

Le microbiote intestinal humain et son impact sur la santé

Jean-Marc Chatel

Equipe “Interactions des Commensales et des Probiotiques avec l’Hôte”

MICALIS

INRA

78352 Jouy en Josas

FRANCE



MICALIS

MICrobiologie de l'**AL**imentation au service de la **S**anté humaine

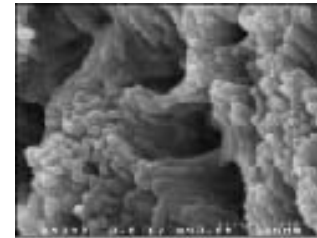
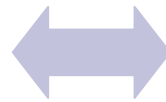
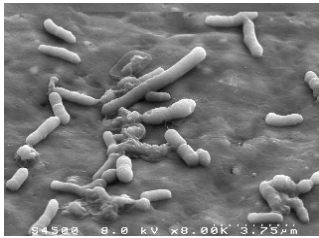
- 3 Pôles:
 - les déterminants moléculaires des dangers microbiologiques associés aux aliments
 - le fonctionnement intégré de la cellule microbienne
 - **l'écosystème microbien digestif de l'homme et son rôle dans la préservation de la santé.**
- 340 personnes, 110 chercheurs, 40 équipes

A pluridisciplinary laboratory

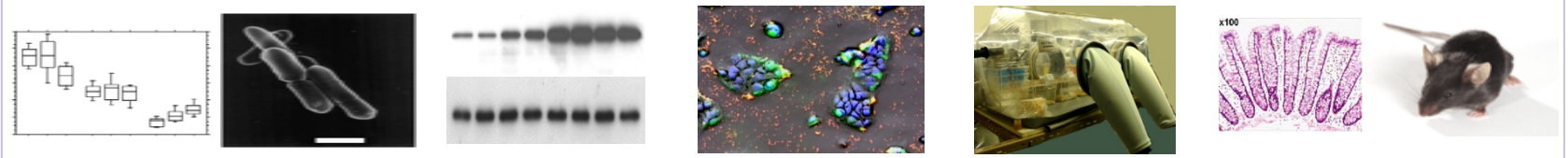
Crosstalk host-transiting and resident microbiota

Two major objectives:

1. Mechanisms of the beneficial effects of probiotic and commensal bacteria (particularly anti-inflammatory ones)
2. Host responses to probiotics and commensal bacteria



- Expertise in G+ bact as delivery vehicles
- Microbiology of commensal bacteria
- Molecular study of microbiota
- Biochemistry and enzymes purification
- Gnotobiotic rodents and inflammatory models
- Human clinical trials
- Cell culture
- Immuno-histochemistry



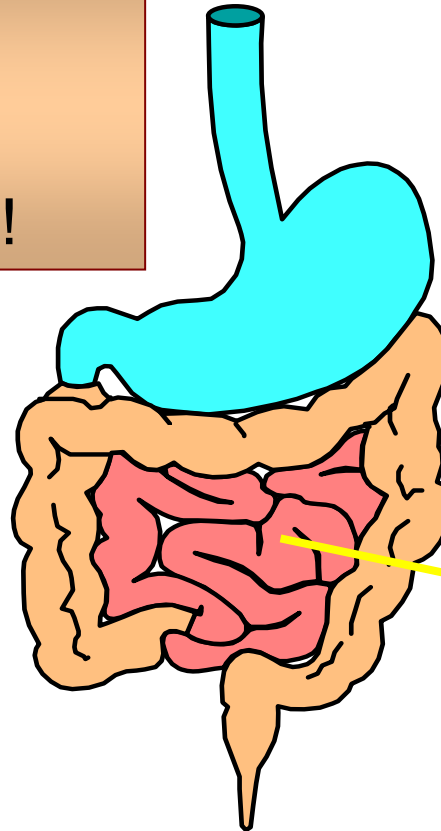
A combination of expertises to analyse essential functions of crosstalk host-microbiota

L'intestin, cet inconnu

Digestion et assimilation
des aliments

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

Deuxième cerveau
100 millions de
neurones!



Microbiote intestinal
100 000 milliards
de bactéries !

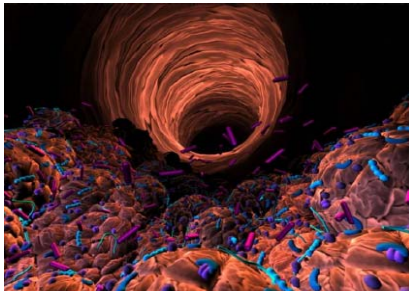
Le Tractus Digestif : une importante surface disponible pour le « Microbiote »



La surface dépliée de la muqueuse digestive humaine correspond à celle de 2 terrains de tennis (400 m²)

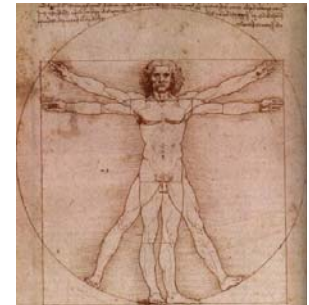


10 fois plus de bactéries dans l'intestin que de cellules composant le corps humain (*Savage et al., 1977*)

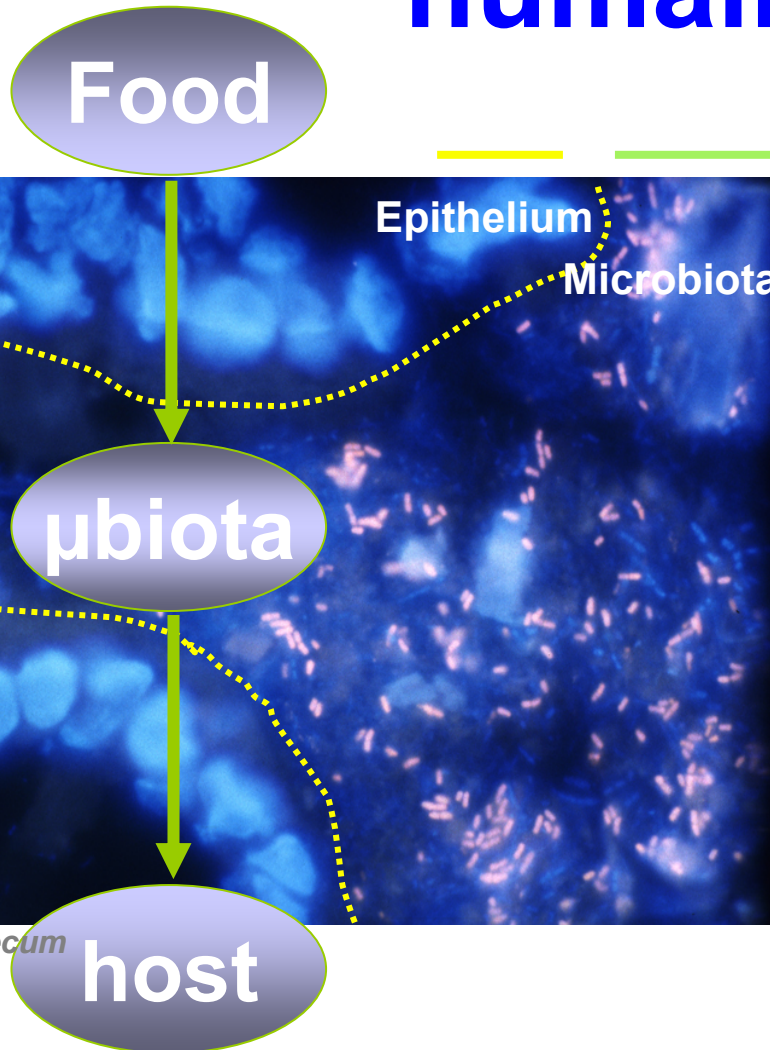


10¹⁴ bactéries (tube digestif)

10¹³ cellules (corps humain)



Le microbiote intestinal humain

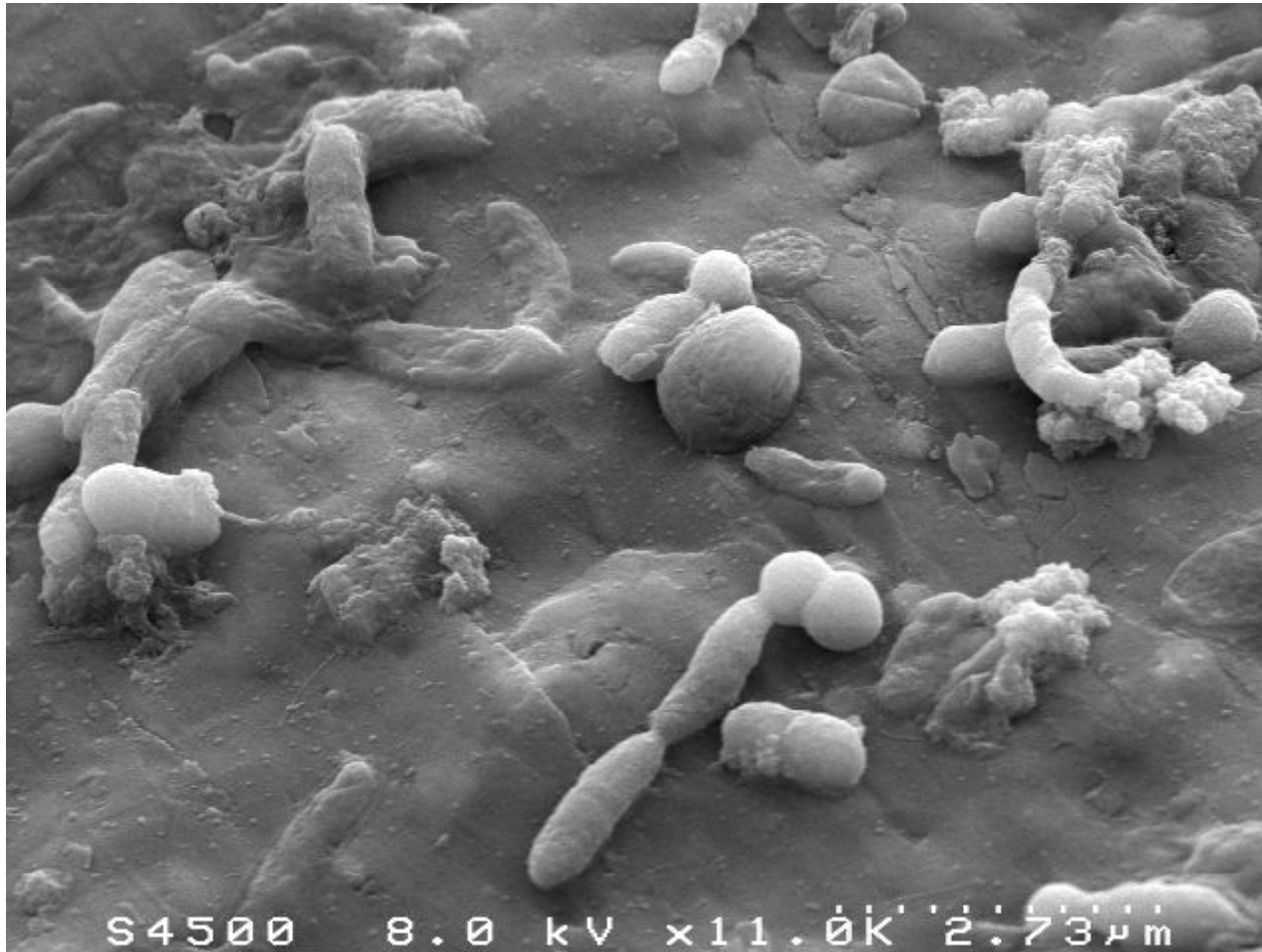


- Microbiote fécal :
 - > 10^{11} $\mu\text{org/g}$
 - 10^{14} bactéries
 - ~ 1000 espèces
- Adapté et fonctionnellement stable
- Nutrition, physiologie, immunité et protection
- Répertoire génétique : ~100 x génome humain

Santé ↔ Maladie

Clichés du microbiote

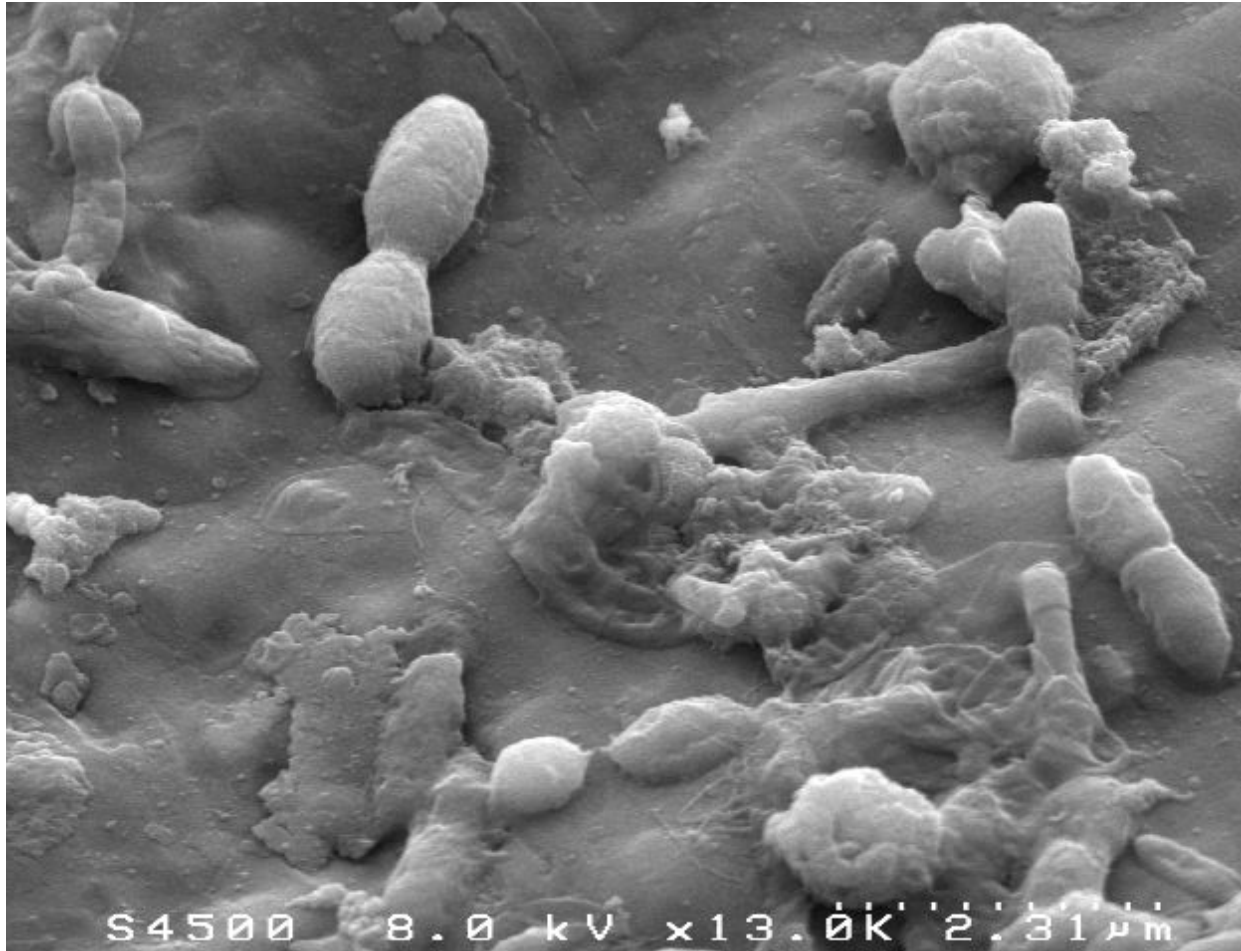
Microscopie électronique à balayage sur matières fécales humaines



Diversité de la population bactérienne

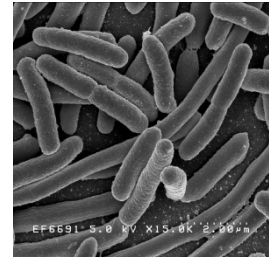
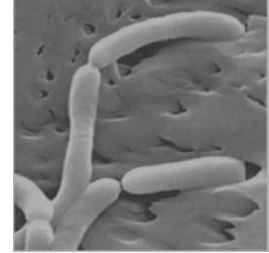
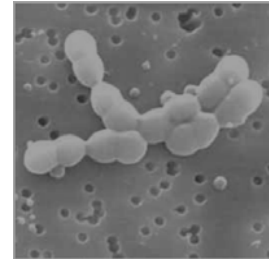
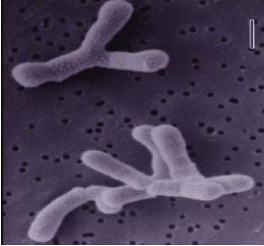
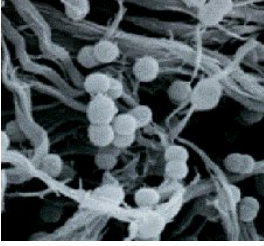
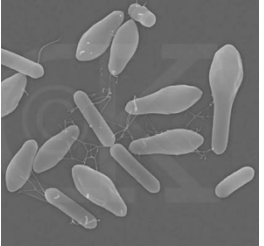
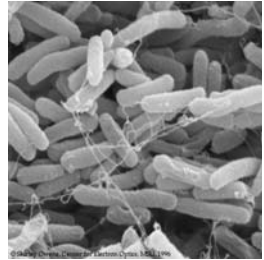
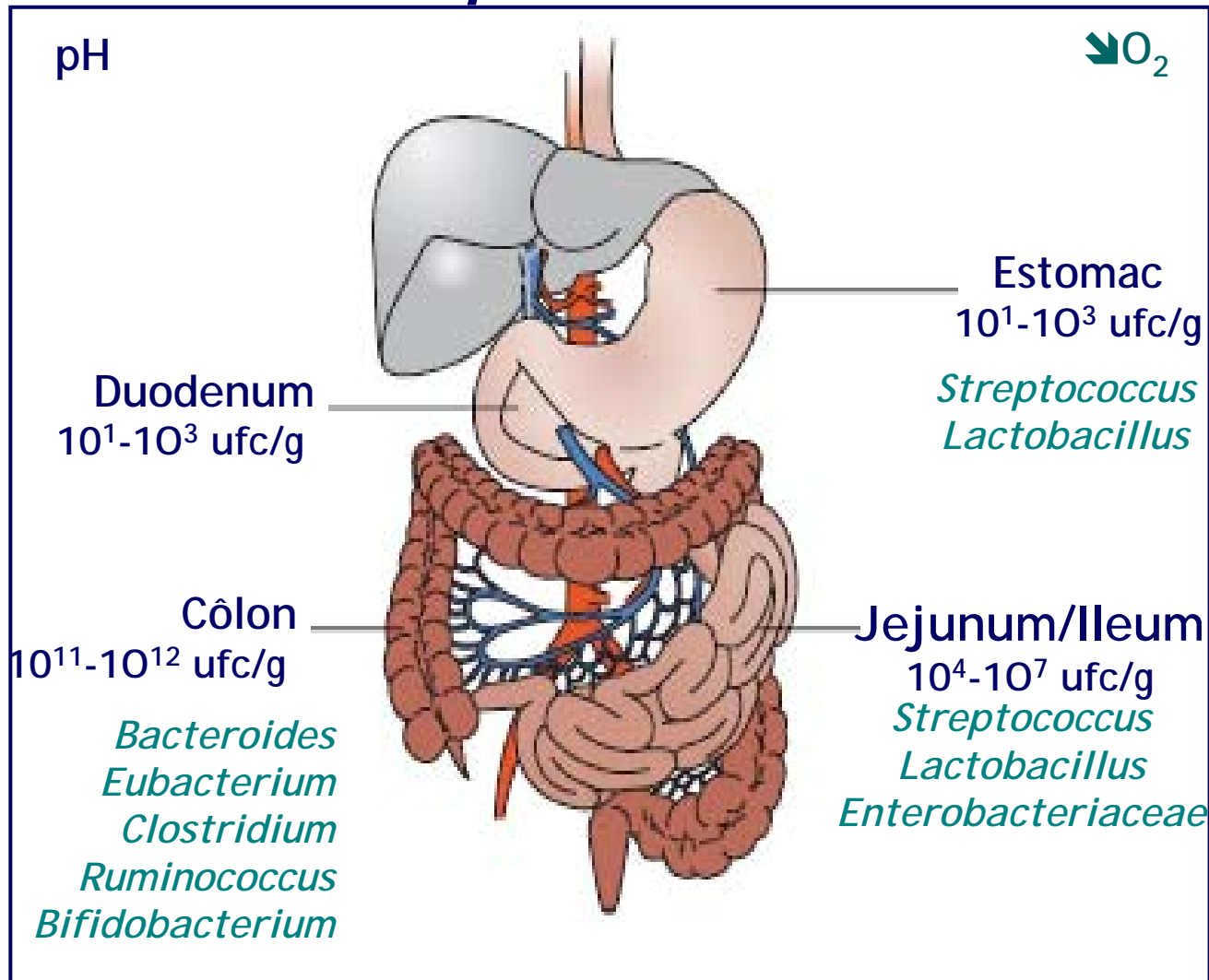
Clichés du microbiote

