



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



Année: 2019

Thèse N°: 21

LA CULTUROMIQUE,
UNE NOUVELLE METHODE D'ETUDE
DU MICROBIOTE INTESTINAL

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : / / 2019

PAR

Madame Salma HARKATI
Née le 21 Novembre 1994 à Fès

Pour l'Obtention du Diplôme de
Docteur en Pharmacie

Mots Clés : Culturomique; Dysbiose; Métagénomique; Microbiote intestinal;
Transplantation fécale

Membres du Jury :

Madame Mona NAZIH
Professeur d'Hématologie Biologique
Monsieur Yassine SEKHSOKH
Professeur de Microbiologie
Madame Saida TELLAL
Professeur de Biochimie
Monsieur Rachid NEJJARI
Professeur de Pharmacognosie

Président
Rapporteur
Juge
Juge



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم



سورة البقرة: الآية: 31



UNIVERSITE MOHAMMED V

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

RABAT



DOYENS HONORAIRES :

- 1962 – 1969 : Professeur_Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ – HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen

Professeur Mohamed ADNAOUI

Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes

Professeur Brahim LEKEHAL

Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération

Professeur Taoufiq DAKKA

Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie

Professeur Jamal TAOUFIK

Secrétaire Général

Mr. Mohamed KARRA

1-ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne – *Clinique Royale*
Anesthésie -Réanimation
pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSALD Younes

Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne –*Doyen de la FMPR*
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anesthésie Réanimation –*Doyen de la FMPO*
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique *Méd Chef Maternité des Orangers*
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – *Dir. du Centre National PV Rabat*
Chimie thérapeutique *V.D à la pharmacie+Dir du*
CEDOC+Directeur du Médicament

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUA Adil
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Chirurgie Générale *Doyen de FMPT*
Anesthésie Réanimation
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie

Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan

Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques *Doyen de la FMPA*
Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- *Directeur CHIS -Rabat*
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie – Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie *Directeur Hôpital My Ismail Meknès*
Chirurgie – Pédiatrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - *Directeur du Service de Santé des FAR*
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale

Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Pédiatrie
Radiologie
Néphrologie
Cardiologie Directeur Hôp. Mil.d'Instruction Med V Rabat

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie Directeur Hôp. Arrazi Salé
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Neurologie – Doyen de la FMP Abulcassis
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie Directeur Hôp. My Youssef
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie Directeur Hôp. Chekikh Zaied
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie
Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSE Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hôp.d'Enfants Rabat**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie

Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina*

Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie **Directeur. Hôp. Al Ayachi Salé**
Pédiatrie
Cardiologie
Biophysique
Microbiologie

Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Cardiologie (mise en disponibilité)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Decembre 2006

Pr SAIR Khalid

Chirurgie générale Dir. Hôp.Av.Marrakech

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation Directeur ERSSM

Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. EL BEKKALI Youssef *
Pr. ELABSI Mohamed
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GHARIB Nouredine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhoussein*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Monsef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2008

Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
Pr. AGDR Aomar*
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AKHADDAR Ali*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMINE Bouchra
Pr. ARKHA Yassir

Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie cardio-vasculaire
Chirurgie générale
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologie biologique
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Chirurgie Générale

Médecine interne
Pédiatre
Chirurgie Générale
Neurologie
Neuro-chirurgie
Radiologie
Rhumatologie
Neuro-chirurgie ***Directeur Hôp.des Spécialités***

Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie biologique
 Anatomie pathologique

Decembre 2010

Pr.ZNATI Kaoutar

Anatomie Pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. BENCHEBBA Driss*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie

**Enseignants Militaires*

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
Pr. BENSGHIR Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad
Pr. EL JOUDI Rachid*
Pr. EL KABABRI Maria
Pr. EL KHANNOUSSI Basma
Pr. EL KHLOUFI Samir
Pr. EL KORAICHI Alae
Pr. EN-NOUALI Hassane*
Pr. ERRGUIG Laila
Pr. FIKRI Meryim

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie biologique
Informatique Pharmaceutique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique et Bromatologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologie
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie
Radiologie

Pr. GHFIR Imade
Pr. IMANE Zineb
Pr. IRAQI Hind
Pr. KABBAJ Hakima
Pr. KADIRI Mohamed*
Pr. LATIB Rachida
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
Pr. MEDDAH Bouchra
Pr. MELHAOUI Adyl
Pr. MRABTI Hind
Pr. NEJJARI Rachid
Pr. OUBEJJA Houda
Pr. OUKABLI Mohamed*
Pr. RAHALI Younes
Pr. RATBI Ilham
Pr. RAHMANI Mounia
Pr. REDA Karim*
Pr. REGRAGUI Wafa
Pr. RKAIN Hanan
Pr. ROSTOM Samira
Pr. ROUAS Lamiaa
Pr. ROUIBAA Fedoua*
Pr. SALIHOUN Mouna
Pr. SAYAH Rochde
Pr. SEDDIK Hassan*
Pr. ZERHOUNI Hicham
Pr. ZINE Ali*

Médecine Nucléaire
Pédiatrie
Endocrinologie et maladies métaboliques
Microbiologie
Psychiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Pharmacologie
Neuro-chirurgie
Oncologie Médicale
Pharmacognosie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique
Pharmacie Galénique
Génétique
Neurologie
Ophtalmologie
Neurologie
Physiologie
Rhumatologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Chirurgie Pédiatrique
Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Mai 2013

Pr. BOUSLIMAN Yassir

Toxicologie

Mars 2014

Pr. ACHIR Abdellah
Pr. BENCHAKROUN Mohammed *
Pr. BOUCHIKH Mohammed
Pr. EL KABBAJ Driss *
Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
Pr. HARDIZI Houyam
Pr. HASSANI Amale *
Pr. HERRAK Laila
Pr. JANANE Abdellah *
Pr. JEAIDI Anass *

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique

Pr. KOUACH Jaouad*
Pr. LEMNOUER Abdelhay*
Pr. MAKRAM Sanaa *
Pr. OULAHYANE Rachid*
Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
Pr. SABRY Mohamed*
Pr. SEKKACH Youssef*
Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Géynecologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Généologie-Obstétrique

AVRIL 2014

Pr. ZALAGH Mohammed

ORL

PROFESSEURS AGREGES :

DECEMBRE 2014

Pr. ABILKASSEM Rachid*
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila
Pr. BEKKALI Hicham *
Pr. BENAZZOU Salma
Pr. BOUABDELLAH Mounya
Pr. BOUCHRIK Mourad*
Pr. DERRAJI Soufiane*
Pr. DOBLALI Taoufik*
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*
Pr. EL MARJANY Mohammed*
Pr. FEJJAL Nawfal
Pr. JAHIDI Mohamed*
Pr. LAKHAL Zouhair*
Pr. OUDGHIRI Nezha
Pr. RAMI Mohamed
Pr. SABIR Maria
Pr. SBAI IDRISSE Karim*

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

AOÛT 2015

Pr. MEZIANE Meryem
Pr. TAHRI Latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

Pr. BENKABBOU Amine
Pr. EL ASRI Fouad*
Pr. ERRAMI Noureddine*
Pr. NITASSI Sophia

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

JUIN 2017

Pr. ABI Rachid*	Microbiologie
Pr. ASFALOU Ilyasse*	Cardiologie
Pr. BOUAYTI El Arbi*	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. BOUTAYEB Saber	Oncologie Médicale
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim	Oncologie Médicale
Pr. OURAINI Saloua*	O.R.L
Pr. RAZINE Rachid	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. ZRARA Abdelhamid*	Immunologie

* *Enseignants Militaires*

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI Katim	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

Mise à jour le 10/10/2018
Khaled Abdellah
Chef du Service des Ressources Humaines



Dédicaces



To my dear parents Hayat & Hamid

*This thesis is dedicated to you guys,
For your endless love, support and encouragement,
I shall always remain grateful.*

To my wisy little sister Mona

*Thank you for always being there for me,
Thank you for listening to all my drama and calming me down in my anger
moments,
Thank you for all your precious advices
Thank you for choosing my outfit
PS : disturbing me in my exam periods wasn't that cool sisy..*

To my brother Ayoub

*Thank you for your support and defending me,
Thank you for your encouragement, you have a weird way to express it but
I know you always believed in me..*

To Imane and Hind

*You're my second family, no words shall express my love and affection for
you guys,
Thank you for existing in my life.*

To my besty Safae

*I'm so lucky to have you as my friend,
Thank you for being my best supporter,
Thank you for that you've taught me.*

To my Partner in crime Ihssan

"Friends are those rare people who ask how we are and then wait to hear the answer." It reminds me of our friendship, it's old that I don't even remember when it has started, we had our ups and downs during all this period, but the boundary has always been real, honest and pure.

Thank you Ihssan for being a part of my life, my besty and my partner in crime.

To my spiritual guide and teacher

I prefer not to mention your name to keep you a mystery,

Thank you for being the most significant of my others,

Thank you for your endless listening,

Thank you for all the awarness and peace you bring into my life contantly.

This thesis would not be possible without your support and guidance.



Remerciements



A Notre Maître et présidente de thèse

Madame NAZIH Mona

Professeure d'Hématologie biologique

*Vous nous avez accordé un grand honneur en acceptant de présider le jury
de notre thèse.*

*Votre parcours professionnel, votre compétence incontestable et vos qualités
humaines font de vous une grande professeure et nous inspirent une grande
admiration et un profond respect.*

*Permettez nous, chère maître de vous exprimer notre profond respect et
notre sincère gratitude.*

A Notre Maître et directeur de thèse

Monsieur SEKHSOKH Yassine

Professeur de Microbiologie

Vous êtes le Professeur qui a réussi à m'inspirer, à me donner confiance en moi et en l'avenir mais aussi qui a réussi à me donner l'envie d'apprendre.

Les plus grandes leçons ne sont pas tirées d'un livre mais d'un enseignant tel que vous. Merci d'avoir pris le temps de m'aider au cours de cette thèse et de m'avoir accompagné dans la maîtrise de mes connaissances.

Merci de m'avoir donné la force et le courage.

Merci pour votre patience, votre disponibilité et vos judicieux conseils.

Je suis éternellement reconnaissante pour tout ce que vous m'avez appris.

A Notre Maître et juge de thèse

Madame TELLAL Saida

Professeure de Biochimie

*Nous vous remercions pour la spontanéité et la gentillesse avec laquelle
vous avez accepté de juger cette thèse.*

*Vous nous faites un très bon exemple à suivre par vos compétences et vos
qualités morales qui font de vous une grande professeure.*

*Nous vous prions de recevoir ici l'expression de nos respects les plus
considérables.*

A Notre Maître et Juge de Thèse

Monsieur NEJJARI Rachid

Professeur de Pharmacognosie

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous accordez en acceptant de juger notre thèse.

Votre compétence et votre dynamisme ont suscité en nous une grande admiration et sont pour vos élèves un exemple à suivre.

Veillez agréer, Monsieur, l'expression de nos respects les plus distingués.



