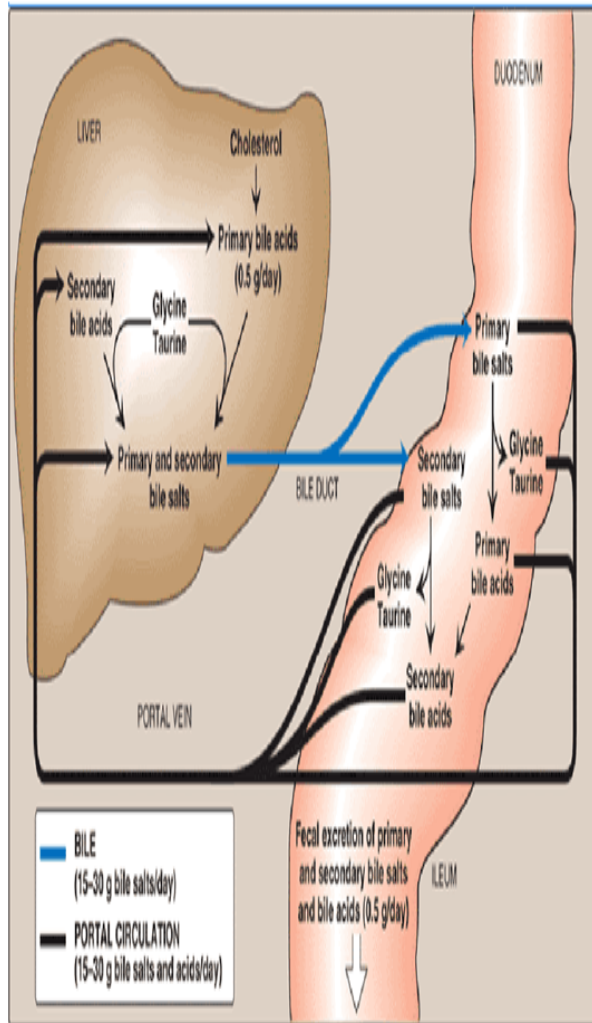


# Bile acids activate colicin activity *in vitro* and *in vivo*



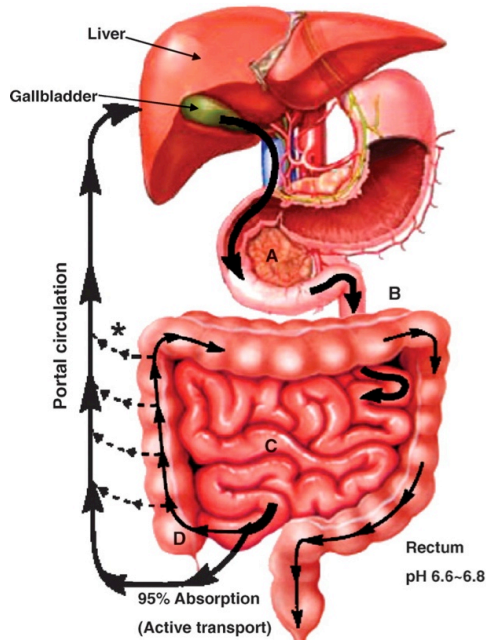


# Increased secondary bile acids (BA) in Notch / APC mice



Increase in excreted secondary BA in APC/Notch tumor bearing mice

# Bile acids and colon cancer



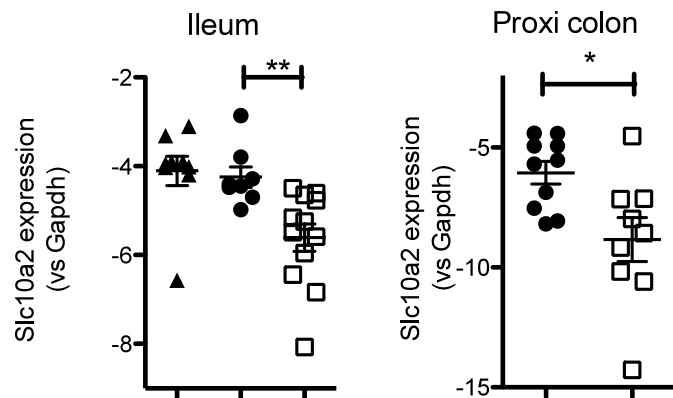
## Risk factors for CRC

↑ DCA, LCA (high fat diet, FAP) (*Barker GM, Br J Surg, 1994*)