Microscopie électronique à balayage sur matières fécales humaines



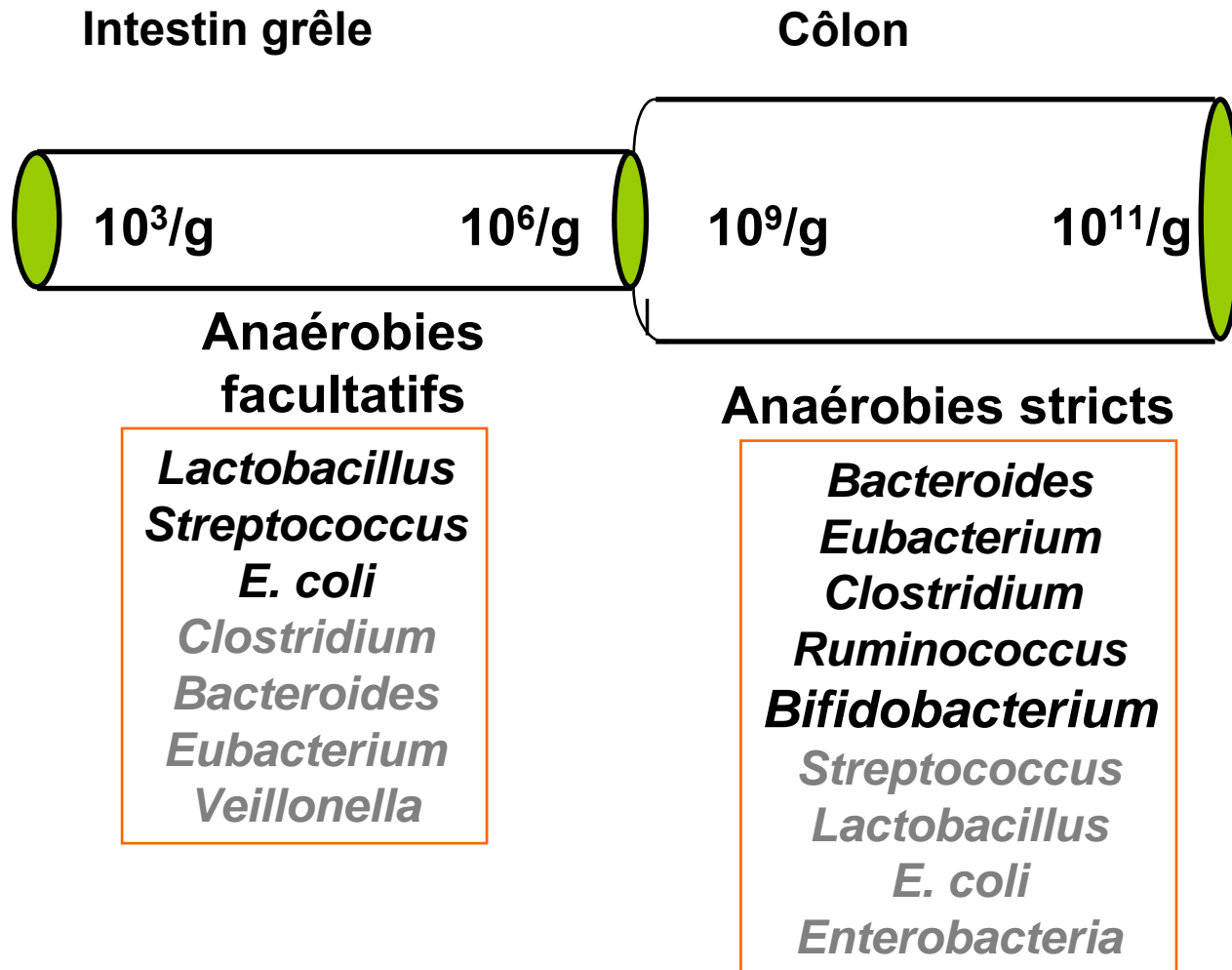
Diversité de la population bactérienne

Le Microbiote Intestinal : Répartition



(Ouwehand & Vesterlund, 2003)

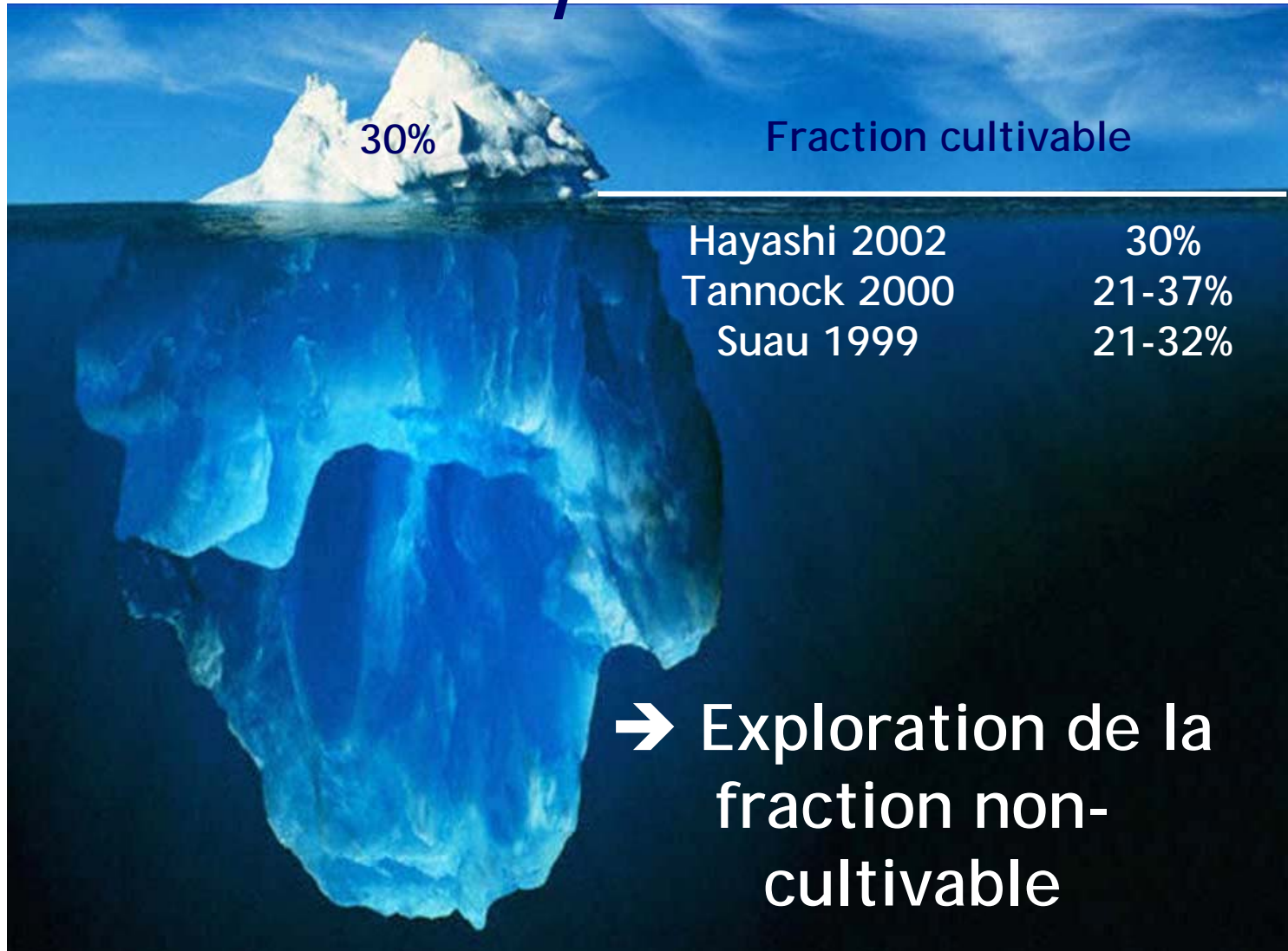
Microbiote intestinale



Le Microbiote Intestinal : Composition

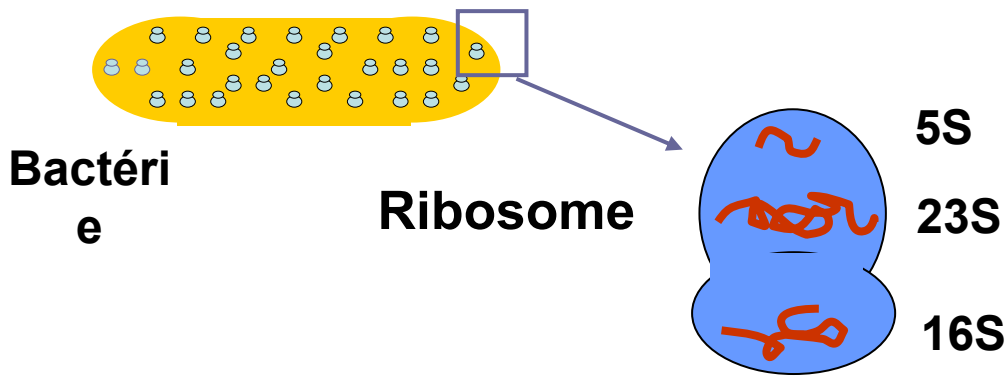


Le Microbiote Intestinal : Composition



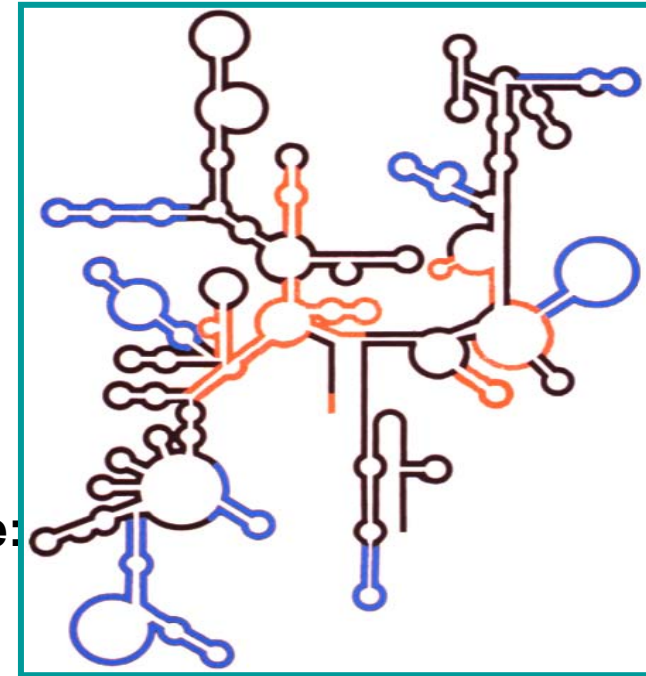
Cible moléculaire: ARNr 16S bactérien

Structure de la molécule d'ARNr 16S:

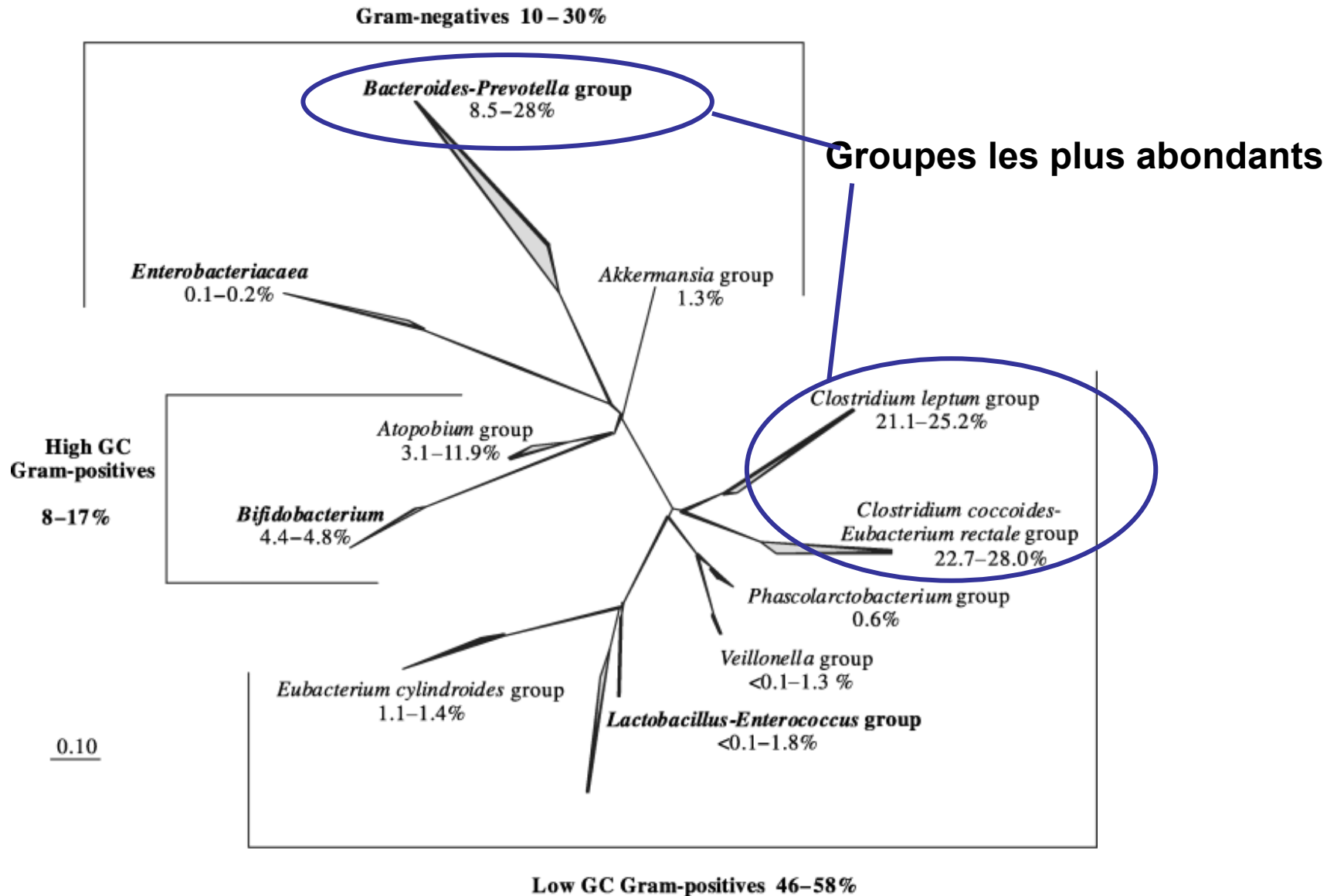


Intérêts de cette molécule:

- ✓ Ubiquitaire
- ✓ Molécule naturellement amplifiée
 - ✓ Structure primaire mosaïque
- ✓ Régions conservées → domaine *Bacteria*
- ✓ Régions variables → groupes bactériens
- ✓ Régions hypervariables → espèces bactériennes



Arbre phylogénique du microbiote humain adulte

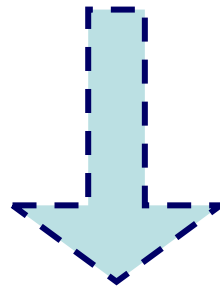


Colonisation du Microbiote Intestinal



Naissance : tube digestif stérile (*Mackie et al., 1999*)

Origines {
 Maternelle
 Environnement
 Alimentation
 (*Perez et al., 2007*)



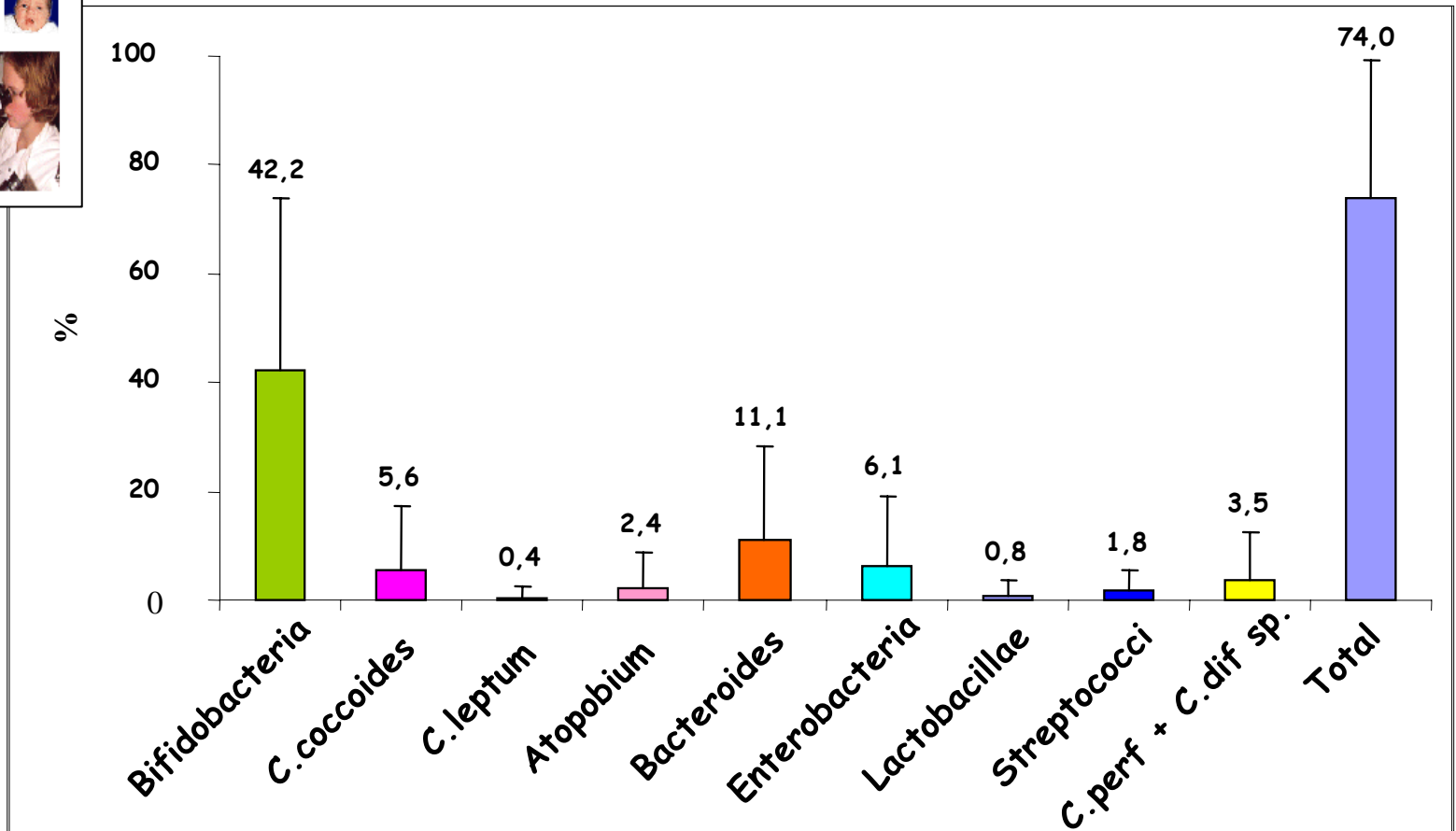
*Implantations
successives d'espèces
bactériennes*

Acquisition du microbiote d'adulte (2 ans)

Biodiversité
Stabilité



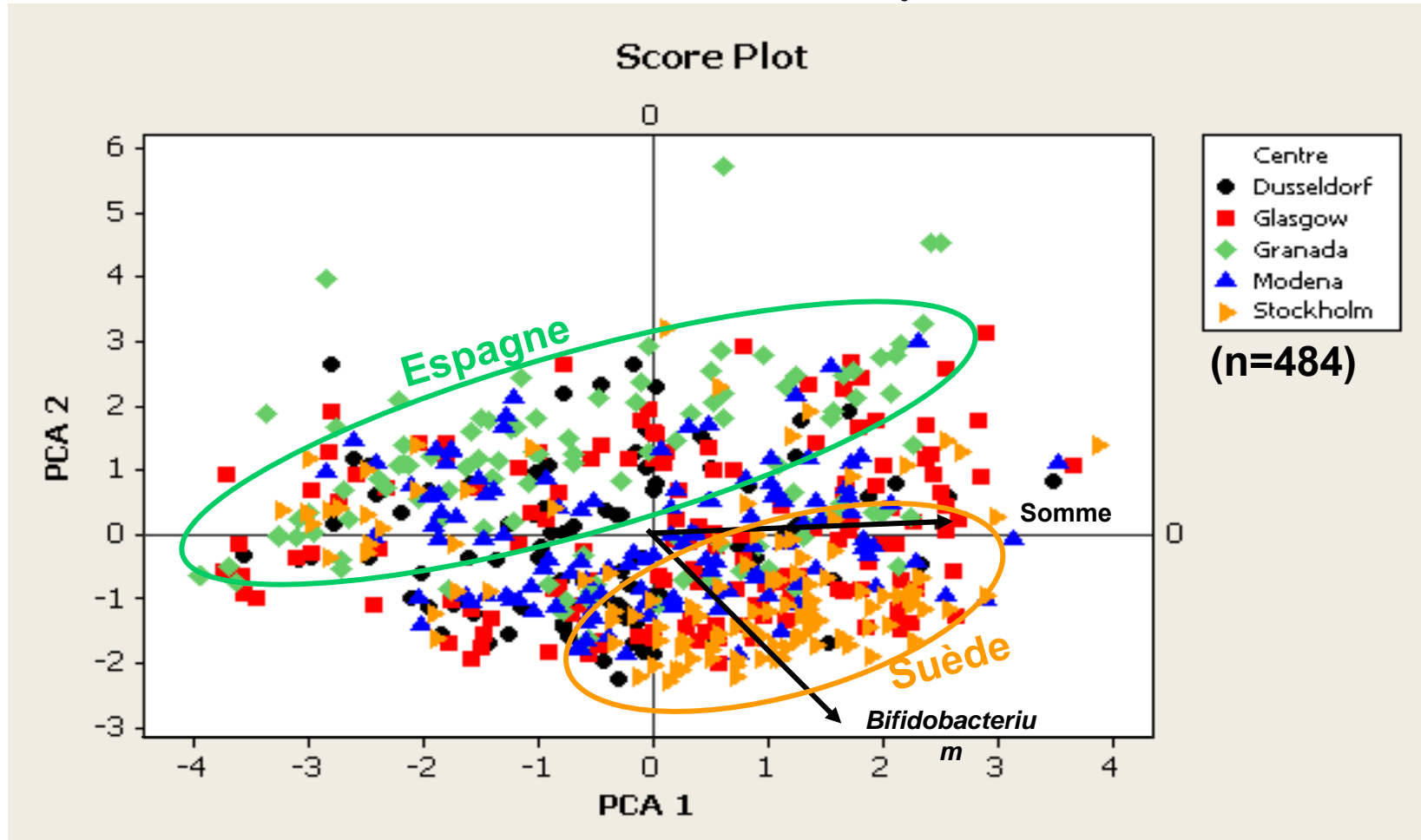
Microbiote fécal d'enfants à 6 semaines



Le microbiote fécal de l'enfant âgé de 6 semaines diffère de celui de l'adulte.