Liste des abréviations



Abréviations

AB	: Acides biliaires
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AG	: Acides gras
AGCC	: Acides gras à chaînes courtes
AHLs	: N-Acétyl homosérine lactones
AI	: Auto inductrice
ANSM	: Agence nationale de sécurité des médicaments
ARN	: Acide ribonucléique
ASD	: Autism spectrum disorder
ATP	: Adénosine triphosphate
CDT	: Cytolethal distending toxin
EFSA	: Autorité européenne de sécurité des aliments
FAO	: Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FOS	: Fructo-oligosaccharides
FXR	: Farnesoid X receptor
GABA	: Acide gamma-aminobutyrique
GALT	: Gut-associated lymphoid tissue
GOS	: Galacto-oligosaccharides
GRAS	: Generally recognised as safe
HIT CHIP	: Human intestinal tract chip
HMO	: Human milk oligosaccharides
IBS	: Irritable bowel syndrome

Ig A	: Immunoglobulines de type A
ILC	: Innate lymphoid cell
IRCD	: Infections récidivantes à <i>Clostridium difficile</i>
JAM-A	: Junctional adhesin molecule-A
KGF	: Keratinocyte growth factor
LPS	: Lipopolysaccharide
MALT	: Mucosa-associated lymphoid tissue
MC	: Maladie de Crohn
MetaHit	: Metagenomics of the human intestinal tract
MICI	: Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide+H ⁺
NCBC	: Centre national pour l'information biotechnologique
NOD	: Nucleotide oligomerisation domain
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PAM	: Peptides anti-microbiens
PUI	: Pharmacie à usage intérieur
QPS	: Qualified presumption of safety
QS	: Quorum sensing
RCH	: Rectocolite hémorragique
REG	: Regenerating islet-derived protein
SCFA	: Short chain fatty acid
SFB	: Sigmented filamentous bacteria
SIBO	: Small intestinal bacterial overgrowth

SII	: Syndrome de l'intestin irritable
SII-PI	: Syndrome de l'intestin irritable post-infectieux
SNC	: Système nerveux central
TF	: Transplantation fécale
TGF-B	: Transforming growth factor B
TLR	: Toll like receptor
TMAO	: Triméthylamine N-oxyde
TMF	: Transplantation de microbiote fécal



Liste des illustrations



Liste des figures

Figure 1: Exemple taxonomie	6
Figure 2: Arbre phylogénétique présentant la majorité des groupes bactériens	8
Figure 3: Répartition du microbiote au niveau du tractus gastro-intestinal	9
Figure 4: Organisation schématique de la barrière intestinale	13
Figure 5: Organisation schématique d'une jonction serrée	16
Figure 6: Interactions nutritionnelles au cours de la dégradation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain	20
Figure 7: Principales voies métaboliques de la fermentation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain	22
Figure 8: Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal humain	26
Figure 9: Voies directes et indirectes pour la conversion du cholestérol en coprostanol par le microbiote intestinal	28
Figure 10: Représentation schématique de l'impact de la dysbiose sur le contenu luminal chez les patients souffrant de la maladie intestinale chronique de l'intestin	37
Figure 11: Echelle de Bristol permettant d'apprécier la forme et la consistance des selles.....	40
Figure 12: Comment les caractéristiques intrinsèques, l'alimentation, l'environnement ou des traitements influencent la composition et l'activité métabolique de l'hôte	47
Figure 13: Effets directs et indirects des prébiotiques sur l'épithélium intestinal et le système immunitaire	64
Figure 14: Chronologie (versant "donneur") de la transplantation fécale (en l'absence de congélation)	68
Figure 15: Graphique de l'évolution du nombre de génomes complets séquencés soumis à la banque de données Genbank au cours du temps	82

Figure 16: Caractérisation phylogénétique du vivant par création d'un arbre phylogénétique utilisant 31 protéines marqueurs	85
Figure 17: schéma représentant les étapes principales des méthodes de caractérisation culture-indépendante	88
Figure 18: Contribution des microbiologistes de l'environnement à l'amélioration de la culture bactérienne grâce aux chambres de diffusion, permettant au nombre de colonies cultivées d'augmenter 300 fois en imitant l'environnement naturel	94
Figure 19: Isolement sur gélose Columbia 5% de sang de mouton	96
Figure 20: Exemples de spectres obtenus à partir de colonies entières de 5 espèces bactériennes différentes	102
Figure 21: Schéma explicatif de la culturomique et son intérêt en taxogenomique	104

Liste des tableaux

Tableau I : Affections humaines et principaux probiotiques d'efficacité démontrée	59
Tableau II : Questionnaire de présélection (item spécifique au don de selles)	69
Tableau III : Questionnaire de sélection / Evénements depuis la visite de présélection	70
Tableau IV : Liste des agents infectieux à dépister chez les donneurs	72
Tableau V : Méthodes de dépistage des bactéries dans les selles de donneurs sains	73



Sommaire



Introduction	1
Partie I : Généralités sur le microbiote intestinal	4
1. Description générale.....	5
1.1. Quelques définitions	5
1.2. Composition du microbiote intestinal.....	6
1.3. Stabilité et résilience	10
2. Principales fonctions du microbiote intestinal.....	11
2.1. Fonction de protection et de barrière	12
2.1.1. Microbiote et mucus	14
2.1.2. Microbiote et épithélium intestinal	15
2.2. Fonctions métaboliques	18
2.2.1. Métabolisme des glucides	19
2.2.2. Métabolisme des gaz	22
2.2.3. Métabolisme des protéines	23
2.2.4. Métabolisme des lipides	26
2.2.5. Synthèse de vitamines	28
2.3. Maturation et fonctionnement du système immunitaire	29
2.3.1. Organisation des défenses spécifiques	29
2.3.2. Interactions microbiote-système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.....	30
Partie II : Enjeux de l'étude du microbiote intestinal humain	33
1. Dysbiose : implication dans certaines pathologies	34
1.1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	34
1.1.1. Description de la dysbiose dans la maladie de Crohn	35

1.1.2. Description de la dysbiose dans la rectocolite hémorragique	36
1.1.3. Mécanismes métaboliques	36
1.2. Syndrome de l'intestin irritable	39
1.2.1. Définition	39
1.2.2. Physiopathologie : implication de la flore intestinale	41
1.3. Cancer colorectal	44
1.3.1. Description de la dysbiose dans le cancer colorectal	44
1.3.2. Mécanisme physiopathologique	46
1.4. Risque cardiovasculaire	47
1.4.1. Microbiote et maladies métaboliques	47
1.4.2. Microbiote et hypertension artérielle	49
1.4.3. Microbiote et dyslipidémie	49
1.5. Troubles psychiatriques majeurs	50
1.5.1. Conséquences potentielles de la dysbiose sur fonctionnement du système nerveux central	50
1.5.2. Microbiote et autisme	51
1.5.3. Microbiote, troubles de l'humeur et troubles psychotiques	52
2. Perspectives thérapeutiques	53
2.1. Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques	53
2.1.1. Définitions	53
2.1.1.1. Probiotiques	53
2.1.1.2. Prébiotiques	55
2.1.1.3. Symbiotiques	56
2.1.2. Mécanismes d'action et effets sur la santé	56
2.1.2.1. Probiotiques	56

2.1.2.2. Prébiotiques et symbiotiques	63
2.2. Transplantation de microbiote fécal	66
2.2.1. Définition et techniques	66
2.2.1.1. Définition	66
2.2.1.2. Cadre législatif	67
2.2.1.3. Techniques	67
2.2.2. Indication : infections à <i>Clostridium difficile</i>	74
2.2.3. Autres indications potentielles	75
2.2.3.1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	75
2.2.3.2. Syndrome de l'intestin irritable	75
2.2.3.3. Syndromes métaboliques	76
Partie III : La culturomique.....	77
1. Rappel historique de l'étude des micro-organismes : méthodes culture-dépendants	78
1.1. Caractérisation phénotypiques	78
1.1.1. Microscope optique et les premières classifications des micro-organismes	78
1.1.2. Microscope électronique	79
1.1.3. Découverte de la structure de l'ADN : Classification phylogénétique	79
1.2. Caractérisation génotypique	80
1.2.1. Les premiers séquençages de l'ARN/ADN et la classification phylogénétique	80
1.2.2. Du séquençage de l'ADN vers la caractérisation des gènes	81
1.2.3. Premier génome bactérien complet	81
1.2.4. Séquences multicapillaires et concept de « pan » et « core-genome »	82
1.2.5. Séquençage de marqueurs phylogénétiques et l'arbre de la vie	83
1.3. Avantages et limites de la caractérisation des flores par méthodes culture-dépendants	86

2. Méthodes culture-indépendantes : la métagénomique	87
2.1. Historique	87
2.2. Principe de la métagénomique	87
2.2.1. Etapes de caractérisation d'échantillons	87
2.2.2. Séquençage d'échantillons	89
2.2.3. Traitements bioinformatiques et caractérisation	91
2.3. Avantages et limites de la métagénomique	91
3. La culturomique	92
3.1. Introduction	92
3.2. Chambres de diffusion	93
3.3. Milieux de culture	95
3.3.1. Les premiers milieux utilisés	95
3.3.2. Méthodes de sélection sur échantillon de départ	96
3.3.3. Enrichissement des milieux	97
3.3.4. Réduction du nombre de conditions de culture	98
3.4. MALDI-TOF pour l'identification	99
3.5. De la culturomique à la taxogénomique	103
3.6. Avantages et limites de la culturomique	105
Conclusion	107
Résumés	109
Bibliographie	113



Introduction



Les idées scientifiques sont le fruit d'une époque, dans toute la complexité de son contexte culturel. Certes, elles sont portées par des personnages retenus par l'Histoire comme emblématiques d'une découverte. Mais elles appartiennent en fait à un ensemble d'intellectuels qui s'influencent les uns les autres. La communauté de chercheurs est soumise à l'ambiance scientifique, sociale, politique, religieuse de son époque qui fertilise la naissance des concepts, indépendamment des individus que l'Histoire mettra en exergue. Les historiens rappellent souvent ce caractère ubiquitaire et synchrone de l'émergence d'un courant scientifique ou artistique.

Nombreux sont les scientifiques à travers le monde qui ont participé à l'histoire du microbiote - dénommé ainsi depuis les années cinquante seulement - c'est un objet scientifique défini comme l'ensemble des microorganismes vivants dans l'intestin. Il questionne la science dans tous les domaines, aussi bien la santé, la génétique et l'épigénétique, que l'environnement et sa dimension écologique, la biologie et les théories de l'évolution...

Le terme microbiote désigne l'ensemble des bactéries qui habitent l'homme et cohabitent avec lui, et ce quelle que soit leur localisation anatomique, sur la peau, dans le conduit auditif, les bronches, la cavité vaginale, etc. Les recherches sur ces bactéries ont cependant essentiellement porté sur le microbiote intestinal, parce que c'est dans le tube digestif où on en trouve le plus grand nombre, mais aussi parce que c'est là où leur influence sur la physiologie de l'organisme semble déterminante. Il y a 100 milliards de bactéries dans 1 gramme de selles, autant que de cellules qui constituent notre cerveau.

