

# Les microbiomes de l'homme

Philippe J Sansonetti

Chaire de Microbiologie et Maladies Infectieuses,  
Collège de France

Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire &  
Unité INSERM 786, Institut Pasteur

Leçon #1, année 2013-2014



Remerciements: Joël Doré, Dusko Ehrlich

# Symbiose

Le terme de symbiose a été introduit par Anton de Bary au 19<sup>ème</sup> siècle comme la règle de vie commune de plusieurs espèces "l'association vivante d'espèces différentes" "Die Erscheinung der Symbiose", Strasbourg, 1879.

L'association symbiotique est souvent construite autour d'un grand partenaire appelé l'hôte et de plus petits partenaires appelés symbiotes.

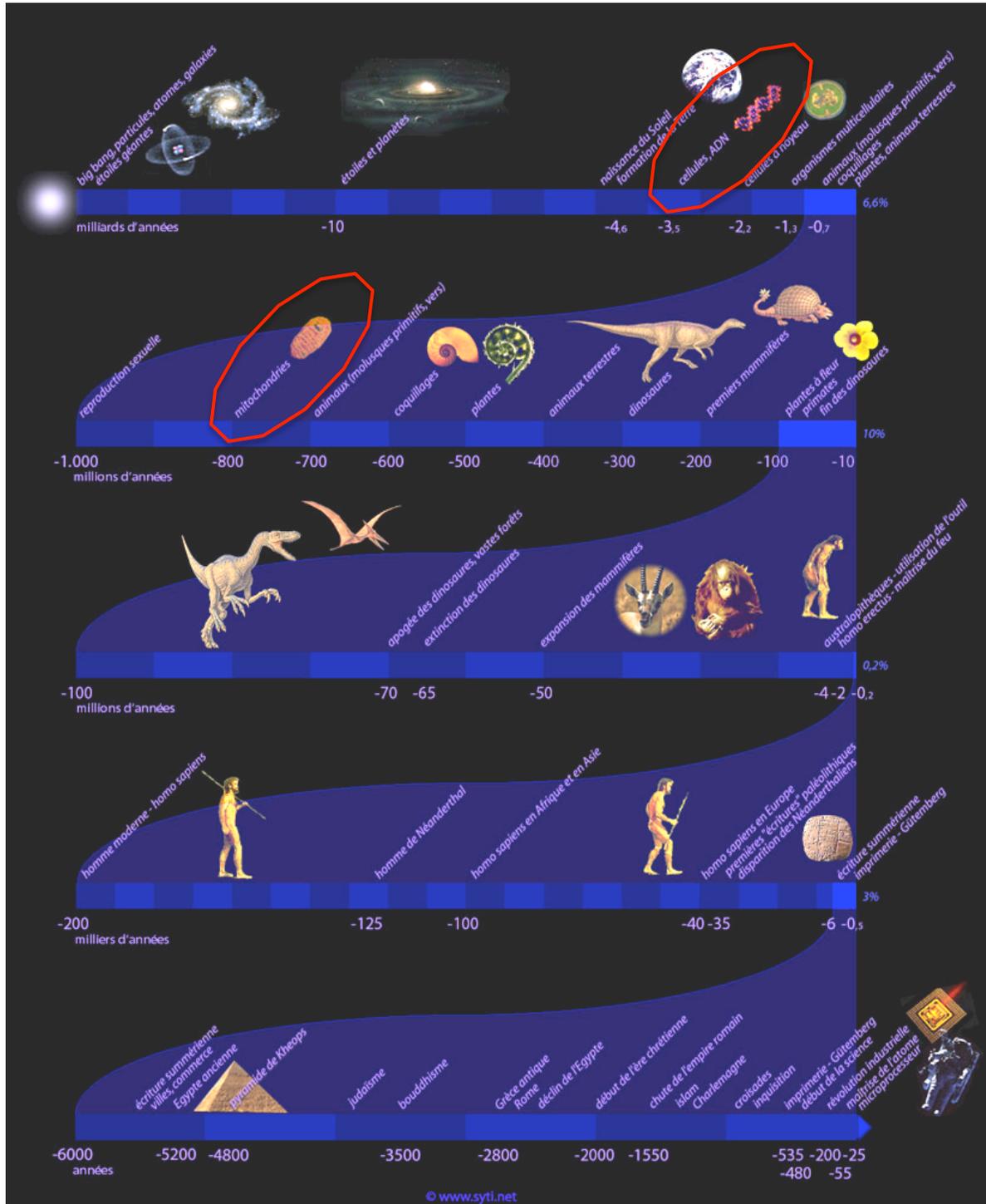
Vue très subjective car pour la symbiose homme-microbes, les microbes dépassent largement l'homme en nombre d'individus et nombre de gènes, même si les volumes respectifs ne sont pas en rapport. Le plus petit n'est pas celui qu'on pense...



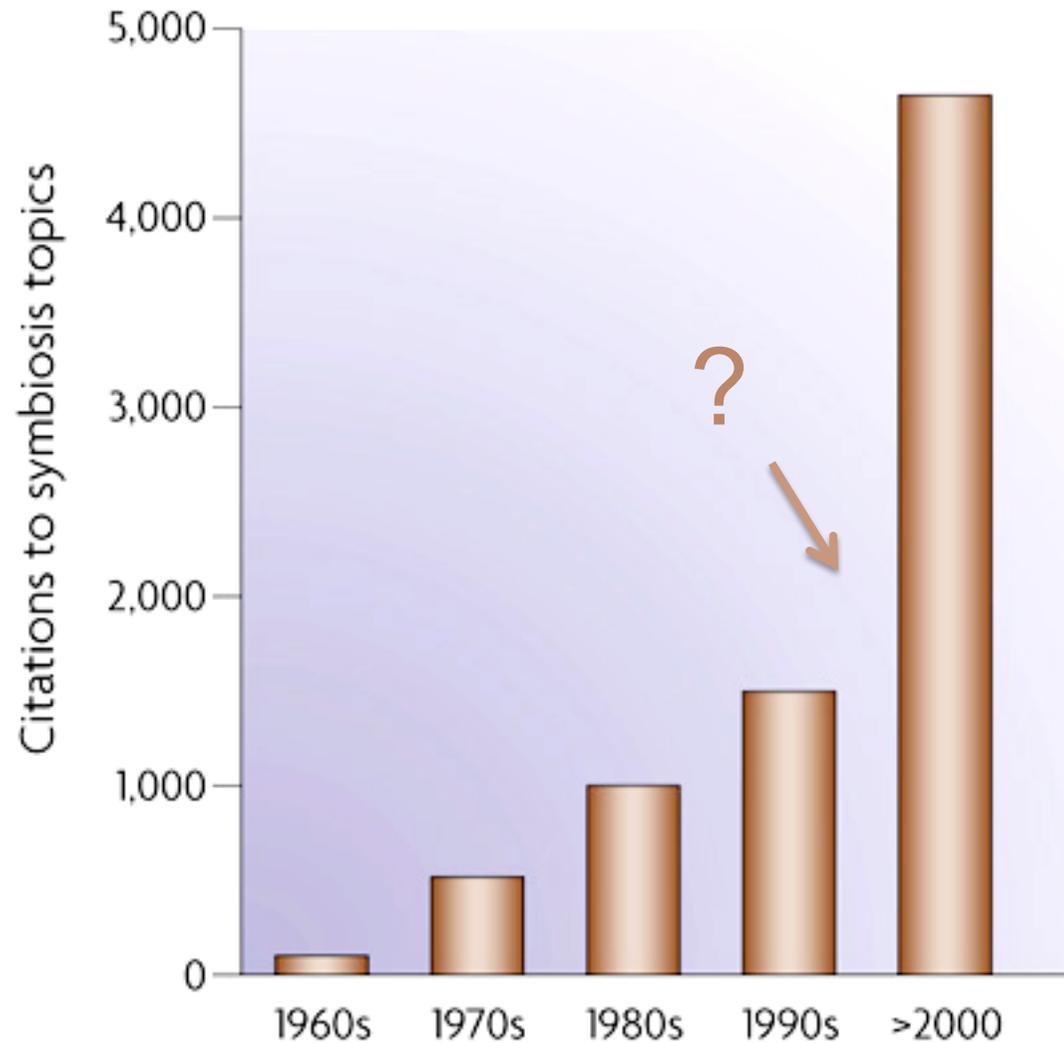
Heinrich Anton de Bary  
1831 (Francfort)-1888 (Strasbourg)  
Médecin, biologiste, botaniste  
Pionnier de la mycologie



# Mitochondrie: LA symbiose primaire



# Croissance rapide du nombre des publications dans le domaine de la symbiose ces 40 dernières années



# SymbioseS

## Catégories de symbioses

Deux paramètres importants:

L'ancienneté apparente de la co-dépendance hôte-symbiote.

L'intensité et l'étendue de cette co-dépendance.

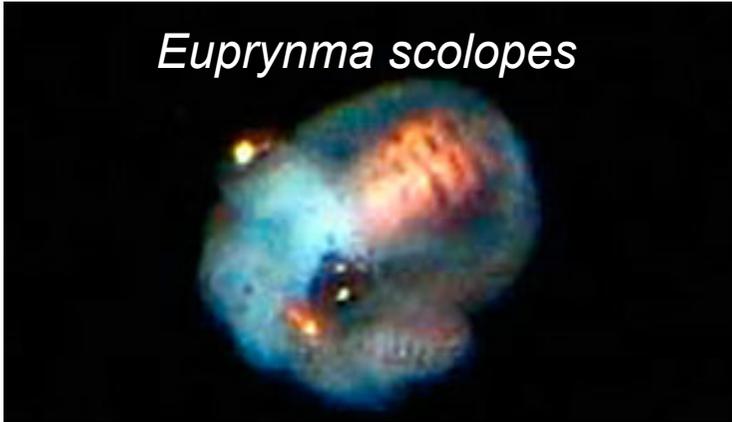
Deux pôles:

Les symbioses anciennes dites « symbioses primaires » où le microorganisme vit dans un véritable « bactériome », un organe spécialisé au sein de l'hôte et dédié à l'exécution du processus symbiotique.

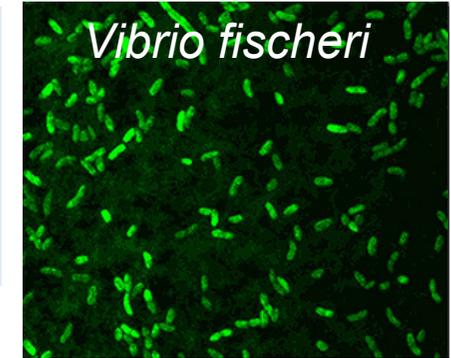
Les symbioses facultatives dites « symbioses secondaires » au cours desquelles le symbiote ne vit pas dans un organe spécialisé et n'est pas indispensable à la vie de l'hôte.

Plusieurs espèces symbiotiques peuvent co-exister chez le même hôte

*Euprymna scolopes*



*E. scolopes-V. fischeri*  
Modèle de symbiose  
primaire:  
organe lumineux



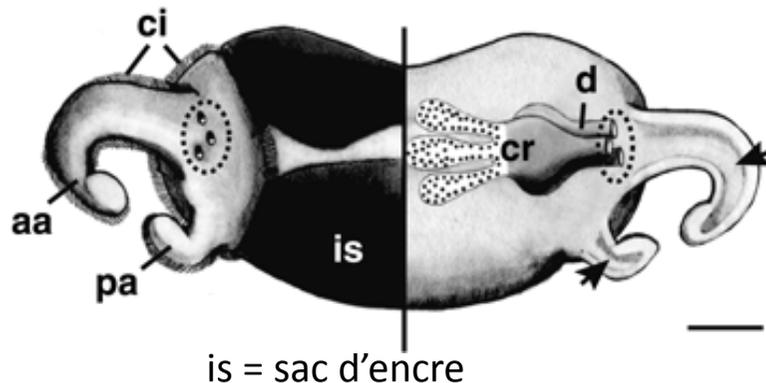
Margaret J. McFall-Ngai, 2012, Semin Immunol

*E. scolopes* possède un organe lumineux. La vue ventrale du calmar montre via une fenêtre dans le tégument la position de l'organe lumineux. Barre = 500 mm



#### Détails de la morphologie de l'organe lumineux:

**A gauche:** surface épithéliale ciliée (ci) composée d'excroissances antérieure (aa) et postérieure (pa) et d'une base avec trois pores s'ouvrant à la surface.



**A droite:** section frontale, montrant les cryptes (cr) contenant les bactéries qui vont coloniser les diverticules (d). La relation entre cryptes et conduits vers les pores (cercle). La section montre aussi (flèches) les sinus dans les excroissances. Barre = 150 mm

# Hologénome: définition, comparaisons

Association du métagénome microbien et du génome humain

Changement de paradigme qui fait passer de l'analyse de quelques modèles de symbiose hôte-microbe, dont l'intérêt biologique reste limité en terme de possible généralisation, même si l'originalité du système attire l'attention, par exemple symbiose *E. scolopes-V. fischeri* / organe lumineux; manipulation de la reproduction chez les insectes - féminisation, parthénogénèse, destruction du mâle et incompatibilité œuf / sperme - définie par l'endosymbionte *Wolbachia* (Werren JH, Baldo R, Clark ME. 2008. *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology*. Nat.Rev.Microbiol.6:741-751)

A l'analyse d'un système complexe où la masse de la flore microbienne associée à une espèce offre l'opportunité de multiples symbioses intriquées, à la fois dans le temps et dans l'espace. Les opportunités de découvertes originales y sont énormes et le déséquilibre de certains de ces systèmes peut conduire, chez l'homme, à des maladies.