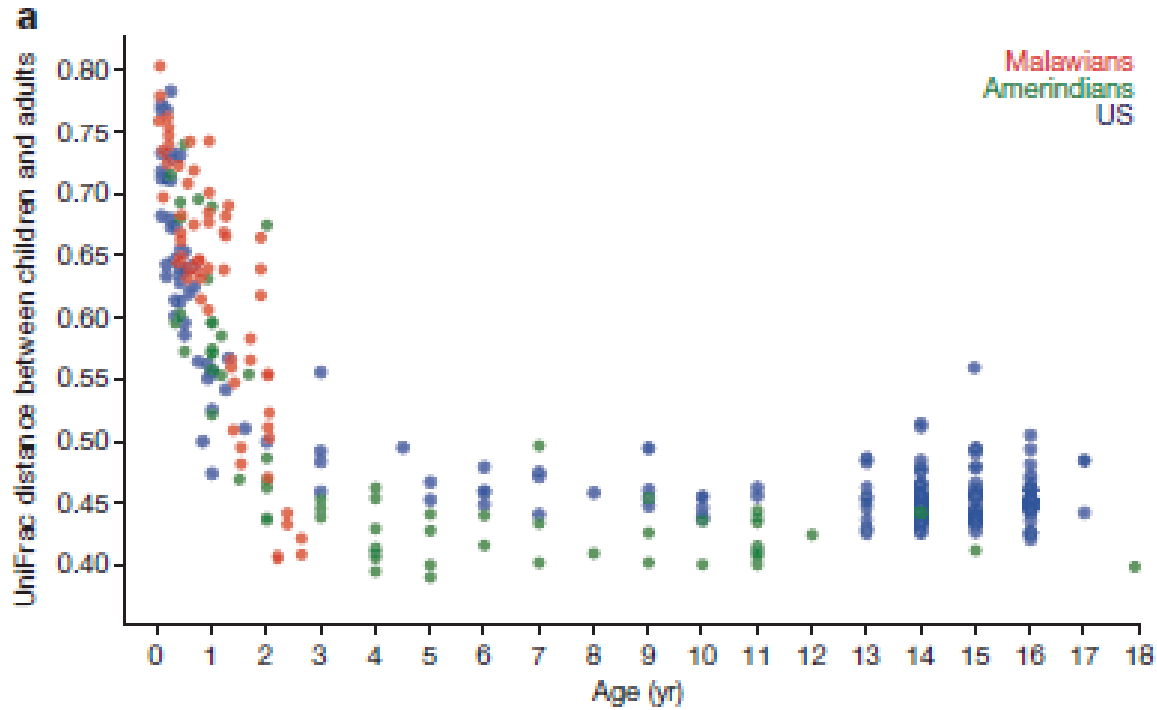
Le genre *Bifidobacterium* est le plus représenté :

Microbiote fécal d'enfants Européens à 6 semaines

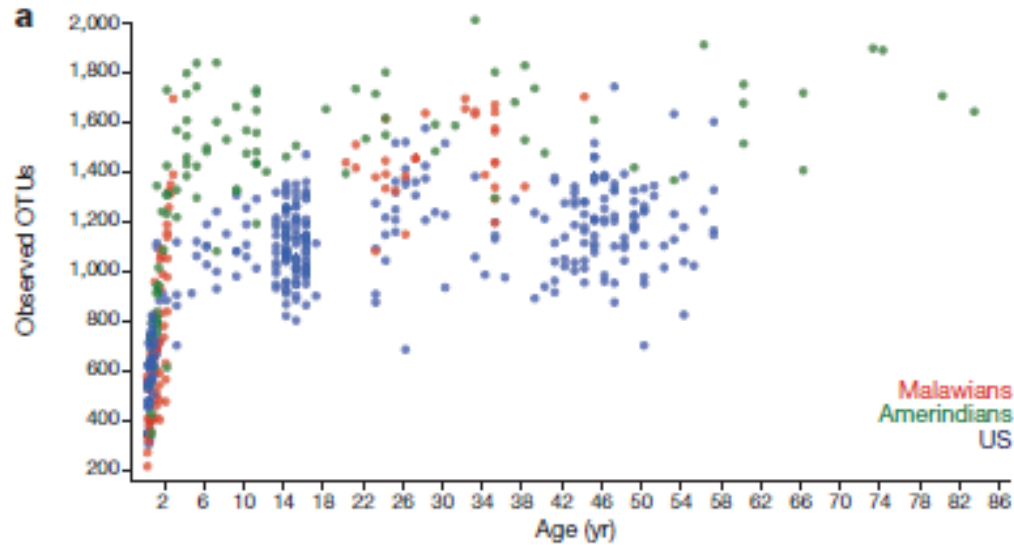


Le pays de naissance a une incidence notable sur la composition précoce du microbiote fécal.

Gradient Nord-Sud de la Suède à l'Espagne : plus de bifides au nord ; une diversification plus précoce au sud



Ce phénomène est vrai aussi bien dans les pays industrialisés que ruraux.



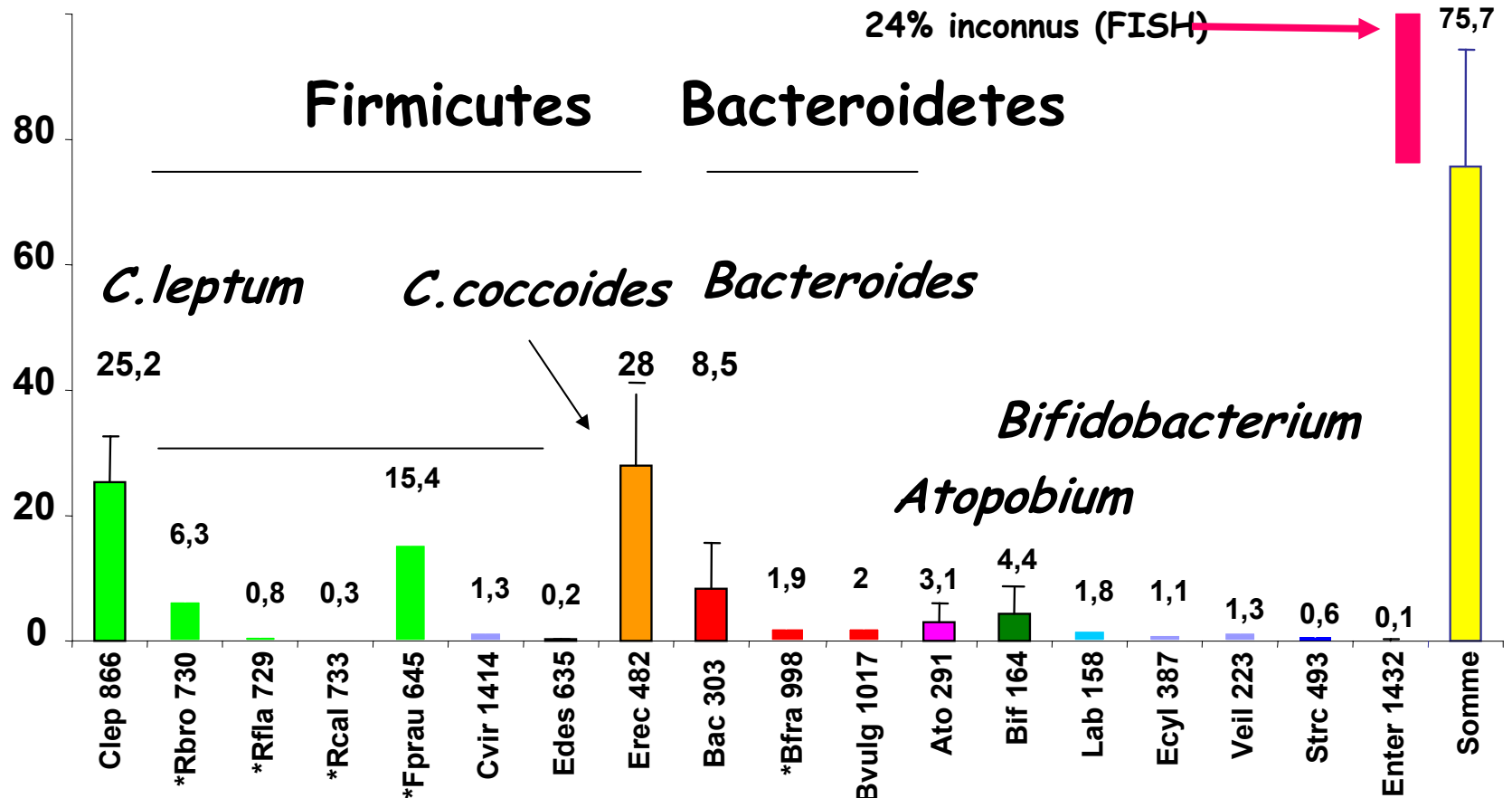
La diversité de composition du microbiote augmente avec l'âge dans toutes les populations.



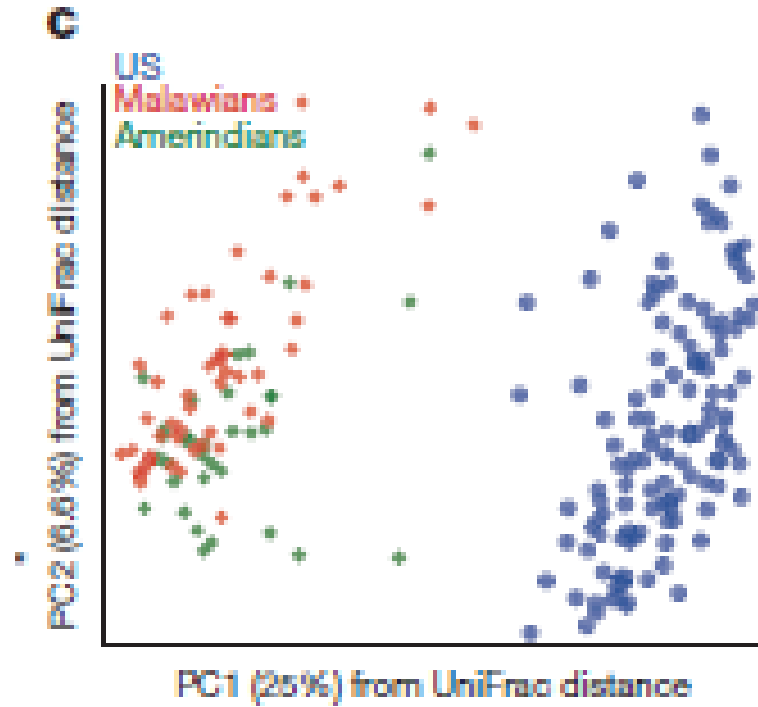
Microbiote fécal d'adultes Européens

(n=91 de France, Danemark, Allemagne, Pays bas et Royaume uni)

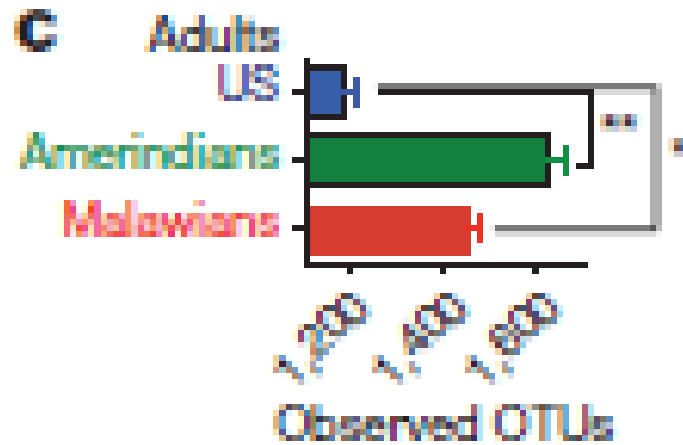
Microbe Diagnostics EU QLK1-2000-0108 C



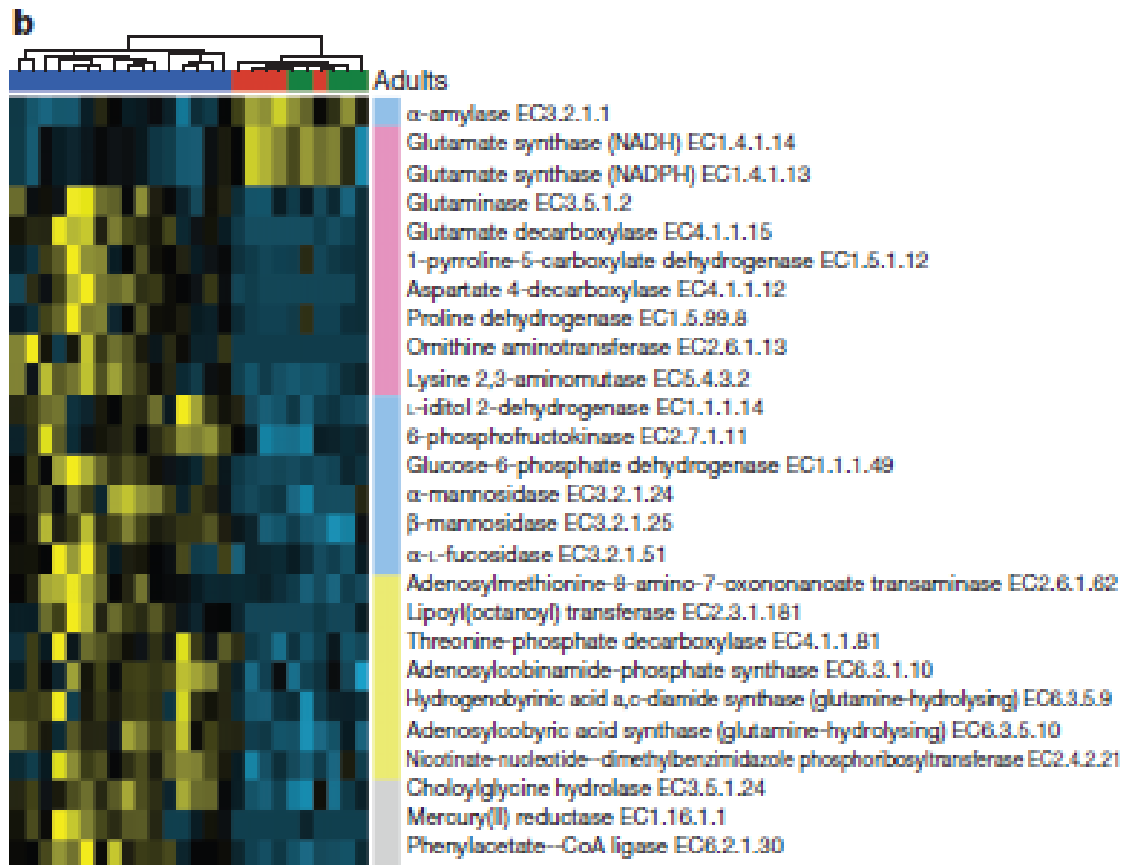
12 sondes d'hybridation reconnaissent 76% des bactéries détectables
 5 groupes phylogénétiques sont dominants et hautement prévalents
 Chez l'adulte, pas de différence significative entre les pays d'Europe étudiés.



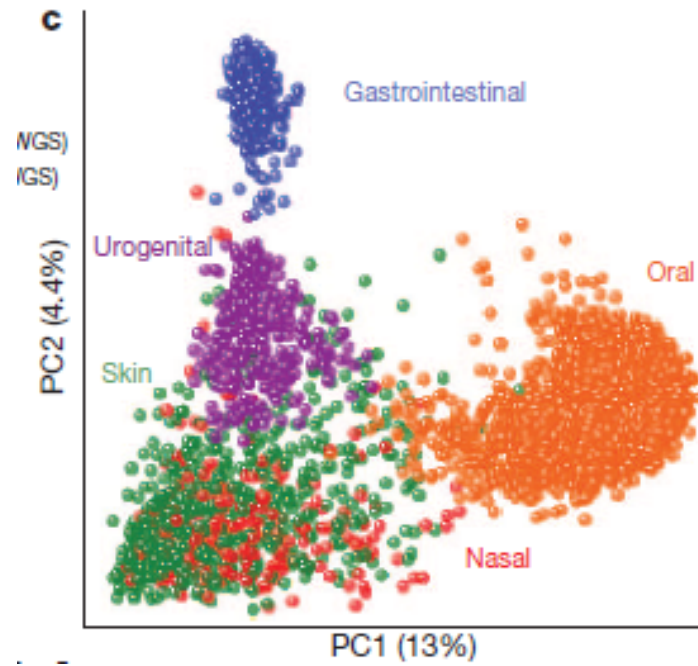
On peut voir des différences significatives si on regarde des populations plus éloignées.



A l'age adulte la diversité varie selon les populations.



Cette différence de composition du microbiote se traduit aussi dans une différence de fonctions.



La composition du microbiote est fonction de l'écologie du système.