À la question de savoir pourquoi chercheurs et médecins n'ont pris que très récemment conscience de l'importance du microbiote, beaucoup affirment que le retard conceptuel s'explique par les difficultés technologiques. Jusqu'à une époque récente, il était en effet impossible de caractériser les populations bactériennes intestinales impropres à la culture sur les milieux usuels, notamment parce que la plupart d'entre elles sont rapidement détruites au contact de l'oxygène. L'histoire du microbiote n'est pas l'histoire d'une découverte, mais celle d'une conquête patiente, progressive, nourrie de concepts et de technologies imaginés dans différentes disciplines.

La première partie de cette thèse bibliographique est centrée sur la présentation du microbiote intestinal : Qu'est-ce que le microbiote intestinal ? De quoi est-il composé ? Quelles sont ses principales fonctions ?

La deuxième partie de cette thèse présente les enjeux de l'étude du microbiote intestinal : Quel lien existe-t-il entre dysbiose et pathologies ? Et quelles approches thérapeutiques basées sur la modulation du microbiote intestinal sont proposées ?

Et finalement la troisième partie présente un rappel historique des méthodes d'étude du microbiote intestinal avant de détailler celle qui a révolutionné l'étude des flores microbiennes normales et pathologiques : La culturomique.



Partie I :
Généralités sur
le microbiote intestinal



1. Description générale

1.1 . Quelques définitions

Microbiote : communauté microbienne.

Métagénome : ensemble du génome, du transcriptome, du protéome et du métabolome de tous les membres du microbiote.

Noyau du microbiote intestinal humain (« core human gut microbiome ») : série de caractéristiques partagées par la très grande majorité des microbiotes intestinaux humains.

Métagénomique : caractérisation du métagénome.

Microbiomique : champ de recherche en plein développement qui a émergé grâce aux progrès des méthodes de séquençage et met l'accent sur l'utilisation de méthodes indépendantes de la culture pour l'étude de la structure, des fonctions et des opérations dynamiques dans les communautés bactériennes.

Eubiose/dysbiose : termes se rapportant à l'équilibre du microbiote ; on parle d'eubiose quand l'hôte est sain et de dysbiose dans les situations pathologiques [1].

Taxonomie en bactériologie : Nous allons prochainement entrer dans la description du microbiote intestinal, donc il est important de bien distinguer la classification scientifique des bactéries.

La taxonomie est la science qui en biologie étudie la classification des êtres vivants.

La classification actuelle comprend le règne, l'embranchement (ou phylum), la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. L'espèce constitue l'unité de base dans la classification du vivant.

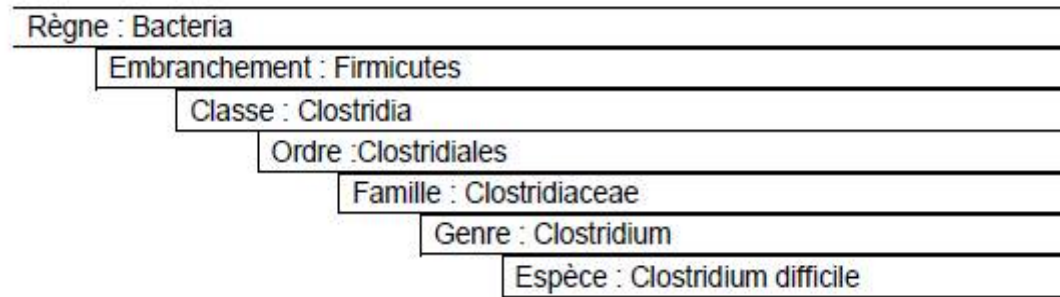


Figure 1: Exemple taxonomie [1]

Cette figure illustre un exemple de taxonomie : l'espèce *Clostridium difficile* appartient au genre Clostridium et au phylum des Firmicutes.

1.2 . Composition du microbiote intestinal

A la naissance, le tube digestif du nourrisson est stérile et sa colonisation débute dès l'accouchement. Le système immunitaire du nouveau né étant immature, son tube digestif est particulièrement permissif et les niveaux de population y atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de selles.

Les différents groupes bactériens colonisent l'intestin selon un schéma relativement organisé dépendant de facteurs exogènes comme l'exposition aux microorganismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée) et environnementale, l'alimentation et parfois l'antibiothérapie, et de facteurs endogènes comme les sécrétions du tube digestif et les produits des premiers microorganismes colonisateurs. Des études récentes indiquent également que le lait maternel contient des bactéries issues du microbiote maternel et qu'il serait donc un vecteur de colonisation du tube digestif.

Bien que les bactéries anaérobies dominant le microbiote intestinal de l'adulte fassent partie des premiers microbes rencontrés lors d'une naissance par voie basse, leur développement en dominance dans l'intestin ne se fera qu'une fois l'oxygène consommé par les bactéries anaérobies facultatives, dans les heures suivant la naissance. La composition du microbiote évolue ensuite pour atteindre une stabilité fonctionnelle vers l'âge de deux à quatre ans. A ce stade, il y a 1000 fois plus de bactéries anaérobies strictes que de bactéries anaérobies facultatives dans le côlon distal et les selles [2].

On estime aujourd'hui que chaque individu adulte héberge en dominance dans ses selles un millier d'espèces bactériennes différentes. La densité bactérienne atteint son maximum dans le côlon distal avec 10^{11} bactéries par gramme de contenu. L'utilisation d'outils moléculaires a montré que la plus grande partie (deux tiers environ) des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu lui est propre.

L'analyse de sa composition en taxa (genres bactériens et/ou grands groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus.

Trois Phyla bactériens (Fig. 2) rassemblant la plus grande part des bactéries fécales dominantes :

- **Firmicutes** : bactéries à gram positif, comprenant tout d'abord le groupe dit «Eubacterium rectale – *Clostridium coccoïdes* » qui est souvent le plus important (14 à 31 % des bactéries totales en moyenne. Ce groupe est composé d'espèces bactériennes appartenant aux genres Eubacterium, Clostridium, Ruminococcus, Butyrovibrio.

Le phylum des Firmicutes comprend également le groupe « *Clostridium leptum* », avec notamment les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*, groupe qui est aussi très souvent dans la dominance (16 à 22 % en moyenne).

- **Bacteroidetes** : sont représentés par les genres apparentés à Bacteroides (Bacteroides, Prevotella et Porphyromonas). Ils sont toujours présents et partagent la dominance avec les groupes précédents (9 à 42 % des bactéries totales suivant les études).

- **Actinobacteria** : ce phylum est moins systématiquement détecté en dominance, mais il représente en moyenne quelques pour cents des bactéries totales. On y trouve les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les bactéries du groupe *Collinsella-Atopobium* (0,3 à 3,7 % en moyenne). Les entérobactéries sont plus rarement observées dans le microbiote fécal dominant (en moyenne 0,4 à 1 %), de même que les lactobacilles et streptocoques (2 %) [3].

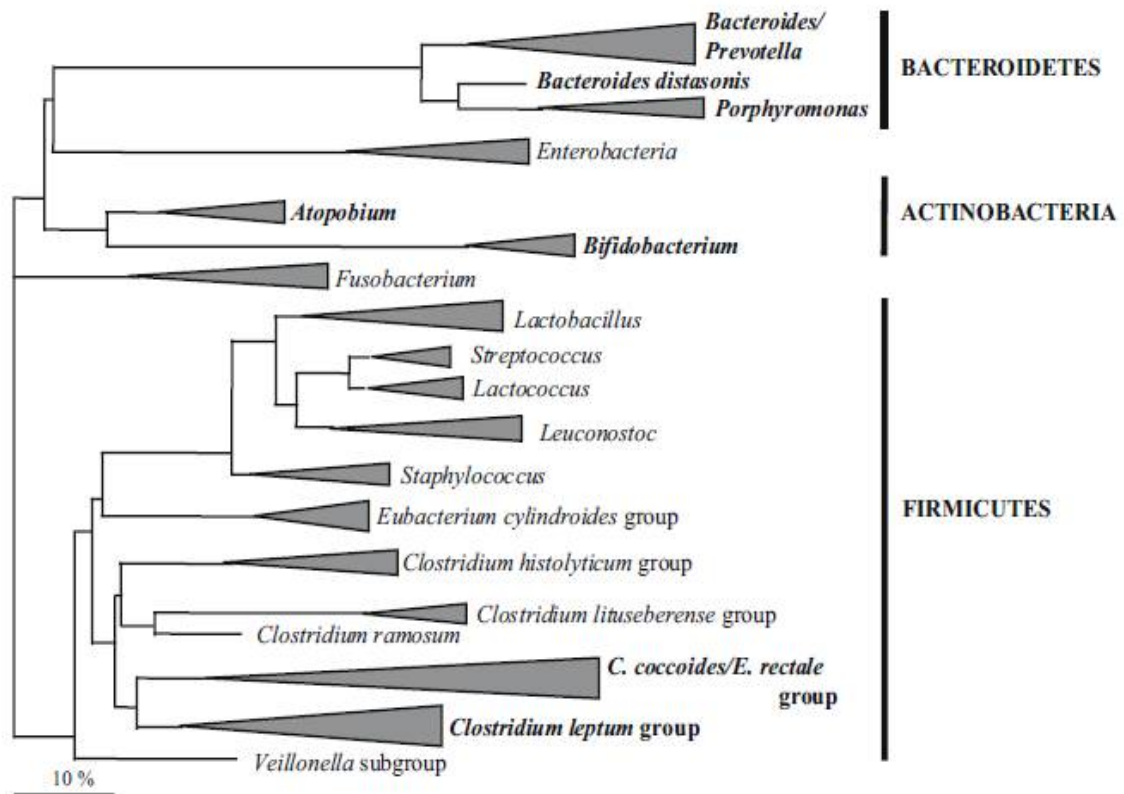


Figure 2: Arbre phylogénétique présentant la majorité des groupes bactériens [3]

Le degré de colonisation du tube digestif augmente au fur et à mesure du tractus, de l'œsophage quasiment stérile au côlon distal pouvant renfermer jusqu'à 10^{12} bactéries.g⁻¹ de contenu (Fig. 3). La flore digestive comprend aussi des Archaea, l'espèce *Methanobrevibacter smithii* étant clairement la plus représentée, divers protozoaires (surtout des amibes, par exemple des espèces *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba moshkovskii*, *Endolimax nana* ou *Iodamoeba butschlii* et des levures, avec surtout des représentants du genre *Candida* [4].