# Glossaire

Microbiote: ensemble des microorganismes (bactéries, levures/champignons, archea) présents au sein d'un écosystème particulier

Microbiome: ensemble du matériel génétique d'une communauté microbienne séquencé en bloc

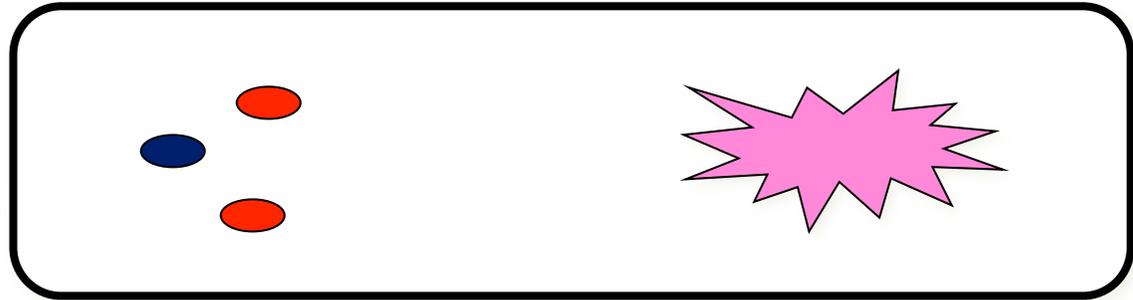
Métagénomique: analyse génomique de l'ADN extrait directement d'un échantillon clinique ou environnemental, donc représentatif d'un écosystème. Evaluation de la diversité de la communauté microbienne:

- ARN 16S

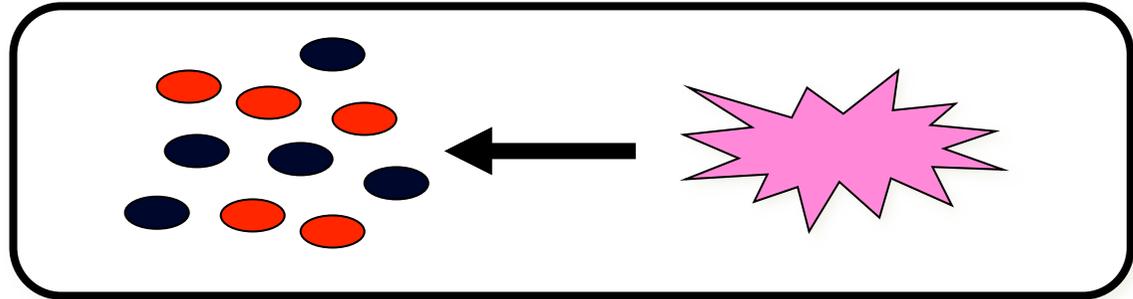
- Analyse plus profonde de la complexité: métagénomique "shotgun" portant sur l'ensemble des séquences ("deep sequencing")

Pan-génome: collection de gènes trouvés chez l'ensemble des membres d'une espèce

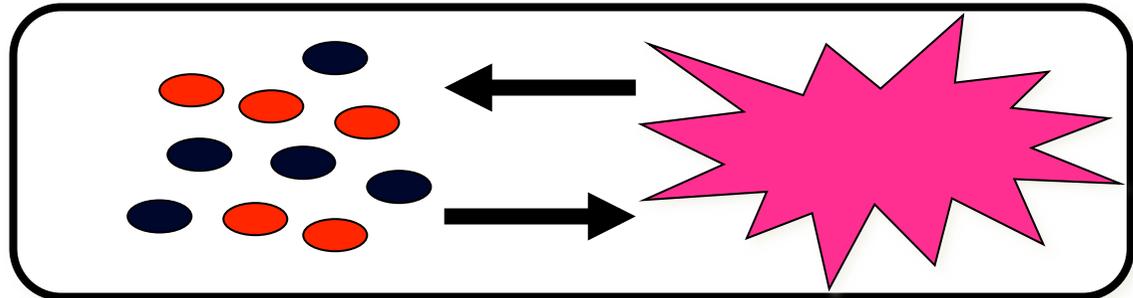
Symbiose  
(terme générique)



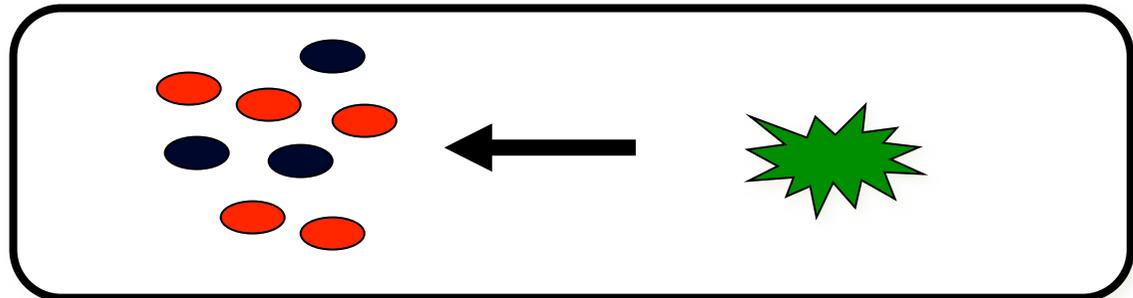
Commensalisme  
(*cum mensa*)



Mutualisme



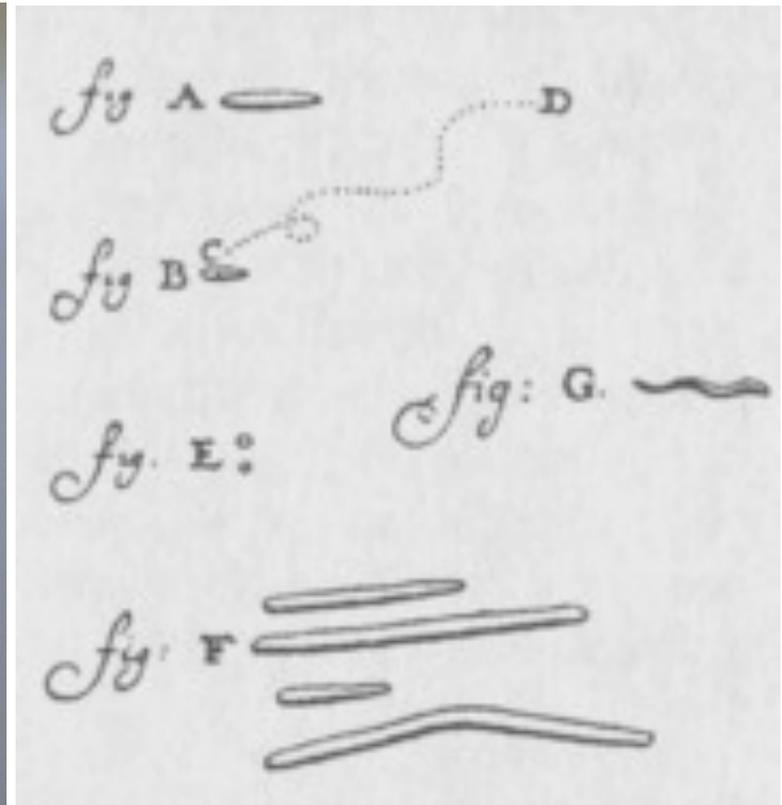
Parasitisme/  
pathogénicité







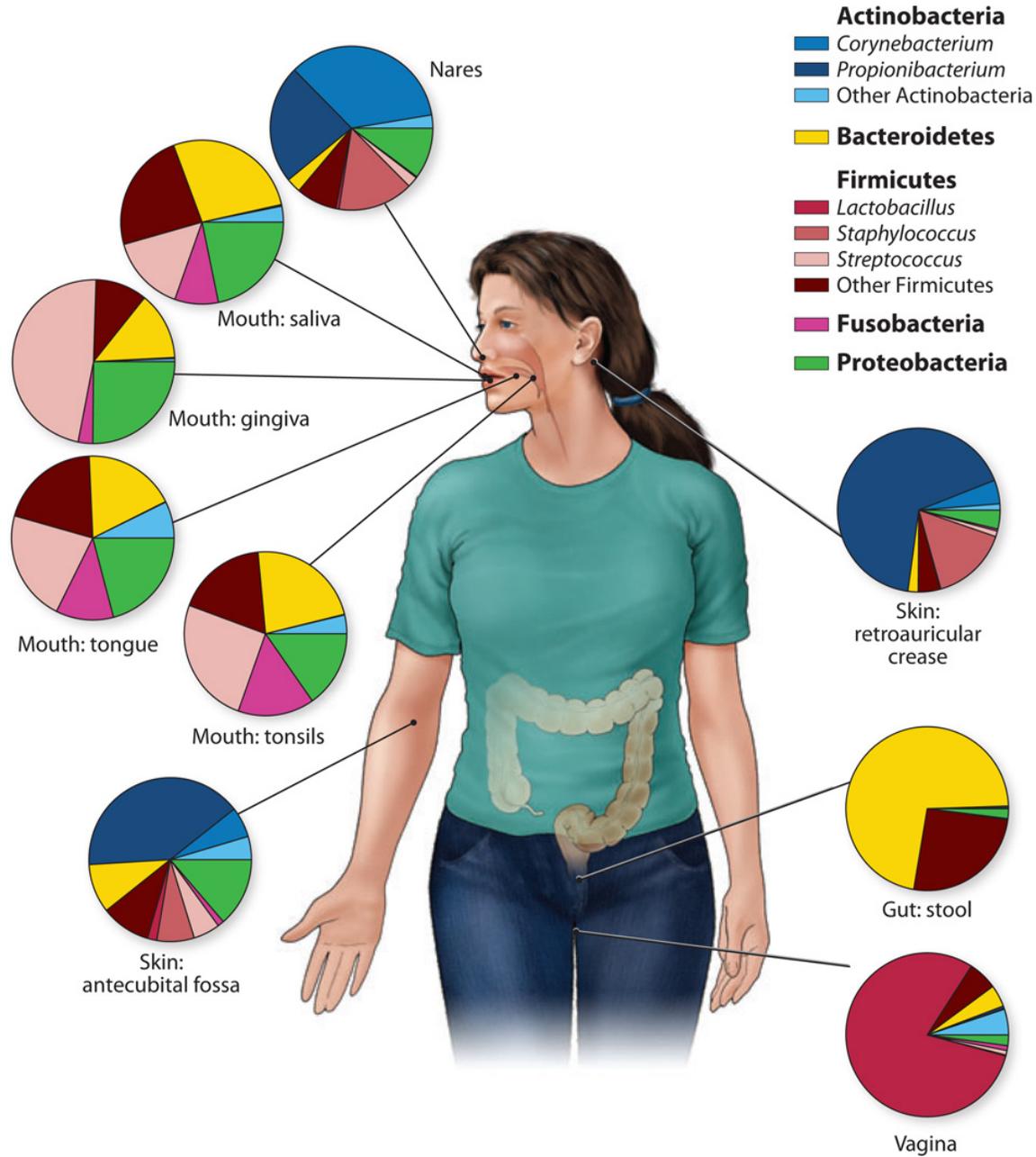
Antonie van Leeuwenhoek  
1632-1723



Soumis à la Royal Society (Londres) en 1683.  
Première évidence écrite de l'observation  
microscopique de bactéries (animalicules) dans la  
plaque dentaire de l'homme (Collected Letters, vol. IV,  
Pl. X ; Gemeentelijke Archiefdienst)

" There are more "animals" living in depots accumulating on the teeth of everyone's mouth than living creatures in an entire kingdom, especially in those who never wash their teeth"

# Le(s) microbiote(s) de l'organisme humain



# Microbiote de l'organisme humain

Le microbiote de l'organisme humain, anciennement dénommé flore microbienne de l'organisme humain, est l'ensemble des bactéries, champignons et autres micro-organismes que le corps humain contient en grand nombre.

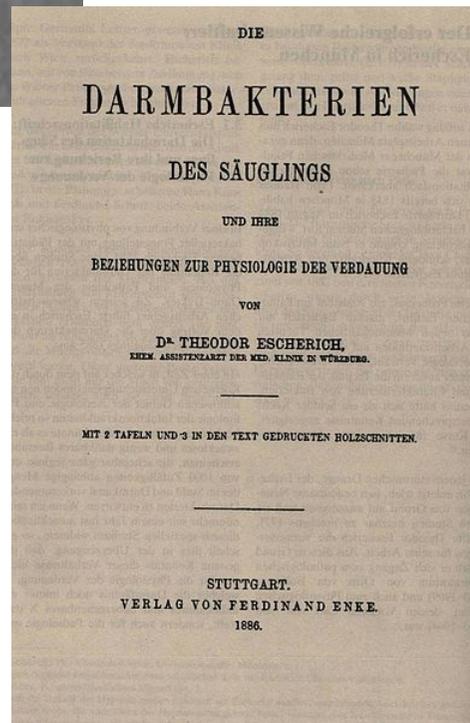
Chacun des sites corporels correspond à une niche écologique spécialisée et caractérisée par ses propres consortia microbiens, des dynamiques communautaires différentes et des interactions étroites avec les tissus.