Les Aliments Fermentés contiennent de très nombreux Micro-Organismes Vivants



Vin
Choucroute
Saucisson

Produits laitiers
- Yaourt
- Laits fermentés
- Fromages

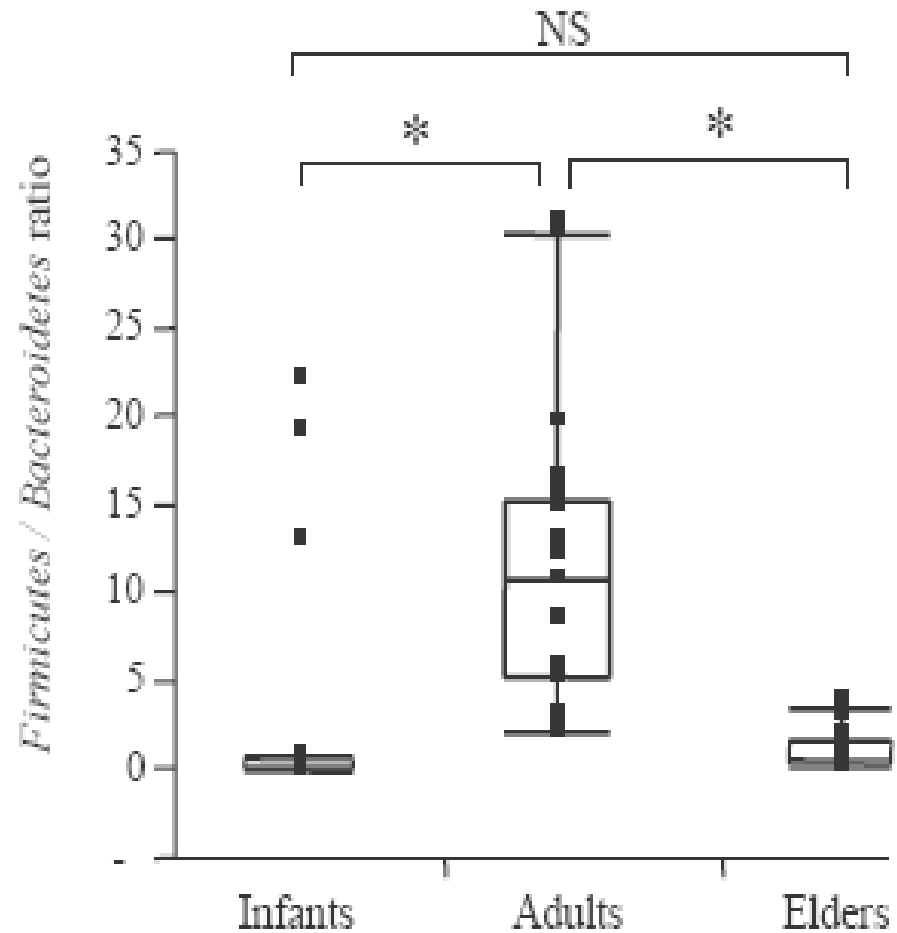


Compléments
alimentaires

Quantitative PCR : Microbiota all along life



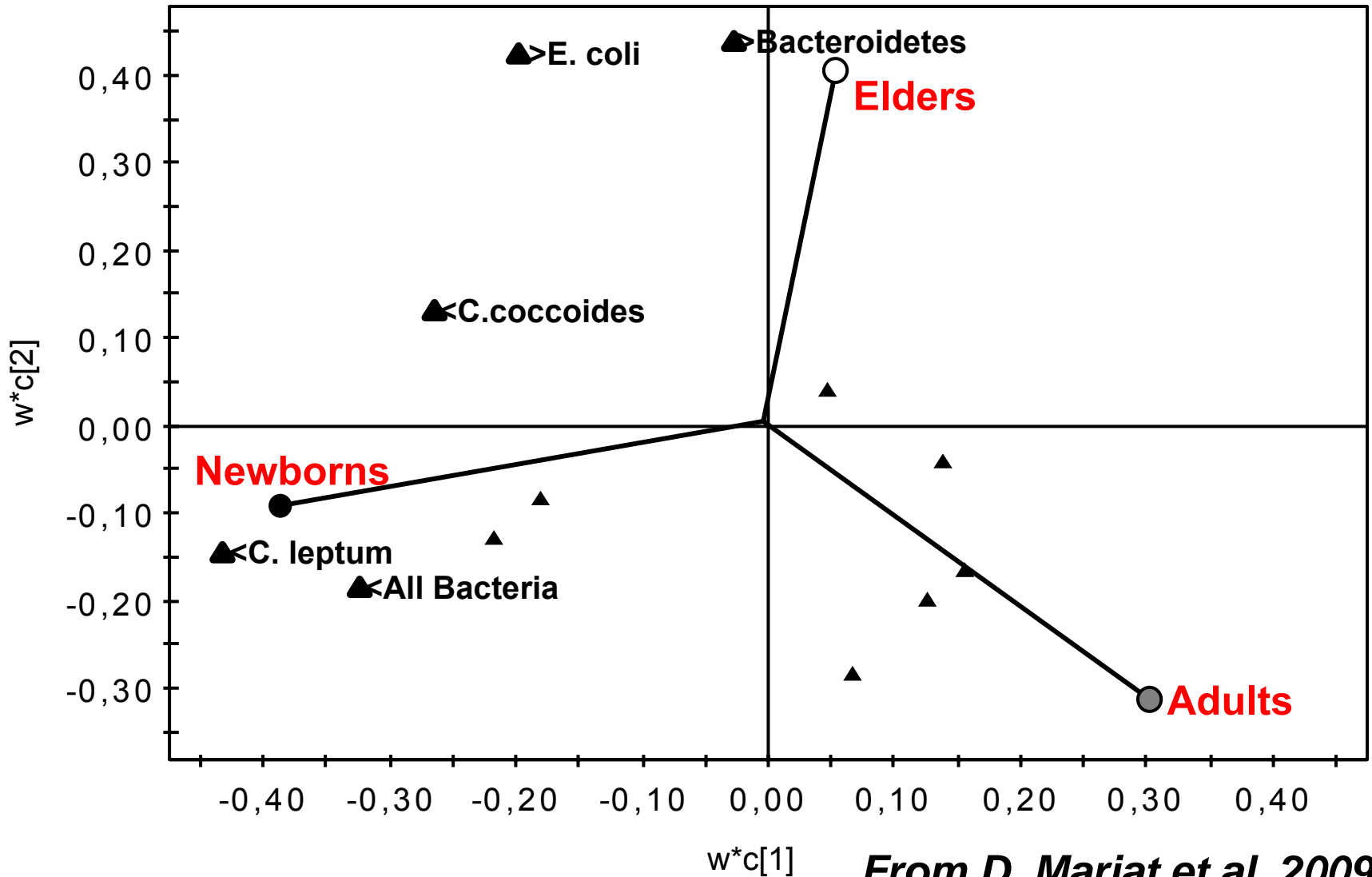
Ratio
Firmicutes /
Bacteroidetes



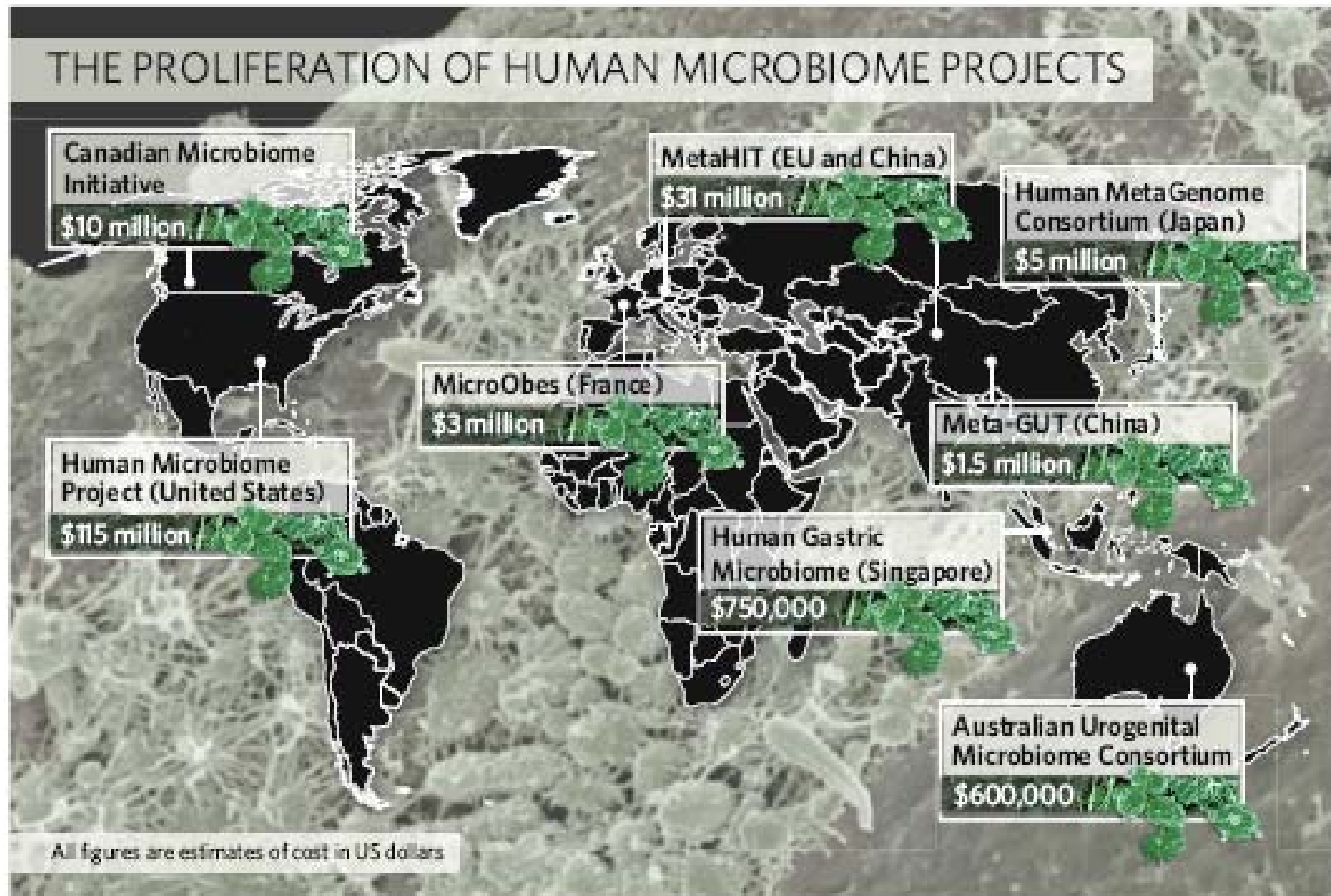
From D. Mariat et al, 2009

Microbiota and age

Adults vs Newborn vs Elders

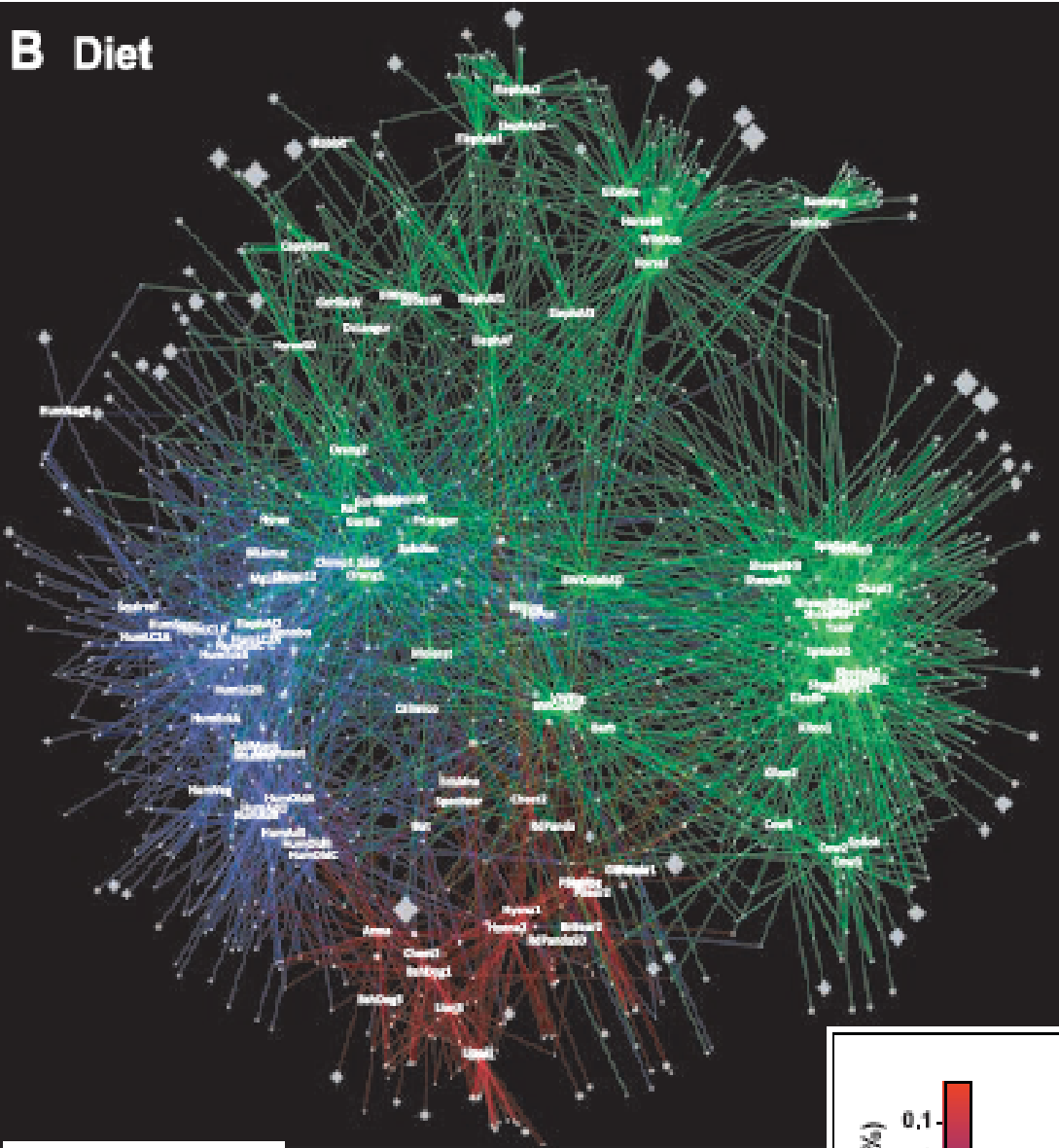


Le métagénome : un « challenge » mondial



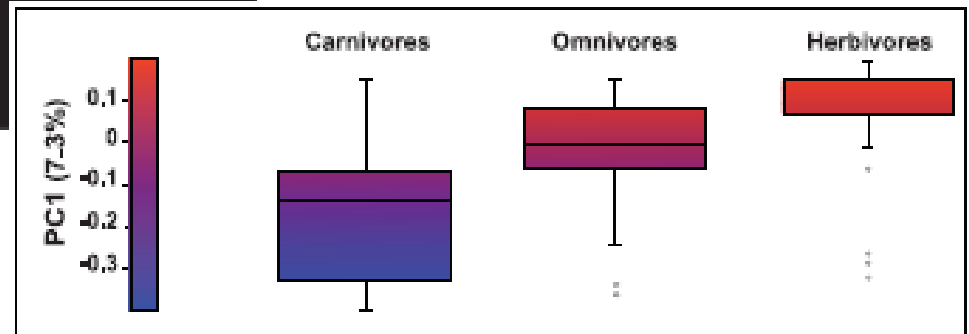
A. Mullard - Nature, May 2008

B Diet

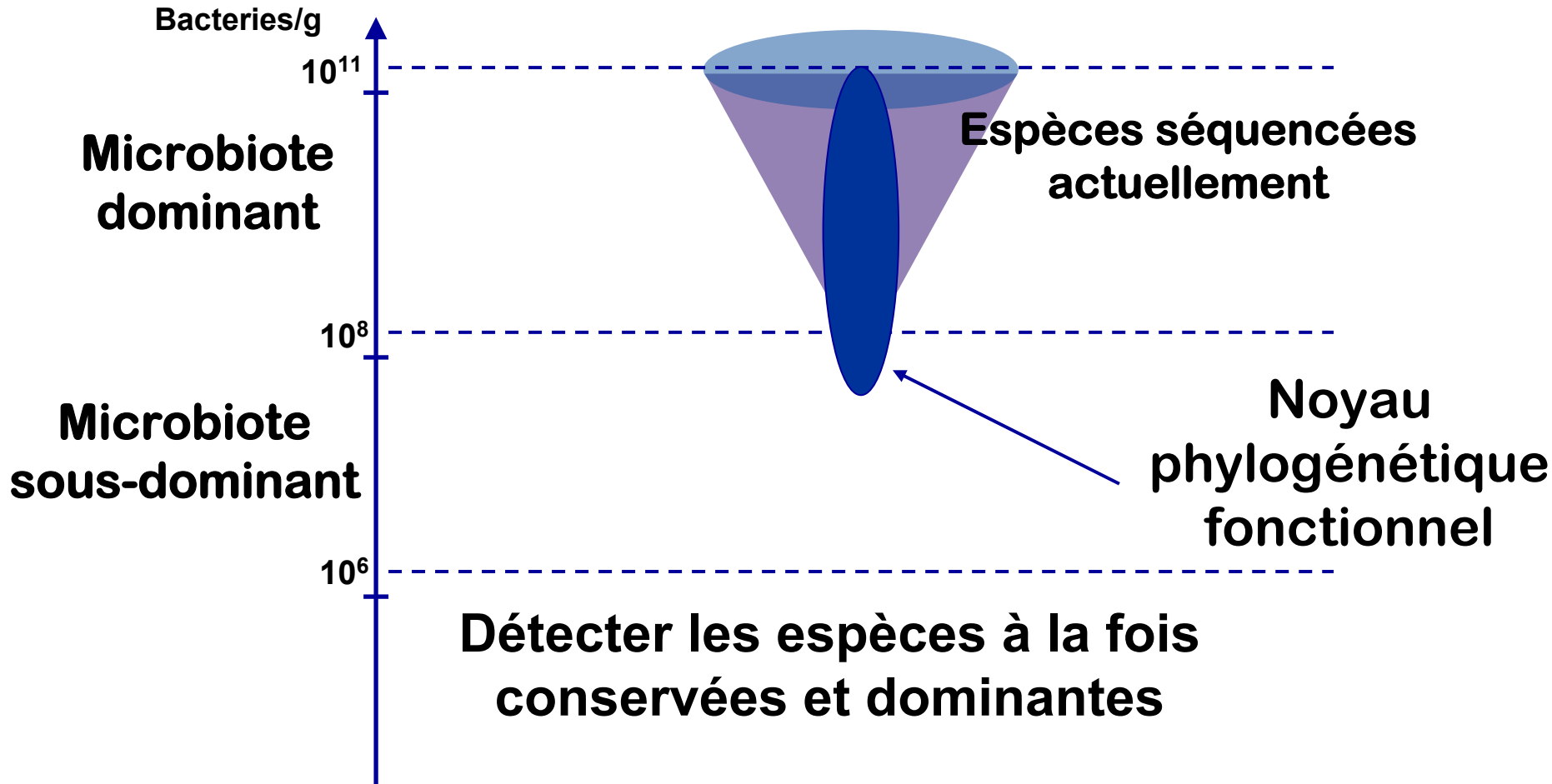


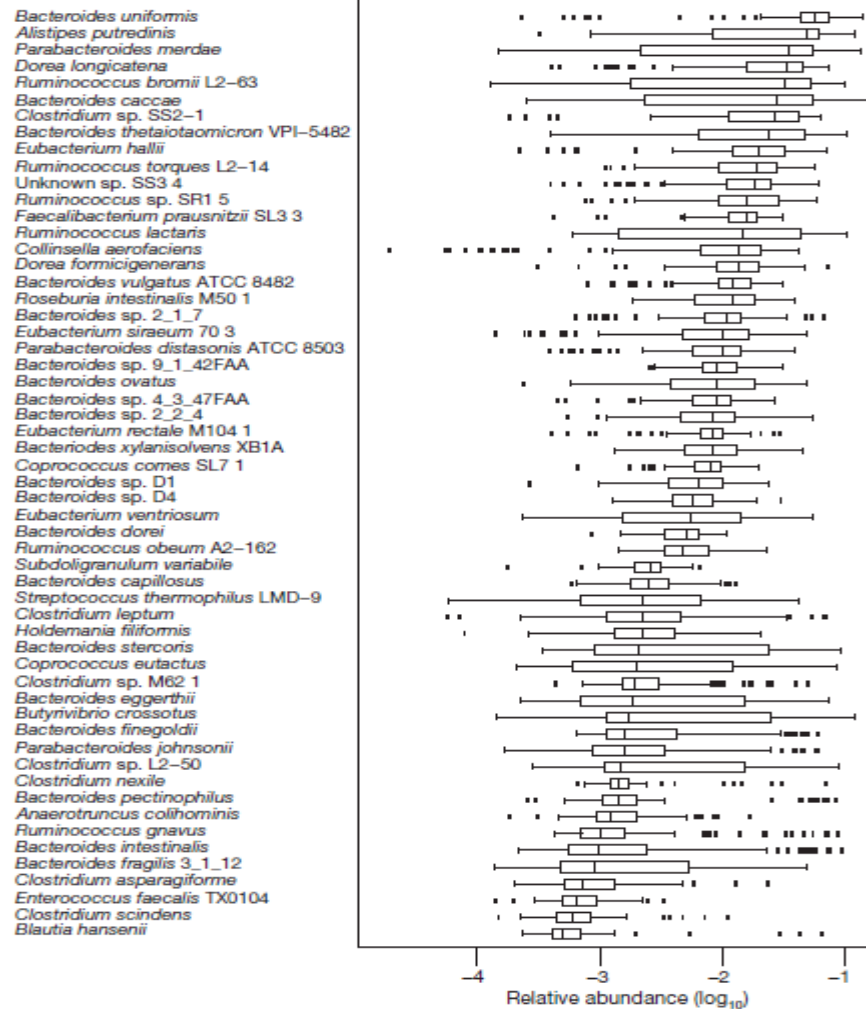
Les données du métagénome

Ley et al, science 2008



Recherche d'un noyau phylogénétique du microbiote intestinal humain





Existence d'un core génome : 57 espèces partagées par plus de 90% des individus.

Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota

Catherine A. Lozupone¹, Jesse I. Stombaugh¹, Jeffrey I. Gordon², Janet K. Jansson^{3,4} & Rob Knight^{1,5,6}

represent less than 0.5% of the microbes present²⁰. As the data set expands to include developing countries and a broader age range^{4,21}, the concept that there is a core set of species in the microbiota is becoming more unlikely.

Despite the highly divergent compositions of gut microbiota across individuals, the functional gene profiles are quite similar (Fig. 4). This

Although taxonomic composition is far more variable than functional gene composition, at a general process level at least, several studies have shown a correlation between the two^{4,14,25}. Functional gene composition variation that is not well explained by taxonomic variation can indicate that phylogenetically unrelated taxa have converged on similar functions and may be crucial for identifying and understanding functional components associated with altered physiological states (Fig. 2).

Peut-on vivre sans bactéries ?



Oui ,mais avec quelques anomalies !

Quelles différences chez ces animaux sans germes ?

- ↘ vascularisation
- ↘ activités enzymatiques digestives
- ↘ épaisseur muscles
- ↘ production de cytokines
- ↘ niveau Ig sériques
- ↘ plaques de Peyer
- ↘ nombre de lymphocytes intra-épithéliaux

- ↗ susceptibilité aux infections
- ↗ couche de mucus
- ↗ besoin calorique (20 à 30 %)



L'obésité : l'épidémie du 21^{ème} siècle

*Ce n'est pas
de ma faute !*



Alessandro del Borro, par Charles Mellin

Définition - Épidémiologie de l'obésité

pays	surpoids	obésité	population totale
États-Unis	193 millions (65,7 %)	89,8 millions (30,6 %)	300 millions
Mexique	64,8 millions (62,3 %)	25,1 millions (24,2 %)	104 millions
Royaume-Uni	37 millions (62 %)	13,7 millions (23 %)	59,7 millions
Australie	11,7 millions (58,4 %)	4,4 millions (21,7 %)	20,1 millions
République Slovaque	3,1 millions (57,6 %)	1,2 million (22,4 %)	5,4 millions
Grèce	6,3 millions (57,1 %)	2,4 millions (21,9 %)	11 millions
Nouvelle-Zélande	2,2 millions (56,2 %)	0,8 million (20,9 %)	4 millions
Canada	15,6 millions (47,4 %)	4,9 millions (14,9 %)	33 millions
France	23,2 millions (37,5 %)	5,8 millions (9,4 %)	62 millions

Source OCDE 2005

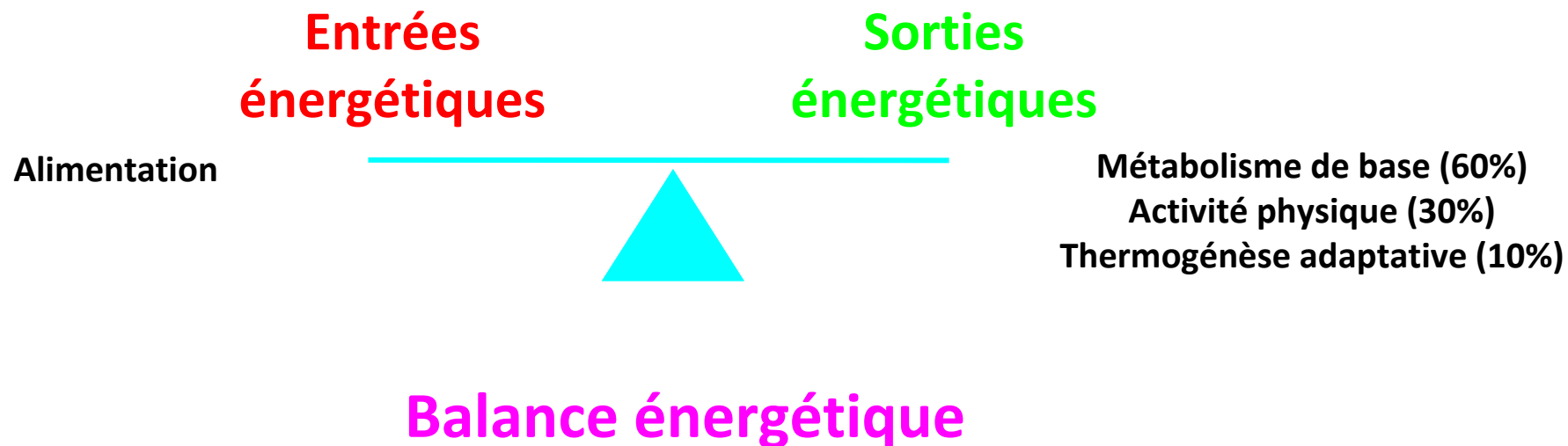
$$\text{IMC (BMI)} = \frac{\text{Poids}}{(\text{Taille})^2}$$

Chez un adulte :

- 18,5 à 25 : normal
- 25 à 30 : surpoids
 - > 30 : obésité
- 35 à 40 : obésité sévère
- > 40 : obésité morbide

- Progression rapide mondiale
- notamment chez les jeunes
- Touche également les PVD

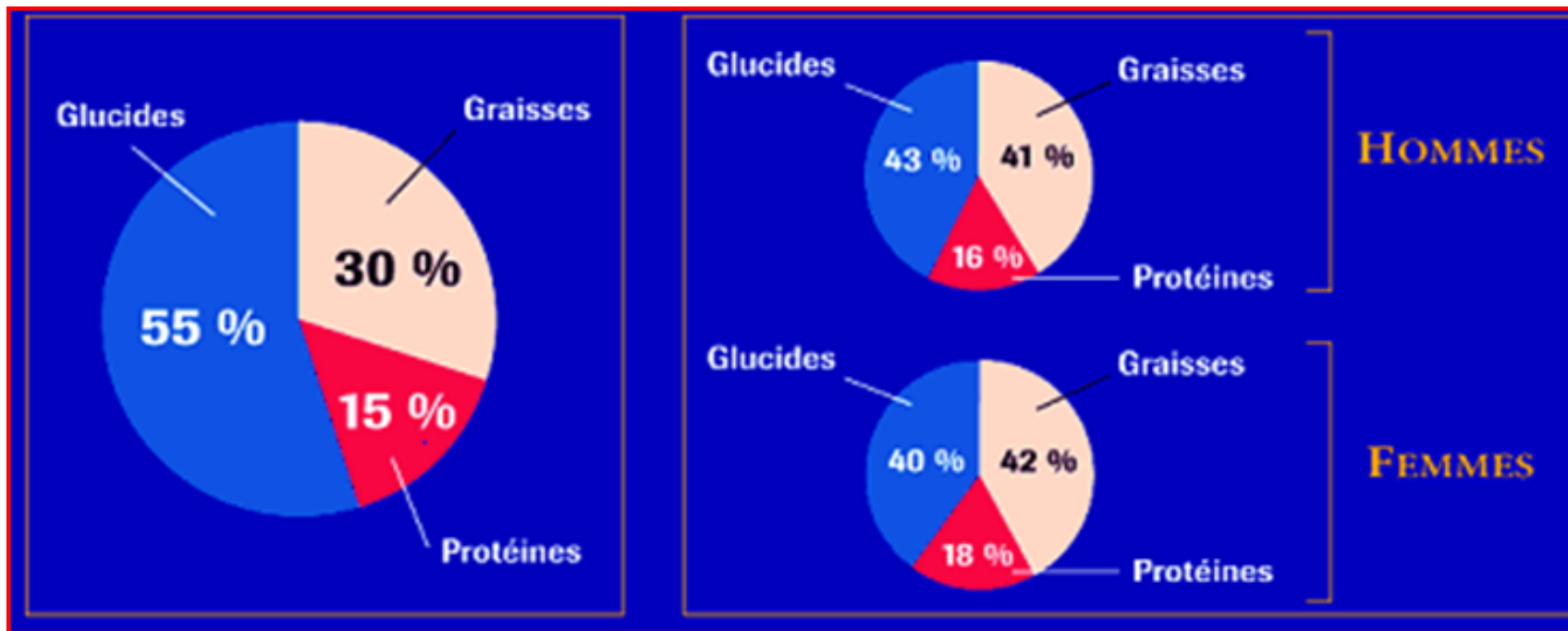
Tout facteur contribuant au déséquilibre du bilan énergétique



Le déséquilibre de l'alimentation

Apports recommandés

Consommation constatée



Quel lien entre microbiote et obésité ?