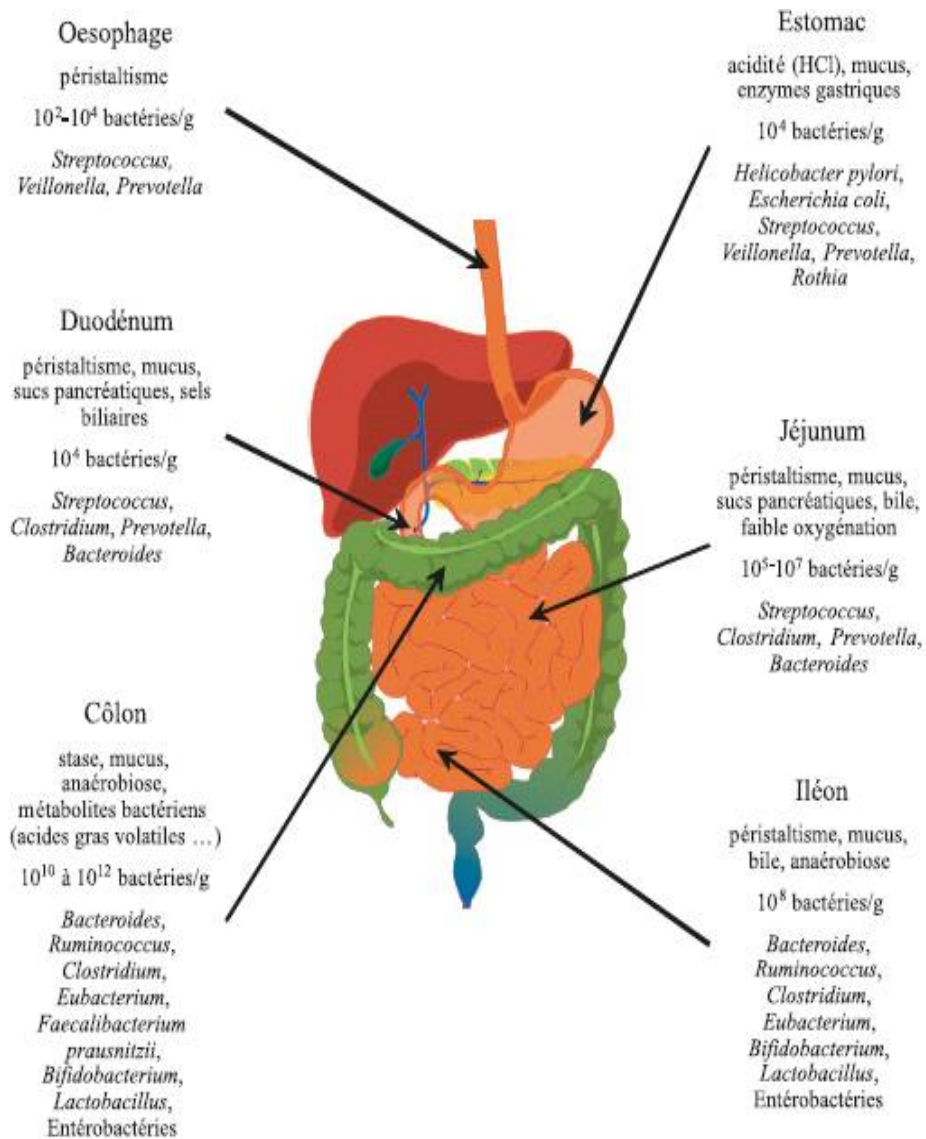


Figure 3: Répartition du microbiote au niveau du tractus gastro-intestinal [4]

1.3 Stabilité et résilience :

Une fois le microbiote adulte mis en place, et si les conditions environnementales ne changent pas, la composition en grands groupes bactériens et en espèces dominantes est stable dans le temps [2]. En revanche, les populations sous dominantes, minoritaires, peuvent varier.

Des facteurs environnementaux peuvent induire des changements majeurs. C'est le cas de changement dans le régime alimentaire : une étude avec un régime alimentaire contrôlé réalisée sur 10 personnes a montré qu'un changement dans la composition du microbiote intestinal était détectable dans les 24 heures qui suivent un régime riche en graisse/pauvre en fibres ou un régime pauvre en graisse/riche en fibres mais les entérotypes restaient stables durant les 10 jours d'étude. Cette étude a confirmé la présence de 2 entérotypes lors de l'analyse du microbiome de 98 sujets. Elle a montré que les entérotypes sont liés à des régimes alimentaires pris sur du long terme. L'entérotipe Bacteroides est associé à un régime riche en protéines et en graisse animales tandis que l'entérotipe Prevotella est associé à un régime riche en carbohydrates [5].

La stabilité à long terme du microbiote intestinal a été également étudiée à l'aide du biopuce HITCHIP (Human Intestinal Tract Chip) contenant plus de 1000 phylotypes microbiens du tractus gastro-intestinal. Le principe de la puce à ADN reposant sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il se trouve en face d'un brin complémentaire (réaction d'hybridation). L'étude réalisée sur 5 personnes non apparentées et en bonne santé sur une très longue durée a montré que la composition du microbiote :

- Commençaient à varier au bout de 10 à 12 ans concernant Bacteroides.
- Était affectée à court terme par l'antibiothérapie car les prélèvements effectués immédiatement après la prise d'antibiotiques étaient dominés par le phylum Firmicutes. Les auteurs considéraient que lorsque les mêmes sondes s'hybridaient avec tous les prélèvements d'un même sujet, ils indiquaient la présence d'un noyau stable tandis que la détection d'un seul microorganisme dans un seul échantillon révélait que sa présence était accidentelle dans le microbiote.
- Variait en fonction des races et de régime alimentaire à long terme

Plusieurs genres bactériens anaérobies dont *Bifidobacterium* et un certain nombre de genres appartenant aux phylums Bacteroidetes et Firmicutes étaient relativement plus stables que le microbiote total. Bien que le microbiote intestinal d'une personne contienne des espèces qui restent stables durant des années, leur abondance relative peut varier considérablement. Les auteurs de cette étude ont conclu que Les variations dues à l'environnement se produisent tout au long de la vie et affectent principalement l'abondance mais pas la présence d'espèces microbiennes spécifiques ce qui fait que ces variations quantitatives modifient le profil des entérotypes au cours de la vie [6].

L'antibiothérapie peut altérer considérablement le microbiote intestinal. Une étude [7] a montré que l'administration d'antibiotiques chez l'enfant durant le premier mois de vie entraîne une diminution de l'abondance de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides fragilis*. Cette altération du microbiote pouvant favoriser par la suite la colonisation par des espèces opportunistes résistantes aux antibiotiques.

Donc, les traitements médicamenteux, ou un régime peuvent modifier la composition du microbiote intestinal, mais l'écosystème bactérien a une aptitude à être résilient et à retrouver son état d'équilibre. Cependant, les mauvaises habitudes alimentaires sur le long terme peuvent entraîner une modification durable du microbiote.

2. Principales fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote, la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, le rôle de barrière à la colonisation par les micro-organismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal et les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte. Le microbiote intestinal doit ainsi être considéré dans son contexte environnemental, incluant l'hôte et l'aliment.

Les interrelations entre ces différents constituants assurent l'homéostasie de l'écosystème microbien digestif. Toute rupture de l'équilibre entre ces constituants est susceptible de perturber le fonctionnement de l'écosystème et d'être à l'origine de pathologies digestives (fonctionnelles, inflammatoires, infectieuses...) [8].

Pour démontrer les fonctions du microbiote intestinal, la communauté scientifique a comparé des animaux nés et élevés en conditions stériles et donc dépourvus de microbiote intestinal : animaux axéniques avec des animaux naturellement colonisés par un microbiote : animaux conventionnels.

2.1. Fonction de protection et de barrière :

L'intestin constitue la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. La paroi intestinale a un double rôle :

- Absorption des nutriments.
- Assurance d'une fonction de barrière en empêchant l'intrusion dans l'organisme de bactéries potentiellement pathogènes, de virus et de toxines.

Cette barrière est constituée par plusieurs acteurs aux fonctions complémentaires. Premièrement, le mucus et l'épithélium intestinal qui assurent un rôle de barrière physique séparant nettement les composés présents dans la lumière de la muqueuse.

Ensuite, les cellules épithéliales possédant la capacité de sécréter des peptides antimicrobiens et autres défencines et donc d'ériger ce que l'on pourrait appeler une barrière chimique. Cette barrière permet la destruction des agents pathogènes avant leur entrée dans la muqueuse. Enfin, un important dispositif immunitaire constitué d'anticorps et de cellules aux propriétés phagocytaires et cytotoxiques est mis en place dans la muqueuse intestinale (Fig. 4).

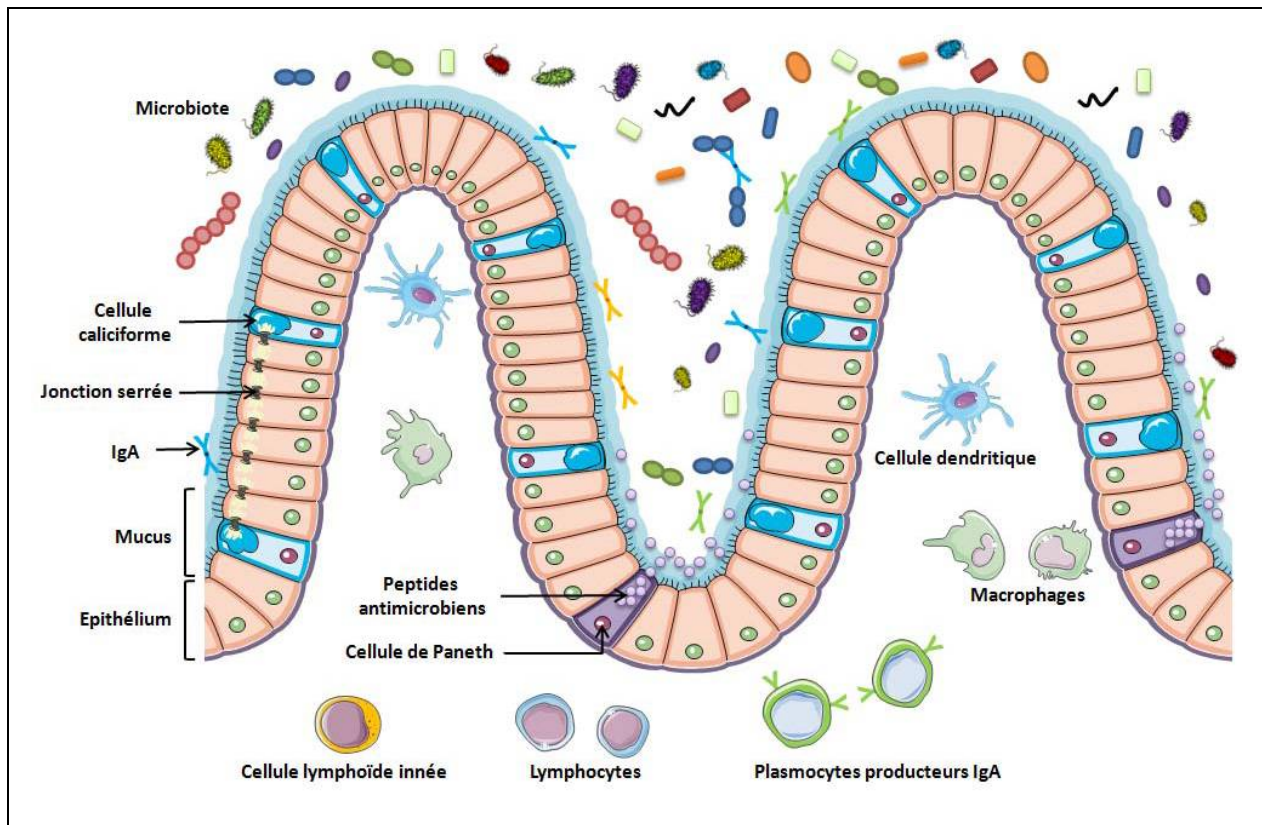


Figure 4: Organisation schématique de la barrière intestinale [9]

La barrière intestinale est constituée d'une couche de mucus (en bleu) tapissant l'épithélium (en rose). Le mucus contient des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth (violet) et des anticorps IgA (Immunoglobulines de type A) produit par les plasmocytes (en vert). Les cellules épithéliales sont reliées au pôle apical par des jonctions serrées limitant les espaces intercellulaires et assurant l'étanchéité relative de l'épithélium. Un important contingent de cellules immunitaires est présent dans la muqueuse comme les macrophages, les cellules dendritiques, les plasmocytes, les lymphocytes et les cellules lymphoïdes innées. Ces cellules vont prendre en charge les composés bactériens, les virus ou encore les toxines capables de traverser l'épithélium.