**Le plus étudié des microbiotes humains est le microbiote intestinal.**

Il est extrêmement divers (biodiversité taxonomique, génétique et fonctionnelle).



Theodor Escherich  
1857-1911

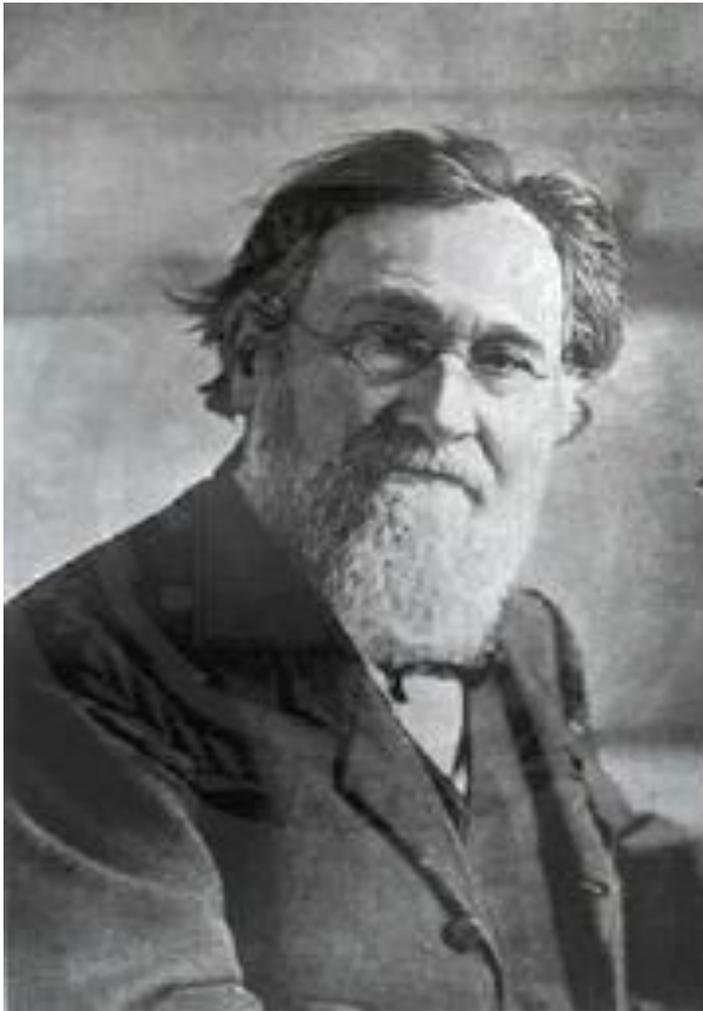


"At a time when microbiologic research has gained us so many laurels by following the research methods of Koch into the regions of the etiology and pathology of infectious diseases, it would **appear to be a pointless and doubtful exercise to examine and disentangle the apparently randomly appearing bacteria in normal feces and the intestinal tract, a situation that seems controlled by a thousand coincidences.** If I have nevertheless devoted myself now for a year virtually exclusively to this special study, it was with the conviction that the accurate knowledge of these conditions is essential, for the understanding of not only the physiology of digestion, ... , but also the pathology and therapy of microbial intestinal diseases."

Escherich, T. 1885.

Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings.

Fortschr. Med. 3: 515-522, 547-447  
*Enterobacteria of infants and their relation to digestion physiology*



Elie Metchnikoff, 1845-1916  
Professeur de Microbiologie à  
L'Institut Pasteur, 1893-1914  
Prix Nobel de Physiologie  
ou Médecine (avec Paul Ehrlich)  
en 1908

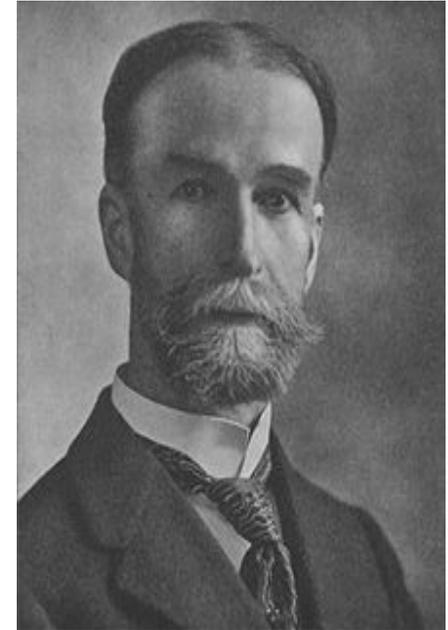
**Elie Metchnikoff** a publié trois livres importants:

*L'immunité dans les maladies infectieuses*, *La nature de l'homme*,  
***La prolongation de la vie.***

Dans ce dernier livre, il développe une théorie selon laquelle le vieillissement est causé par la prolifération progressive et incontrôlée de bactéries toxiques dans l'intestin et que les bactéries lactiques pourraient antagoniser ce processus de "putréfaction intérieure" et prolonger la vie (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*). Cette théorie était basée sur l'observation que la consommation importante de produits lactés fermentés en Bulgarie était corrélée à une prévalence importante d'individus centenaires... Cette théorie inspira le microbiologiste japonais Minoru Shirota d'étudier la relation causale entre bactéries et bonne santé de l'intestin.

"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

✖ You are currently running Firefox 3, which is not supported by NCBI web applications. [More information](#)

 **BioMed Central**  
The Open Access Publisher

 **Gut Pathogens**

[this article](#) [search](#) [submit a manuscript](#) [register](#)

From: [Gut Pathog. 2009; 1: 21.](#)

Published online 2009 December 7. doi: 10.1186/1757-4749-1-21

[Copyright/License](#) ▶

[Request permission to reuse](#)

## Figure 1

Gut Pathog

ASBMB

Biological Chemistry

### SOME OBSERVATIONS ON THE STUDY OF THE INTESTINAL BACTERIA.

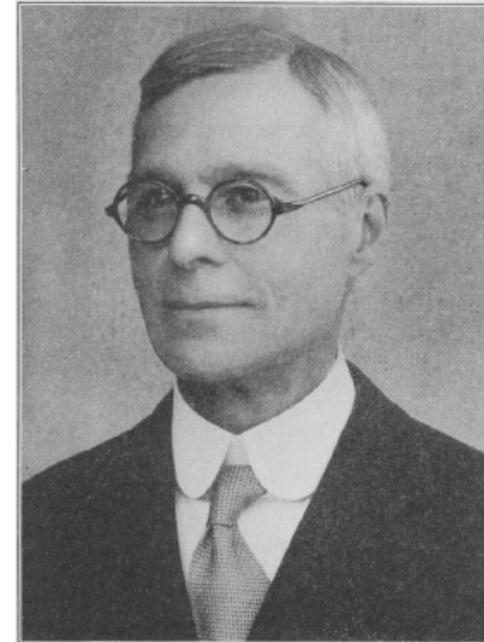
By ARTHUR I. KENDALL.

*(From the Laboratory of Dr. C. A. Herter, New York.)*

*(Received for publication, September 14, 1909.)*

The alimentary canal may be regarded from the point of view of bacterial processes within it, as a singularly perfect incubator; an incubator in which there is provided at different levels such a range of reaction and diversity of food that not only are the conditions suitable for the growth of the normal habituated intestinal bacteria but often also for those organisms, capable of developing at body temperature, which are ingested with the food of the host.

*An idea of the truly enormous daily bacterial proliferation*



Next >>

Downloaded from www.jbc.org

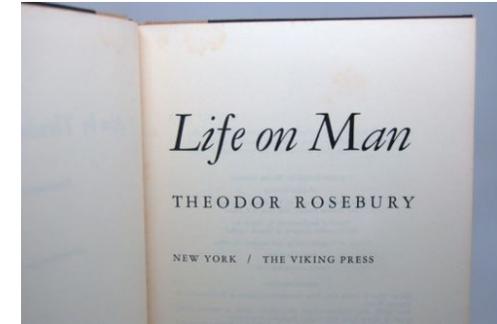
Arthur I Kendall  
Northwestern U.,  
Chicago

"Having determined by experiment that a given diet (for example, simple protein) is associated with a definite type of bacterial activity, and that coincidentally certain of these indicators are present in the urine of the host, it becomes a relatively simple matter to isolate individual strains of this fecal flora which will reproduce, either alone or symbiotically with other strains, these same end products."

Arthur I Kendall, 1909



## Un lien entre la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et les années 60



**Theodor Rosebury**, un des pionniers de l'étude de la flore orale, a résumé dans un livre intitulé "**Microorganisms Indigenous to Man**" l'ensemble des données publiées dans le domaine du microbiote de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle aux années 60. A l'époque de la rédaction de cet ouvrage, il était Professeur dans le Département de Microbiologie de l'école dentaire de Washington University à Saint Louis, Missouri. Début de l'écriture en 1944, publication en 1962...

Rosebury T. 1962. Microorganisms indigenous to man. McGraw-Hill, New York, pp 1-135

Un résumé des connaissances sur lesquelles s'est fondée l'étude moderne des microbiotes.

Point sur les connaissances au début des années 60

"Every adult individual tested has a microbial biota, the biotas are composed of bacteria, most of the bacteria in the biotas are of species of genera of strict anaerobes such as *Bacteroides* and of metabolic anaerobes such as *Lactobacillus*.

Maximum bacteroides populations in adults are many fold higher than the populations of *E. coli* and coliform bacteria, and the biotas of almost all infants fed at the breast contain species of the genus *Bifidobacterium* in high populations"

# Contributions de chercheurs pionniers des années soixante à la vision moderne du microbiote intestinal humain

Adapté de Dwayne C Savage

Microbial biota of the human intestine: A tribute to some pioneering scientists

Curr. Issues Intest. Microbiol. 2001. 2:1-15

PROPRIETES	CHERCHEURS IMPLIQUÉS
Largement composée d'anaérobies >50 genres bactériens, 100' species + Archea méthanogènes	Drasar, Gorbach, Haenel, Mitsuoka, Smith
> 100 milliards de bactérie/g feces 50 % masse fécale	Drasar, Gorbach, Mitsuoka
Etablissement chez le nouveau né selon un schéma de "succession écologique"	Dubos & Schaedler, Raibaud & Ducluzeau, Smith
Certaines sp. forment une communauté associée à la surface de la couche de mucus, d'autres restent lumineales	Dubos & Schaedler, Gustafsson & Midvedt
Les membres du microbiote obéissent à des lois écologiques et sont régulées par des facteurs de l'environnement, de l'hôte... et d'eux mêmes	Drasar, Dubos & Schaedler, Gorbach, Gustafsson & Midvedt, Mitsuoka, Raibaud & Ducluzeau
<b>Le microbiote peut être vu comme un organe indispensable à la vie</b>	Dubos & Schaedler, Gustafsson & Midvedt, Mitsuoka, Raibaud & Ducluzeau

**Raibaud, P.**, Dickinson, A.B., Sacquet, E., Charlier, H., et Mocquot, G. 1966. La microflore du tube digestif du rat. I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. Ann. L'Inst. Pasteur 110: 568-590.

**Raibaud, P.**, Dickinson, A.B., Sacquet, E., Charlier, H. et Mocquot, G. 1966. La microflore du tube digestif du rat. II. Dénombrement de différents genres microbiens dans l'estomac et l'intestin de rats conventionnels et variations quantitatives individuelles et en fonction de l'âge. Ann.Inst. Pasteur 110: 861-876

**Ducluzeau, R., et Raibaud, P.** 1973. Effet d'une souche de *Lactobacillus* sur la cinétique d'établissement de *Shigella flexneri* et d'*Escherichia coli* dans le tube digestif de souriceaux "gnotoxéniques." Rôle de l'immunisation des mères. Can. J. Microbiol. 19: 1021-1030.

**Ducluzeau, R, Raibaud, P.,** et Ladire, M. 1974. Cinétique de l'établissement d'une microflore anaérobie stricte dans le tube digestif de souriceaux nés de mères gnotoxéniques entre la naissance et le sevrage. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 125A:57-68.

**Ducluzeau, R.,** Ladire, M., Callut, C., **Raibaud, P.,** and Abrams, G.D. 1977. Antagonistic effect of extremely oxygen-sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and of *Escherichia coli* against *Shigella flexneri* in the digestive tract of gnotobiotic mice. Infect. Immun. 17: 415-424.

Patte, C., Tancrede, C., **Raibaud, P., and Ducluzeau R.** 1979. Premières étapes de la colonisation bactérienne du tube digestif du nouveau-né. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 130A: 69-81.

**Ducluzeau, R.,** Ladire, M., Duval, Y., and Huet, S. 1981. Influence du vieillissement de l'hôte sur l'effet de barrière permissive a l'égard d'une souche d'entérobactérie exercé par une flore bactérienne complexe dans le tube digestif de souris maintenues en isolateur. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 132B: 91-100.