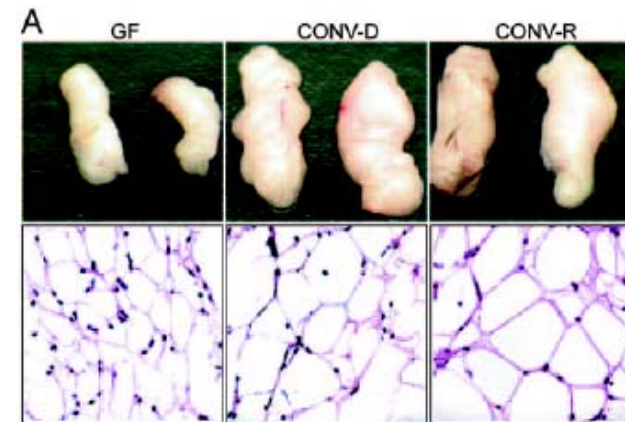
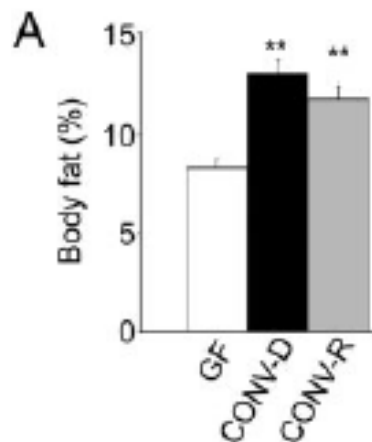
Hypothèse suggérée par les travaux de JI Gordon (USA):

Le microbiote des individus obèses est plus efficace à extraire l'énergie à partir d'un régime nutritionnel donné que celui d'individus maigres

The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage

Fredrik Bäckhed^{***}, Hao Ding^{*§1}, Ting Wang¹, Lora V. Hooper^{***}, Gou Young Koh^{**}, Andras Nagy^{§**}, Clay F. Semenkovich^{§§}, and Jeffrey I. Gordon^{*†††}

PNAS, 2004



Colonisation de souris sans germe par un microbiote de souris conventionnelle: augmentation de 60% de la masse grasse en 10-14 jours, malgré une diminution de la consommation d'aliments

Incidence du transfert du microbiote de souris obèses ?

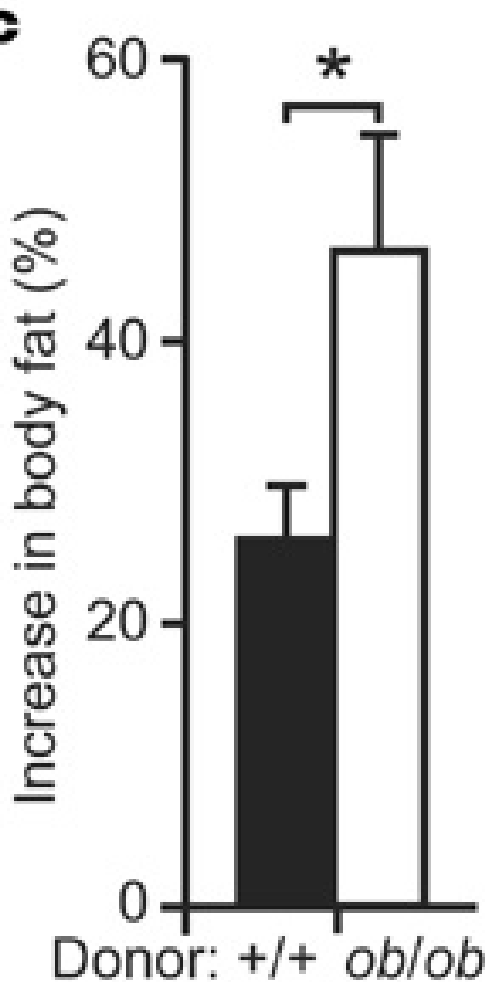
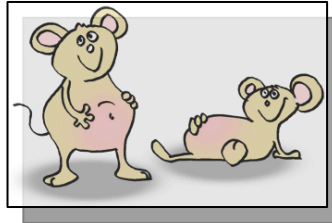


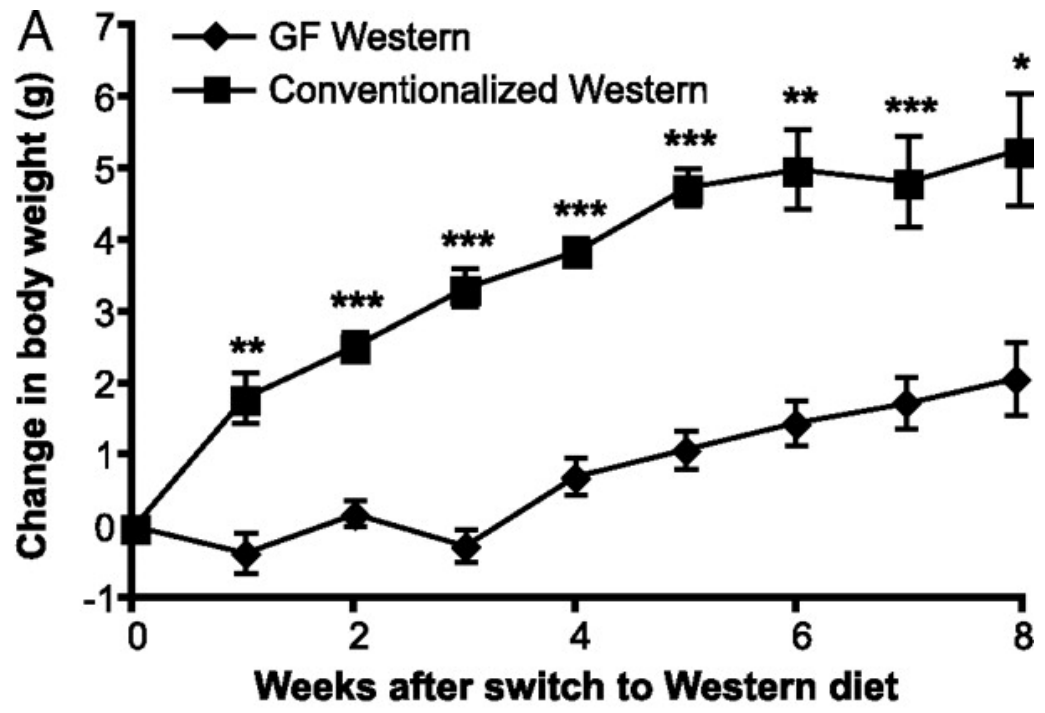
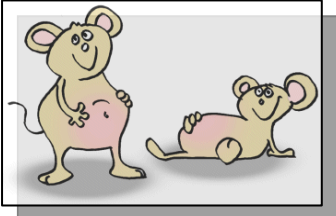
Fig 3c Colonization de souris GF WT C57BL/6J avec un microbiote caecal de souris minces (+/+) ou obèses (ob/ob) . Taux de graisse totale mesurée avant et après 2 semaines de colonisation.



NATURE | Vol 444 | 21/28 December 2006

Les souris colonisées par un microbiote de souris ob/ob ont une augmentation significative de la graisse totale=>le microbiote des souris ob/ob a une plus grande efficacité à récupérer de l'énergie des résidus alimentaires

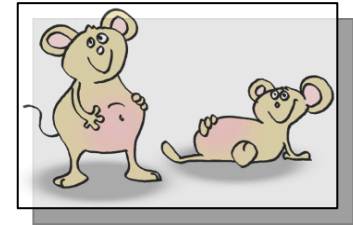
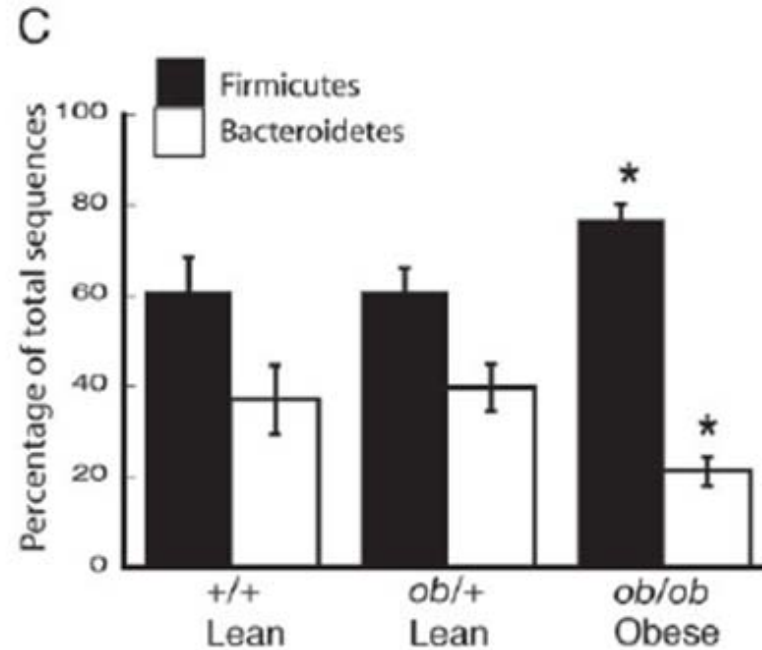
Incidence de régime « surgras » chez des souris avec ou sans microbiote ?



Les souris sans germes sont protégées contre l'obésité induite par l'alimentation

Equilibre du microbiote et obésité ?

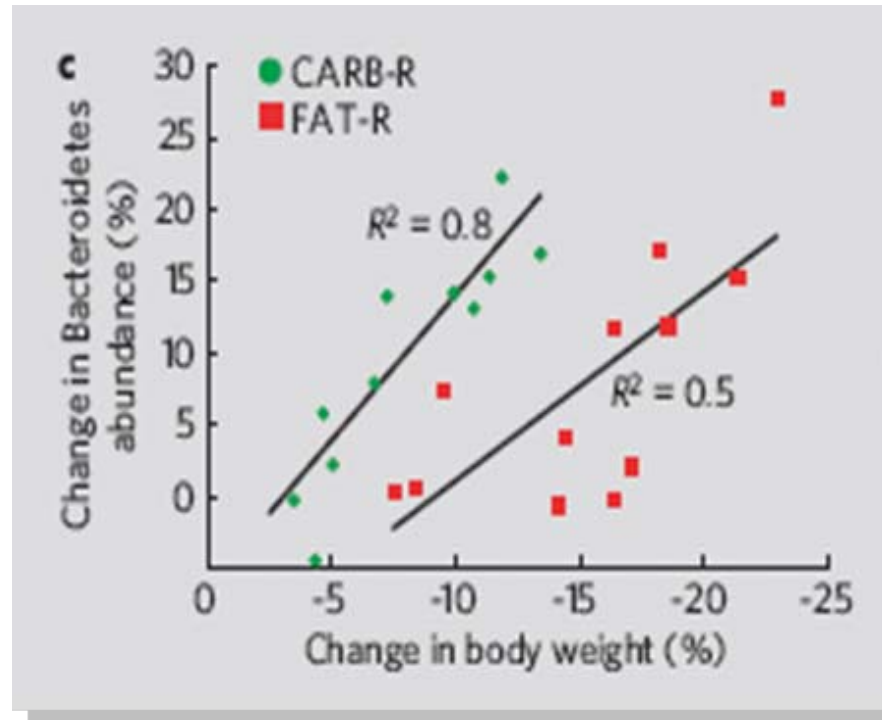
Analyse de 5088 séquences de gènes de 16S rRNA du microbiote de souris mince, mince ob et ob/ob



11070-11075 | PNAS | August 2, 2005 | vol. 102 | no. 31

Le ratio Firmicutes / Bacteroidetes serait-il la clef ?

Incidence du régime sur l'équilibre du microbiote Intestinal humain ?



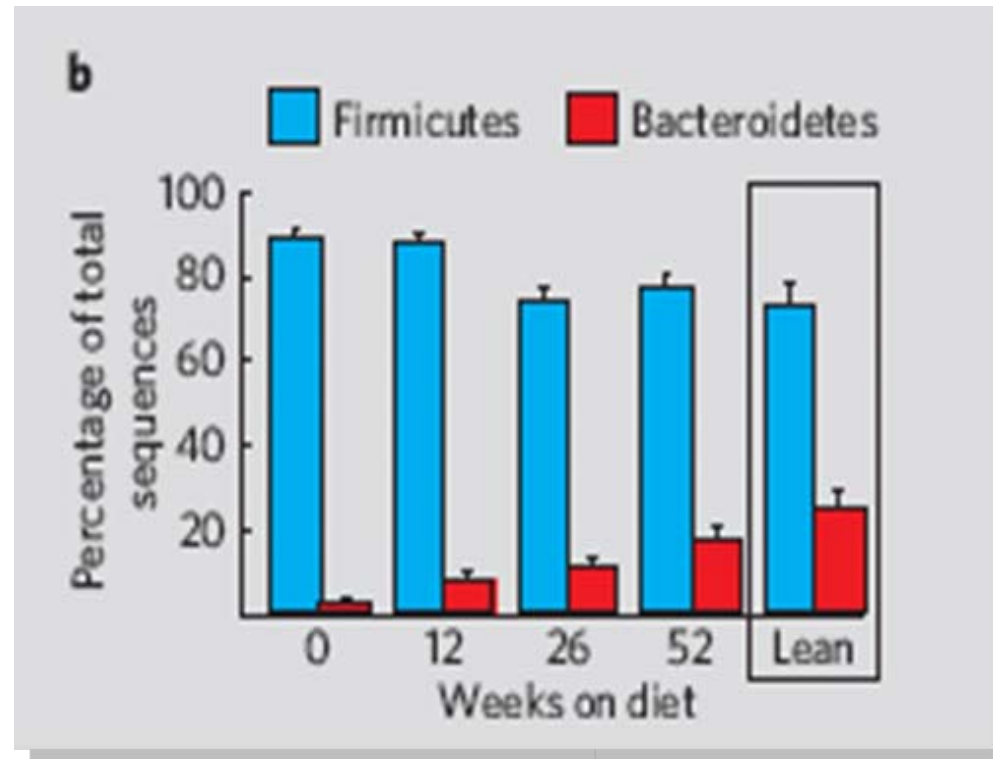
MICROBIAL ECOLOGY

Human gut microbes associated with obesity

NATURE | Vol 444 | 21/28 December 2006

A partir de 6% de perte de poids chez les obèses, on observe une modification du ratio Firmicutes / Bacteroidetes

Incidence du régime sur l'équilibre du microbiote Intestinal humain ?



MICROBIAL ECOLOGY

Human gut microbes associated with obesity

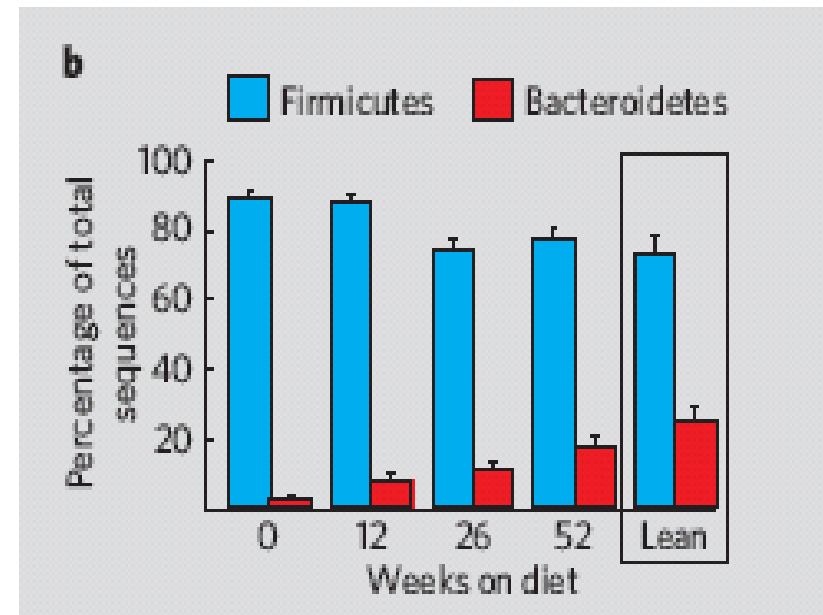
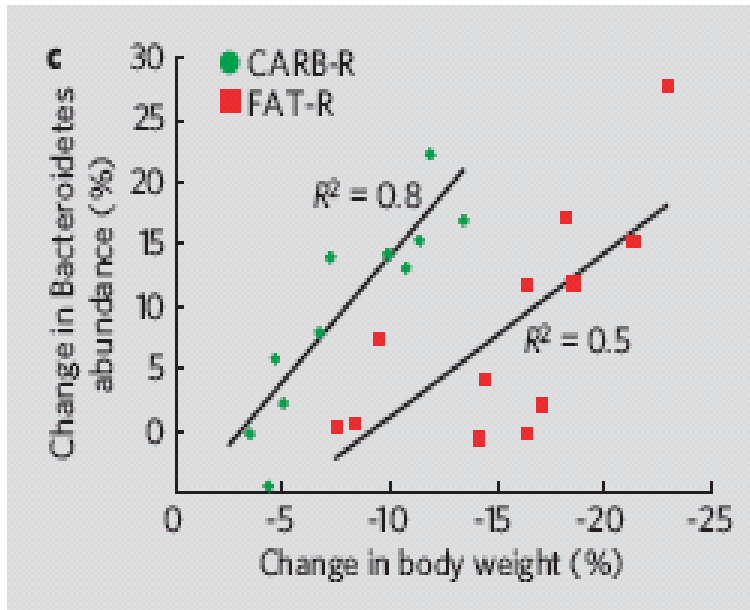
NATURE | Vol 444 | 21/28 December 2006

La mise au régime d'individus obèses rééquilibre leur ratio Firmicutes / Bacteroidetes

Human gut microbes associated with obesity

Ruth E. Ley, Peter J. Tumbaugh, Samuel Klein,
Jeffrey I. Gordon

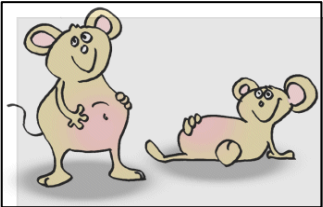
NATURE | Vol 444 | 21/28 December 2006



**A partir de 6% de perte de poids chez les individus obèses, on observe une modification de l'équilibre du microbiote :
Firmicutes / Bacteroidetes**

An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest

Peter J. Turnbaugh¹, Ruth E. Ley¹, Michael A. Mahowald¹, Vincent Magrini², Elaine R. Mardis^{1,2} & Jeffrey I. Gordon¹



NATURE | Vol 444 | 21/28 December 2006

**L'augmentation des graisses est « transférable »
par le microbiote des souris obèses**

**Le microbiote permettrait de « récupérer »
de l'énergie des résidus alimentaires**

Evolution du ratio *Firmicutes* / *Bacteroidetes* chez des obèses morbides avant et après « bypass » (collaboration avec K. Clément, La Pitié-Salpêtrière, Paris)



Microbiote et obésité	
	<i>Firmicutes</i> / <i>Bacteroidetes</i>
Before gastric bypass	121 ± 28 (A)
3 months after*	12 ± 6 (B)
6 months after*	21 ± 8 (B)
Lean persons	11 ± 0.4 (B)

(*: with loss of weight)

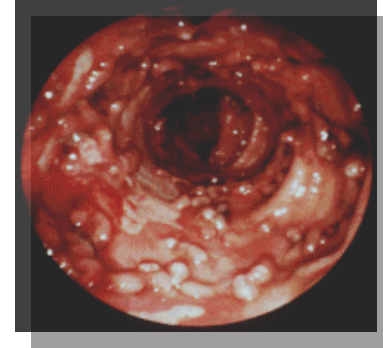
Data not sharing the same letter are significantly different to the human population, at $P < 0.05$.