2.1.1. Microbiote et mucus :

L'intestin est tapissé par une couche de mucus intestinal produite par des cellules dites caliciformes. La fonction majeure attribuée au mucus c'est la protection de l'épithélium intestinal. Ce mucus est composé de grandes protéines fortement glycosylées : les mucines. Dans l'intestin grêle, le mucus est constitué d'une seule couche peu épaisse. A l'opposé, le mucus du côlon est plus épais et réparti en deux couches : une couche interne dense et attachée à l'épithélium et une couche externe plus lâche dans laquelle séjourne certaines bactéries du microbiote. La présence de mucus est indispensable à une bonne cohabitation entre les bactéries et l'hôte. En effet, le rôle premier du mucus est de tenir à distance les bactéries commensales de l'épithélium et ainsi éviter une trop grande stimulation du système immunitaire. Dans les conditions physiologiques, la couche interne de mucus (au contact de l'épithélium) est considérée comme stérile. Le mucus colique est structuré autour d'un réseau de mucines 2 sécrétées par les cellules caliciformes. Lorsque des souris sont invalidées pour le gène codant pour la mucine 2 on constate un contact direct entre le microbiote et l'épithélium, dans ces conditions, les souris développent spontanément une colite très sévère associée à une inflammation intestinale majeure [10]. D'une manière générale, selon les études la défaillance de cette barrière protectrice permettant le contact entre l'épithélium et le microbiote conduit à une inflammation intestinale [11].

Au-delà de son rôle protecteur, le mucus constitue une source de carbones non négligeable pour certaines bactéries intestinales dites mucolytiques. La dégradation des mucines par des exoglycosidases et des protéases bactériennes peut produire des monosaccharides utilisables comme source énergétique et des acides aminés. De plus, des travaux récents ont montré qu'en plus de se nourrir de mucus les bactéries intestinales pouvaient contrôler son épaisseur [12].

Ce qu'il faut noter, c'est que, la présence du microbiote intestinal régule la composition du mucus qui recouvre et protège la muqueuse intestinale.

2.1.2. Microbiote et épithélium intestinal :

Les épithélia sont des tissus de revêtement recouvrant la surface externe et les cavités internes de l'organisme. Ils sont constitués d'une ou plusieurs couches de cellules juxtaposées et reliées entre elles par des jonctions intercellulaires. Par exemple, la barrière épithéliale de la peau (épiderme) est la barrière biologique la plus imperméable du corps. Elle est constituée de plusieurs couches de cellules et elle prévient des agressions et de l'infection systémique. L'épithélium du tubule rénal, quant à lui, assure le transport actif et passif de solutés afin de maintenir la composition correcte de l'urine et du sang. Pour ce faire, il est constitué d'une monocouche de cellules permettant ainsi un meilleur transport. La barrière épithéliale intestinale a une charge beaucoup plus difficile : elle doit défendre l'organisme contre l'environnement extérieur, comme la peau, mais également assurer un transport actif et passif, comme le tubule rénal. Pour cela, l'épithélium est constitué d'une seule couche de cellules reliées entre elles par des jonctions serrées. Cette monocouche cellulaire n'est pas plane mais elle forme de nombreux replis appelé villosités qui favorisent l'absorption des nutriments. Ces villosités sont particulièrement longues dans l'intestin grêle et quasiment inexistantes dans le côlon où la surface épithéliale est plane.

Plusieurs populations cellulaires composent cet épithélium : les entérocytes, les cellules endocrines, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules M et les cellules souches intestinales.

Les entérocytes constituent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium intestinal. Ce sont les cellules impliquées dans l'absorption des nutriments.

Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones gastro-intestinales impliquées dans la motricité du tube digestif, le contrôle de la prise alimentaire, ou la régulation de la glycémie.

Les cellules caliciformes sécrètent le mucus.

Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens. Ces cellules se situent dans l'intestin grêle et sont particulièrement abondantes dans l'iléon.

Les cellules souches sont situées au fond des cryptes villositaires. Elles peuvent se différencier en tous les autres types cellulaires de l'épithélium. Le renouvellement de l'épithélium intestinal est très rapide, en seulement quelques jours toutes les cellules sont remplacées.

L'ensemble de ces cellules est relié par des jonctions intercellulaires. Il existe plusieurs types de jonctions permettant l'étanchéité et la cohésion mécanique de l'épithélium. Les jonctions serrées sont situées au pôle apical des cellules épithéliales (Fig. 5).

En condition physiologique, ces jonctions ne laissent passer que des molécules hydrosolubles de faible poids moléculaire. La description de ces jonctions serrées donne l'impression d'une structure figée, une sorte de ciment inerte entre les entérocytes. C'est tout le contraire et la perméabilité paracellulaire est finement régulée au cours du temps [9].

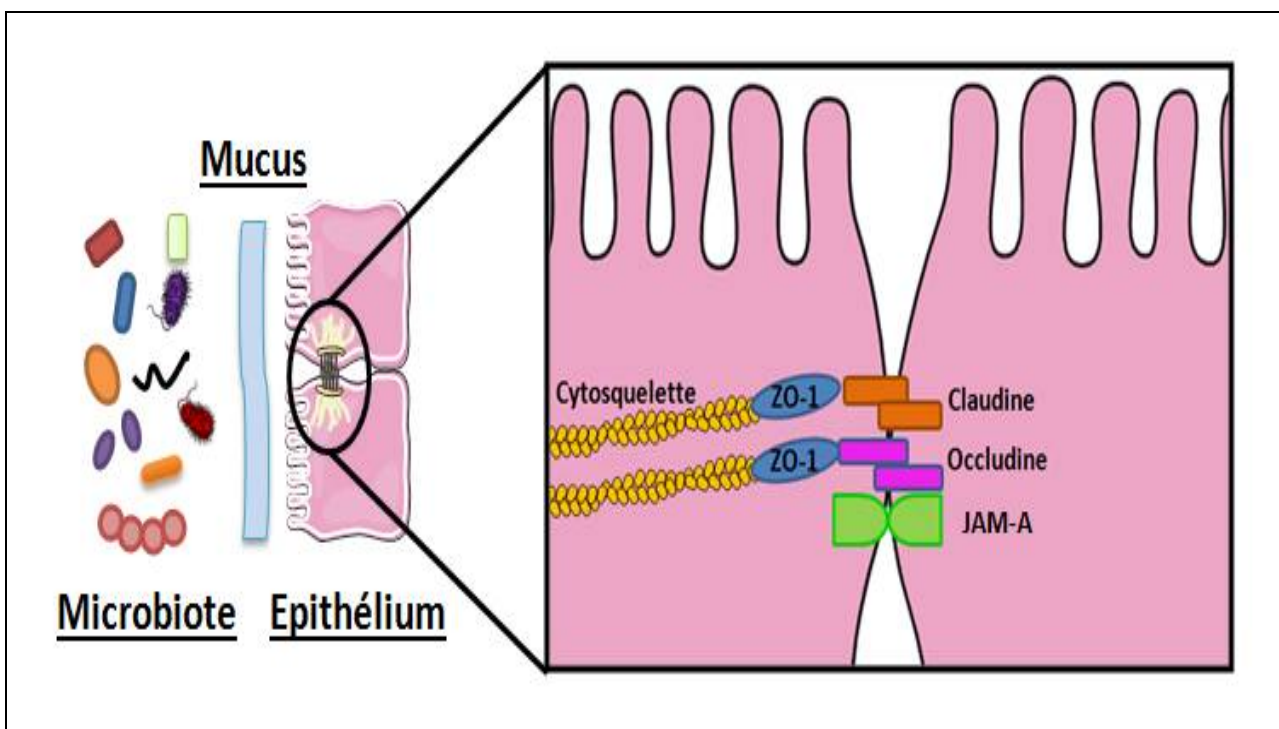


Figure 5: Organisation schématique d'une jonction serrée [9]

Les jonctions serrées sont constituées de plusieurs types de protéines. Des protéines transmembranaires : Claudine, Occludine et JAM-A qui assurent le rapprochement des membranes plasmiques de 2 cellules épithéliales adjacentes, et des protéines comme ZO-1 qui permettent la liaison des protéines transmembranaires aux filaments du cytosquelette. Les jonctions serrées sont présentes au pôle apical des entérocytes et limitent le passage de composés entre les cellules épithéliales intestinales (ZO-1 : Zonula Occludens 1; JAM-A Junctional Adhesion Molecule-A).

L'épithélium intestinal joue un rôle important dans la coordination des défenses intestinales. En effet celui-ci n'est pas seulement une barrière passive, il joue également un rôle d'interface privilégié pour les dialogues entre le microbiote intestinal et l'organisme.

Les cellules de l'épithélium possèdent plusieurs types de récepteurs capables de reconnaître des fragments bactériens comme les récepteurs TLR (Toll Like Receptor) ou NOD like receptor (Nucleotide Oligomerisation Domain like receptor). Ces récepteurs reconnaissent des fragments contenus dans la paroi des bactéries comme les LPS (LipoPolySaccharides) ou les peptidoglycanes ou de l'ADN bactérien. Ils peuvent être localisés à la membrane (TLR) ou dans le cytoplasme des entérocytes (NOD like récepteur).

L'activation de ces récepteurs peut aboutir à la libération de mucus par les cellules caliciformes ou de peptides antimicrobiens par les entérocytes. Ces sécrétions vont alors limiter le contact entre les cellules épithéliales et le microbiote.

Une nouvelle étude a mis en évidence un nouveau mécanisme par lequel l'épithélium garde ses distances avec le microbiote. Les auteurs de l'étude ont pu montrer que l'épithélium intestinal est capable de sécréter une protéine pouvant bloquer le déplacement des bactéries dotées d'un flagelle. Cette protéine nommée Lypd8 peut se lier au flagelle des bactéries et diminuer fortement leur migration dans le mucus. Par ailleurs, chez les souris invalidées pour Lypd8, la couche interne de mucus est habitée par les bactéries flagellées et ces souris développent facilement une inflammation intestinale [13].