# Microbiote, quand les techniques précèdent les concepts

Le microbiote est un domaine où les progrès des connaissances et des concepts ont souvent suivi les grandes avancées méthodologiques:

- Amélioration de la culture des bactéries anaérobies (tubes de « Raibaud », chambre de Freter et technique de Hungate)
- Puis expérimentation utilisant des animaux axéniques (sans germes)
- Plus récemment, le développement de bases de données sur l'ARNr 16s a permis l'étude de la diversité du microbiote
- Enfin, le séquençage massif du génome de la totalité des bactéries du microbiote associé au criblage fonctionnel doit permettre une analyse fonctionnelle sans précédent

# Culture-isolement-identification bactérienne

Culture et isolement des bactéries ont longtemps été « l'étalon or » de l'identification et de la caractérisation des microbes.

Après isolement de colonies, l'identification bactérienne est assurée par l'observation directe des bactéries: morphologie, motilité, coloration au Gram, analyse biochimique, éventuellement agglutination.

**Aujourd'hui spectrométrie de masse.**

L'isolement peut être facilité par l'utilisation de milieux d'enrichissement ou de milieux sélectifs. Milieux anaérobies, etc.

Dans de nombreuses situations, il est apparu que le nombre et la diversité de bactéries observées dépassaient de loin ce qui était réellement cultivé.

# Culture-isolement-identification bactérienne

La méthode classique « culture-identification » a donc ses limites.

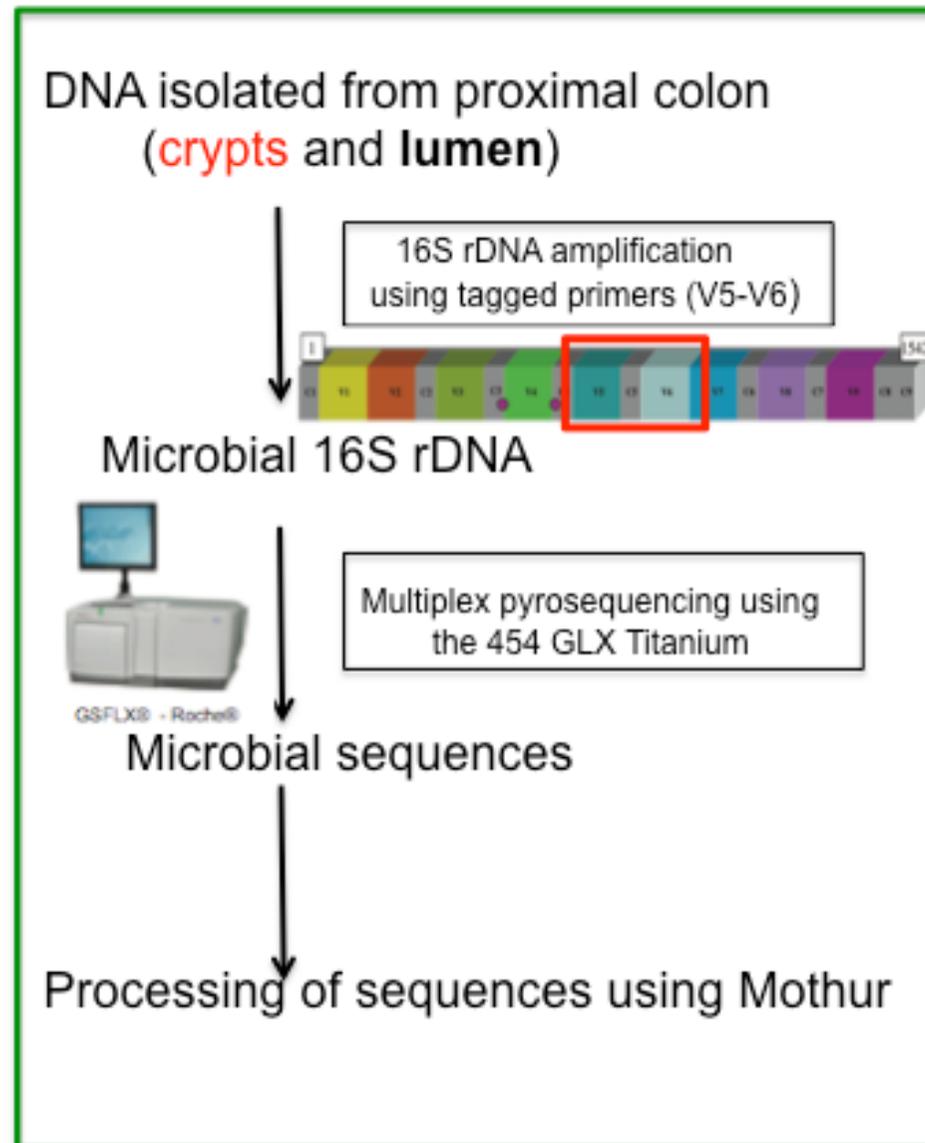
Seules 60 à 80 % des espèces bactériennes sont cultivables  
(Moore WE & Holdeman LV. 1974. Appl Microbiol; Hayashi H et al. 2002. Microbiol Immunol)

**Utilisation des portions variables des séquences ADN codant les ARNr 16S (Woese CR. 1977. PNAS)**

Identification par combinaison PCR/amplification de séquences hypervariables (Pace NR et al. 1985. PNAS, 82:6955-6959). Techniques initialement éprouvées sur des échantillons environnementaux complexes (Gruice EA & Segre JA. 2012. Ann Rev Genomics Hum Genet)

Difficulté d'établir un diagnostic d'espèce sur la base des méthodes moléculaires. On parle d'OTU (organisational taxonomy unit)  
(Achtman M & Wagner M. 2008. Nat Rev Microbiol)

# Utilisation des portions variables des séquences ADN codant les ARNr 16S



# Microbiote oral 316 ans plus tard...

Kroes I, Lepp PW, Relman DA

Bacterial diversity within the human subgingival crevice

Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 96:14547-14552

Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J,

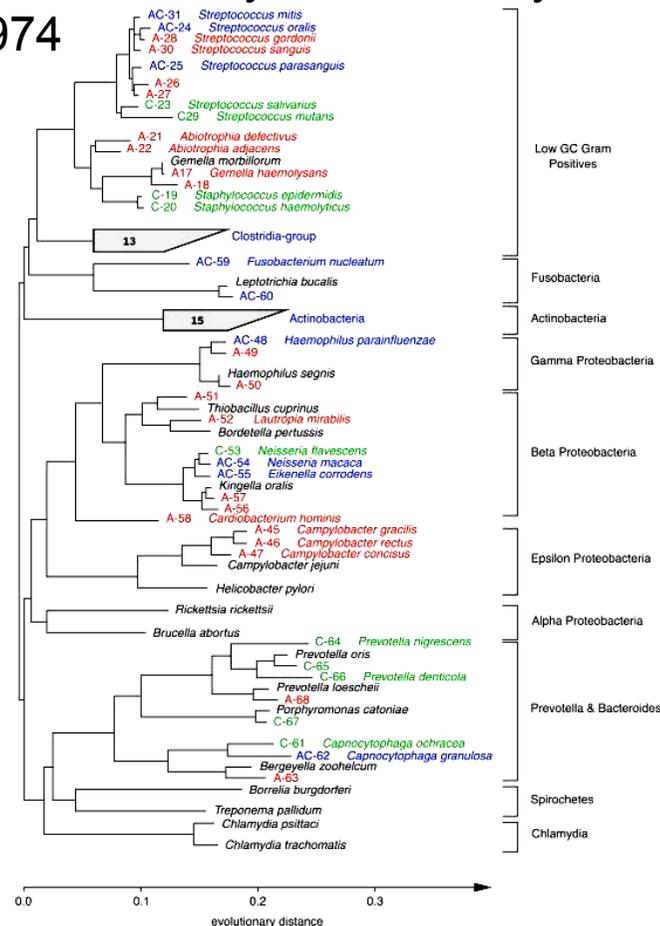
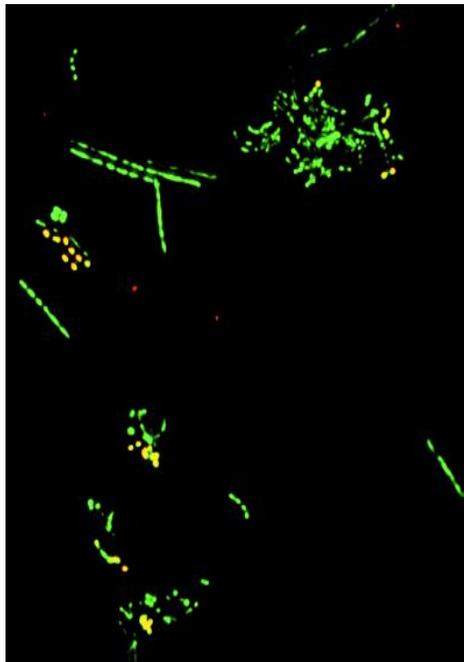
Mongodin EF, Nelson KE, Gill SR, Fraser-Liggett CM, Relman DA

Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals.

ISME J, 2010, 4:962-974



David Relman



Plusieurs pathologies stomatologiques sont suspectes d'une étiologie microbienne: Caries = classiquement *Streptococcus mutans*, mais une analyse métagénomique suggère un schéma plus complexe: les individus qui n'ont jamais souffert de carie hébergent un consortium de microorganismes enrichi en gènes codant pour des molécules antimicrobiennes et des autoinducteurs du quorum sensing (Belda-Ferre P et al. 2012. ISME J)



"Rien n'a de sens en biologie si ce n'est à la lumière de l'évolution"

Theodosius Dobzhansky, 1973

American Biology Teacher, 35:122-129

... ou de la co-evolution

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

Le terme "microbiome" a été introduit par Joshua Lederberg pour intégrer la notion d'une communauté écologique comprenant symbiotes, commensaux et pathogènes partageant notre espace corporel, dans le but de reconnaître leur fonction de déterminants de la santé et de la maladie.

Lederberg J & McCray AT. 2001. Ome sweet'omics-a genealogical treasury of words.

Scientist, 15:8



Joshua Lederberg (1925-2008)

# Rôle des microorganismes dans l'évolution du monde animal (et végétal)

Théorie de l'**hologénome** de Rosenberg, initialement fondée sur l'étude de la résistance/sensibilité des coraux aux microorganismes qui les colonisent (Rosenberg E et coll. 2007. Nat.Rev.Microbiol.)

Rapidement élargie à l'ensemble du monde vivant (Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. FEMS Microbiol.Rev.)

Théorie du **superorganisme** de Wilson & Sober (Wilson DS & Sober E. 1989. J.Theor.Biol.)

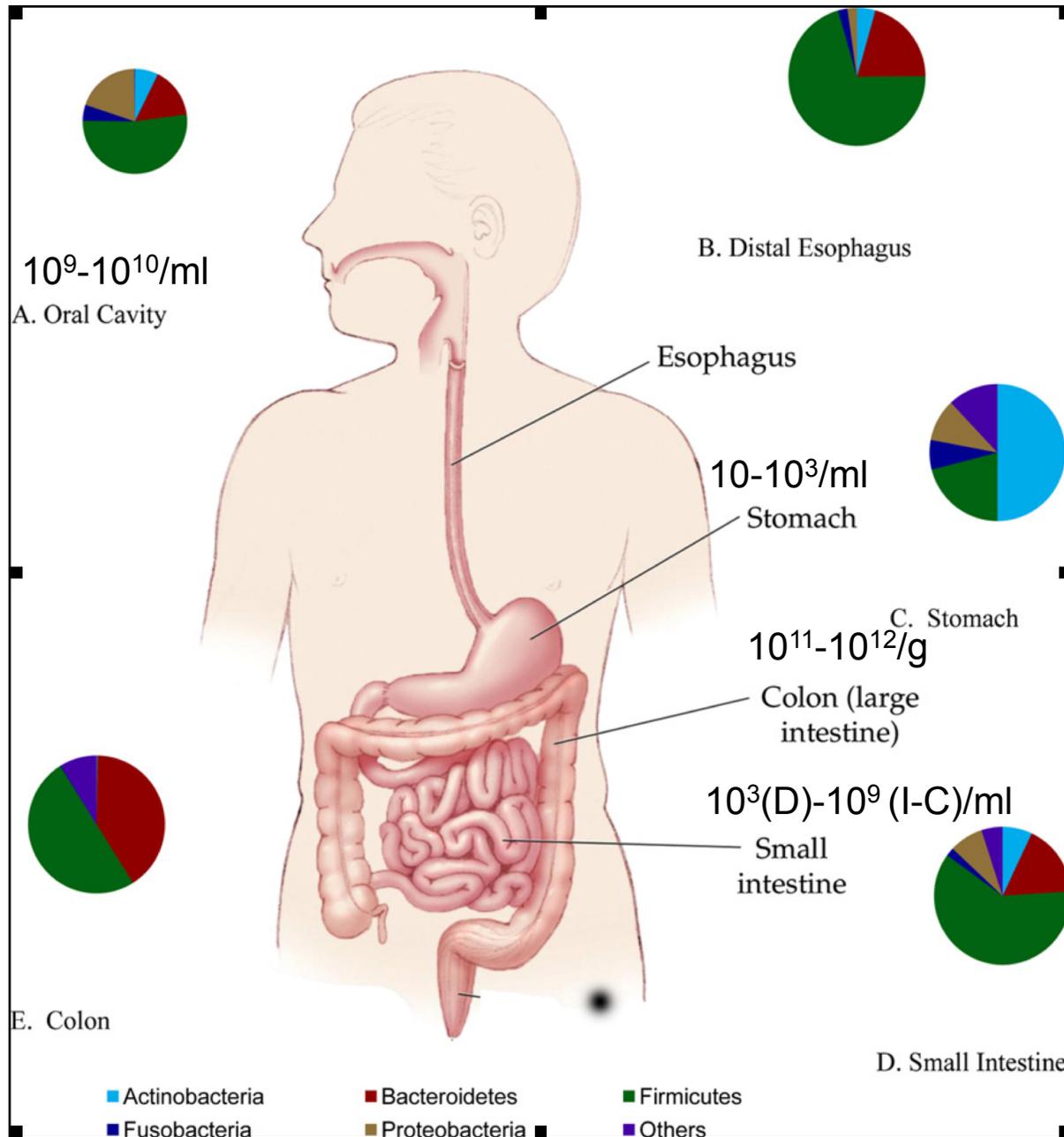
Concept de l'**organe oublié** chez l'homme pour la flore intestinale (O'Hara AM & Shanahan F. 2006. EMBO Repts.)