**Aussi le programme MicObes coordonné par J. Doré
⇒ Évolution de la nature du microbiote chez 50 personnes
durant régime et stabilisation.**

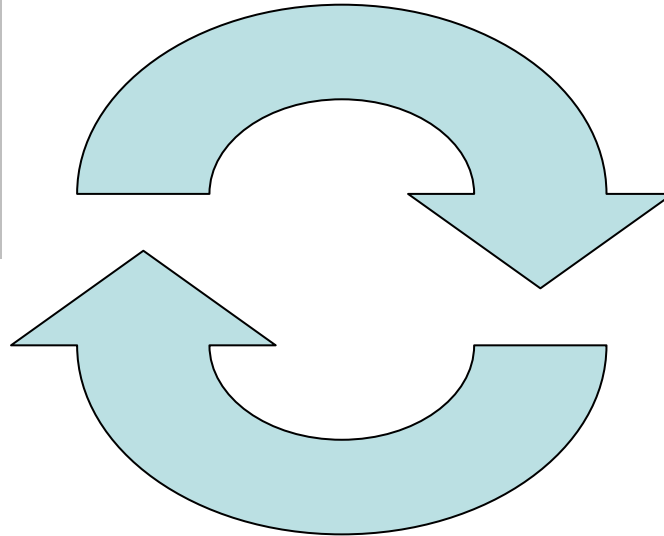
Beaucoup de questions posées sur les liens Microbiote/obésité/inflammation



Obésité



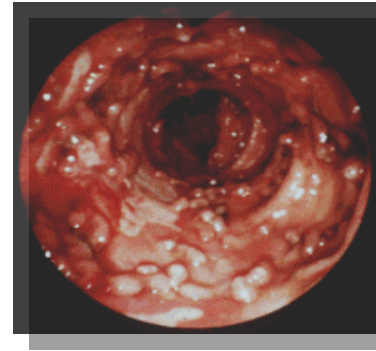
Inflammation



Microbiote

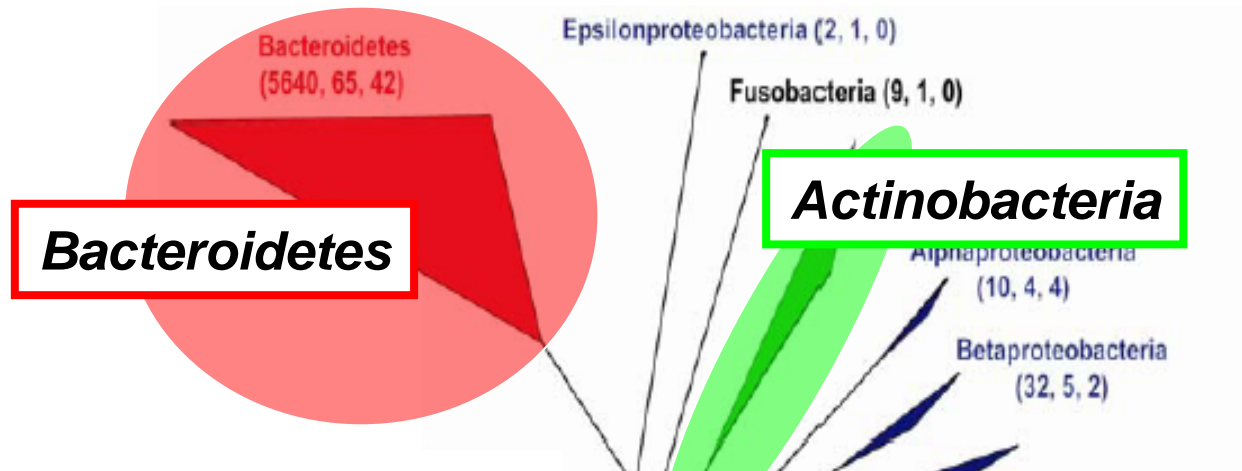


Conclusions-perspectives

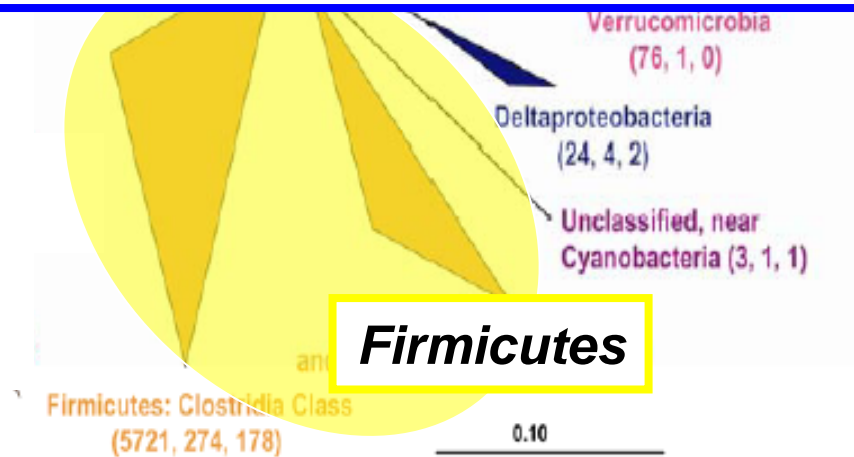


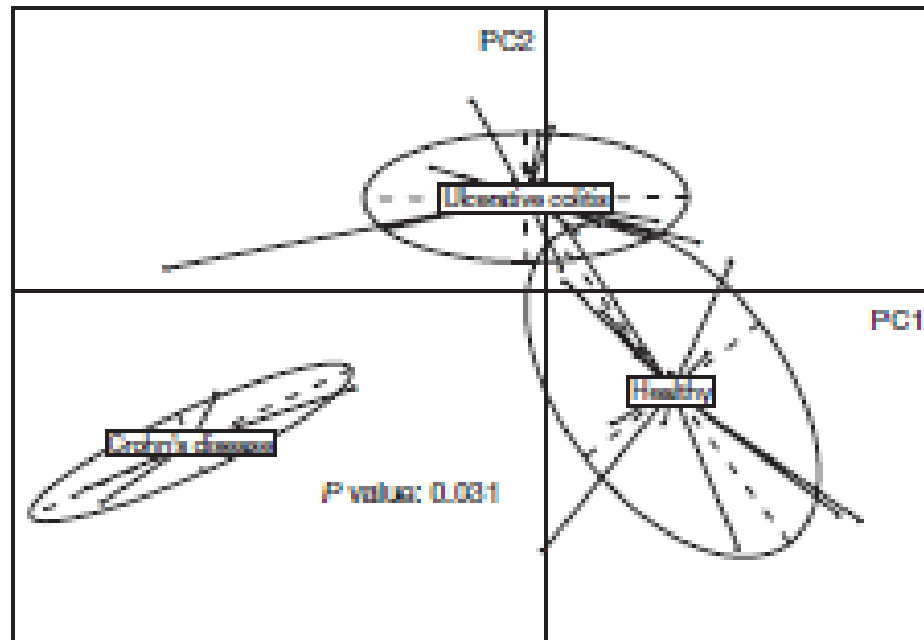
- L'alimentation ou des probiotiques et/ou des prébiotiques peuvent ils changer le ratio Firm./Bact. ?
- La réduction des Firmicutes chez les obèses est-elle suffisante pour les faire maigrir ?

Le microbiote humain dominant est composé de 3 phyla majeurs

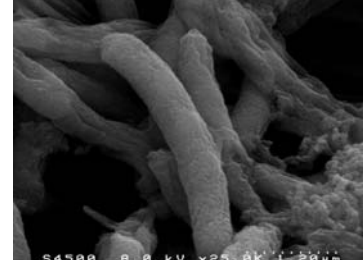
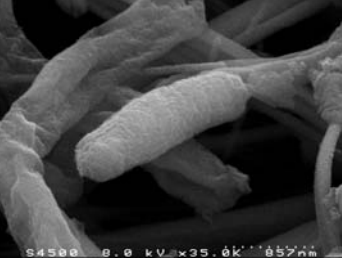


Une dysbiose dans les MICI ?





Il existe bien une différence de composition du microbiote entre les sains et les patients atteints de MICI.



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

Harry Sokol, Bénédicte Pigneur, Laurie Watterlot, Omar Lakhdari, Luis Bermúdez-Humarán, Jean Gratadoux, Sébastien Blugeon, Chantal Bridonneau, Jean-Pierre Furet, Gerard Corthier, Corinne Grangette, Nadia Vasquez, Philippe Pochart, Germain Trugnan, Ginette Thomas, Hervé Blottière, Joël Dore, Philippe Marteau, Philippe Seksik, and Philippe Langella

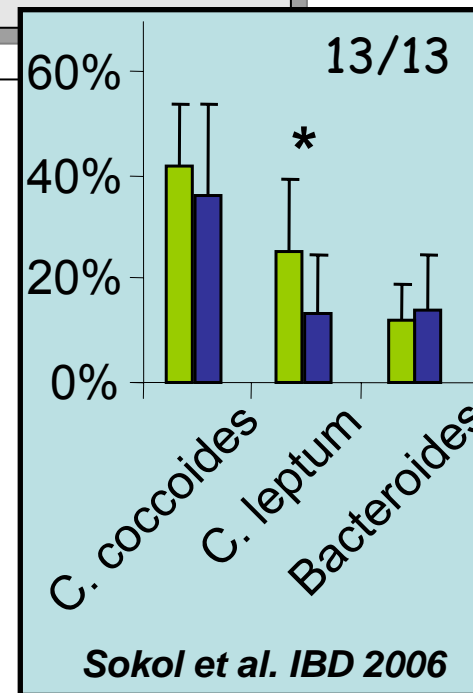
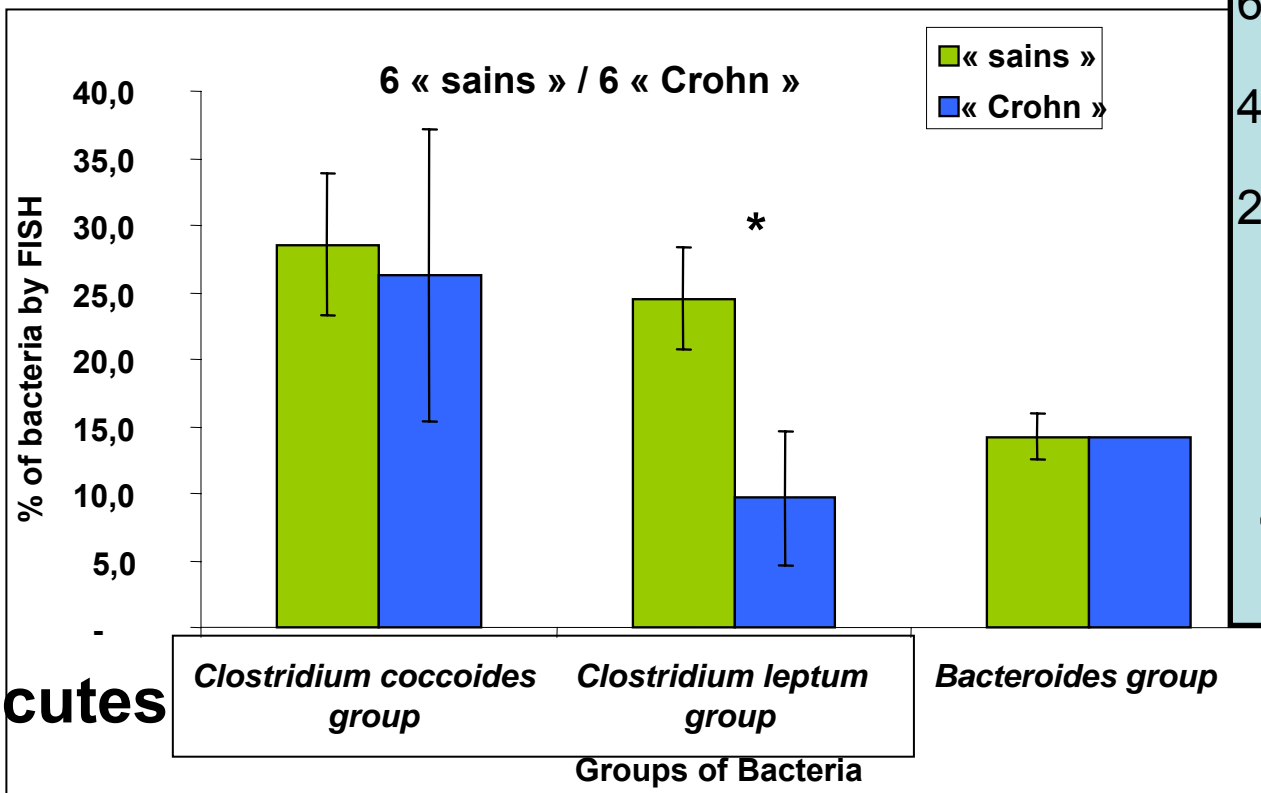


Inserm



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach



Firmicutes

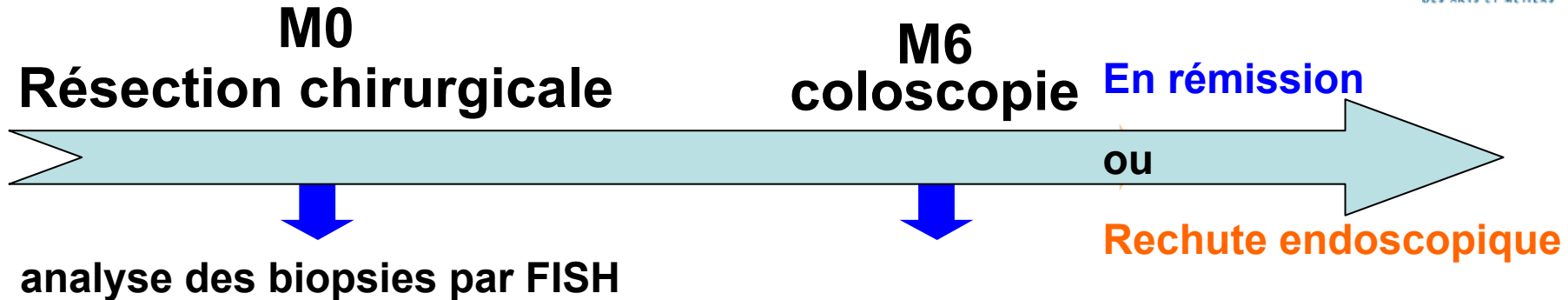
C. Manichanh et al. Gut 2006

La proportion relative de *C. leptum* parmi les Firmicutes fécaux est plus élevée chez les sujets sains que chez les malades atteints de Crohn.

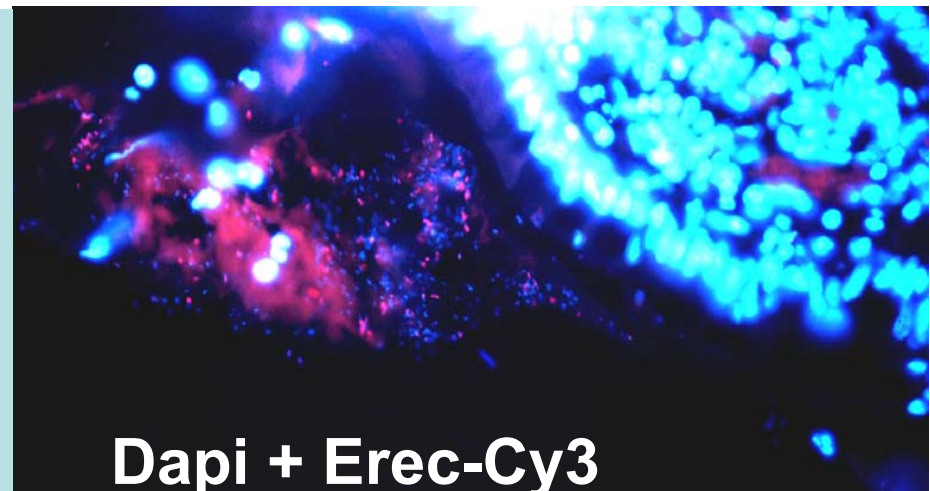
20 patients avec MC active, nécessitant une résection iléo-caecale

Seksik et al. DDW-2007

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS



- Eub338 (Eubacteria)
- Bac303 (*Bacteroides-Prevotella*)
- Ent1458 (Enterobacteria)
- Erec482 (*Clostridium coccoides*)
- Lab158 (*Lactobacillus-Enterococcus*)
- Bif164 (*Bifidobacterium*)
- Fprau645 (*F. prausnitzii*)

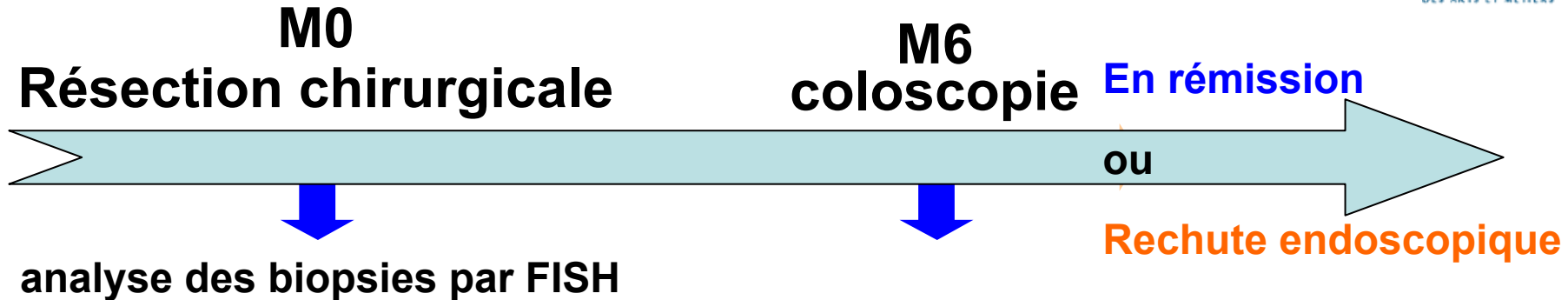


Dapi + Erec-Cy3

20 patients avec MC active, nécessitant une résection iléo-caecale

Seksik et al. DDW-2007

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS



- Eub338 (Eubacteria)
- Bac303 (*Bacteroides-Prevotella*)
- Ent1458 (Enterobacteria)
- Erec482 (*Clostridium coccoides*)
- Lab158 (*Lactobacillus-Enterococcus*)
- Bif164 (*Bifidobacterium*)
- Fprau645 (*F. prausnitzii*)

F. prausnitzii à M0
3.3%±3.4 → Rémission at M6

VS

0.3%±0.5 → Rechute à M6⁵⁷

Firmicutes / *F. prausnitzii*

1. Diminution de Firmicutes et de *F. prausnitzii* en particulier dans le microbiote de patients ayant une inflammation intestinale
2. Diminution de ***Faecalibacterium prausnitzii***, un membre majeur des Firmicutes, associée avec un risque élevé de récurrence postopératoire de MC iléale

***F. prausnitzii* semble important pour l'homéostasie intestinale:
A-t-il des propriétés anti-inflammatoires?**

Évaluation des effets anti-inflammatoires de *F. prausnitzii*

1. Expériences *in vitro*:

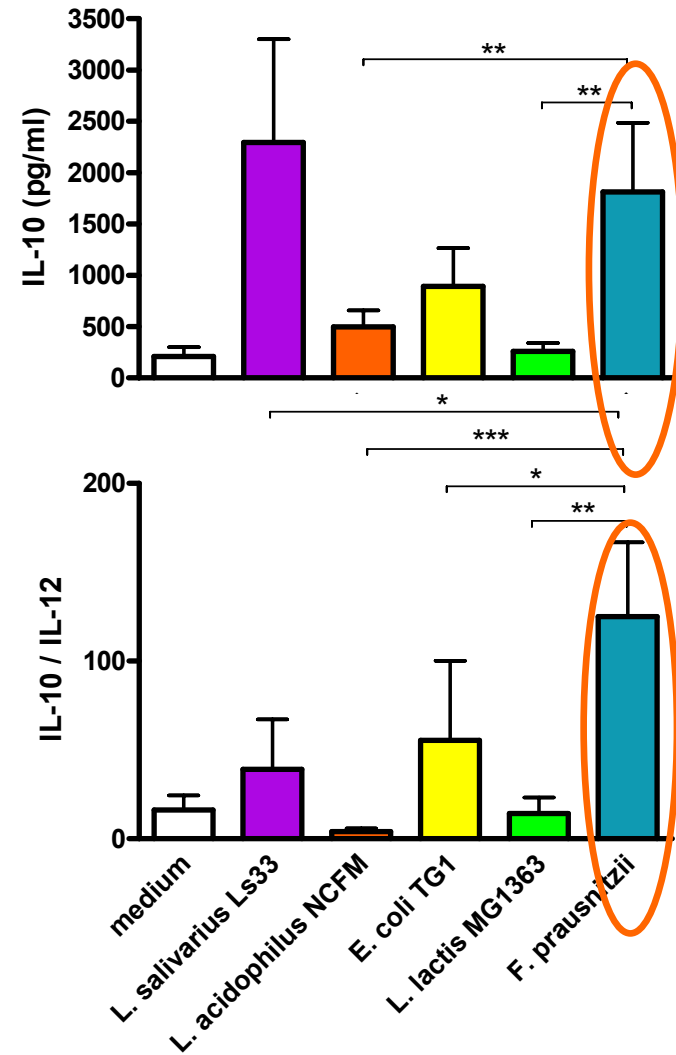
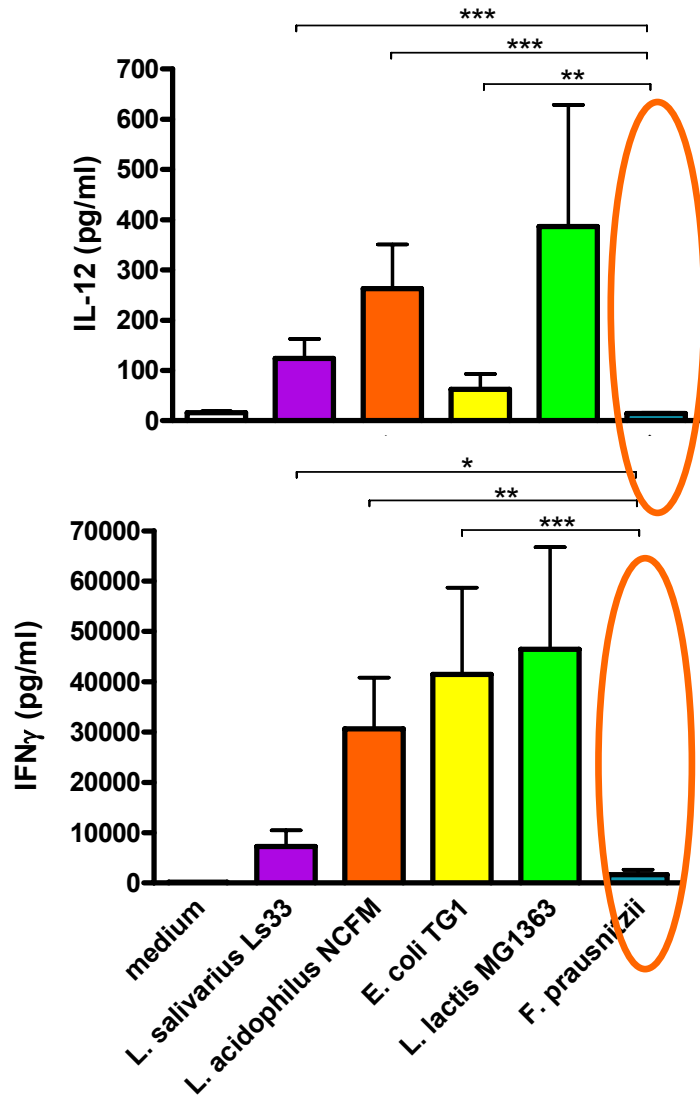
- Mesure de la sécrétion de cytokines par les cellules mononuclées du sang périphérique (**PBMC**)
- Mesure de la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 β sur **cellules Caco-2**
- Mesure de l'induction de NFK-B sur **cellules Caco-2** (exprimant de manière stable un gène rapporteur pour NFK-B)