Le microbiote intestinal est également capable de moduler l'épithélium et la perméabilité des jonctions serrées. En effet, la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote va permettre la production d'acides gras à chaîne courte qui constituent la principale source énergétique des entérocytes du côlon. Chez les souris axéniques, les entérocytes n'ont pas de butyrate comme source énergétique. Dans ces conditions ils arborent un phénotype caractéristique d'une cellule privée d'énergie : leurs taux d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide + H⁺) intracellulaires sont faibles, le cycle de Krebs est ralenti et les cellules initient des processus d'autophagies. L'autophagie est la dégradation d'une partie des constituants du cytoplasme d'une cellule par ses propres lysosomes. Elle peut être induite par les conditions de stress cellulaire tels qu'une carence en nutriment comme c'est le cas dans cette étude [14] [15] : La supplémentation en butyrate chez des souris axéniques permet de corriger ces phénomènes en apportant une source énergétique aux entérocytes. De plus, la colonisation du tractus digestif d'une souris axénique par des bactéries intestinales est capable de modifier complètement le métabolisme des entérocytes aussi bien coliques que jéjunaux.

Ces résultats mettent en évidence le rôle majeur des bactéries sur le métabolisme de l'épithélium intestinal, ainsi sur la fonction de barrière et protection.

2.2. Fonctions métaboliques :

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques, parmi elles, la fermentation des substrats joue un rôle majeur dans le maintien de la santé de l'hôte.

Les capacités métaboliques du microbiote intestinal humain sont corrélées à la nature des substrats disponibles pour la fermentation colique. Ces substrats sont d'origine endogène (sécrétions biliaires, mucus, cellules épithéliales desquamées) ou exogène (substrats alimentaires, xénobiotiques) ainsi, une grande variété est disponible pour la fermentation par le microbiote intestinal, ce qui contribue à maintenir la biodiversité bactérienne de cet écosystème.

Les métabolites issus de la fermentation produits par les micro-organismes intestinaux sont pour une large part absorbés et utilisés par l'hôte. Bien que la plupart d'entre eux soient bénéfiques pour la santé, quelques-uns pourraient aussi avoir des effets délétères.

Les interactions entre l'alimentation, le microbiote intestinal et l'hôte jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie de l'écosystème. Toute rupture de cet équilibre est susceptible de modifier les fonctionnalités du microbiote intestinal et de conduire à une situation pathologique comme nous allons voir dans les chapitres qui suivent.

Dans cette partie, nous allons présenter les principales fonctions métaboliques du microbiote intestinal humain.

2.2.1. Métabolisme des glucides :

Les substrats provenant de l'alimentation se composent principalement d'hydrates de carbone non digérés dans la partie supérieure du tube digestif. Provenant principalement des céréales, des légumes et des fruits, ces hydrates de carbone sont essentiellement composés d'amidon résistant, des polysaccharides végétaux (issus de la paroi cellulaire et des réserves) et de certains oligosaccharides et sucres comme l'inuline, les gommes, les mucilages ou les fructooligosaccharides. La quantité totale de polysaccharides alimentaires qui atteint chaque jour le côlon varie, selon le régime, de 10 à 40 g. L'écosystème intestinal humain est bien adapté à l'utilisation d'une large gamme des polysaccharides présents. Leur dégradation anaérobie est un processus complexe qui met en jeu plusieurs groupes fonctionnels de micro-organismes (Fig. 6).

Les différents micro-organismes interagissent pour former une chaîne trophique qui assure la conversion des macromolécules en AGCC et en gaz. La première étape de cette chaîne est l'hydrolyse des polysaccharides par les bactéries hydrolytiques, qui aboutissent à la libération de fragments plus petits. Les produits de la fermentation des sucres par les micro-organismes hydrolytiques et glycolytiques incluent des métabolites intermédiaires comme le formate, l'éthanol, le succinate, le lactate et l'hydrogène, qui ne s'accumulent pas dans l'écosystème mais sont à leur tour métabolisés par d'autres espèces bactériennes en produits finaux.

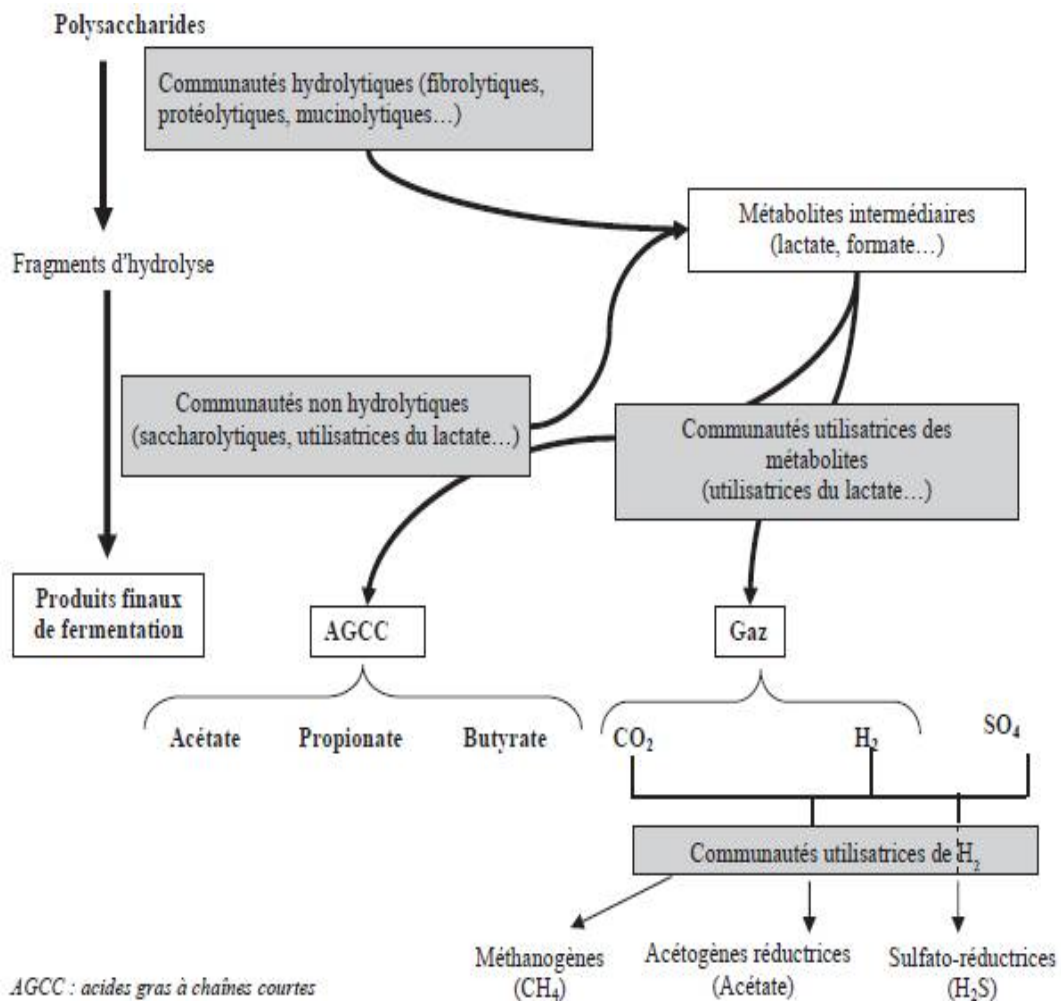


Figure 6: Interactions nutritionnelles au cours de la dégradation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain [16]

La dégradation des polysaccharides met en jeu une série d'enzymes d'hydrolyse (polysaccharidases, glucosidases...) qui ne sont pas produites par l'hôte. Cette fonction d'hydrolyse est essentielle, car elle fournit aux bactéries du carbone et de l'énergie à partir des sucres et/ou des oligosaccharides ainsi libérés. Les principales espèces bactériennes pour lesquelles une activité hydrolytique a été démontrée appartiennent aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi qu'à certaines espèces de *Clostridium*, *Eubacterium* et *Enterococcus*. L'activité des diverses hydrolases mise en évidence dans les

échantillons fécaux est associée pour l'essentiel à la fraction bactérienne, en particulier l'activité hydrolytique impliquée dans la dégradation des polysaccharides insolubles comme la cellulose ou les hémicelluloses [16], dans ce cas, l'activité hydrolase la plus élevée est mesurée dans la fraction bactérienne associée aux particules alimentaires.

En dépit de la vaste diversité des hydrates de carbone disponibles et du grand nombre d'espèces capables d'en assurer la fermentation, le nombre de voies métaboliques par lesquelles ces substrats sont catabolisés est relativement limité (Fig.7).

La majorité des espèces bactériennes utilisent la glycolyse pour convertir les hydrates de carbone en pyruvate. Le pyruvate est ainsi le métabolite central de ces processus de fermentation ; emprunte ensuite différentes voies pour être converti en produits de fermentation qui représentent les accepteurs finaux d'électrons.

Les principaux métabolites formés sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Cependant, certaines espèces bactériennes produisent également des métabolites intermédiaires, comme le succinate, le lactate, l'acrylate, l'éthanol, le formate ou encore H₂ et CO₂, qui ne s'accumulent pas dans l'écosystème puisqu'ils sont rapidement métabolisés *in situ* par d'autres espèces bactériennes en métabolites principaux.

Les principaux (acétate, propionate et butyrate) AGCC sont rapidement absorbés par les cellules épithéliales, puis métabolisés dans différents organes (épithélium intestinal, foie, muscle, cerveau...).

Dans le côlon humain, les deux voies possibles de biosynthèse du propionate (la voie du succinate et celle de l'acrylate) pourraient coexister, La formation de propionate via la décarboxylation du succinate est sans doute la voie principale [17].

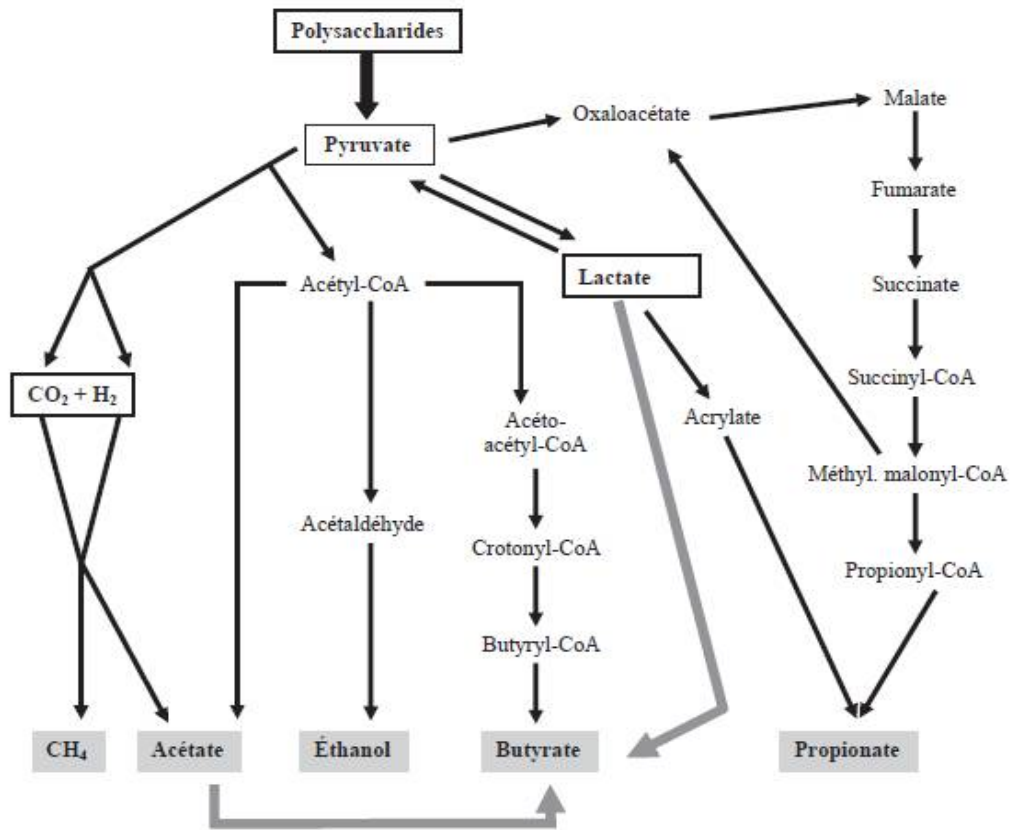


Figure 7: Principales voies métaboliques de la fermentation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain [17]