Nécessité de considérer **un second volet du programme de séquence du génome humain** considérant ses flores endogènes (Relman DA & Falkow S. 2001. Trends Microbiol.)

Concept maintenant concrétisé dans la US NIH Roadmap Initiatives:  
« Human Microbiome Project » (<http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>)  
et le Programme Européen MetaHit (FP7)

# Microbiotes du tractus oro-oesphago-gastro-intestinal

Firmicutes,  
 Proteobactéries,  
 Bacteroidetes,  
 Actinobactéries,  
 Fusobacteria  
 Rares: SR1,  
 TM7,  
 Cyanobactéries  
 Spirochètes,  
 Tenericutes,  
 Synergistetes  
 (Ahn J et al.  
 2011.PLoS One



Firmicutes,  
 Bacteroidetes,  
 Actinobacteria,  
 Proteobacteria,  
 Fusobacteria,  
 TM7  
 Streptococcus,  
 Veillonella, Prevotella  
 = les genres les plus fréquents  
 (Pei Z et al. 2004.  
 PNAS)

Proteobacteria,  
 Firmicutes,  
 Actinobacteria,  
 Bacteroidetes,  
 Fusobacteria...  
 Helicobacter pylori  
 (Bick et al. 2006.  
 PNAS)

Diversité  
 restreinte/colon  
 Anaérobies  
 facultatifs...

?

## Microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal humain est dominé par cinq phyla (**Firmicutes**, **Bacteroidetes**, Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia) et un phylum d'Archaeobactérie (Euryarchaeota). Les groupes bactériens moins prévalents sont répartis parmi les phyla suivants: Cyanobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae, Spirochaetes et TM7.

**Firmicutes.** Ce phylum inclus Ruminococcus, Clostridium, Lactobacillus (plusieurs sont des probiotiques), des Eubacteries productrices de butyrate: Faecalibacterium, Roseburia.

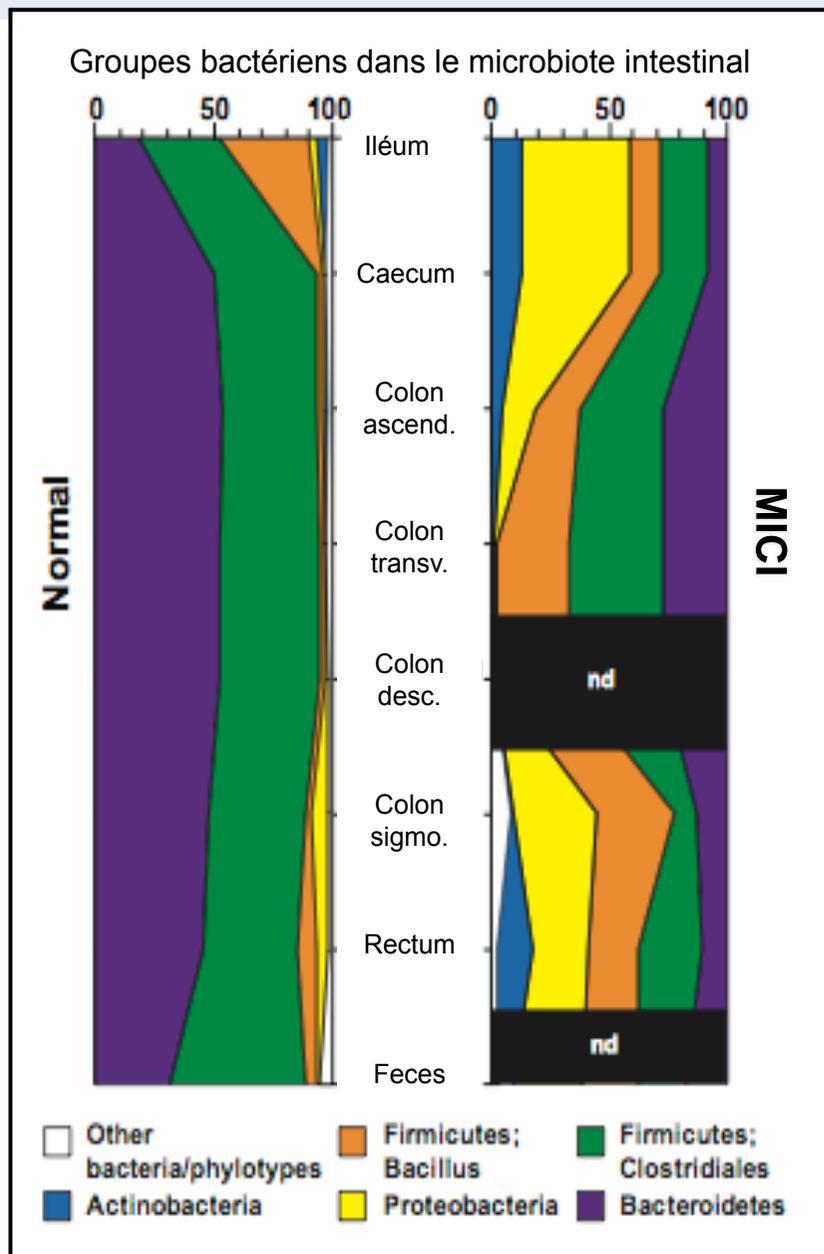
**Bacteroidetes.** Ce phylum inclut les Bacteroides, Prevotella et Xylanibacter qui dégradent une série de glycanes complexes.

**Actinobacteria.** Ce phylum inclut Collinsella et Bifidobacterium (comprenant des souches probiotiques).

**Proteobacteria.** Ce phylum inclut les Escherichia (famille des Entérobactéries) et Desulfovibrio (bactéries sulfo-réductrices), Verrucomicrobia (récemment découvert) et Akkermansia (dégradation des mucines).

**Euryarchaeota.** Ce phylum contient Methanobrevibacter (un genre très prévalent impliqué dans la méthanogénèse intestinale).

# Le microbiote de l'intestin humain



D'après Peterson et coll., 2008

# Représentativité du microbiote fécal

Jusqu'à quel point la flore fécale reflète-t-elle fidèlement la diversité des niches écologiques représentées dans l'intestin ?

"Diversité microbienne spatiale" individuelle et interindividuelle ?

- Flore présente à différents niveaux: duodéno-jejunum, iléon, caecum/appendice, colon ascendant vs horizontal, vs sigmoïde, vs rectum (ex: flore duodéno-jéjunale = "goutte d'eau dans l'océan" en comparaison de la flore colique (quantité et diversité))
- Flore associée à la muqueuse, flore présente dans le mucus, flore présente en surface du mucus, flore luminale
- Flore de la crypte vs flore en regard des villosités intestinales ou de l'épithélium superficiel

# Pourquoi sommes nous hôtes d'un microbiote intestinal?

Dans la relation symbiotique établie entre les bactéries résidentes et l'hôte eucaryote multicellulaire, les bactéries profitent d'un environnement stable (température, oxygène, pH, nutriments)

L'hôte gagne un large spectre de capacités digestives, métaboliques et nutritionnelles, une capacité de protection contre l'intrusion de microorganismes allogènes/ pathogènes (effet de barrière), une stimulation contrôlée de l'immunité muqueuse et systémique, voire d'autres fonctions...

La co-evolution a créé un "paradoxe immunologique" forçant l'hôte à conjuguer TOLERANCE au microbiote commensal et rapide RECONNAISSANCE des microbes pathogènes.

## Effets biologiques du microbiote intestinal sur son hôte humain

Développement de l'immunité innée et adaptative

Effet de barrière microbiologique

Maintien de l'intégrité de l'épithélium

Source d'énergie

Biosynthèse de vitamines, transformation des sels biliaires, catabolisme des sucres végétaux complexes (cellulose, pectines) et des mucines

Métabolisme des xénobiotiques

---

# Etablissement du microbiote intestinal humain

Le fœtus humain vit dans un liquide amniotique stérile.

Stérile *in utero*, l'intestin est colonisé dès la naissance

## **La colonisation dépend de la voie d'accouchement:**

- L'accouchement vaginal donne lieu à l'établissement d'une flore intestinale reflétant la flore vaginale de la mère (Lactobacillus, Prevotella, Sneathia)
- L'accouchement par césarienne donne lieu à l'établissement d'une flore reflétant la flore cutanée (Propionibacterium, Staphylococcus, Corynebacterium)

## **La colonisation dépend du mode d'alimentation du nourrisson:**

Différences significatives entre la flore des nourrissons nourris au sein et ceux nourris au biberon. Certaines des bactéries retrouvées chez les enfants nourris au biberon sont associées à une prévalence plus élevée d'utilisation d'antibiotiques.

La colonisation dépend aussi du niveau d'hygiène maternel, d'une hospitalisation et de la prématurité.

La convergence vers une flore adulte survient en fin de première année.

Dominguez-Bello MG et al. 2010. PNAS

Penders J et al. 2006. Pediatrics

Palmer C et al. 2007. PLoS Biol

# Stabilisation du microbiome

La flore fécale, dans les deux premières années de la vie chez un enfant en bonne santé est caractérisée par un processus de développement chaotique et stochastique évoluant vers un "état stable" correspondant à ce que sera le microbiote adulte, ponctuée par des variations plus ou moins importantes possiblement liées à des infections virales et/ou à des bactériophages.

Ces espèces fondatrices évoluent ensuite chez chaque individu en fonction d'un certain nombre de facteurs:

Fond génétique de l'hôte (Benson AK et al. 2010. PNAS)

Composition du microbiote = trait génétique complexe ?

Physiologie intestinale (Rey RE et al. 2008. Science)

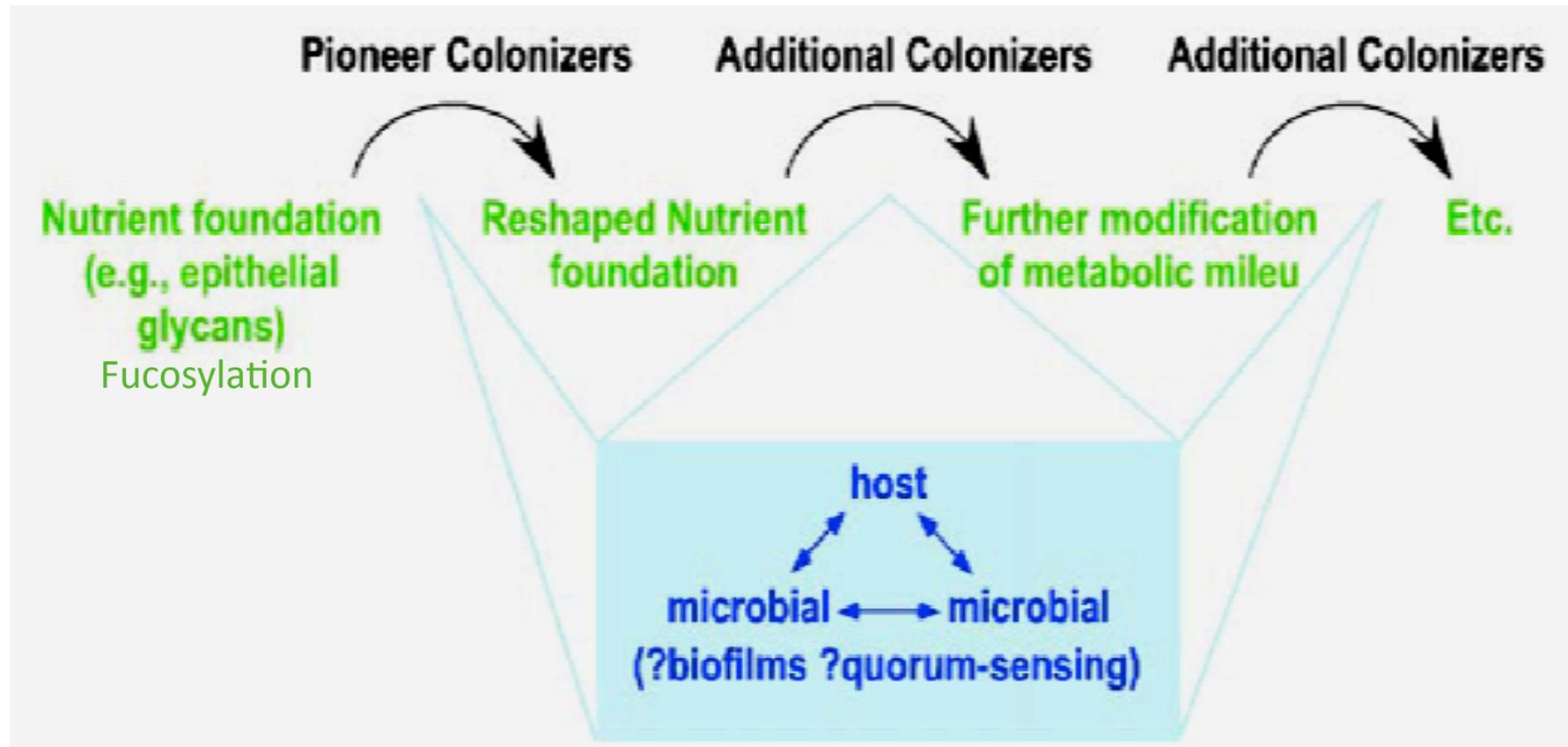
Régime alimentaire (Muegge BD. 2011. Science)