2. Expériences *in vivo*:

- **Colite induite au TNBS** (souris Balb/c)
 - Histologie
 - Cytokines coliques (ELISA)
 - Composition du microbiote par PCR temps réel

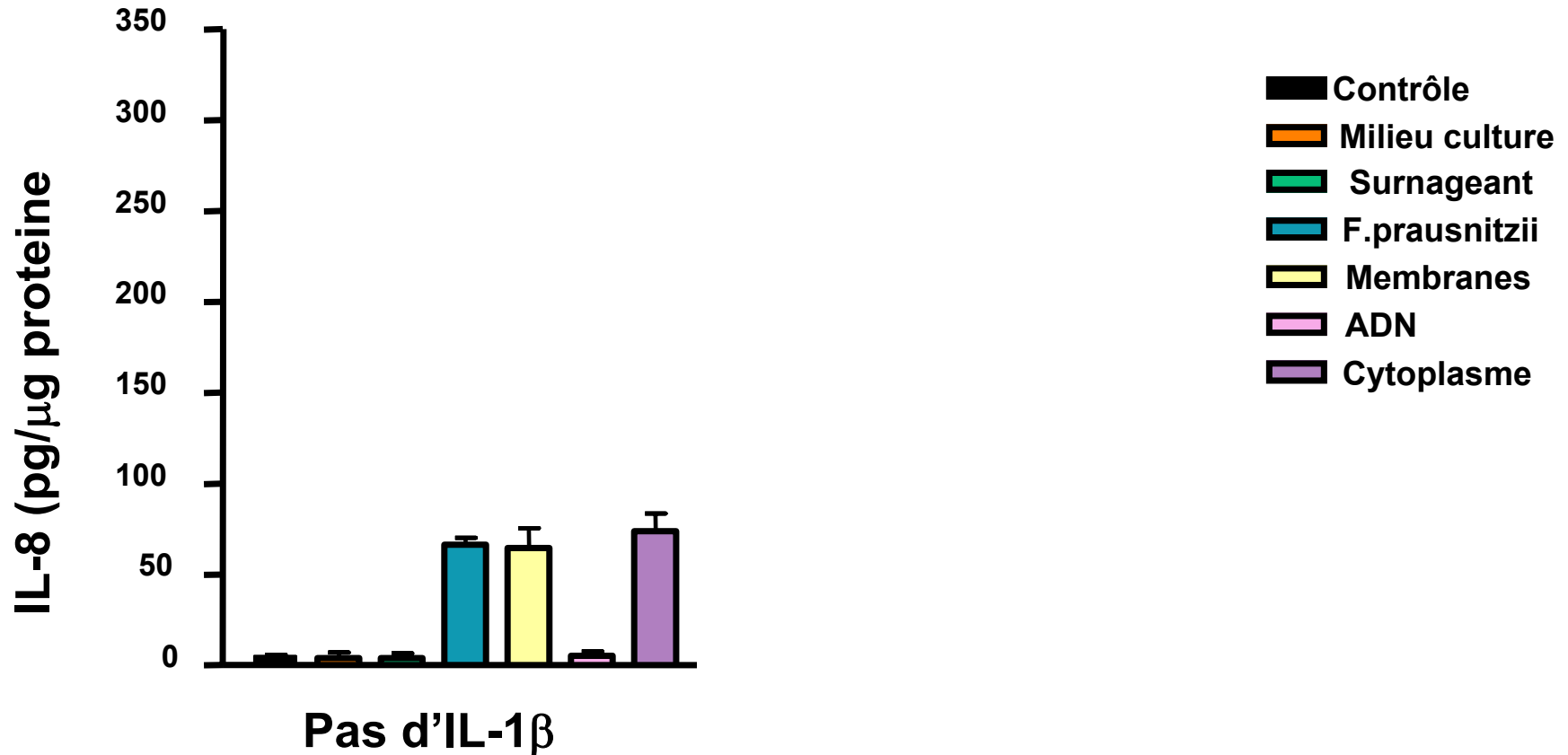
Résultats

PBMC



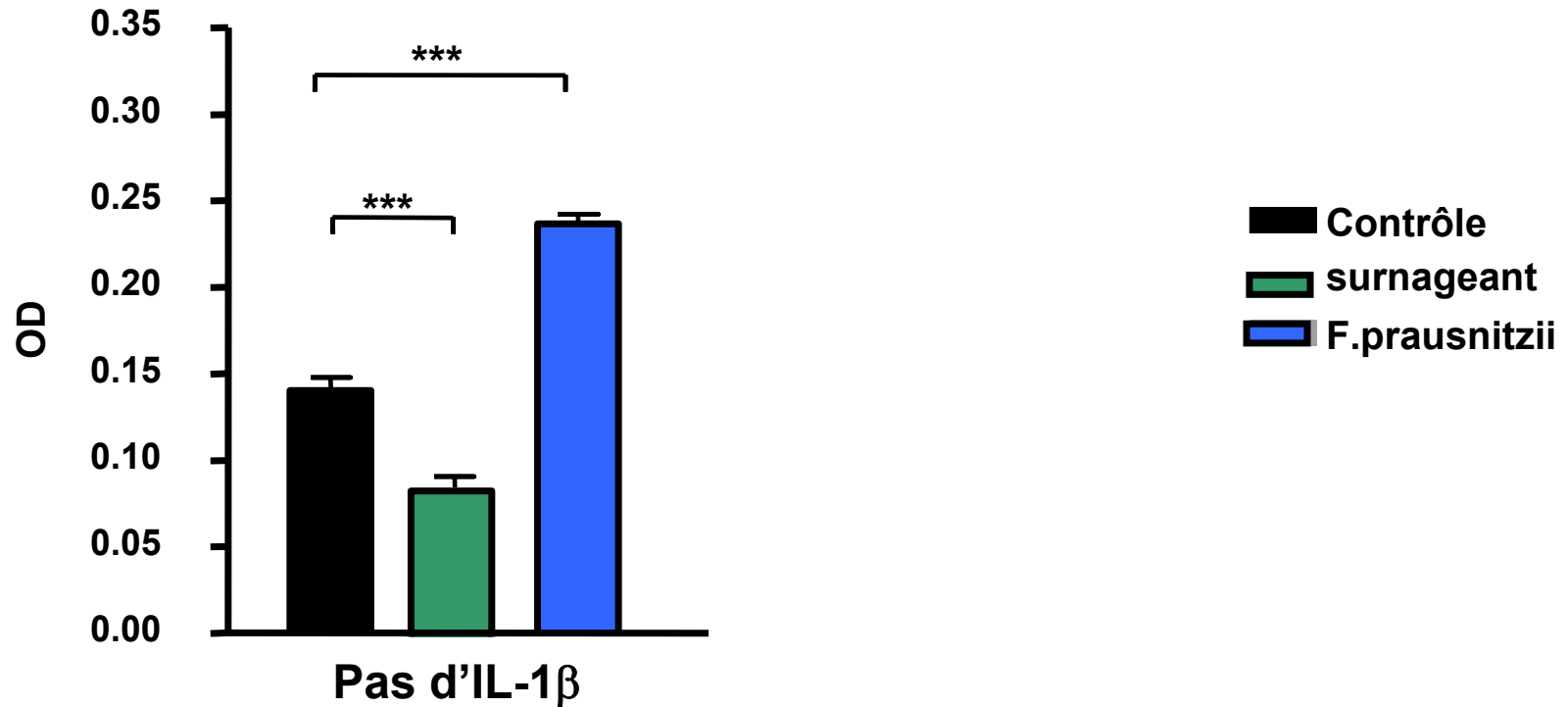
***F. prausnitzii* induit une très faible sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ et une forte sécrétion d'IL-10**

Sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 β sur cellules Caco-2



F. prausnitzii n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 β alors que le **surnageant** la réduit

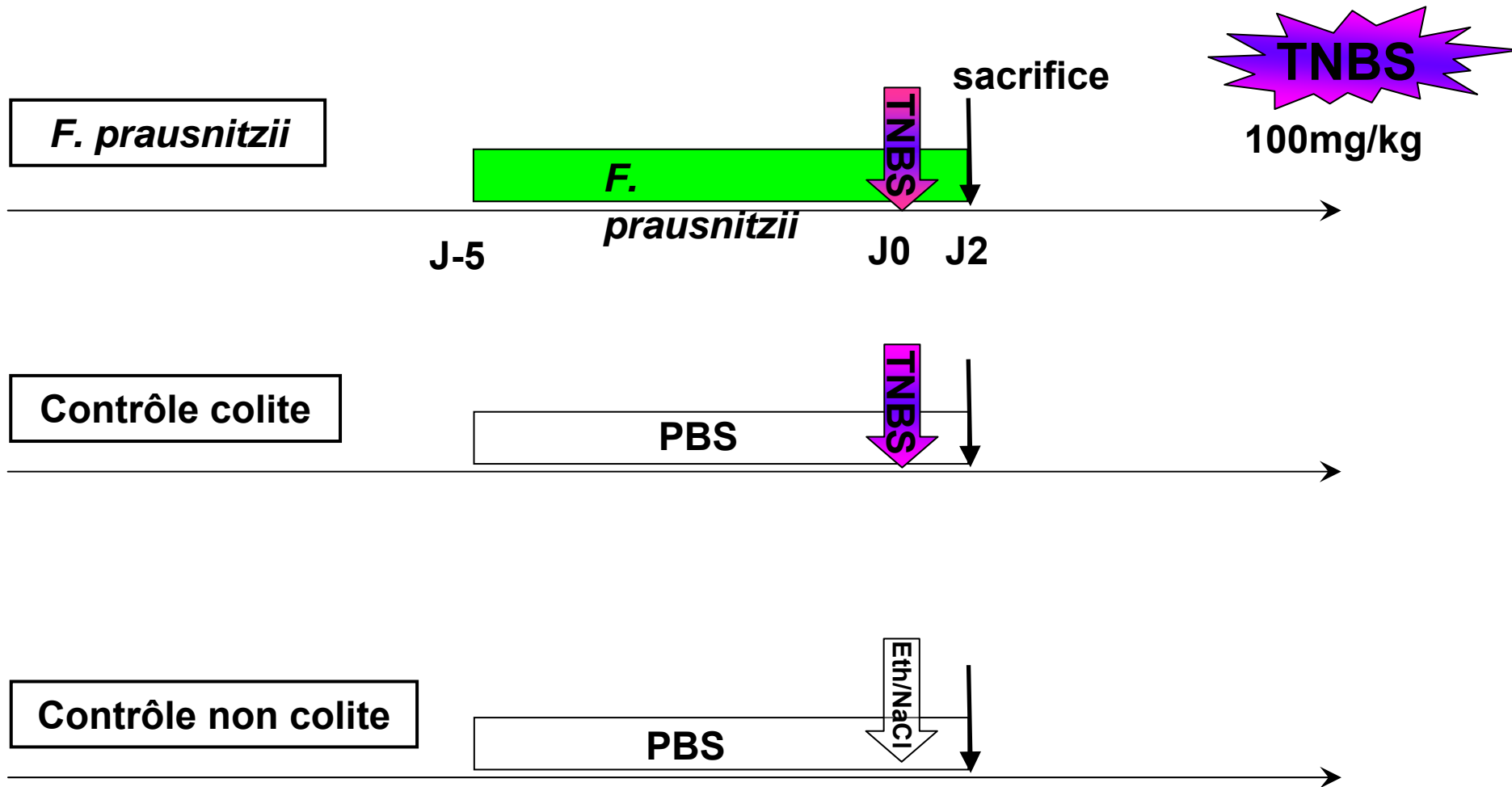
Induction de NF- κ B sur cellules Caco-2



Sur cellules Caco-2 transfectées avec un gène rapporteur pour NF κ B, *F. prausnitzii* n'a pas d'effet sur l'activation de NF κ B induite par l'IL-1 β alors que le surnageant la bloque

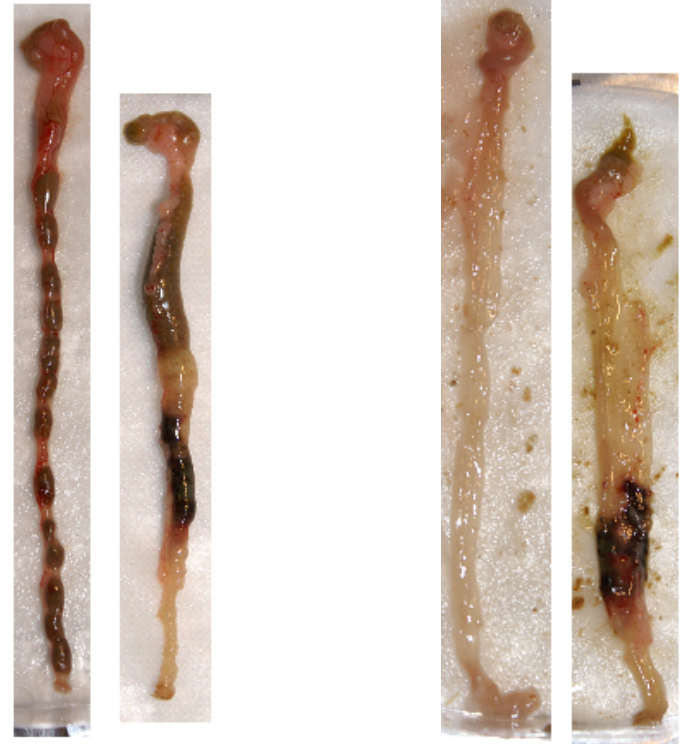
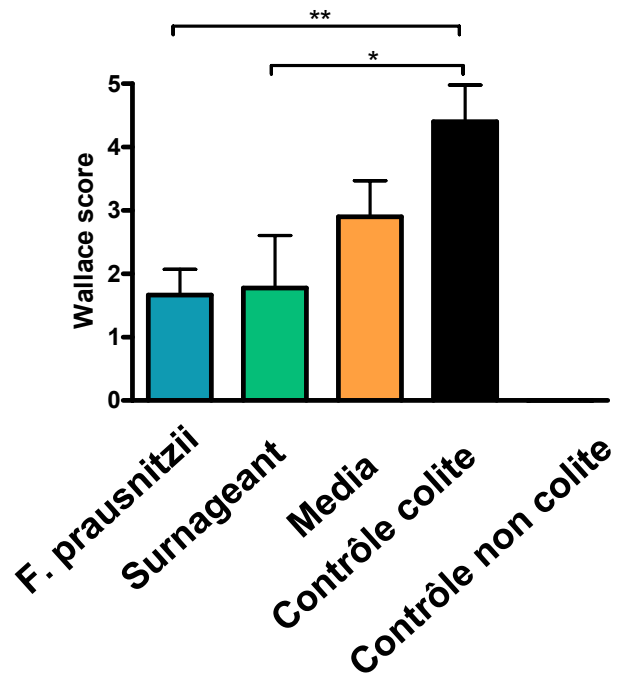
Colite induite au TNBS :

Protocole d'administration de *F. prausnitzii*



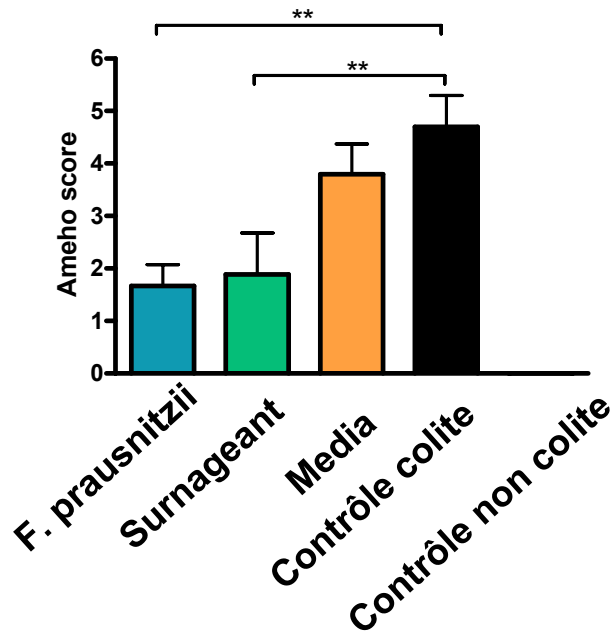
TNBS

Score macroscopique de Wallace



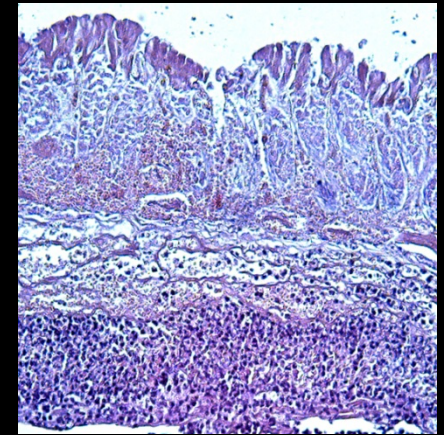
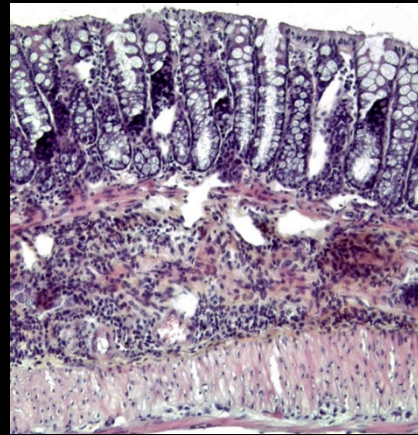
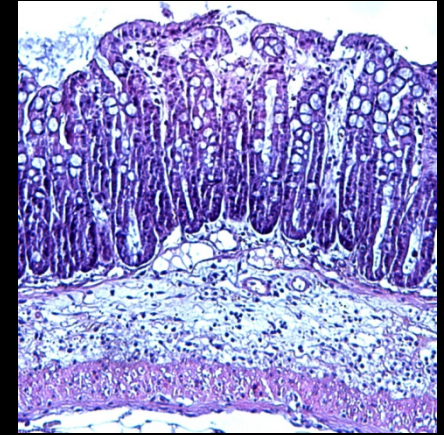
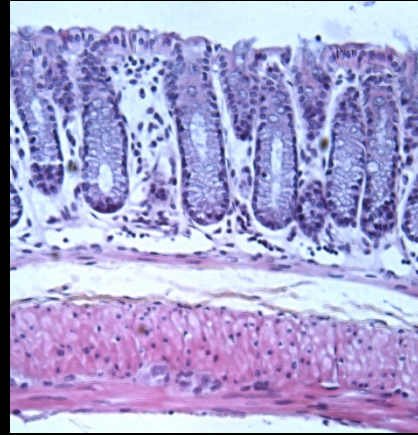
TNBS