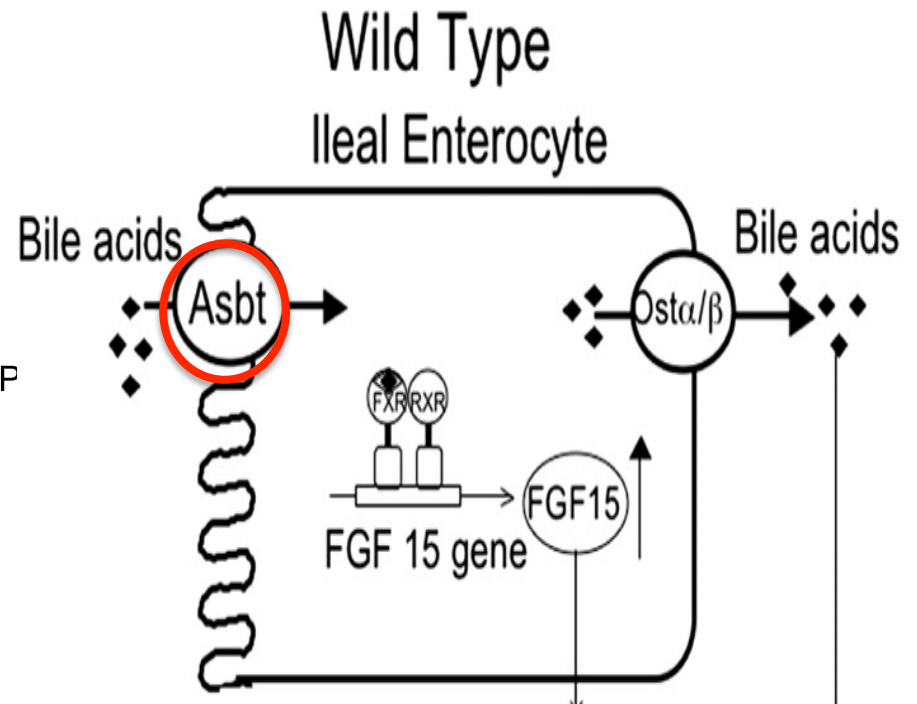
↑ LCA/DCA ratio (*Eur J Cancer Prev, Hill MJ, 1991*)

## Cancer development in animal models

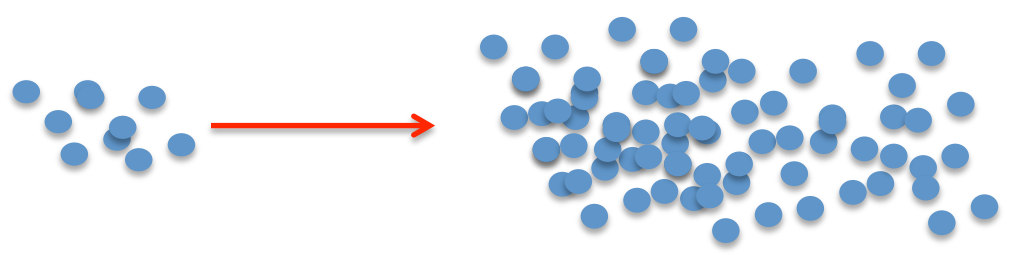
(*Cao H, Fam Cancer, 2014; Yoshimoto S, Nature, 2013*)



- ▲ B6
- Notch
- Notch/AP



- Deficient re-absorption of bile salts
- Increase in luminal bile salts concentration
- Favorable conditions for growth and colonization by *S. gallolyticus*



Mutagenic insult ?  
Isolate-dependent ?