Poids (Turnbaugh PJ. 2009. Nature)

Environnement, géographie (Rey et al.; Erwin G et al. 2001. Microb Ecol Health Dis)



Jeff I Gordon



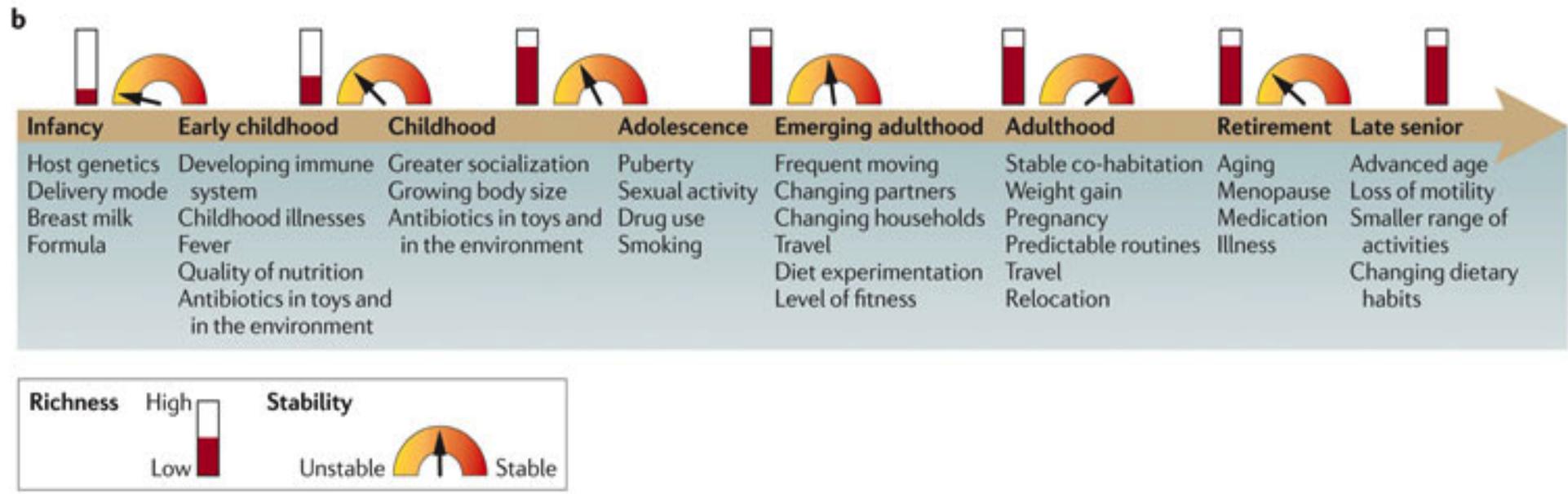
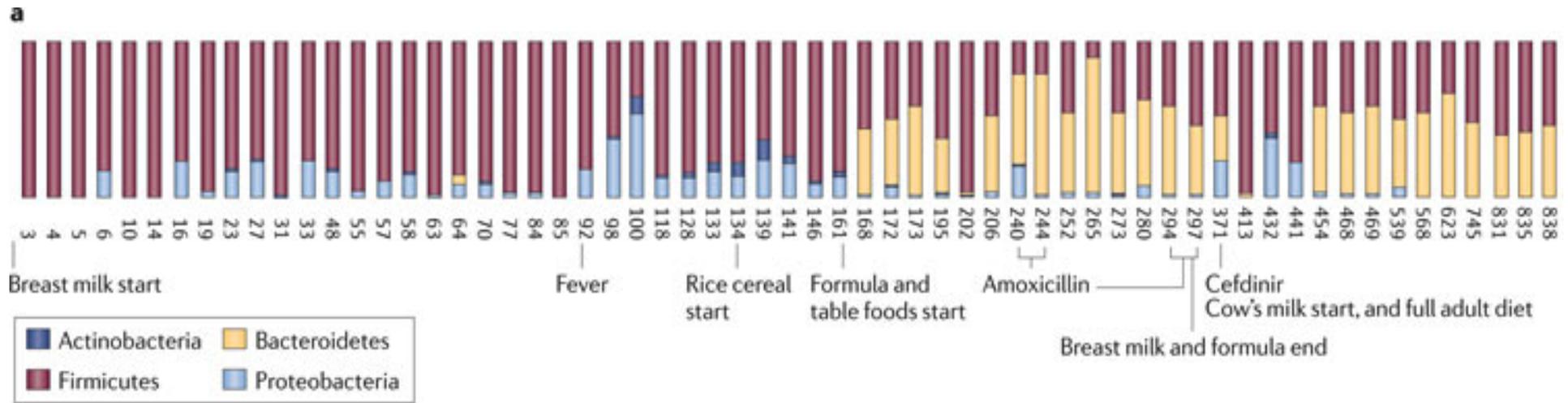
# Stabilité du microbiome

Le microbiote semble se stabiliser sur une base temporelle à l'âge adulte (données actuellement insuffisantes).

Des différences commencent à apparaître chez l'adulte plus âgé avec reprise de prédominance de *Bifidobacterium*. Ces modifications pourraient refléter le processus de vieillissement lui-même ou des conditions environnementales: régime alimentaire, antibiotiques et autres traitements (Biagi E et al. 2010. PLoS One).

Les variations semblent en général limitées et les manipulations du régime alimentaire (excès de fibres ou de graisses) montrent un effet sur le microbiome, mais il semble limité dans sa variabilité, sa durée et son impact sur les entérotypes (Wu GD et al. 2011. Science).

# Stabilité du microbiote intestinal humain

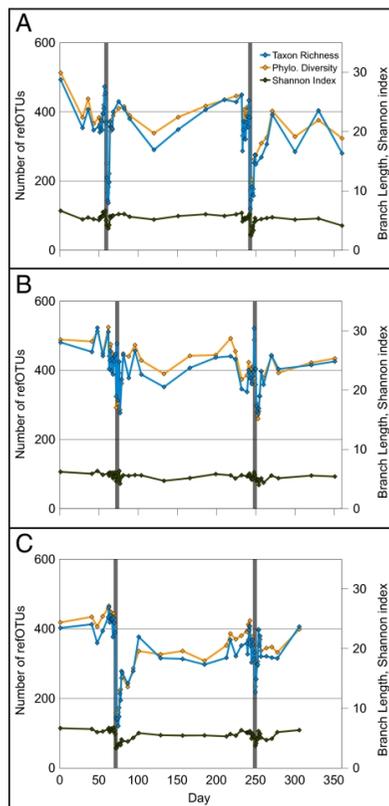


# Métagénomique analytique du microbiote humain

Réponse du microbiote intestinal humain aux antibiotiques: "**état stable alternatif**"

Effets pervers d'un antibiotique sur le microbiote intestinal humain révélé par le séquençage du rRNA 16S (Dethlefsen L et coll. 2008. PLoS Biol)

Récupération incomplète et variations individuelles des réponses du microbiote intestinal humain à des perturbations induites par l'administration successive d'un antibiotique (Dethlefsen L & Relman DA, 2011. PNAS)



- En absence de perturbation, la variabilité temporelle est resserrée autour d'une composition moyenne des communautés microbiennes des individus.
- Après administration de Ciprofloxacine, un effet rapide est observé sur la diversité et la composition du microbiote.
- Résilience avec *restitutio ad integrum* après une dose de Cipro.
- Résilience moins évidente après une seconde dose de Cipro. Recupération de la diversité et de la densité microbienne, mais composition souvent très altérée.

Apparition d'un nouvel équilibre écologique dont la signification n'est pas claire: "état stable alternatif".

# Perturbation du microbiome par les antibiotiques

## En résumé...

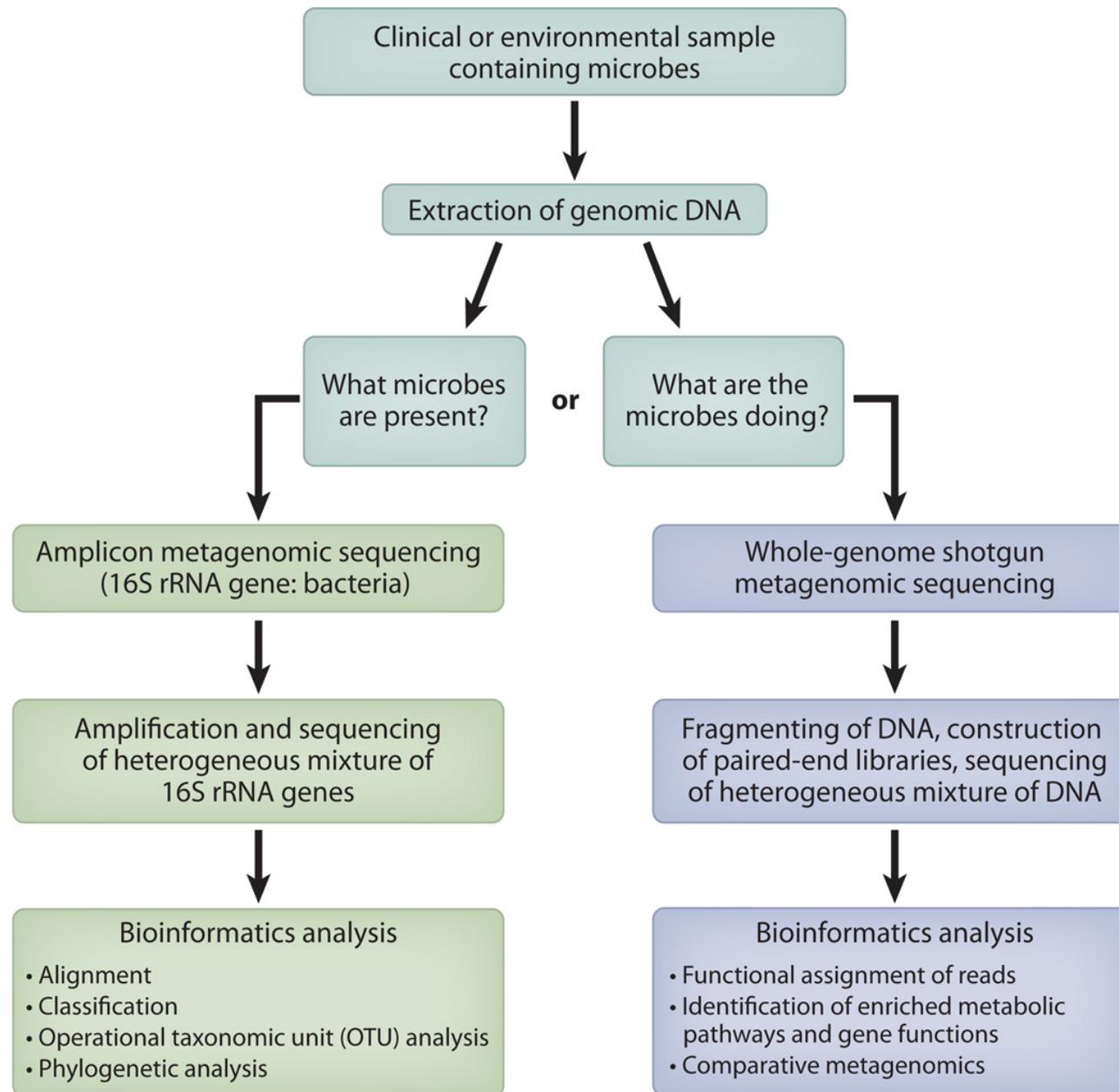
Changements majeurs dans le microbiote **d'enfants** recevant des antibiotiques.

Glissements spectaculaires pouvant même rendre la flore indétectable (Palmer C et al. 2007. PLoS Biology).