2.2.2. Métabolisme des gaz :

L'hydrogène représente l'un des gaz majoritairement formé lors de ces processus fermentaires (Fig. 7). En effet, des quantités importantes de H₂ sont produites chaque jour dans le côlon (environ 300 ml/g de substrat fermenté). Son élimination de l'écosystème est fondamentale au maintien de l'efficacité du processus fermentaire. Il est ainsi en partie excrété par voies pulmonaire et anale, la majeure partie de H₂ étant réutilisée *in situ* par les micro-organismes hydrogénotrophes (Fig. 6). Bien qu'intervenant en fin de chaîne trophique, ces microorganismes hydrogénotrophes jouent un rôle fondamental en maintenant la pression partielle en hydrogène à un niveau faible (oxydation plus complète des substrats et augmentation du gain total d'ATP pour le microbiote). La production de méthane par les

archaea méthanogènes dans le côlon représente une des voies du métabolisme de H₂. Toutefois, seule une fraction de la population adulte (30 % à 50 %) héberge des méthanogènes. L'aptitude à produire ou non du méthane a permis de distinguer deux groupes de sujets, selon qu'ils excrètent ou non ce gaz (sujets méthano-excréteurs et non-méthano-excréteurs), le déterminisme de ce statut de méthano-excrétion chez l'homme reste toutefois encore inconnu. L'archaea méthanogène prédominante chez les sujets méthanoexcréteur est *M smithii*. Chez les sujets non-méthano-excréteurs, des voies hydrogénotropes alternatives à la méthanogenèse ont été mises en évidence, parmi lesquelles l'acétogenèse réductrice (synthèse d'acétate à partir de H₂ et CO₂). Les espèces acétogènes hydrogénotropes appartiennent à divers genres bactériens (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*), cette même fonction étant donc retrouvée chez des taxons très diversifiés.

La sulfato-réduction, qui correspond à la réduction du sulfate en H₂S, représente également une voie hydrogénotrope mise en évidence au sein de l'écosystème colique. La réduction du sulfate par l'H₂ conduit à la formation de sulfures, composés potentiellement toxiques pour les cellules eucaryotes. Les espèces sulfato-réductrices du côlon humain appartiennent à différents genres bactériens, le genre prédominant étant *Desulfovibrio*. L'activité hydrogénotrope de cette communauté sulfato-réductrice est dépendante de la quantité de sulfate disponible dans l'écosystème, provenant soit de substrats alimentaires sulfatés soit de sécrétions endogènes. La disponibilité en sulfate étant vraisemblablement différente en fonction du régime alimentaire et des sécrétions de mucus, les micro-organismes sulfatoréducteurs doivent donc être capables de s'adapter à des variations importantes de concentration en sulfate dans l'écosystème [8].

2.2.3. Métabolisme des protéines :

Quantitativement, le métabolisme des protéines est moins important que celui des polysaccharides, en particulier dans le côlon proximal. On estime que la quantité totale de composés riches en azote dans le côlon varie de 6 à 18 g par jour, dont 1 à 2 g provenant de l'iléon. Certaines protéines alimentaires sont capables d'atteindre le côlon, la quantité variant en fonction du régime et de la structure des protéines de la nourriture, mais les principales sources d'azote sont les substrats générés par l'hôte.

Les substrats endogènes proviennent à la fois de l'intestin grêle et du côlon (enzymes pancréatiques, sécrétions biliaires, desquamation des cellules épithéliales, mucines, etc.). À la différence de la fermentation des glucides, la dégradation des protéines dans le côlon génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indoles, ammoniac, amines...). Cette biodégradation nécessite la contribution de différentes espèces bactériennes dotées d'activités complémentaires (protéases, désaminases, décarboxylases...) qui interagissent pour assurer la dégradation et le métabolisme des protéines. En stimulant la protéosynthèse bactérienne, la fermentation des glucides contribue pour une large part à diminuer la quantité de métabolites toxiques issus de la protéolyse.

Les protéines et les peptides sont les principales sources d'azote dans le côlon. Les bactéries intestinales hydrolysent ainsi ces molécules afin d'obtenir le carbone et l'azote qui entrent dans leur composition. La protéolyse est de ce fait un processus fondamental dans le côlon. La structure et la solubilité des protéines ainsi que leur temps de transit sont probablement des facteurs importants. Le pH intraluminal joue également un rôle, car le pH optimal des protéases est proche de la neutralité. Les facteurs qui modulent le pH colique, comme la production d'acides au cours de la fermentation des glucides, sont ainsi capables de moduler l'activité protéolytique au sein de l'écosystème. Les protéases bactériennes devraient par conséquent être particulièrement actives dans le côlon distal, où le pH est proche de 7,0.

L'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques (protéases) aboutit à la libération de peptides (Fig.8). Les peptides peuvent être assimilés par différentes espèces bactériennes. Leur utilisation s'accompagne souvent de l'excrétion d'acides aminés non essentiels pour leur croissance bactérienne, qui deviennent potentiellement disponibles pour d'autres espèces bactériennes coliques incapables de digérer les peptides.

La fermentation des acides aminés met en jeu des réactions d'oxydation et de réduction variées, avec des accepteurs finaux d'électrons très divers (acides gras insaturés, autres acides aminés, H₂, etc.). La désamination des acides aminés, qui conduit à la formation d'AGCC et d'ammoniac, apparaît comme la voie principale utilisée par les espèces bactériennes du côlon. L'acétate, le propionate et le butyrate sont les principaux métabolites produits. Cependant, une large gamme d'autres composés sont également formés au cours du métabolisme des

acides aminés, comme les phénols, les acides dicarboxyliques et les acides gras ramifiés (isobutyrate, 2-méthylbutyrate, isovalérate). Les acides gras ramifiés pourraient être considérés comme des marqueurs de la protéolyse dans le côlon. La concentration de ces métabolites augmente significativement du côlon proximal au côlon distal. Le phénol et l'indole issus de la décomposition des acides aminés aromatiques par certaines espèces de *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont absorbés et détoxifiés par la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. Une augmentation de la formation de phénol et d'indole a cependant été décrite en association à diverses situations pathologiques chez l'homme, notamment en cas de cancer du côlon.

La majeure partie de l'ammoniac produit dans le côlon provient de la désamination des acides aminés et la contribution de l'urée à cette production est mineure (Fig.8).

L'ammoniac formé par le microbiote intestinal est absorbé par la muqueuse colique et transporté par la veine porte jusqu'au foie, où il est converti en urée, qui est excrétée dans l'urine. L'ammoniac est aussi la principale source d'azote pour un très grand nombre d'espèces bactériennes dans le côlon. À l'intérieur de la cellule bactérienne, des aminotransférases permettent aussi, grâce au transfert de l'ammoniac sur les squelettes carbonés, la synthèse d'acides aminés nécessaires à la bactérie. L'ammoniac est un composé potentiellement toxique pour l'hôte. Dès les faibles concentrations (5-10 mmol), ce métabolite peut être délétère pour la morphologie et le métabolisme intermédiaire des cellules intestinales, et augmenter la synthèse de l'ADN. L'ammoniac pourrait de ce fait être impliqué dans les mécanismes d'initiation du cancer colique. La concentration d'ammoniac dans le côlon résulte d'un équilibre entre la désamination des acides aminés par les bactéries et de l'utilisation de l'ammoniac par les cellules pour leur biosynthèse. En stimulant la synthèse des protéines, la fermentation des glucides contribue à diminuer la concentration d'ammoniac dans la lumière colique [17].

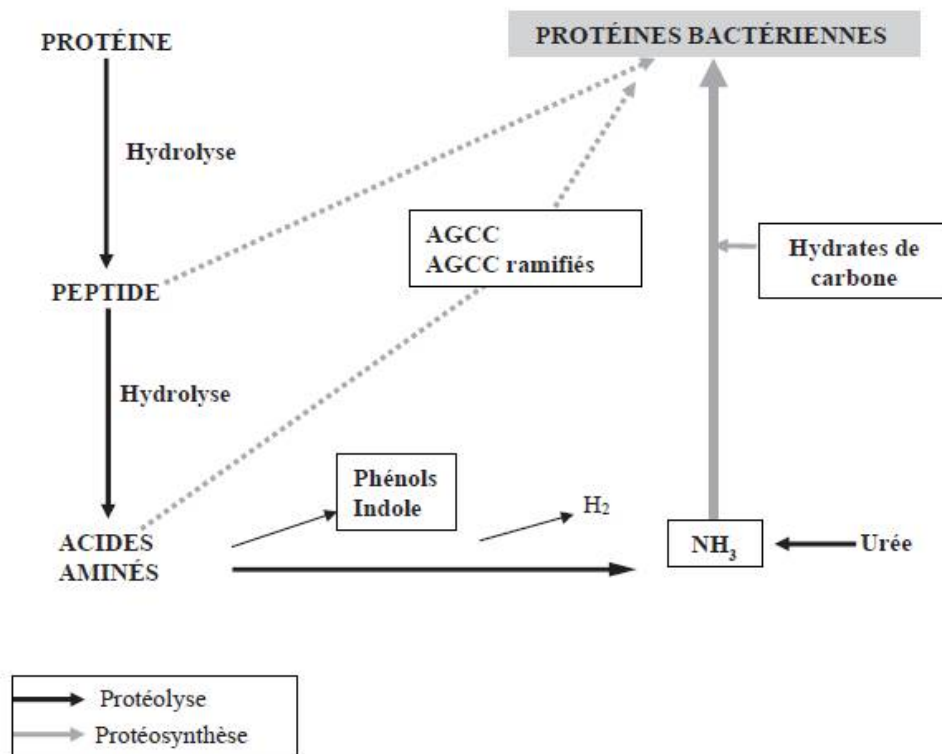


Figure 8: Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal humain [17]

2.2.4. Métabolisme des lipides :

Chez l'homme, la quantité de lipides totaux qui parviennent dans le côlon en conditions physiologiques a été évaluée entre 5 et 8 g par jour, ce chiffre pouvant être considérablement augmenté en situations pathologiques (insuffisance pancréatique, résections intestinales, cholestase...). Ces lipides se retrouvent au contact du microbiote intestinal, porteur d'une multitude d'activités enzymatiques (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) pouvant s'exercer sur les lipides. De nombreuses espèces bactériennes possèdent ainsi des lipases permettant d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues. La bio-hydrogénation des acides gras (AG) insaturés par le microbiote intestinal est quant à elle connue de longue date, révélée par le fait qu'une forte proportion des AG dosés dans les selles de rats conventionnels sont saturés, cette proportion étant nettement plus faible chez le rat axénique. Cependant, tous les AG ne subissent pas ces transformations puisque les AG insaturés à 18 carbones sont

réduits par le microbiote intestinal, tandis que les AG à 20 ou 22 carbones ne seraient pas métabolisés. L'hydroxylation de l'acide oléique en acide 10-hydroxy-stéarique constitue un autre exemple du métabolisme des lipides par le microbiote intestinal. Elle consiste en la simple addition d'une molécule d'eau sur la double liaison de l'acide oléique.