Score histologique d'Ameho



Normal

Ameho 1-2

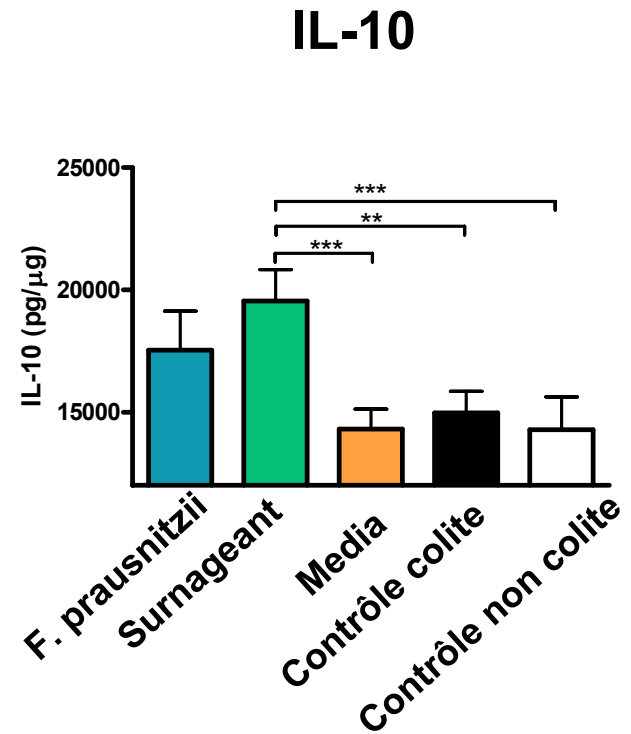
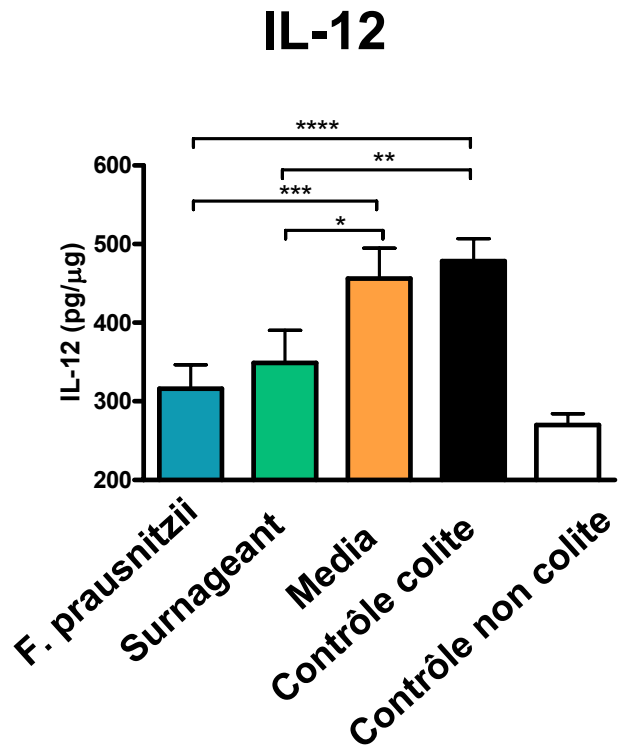


Ameho 3-4

Ameho 5-6

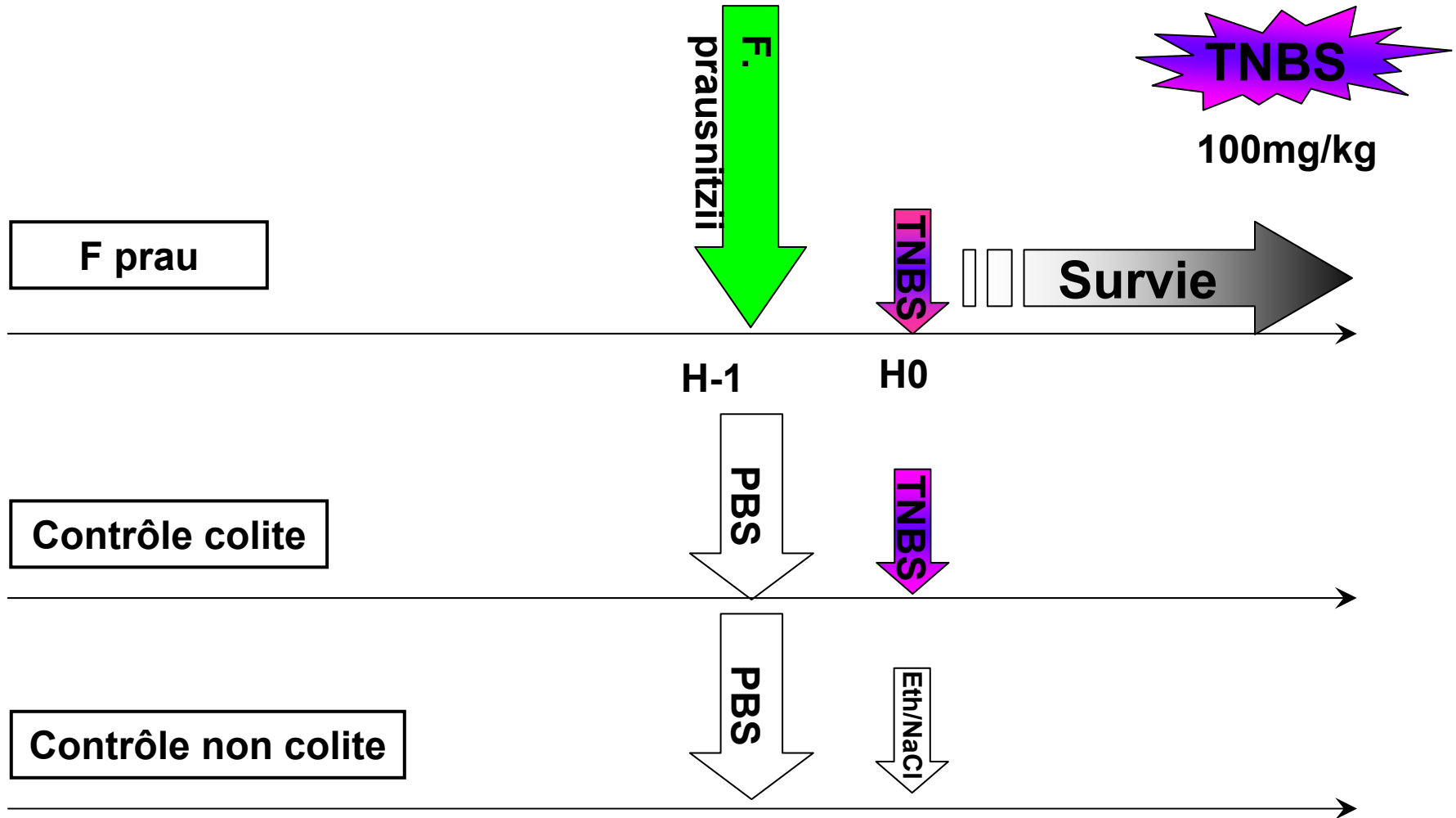
TNBS

Cytokines coliques



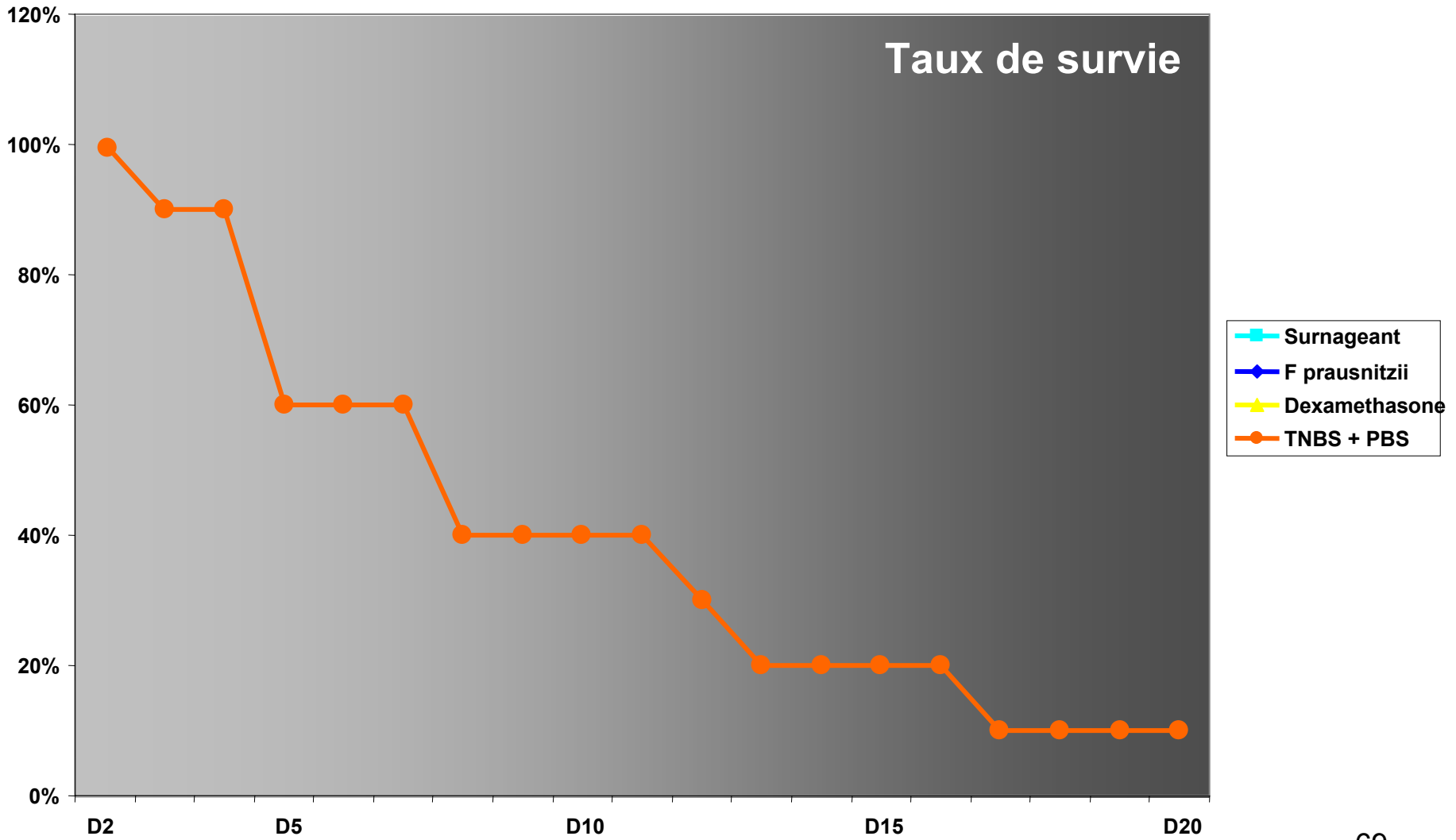
Colite au TNBS:

Administration intraperitoneale de *F. prausnitzii*

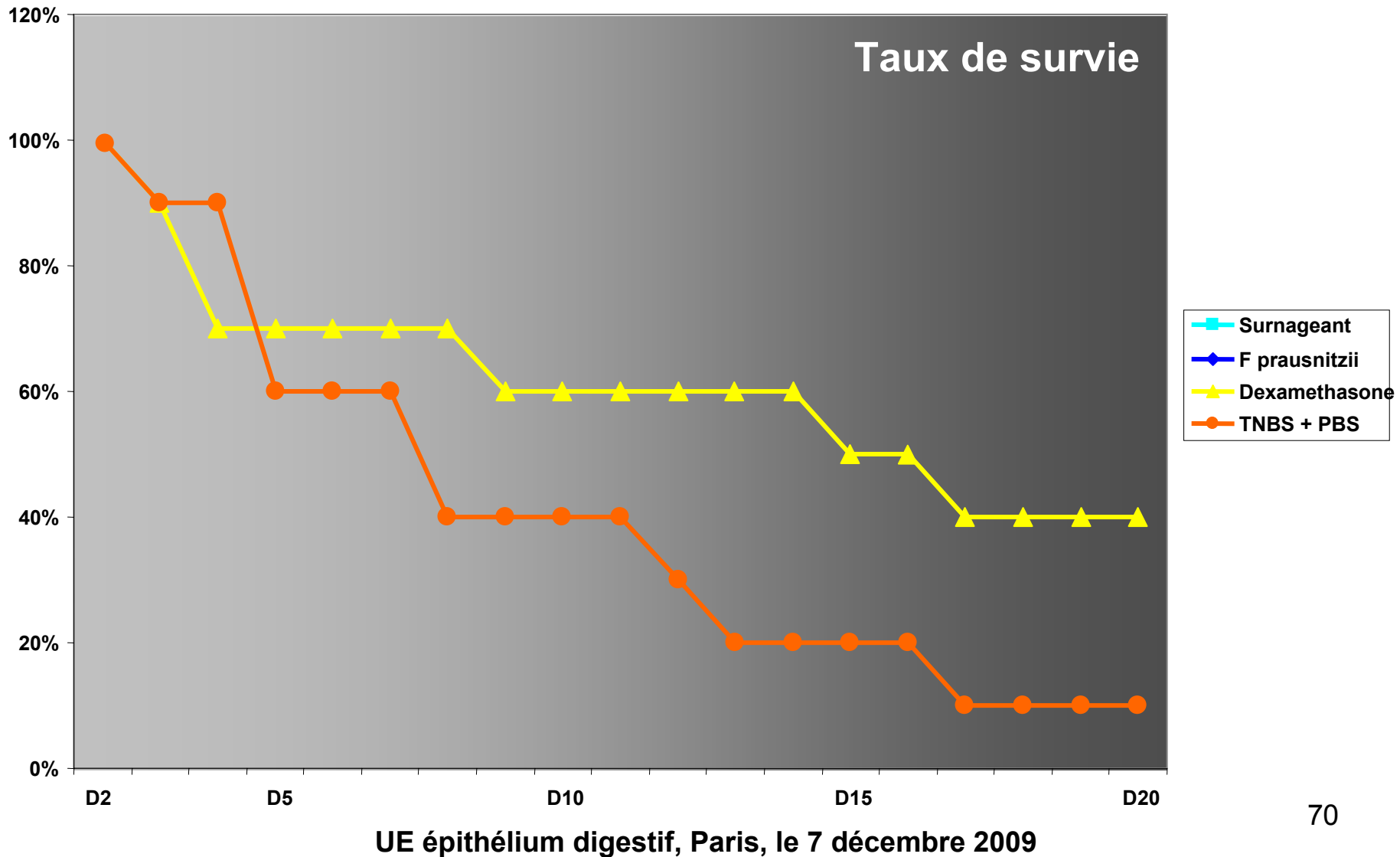


Colite au TNBS:

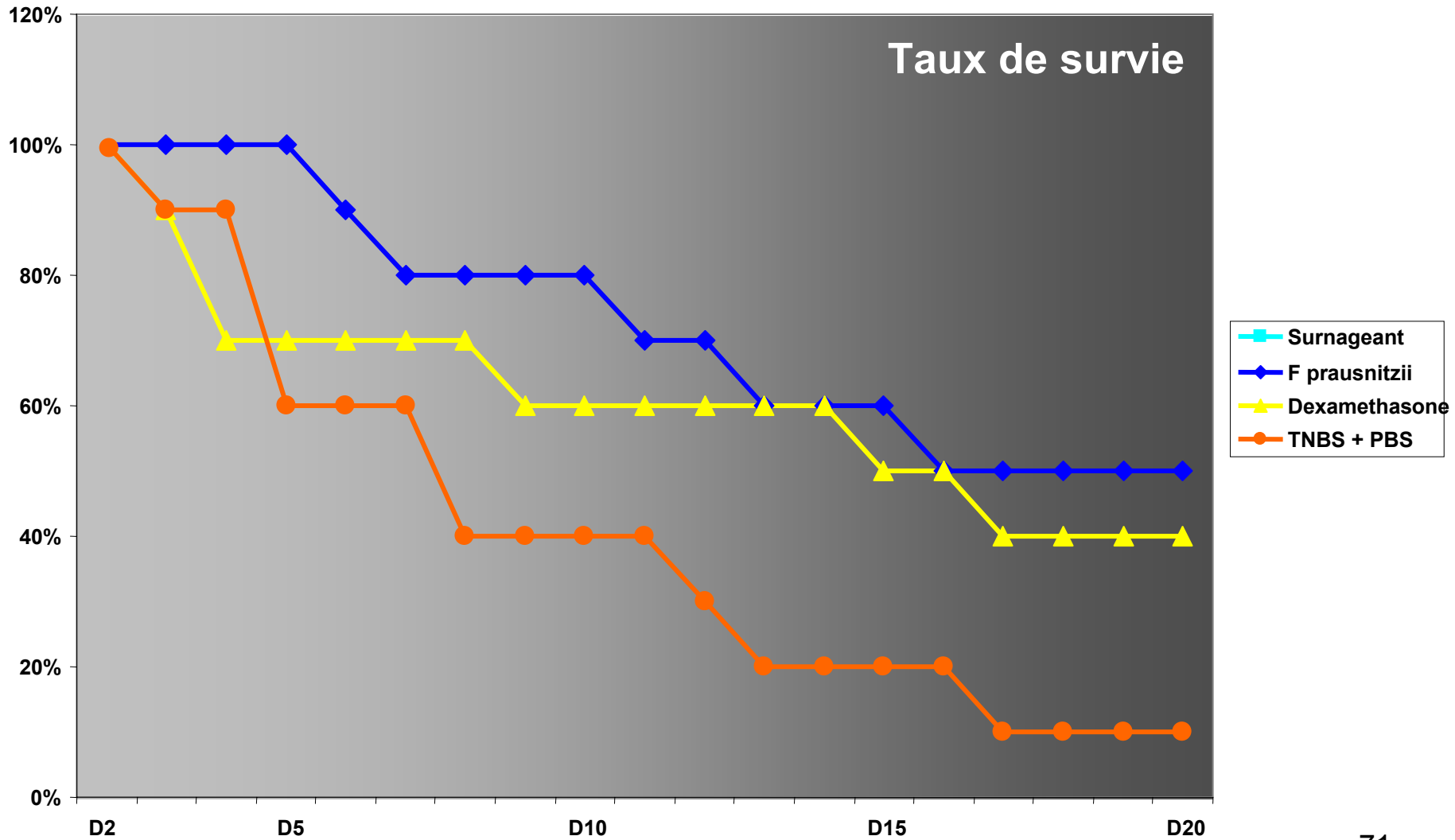
Administration intraperitoneale de *F. prausnitzii*



Colite au TNBS: Administration intraperitoneale de *F. prausnitzii*

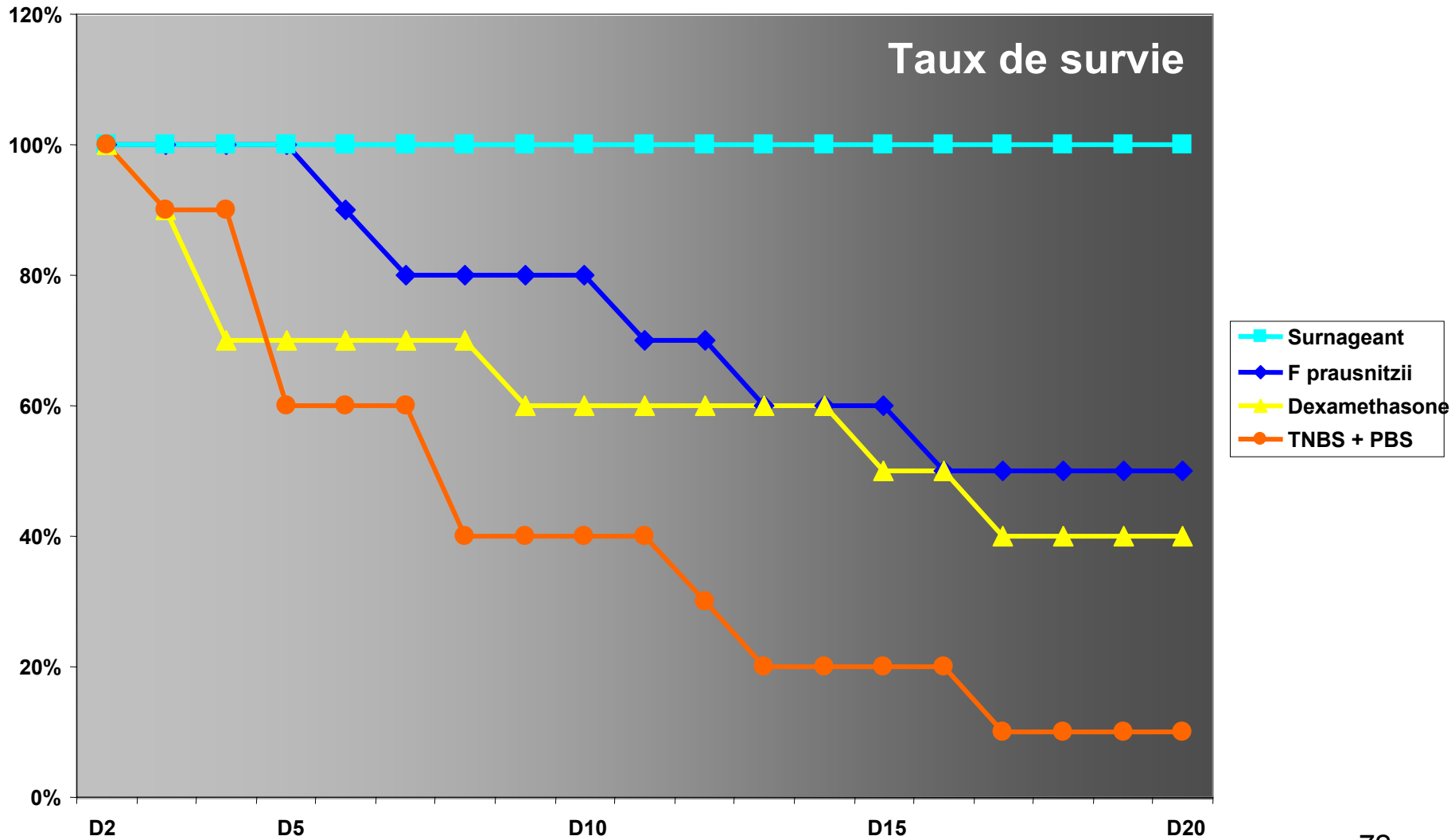


Colite au TNBS: Administration intraperitoneale de *F. prausnitzii*



Colite au TNBS:

Administration intraperitonéale de *F. prausnitzii*



Conclusion

- ***F. prausnitzii*** a des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*
- Ces effets sont en partie due à des **métabolites sécrétés** dans le surnageant bloquant l'activation de NFκB et la sécrétion d'IL-8

Conclusion

F. prausnitzii a été identifié par une **approche rationnelle** basée sur l'analyse comparative du microbiote de patients et de sujets sains

Perspectives

- Rééquilibrer la dysbiose en utilisant *F. prausnitzii* dans le traitement des MICI
- Identifier et isoler les métabolites actifs

F. prausnitzii biotique

Un peu de pub pour terminer...



On est là !

Coordonnées

- **Jean-Marc CHATEL PhD.**
Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte
MICALIS, Pole Ecosystème
Bat 440
INRA Centre de Recherche de Jouy
Domaine de Vilvert
78352 Jouy en Josas cedex France
Phone : +33 1.34.65.24.68
Fax : +33 1.34.65.24.62
jean-marc.chatel@jouy.inra.fr