Chez **l'adulte**: réponses variables, mais disparition définitive de certains taxa chez certains individus.

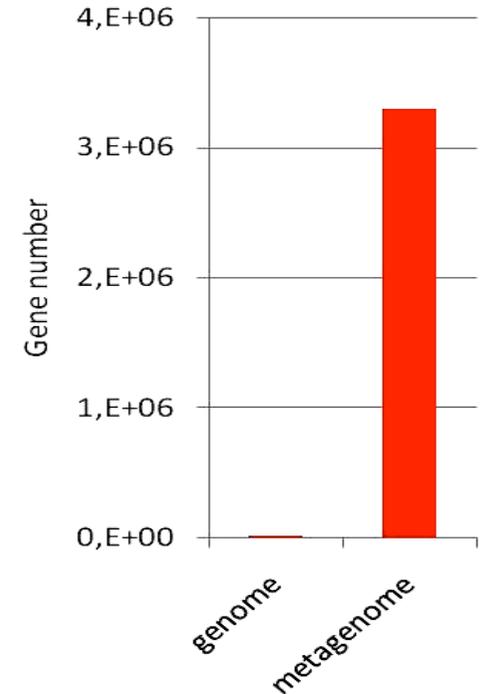
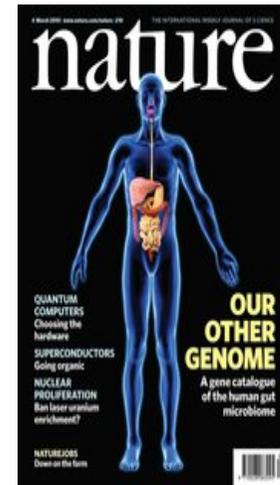
Résilience relative, tendance cependant à une restriction de la diversité (Dethlefsen L et al. 2008. PLoS Biology)

# Etapes du séquençage métagénomique et analyse des données



# De la séquence du génome humain à la métaséquence du microbiome intestinal humain

- Publication de la première séquence d'un génome humain: 2001 (International Human Genome Sequencing Consortium; Venter et al., 2001)
- Publication de la première métaséquence de microbiomes humains: (MetaHit Consortium; Quin et al. 2010. Nature)



<http://www.metahit.eu>

Métagénome bactérien de l'intestin humain

Séquençage à haut débit de l'ADN d'échantillons de selles de 124 sujets européens (Danemark, Espagne)

Analyse bioinformatique de 5 milliards de "reads" courts.

Identification de 3,3 millions de gènes = 150 x nb. de gènes du "premier génome"

1000 espèces environ

Partage interindividuels d'un "core metagenome", mais grandes différences au niveau des espèces

En moyenne, chaque individu héberge ~540 000 genes du catalogue initial de 3.3 millions de gènes

Qin, Raes et al, Nature 2010

### **Similarités:**

"Core metagenome" :  
~50 % des gènes microbiens d'un individu sont partagés par au moins 50 % des individus de la cohorte

### **Spécificités:**

Gènes rares:  
gènes partagés par moins de 20 % des individus.  
= 2.4 millions de gènes



# MetagenomiqueS du microbiote humain

## Métagénomiques

**Descriptive:** catalogage de gènes/identification de gènes et espèces

**Functionelle:** potentiel pour des fonctions nutritionnelles, métaboliques, etc...

**Analytique:** étude des paramètres influençant le microbiote (environnement, antibiotiques, régime, autres...)

**Corrélatif:** maladies, biomarqueurs

## Métagénomique corrélative et fonctionnelle du microbiote intestinal humain:3 "entérotypes"

Chaque entérotipe est dominé par un genre différent Each enterotype is dominated by a different genus — **Bacteroides**, **Prevotella** ou **Ruminococcus** — mais n'est pas affecté par le genre, l'âge ou l'origine géographique (Arumugam M et al. 2011. Nature).

**Entérotipe dominé par Bacteroides** = associé à un régime riche en protéines et graisses animales.

**Entérotipe dominé par Prevotella** = associé à un régime riche en carbohydrates.

**Entérotipe dominé par Ruminococcus** en recouvrement avec l'entérotipe Bacteroides (Wu GD et al. 2011. Science).

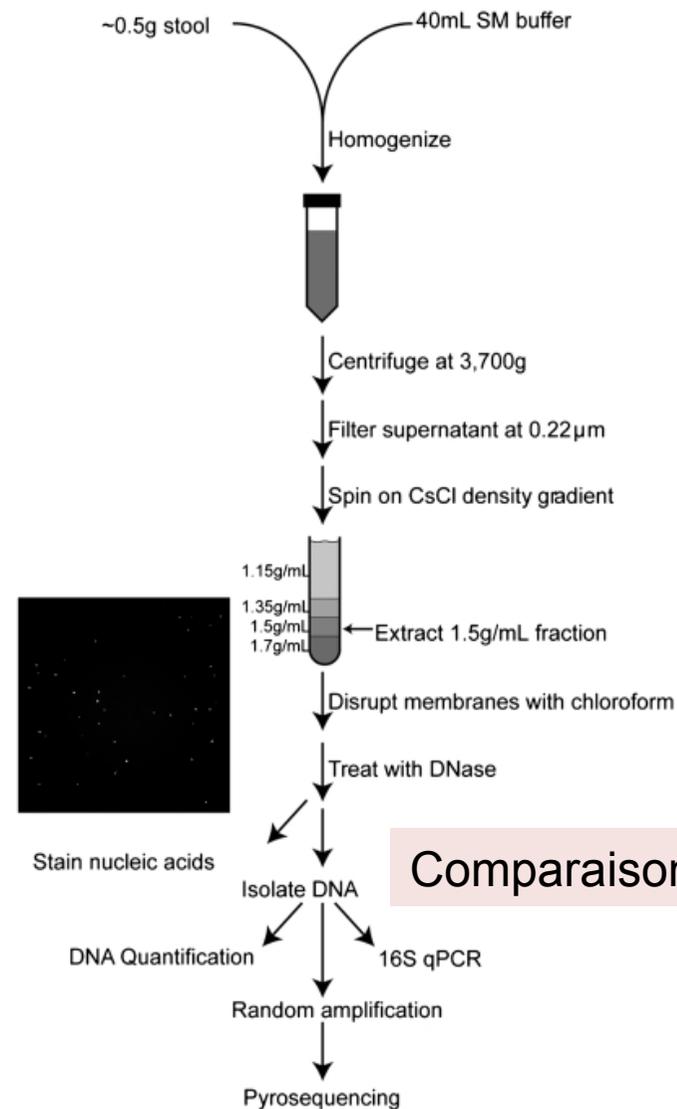
Un changement de régime alimentaire de 10 jours ne s'est pas montré suffisant pour altérer l'entérotipe d'un individu, suggérant que des modifications de long terme sont nécessaires (Wu GD et al. 2011. Science)

Le concept d'entérotypes est l'objet de discussions.

# Et les virus ?

## Virome intestinal

### Purification des VLP

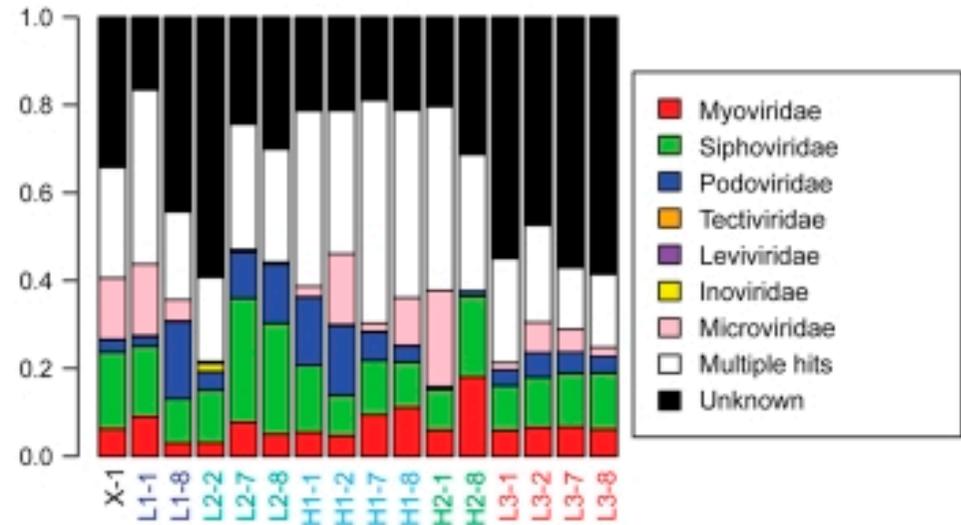


Comparaison aux séquences du microbiote

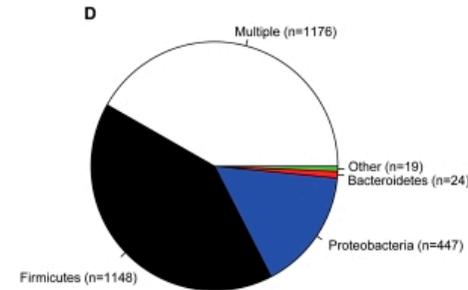
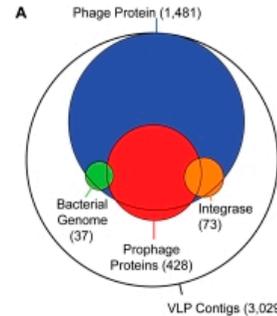
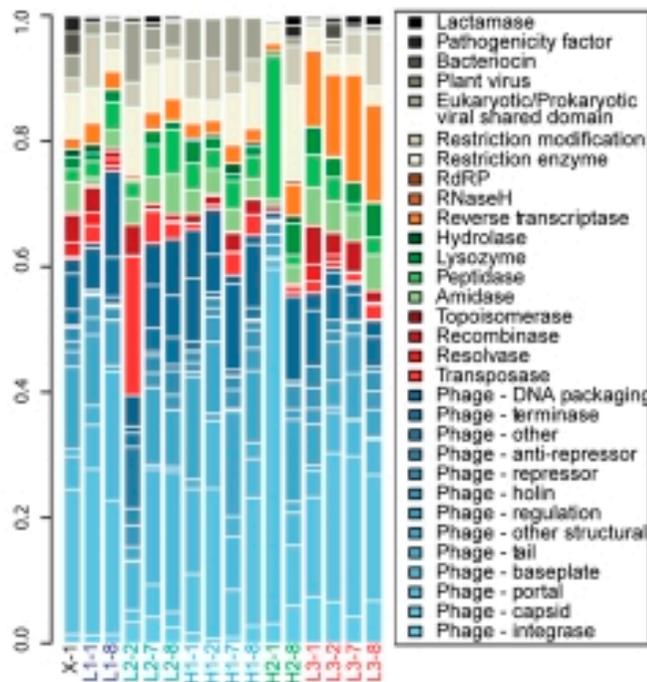
# issues du virome intestinal humain

Assemblage de 336 Mb de séquences de VLP produisant 7175 contigs, beaucoup correspondant à des génomes complets ou partiels de **bactériophages**.

Contigs riches en fonctions virales requises pour le cycle lytique, la lysogénisation et la croissance lysogène. Mais aussi: CRISPR viraux, résistance aux antibiotiques, virulence.



Classification taxonomique des VLP



Analyse des bactériophages tempérés au sein du virome intestinal humain

Analyse des fonctions des protéines codées par les contigs

# "Human Microbiome Project"

Publication/annonce du "Human Microbiome Project"  
(Programme du NIH de 173 millions de dollars)

Profil normal des microbiomes de 300 sujets sains

Metagenome des microbiotes de  
plusieurs sites anatomiques (i.e. peau /  
hfollicule pileux, cavité orale, tractus  
respiratoire, cavité vaginale)

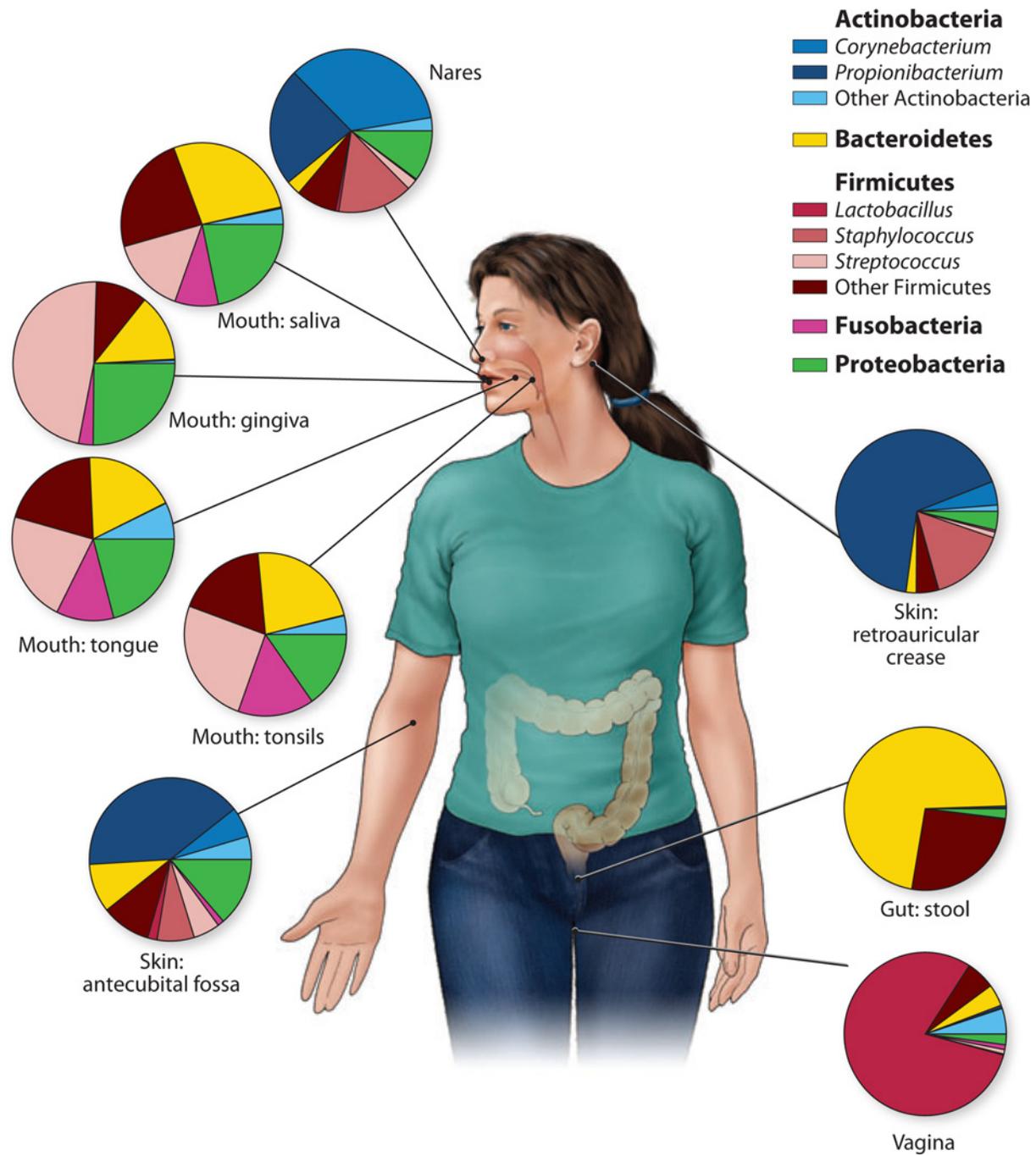
Combinaison de rRNA 16S et  
séquençage profond (Whole Genome  
Sequencing = WGS)

"Human Microbiome Project Consortium"  
Methé BA et al. 2012. Nature, 486: 215–221

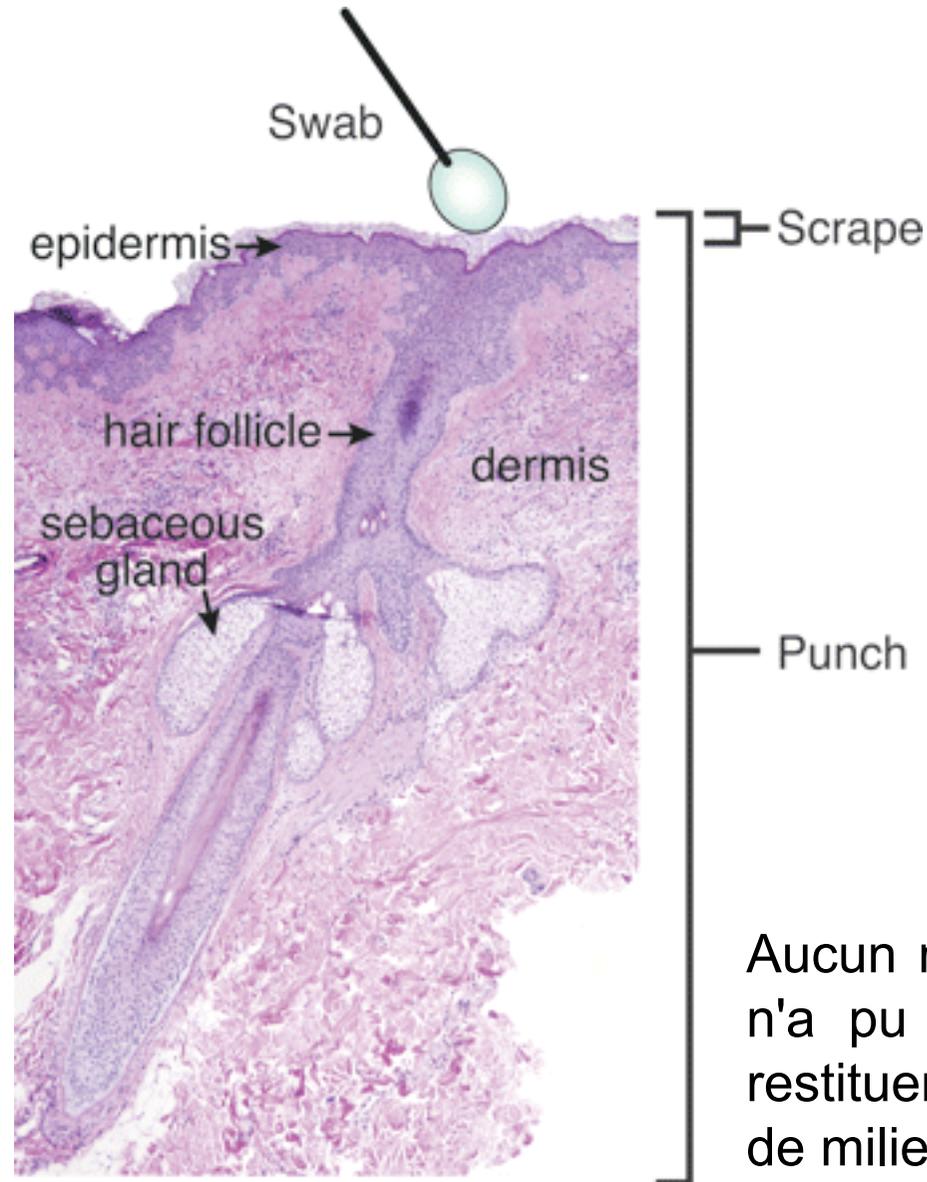


NIH HUMAN  
MICROBIOME  
PROJECT

<http://hmpdacc.org>



# A la découverte du microbiote cutané



Aucun milieu de culture n'a pu jusqu'à présent restituer les propriétés de milieu de la peau

# Espèces bactériennes cutanées dominantes composition "classique" basée sur la culture

## **Nombreuses espèces bactériennes cultivées de la peau humaine**

Leyden JJ et al. 1987. J Invest Derm. 88:65-72; Roth RR & James WD. 1988. Ann Rev Microbiol. 42: 441-464

0-10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup> selon le site étudié.

Genes/espèces bactériens constamment isolés:

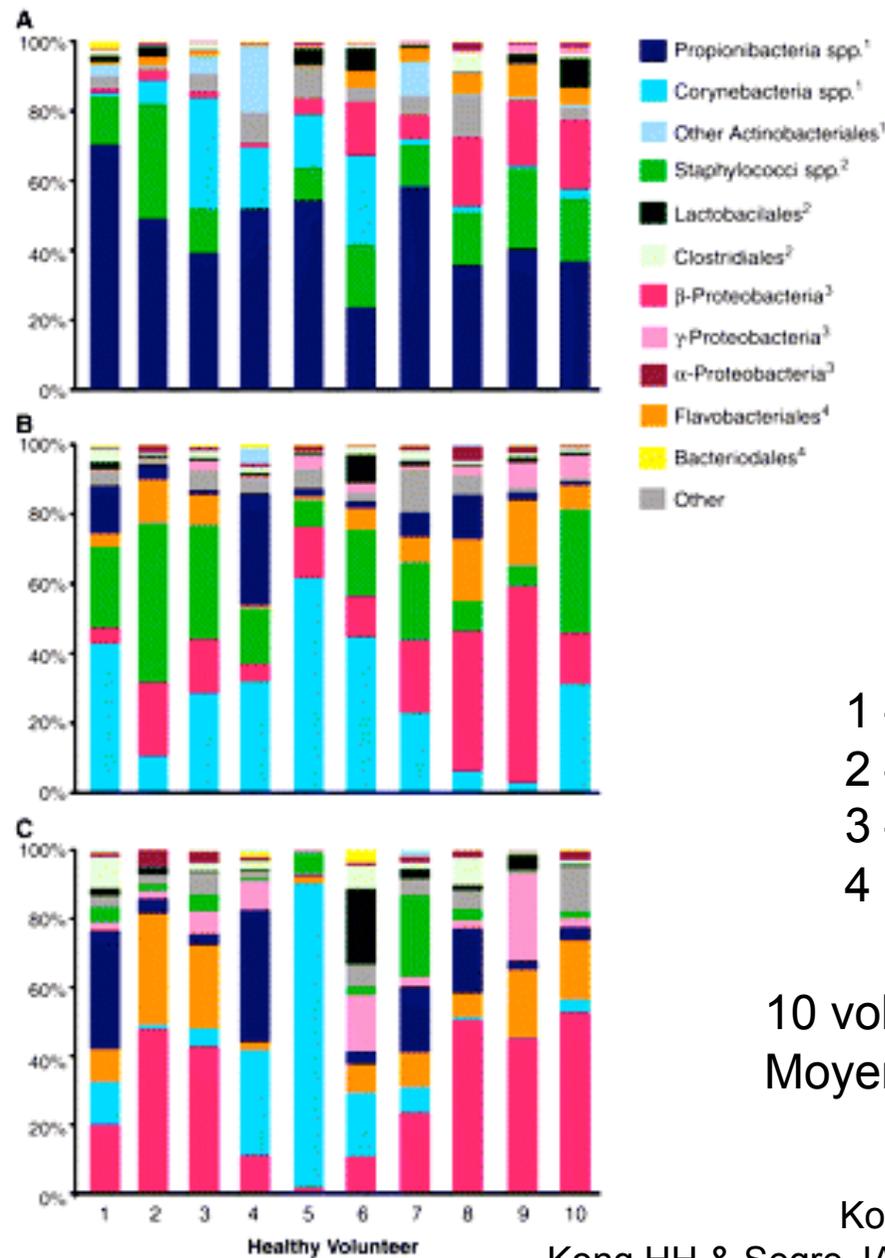
- Staphylococcus (*S. epidermidis*, *S. aureus*)
- Micrococcus (*M. luteus*, *M. agilis*)
- Corynebacteria (JK group)
- Brevibacteria (*B. epidermidis*, *B casei*)
- Propionibacteria (*P. acnes*)
- Acinetobacter (*A. baumannii*)
  
- *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* présents transitoirement ou présents de manière soutenue si infection
  
- Une espèce fongique: *Pytirosporium ovale* (*Mallasezia furfur*) dans la forme filamenteuse invasive (hyphe)

# Diversité du microbiote selon le site de prélèvement

**Zones sébacées**  
 Propionibactéries  
 Staphylococcus

**Zones humides**  
 Corynebacteries  
 Betaproteobactéries  
 Staphylococcus

**Zones sèches**  
 Betaproteobactéries



- 1 – Actinobacteries
- 2 – Firmicutes
- 3 – Proteobacteries
- 4 – Bacteroidetes

10 volontaires sains  
 Moyenne de 20 échantillons

# Une vue écologique et évolutionniste du mutualisme homme (mammifère) - bactéries

Les communautés microbiennes qui composent le microbiote humain sont composées d'un mélange complexe d'espèces qui ont co-évolué avec leur hôte

La diversité d'espèces et les variations observées entre individus résultent de nombreux paramètres (Dethlefsen L, et al. 2007. Nature):

- Historique de la colonisation
- Migrations d'espèces microbiennes entre hôtes
- Interactions écologiques très fortes au sein des hôtes ("symbiose dans la symbiose")
- Variabilité entre les hôtes (microbiote intestinal):
  - (i) **régime alimentaire** (long terme), régimes riches en graisses-protéines/ régimes riches en carbohydrates (Wu GD et al. 2011. Science)
  - (ii) **fond génétique** démontré chez la souris (Benson AK et al. 2010. PNAS). Traits polygéniques influencés par l'environnement sélectionnés et stabilisés car essentiels pour maintenir l'équilibre physiologique en période de crise (maladie, changements environnementaux)

# Une vue écologique et évolutionniste du mutualisme homme (mammifère) - bactéries

La composition et l'équilibre actuels du microbiote humain reflètent possiblement une intersection:

- (i) Une "**mémoire de l'évolution**" récapitulant tous les événements auxquels l'espèce humaine a été confrontée et a survécu grâce aux interactions mutualistiques "proposées" par le microbiote.
- (ii) Une "**écologie contemporaine**" intégrant la survenue rapide de nouveaux paramètres comportementaux, sociétaux et environnementaux (médecine périnatale, hygiène, antibiotiques, nouveaux aliments et nouvelles habitudes alimentaires, etc...).

Ces deux états sont-ils compatibles avec les règles écologiques ?

Peut-on envisager un "état stable alternatif" sans effets (négatifs) secondaires ?

Dans cette transition écologique pourrait résider plusieurs questions clés de la médecine contemporaine.