Enfin, de nombreux microorganismes, notamment des bactéries Gram-positives, possèdent des activités phospholipasiques. Il existe ainsi des phospholipases et des sphingomyélinases bactériennes différant par la spécificité de leurs substrats et par leurs produits d'hydrolyse. Certains de ces produits, tels les diglycérides et inositol triphosphates, peuvent pénétrer dans les cellules de l'hôte et agir comme messagers intracellulaires, en particulier au sein de voies de signalisation qui contrôlent l'expression de gènes. Il est intéressant de noter que le taux de conversion de la phosphatidylcholine en *sn*-1,2-DG par des cultures de selles humaines, ainsi que la concentration de *sn*-1,2-DG dans les selles brutes, sont extrêmement variables d'un individu à l'autre. L'ensemble de ces données suggère que pour une même quantité et qualité de lipides parvenant au côlon, les métabolites formés diffèrent d'un individu à l'autre en fonction de la composition de son microbiote intestinal, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi tous les individus ne répondent pas de la même façon à un régime alimentaire, en particulier riche en lipides. Le côlon reçoit également jusqu'à 1 g par jour de cholestérol.

En effet, malgré des variations inter-individuelles importantes, seule la moitié du cholestérol alimentaire est absorbée en moyenne, principalement dans le duodénum et le jéjunum proximal. À cela s'ajoute le cholestérol provenant de la sécrétion biliaire, de la desquamation des muqueuses intestinales et de la sécrétion transépithéliale. Dès les années 1930, il a été montré que le microbiote intestinal était capable de convertir ce cholestérol. Ce métabolisme microbien, pour lequel deux voies (directe et indirecte) ont été proposées, aboutit à la réduction du cholestérol en coprostanol, non absorbé par l'intestin et éliminé dans les fèces (Fig. 9). Il a ensuite été montré que chez les rats axéniques, l'absorption du cholestérol était augmentée tandis que son excrétion fécale était réduite, aboutissant à une accumulation plus importante de cholestérol dans le foie par rapport à des rats conventionnels. Plusieurs études ont par ailleurs montré que ce métabolisme du cholestérol suit une répartition

bimodale au sein de la population humaine : chez la majorité des individus, plus de 70 % du cholestérol est ainsi métabolisé par le microbiote, alors que pour une minorité, moins de 20 % du cholestérol est transformé. Il a ensuite été observé que cette répartition est directement liée au nombre de bactéries réductrices de cholestérol présentes dans le tube digestif, une population supérieure ou égale à 10^8 /g de contenu digestif étant nécessaire pour une conversion totale du cholestérol intestinal [18].

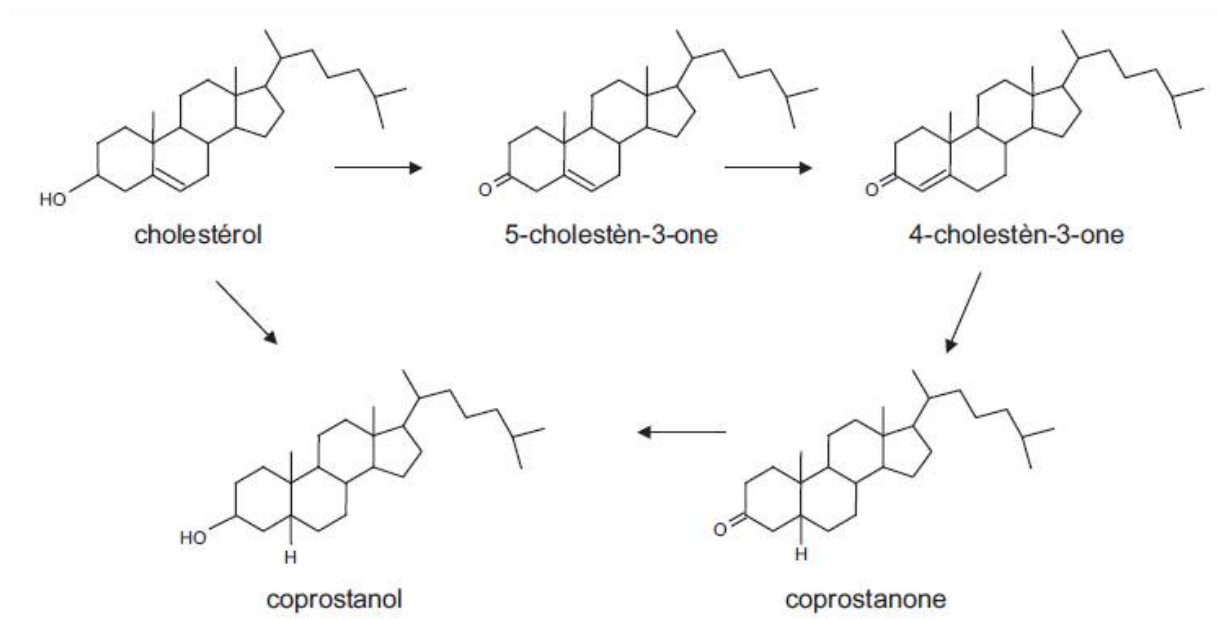


Figure 9: Voies directes et indirectes pour la conversion du cholestérol en coprostanol par le microbiote intestinal [18]

2.2.5. Synthèse de vitamines :

L'être humain n'est pas capable de synthétiser les vitamines, cofacteurs essentiels pour les fonctions cellulaires et le développement. Une déficience en une ou plusieurs vitamines peut avoir un effet délétère important. Par conséquent, il est nécessaire d'obtenir ces vitamines de manière exogène.

Les deux sources de vitamines sont l'alimentation et le microbiote intestinal. En effet, les bactéries sont capables de synthétiser une grande variété de vitamines telles que la biotine (vitamine H), la famille des vitamines B (B1, B2, B5, B6, B7, B9 et B12), la vitamine K. Il a été montré que les voies métaboliques de biosynthèse du folate (vitamine B9), de la thiamine (vitamine B1), de la pyridoxine (vitamine B6) ainsi que de la cobalamine (vitamine B12) sont fortement représentées dans le métagénome du microbiote colique humain [19].

Les cellules épithéliales humaines sont capables d'absorber ces vitamines grâce à des systèmes de transport efficaces.

2.3. Maturation et fonctionnement du système immunitaire :

2.3.1. Organisation des défenses spécifiques :

Le système immunitaire associé aux muqueuses est un organe lymphoïde secondaire, au même titre que les ganglions et la rate. On retrouve des structures d'architecture similaire dans ces organes : des follicules primaires ou secondaires (c'est-à-dire ayant un centre germinatif), contenant des lymphocytes B, des cellules dendritiques folliculaires et quelques lymphocytes T ; entourant ces follicules, une zone contenant des lymphocytes T, des cellules dendritiques interdigitantes et quelques lymphocytes B. Dans l'intestin, ces structures font partie du GALT (Gut-Associated Lymphoid System) : il s'agit des ganglions mésentériques et des plaques de Peyer, du nom de l'anatomiste suisse Johann Conrad Peyer les ayant décrites la première fois en 1677. Physiologiquement, Les plaques de Peyer sont décrites principalement dans l'iléon, dans toutes les espèces et chez tous les individus d'une même espèce, mais elles peuvent se multiplier en taille, en nombre et en localisation en fonction des besoins de réponses immunitaires intestinales. Elles sont les principaux sites inducteurs des réponses immunitaires muqueuses. À côté de ces structures, il y a un système immunitaire diffus, réparti dans le chorion (ou lamina propria) de toutes les muqueuses de l'organisme, constitué de plasmocytes à IgA, de lymphocytes T CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires) activés et mémoire provenant des plaques de Peyer, de cellules dendritiques tolérogènes CD103⁺ : toutes des cellules impliquées dans la réponse immunitaire adaptative. Récemment, il a été identifié des cellules de l'immunité innée, les ILC (*innate lymphoid cells*– cellules lymphoïdes innées), réparties dans le chorion, les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la formation des plaques de Peyer, le

maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et également, précocement, dans les réponses aux germes pathogènes. Elles sont en relation étroite avec les cellules épithéliales et la flore commensale ; un des modes d'action des ILC est la synthèse d'IL-22, qui agit directement sur les cellules épithéliales pour leur faire synthétiser des peptides anti-bactériens, défensines β , RegIII β et RegIII γ (*Regenerating islet-derived protein 3*) en réponse à la stimulation par des germes pathogènes.

Enfin, des lymphocytes T, en majorité CD8+ activés, sont répartis entre les cellules épithéliales (lymphocytes intra-épithéliaux, environ 1 pour 4 à 10 cellules épithéliales), intervenant en première ligne de défense : élimination des cellules épithéliales modifiées (virus, stress...) par action cytotoxique rapide, réparation de l'épithélium (synthèse de TGF- β , KGF (Keratinocyte Growth Factor), limitation de la colonisation par les bactéries, favorisant les réponses humorales dans les muqueuses *via* le TGF- β . En effet, les principaux effecteurs de la réponse immunitaire muqueuse sont les IgA sécrétoires synthétisées sous forme dimérique par les plasmocytes du chorion, sous l'influence du TGF- β . Elles ont de multiples rôles de défense de l'épithélium muqueux, en particulier en prévenant l'envahissement de cet épithélium et des tissus sous-jacents par les germes de la flore commensale ou par des germes pathogènes, selon une stratégie d'exclusion et non de recrutement du complément, de façon à ne pas aggraver la muqueuse. Toute cette organisation permet d'une part de stimuler des réponses non inflammatoires et tolérogènes vis-à-vis de la plupart des antigènes environnementaux et de notre flore commensale et, d'autre part, de développer des réponses efficaces et très régulées contre des antigènes pathogènes, pour maintenir l'homéostasie de nos muqueuses.

2.3.2. Interactions microbiote-système immunitaire associé à la muqueuse intestinale:

Chez le nouveau-né, les muqueuses sont « vides » : peu de cellules immunitaires réparties dans le chorion, quelques lymphocytes B et des lymphocytes T inducteurs à des sites prédéterminés qui sont à l'origine des plaques de Peyer, et des ILC, cellules lymphoïdes innées. Les ganglions mésentériques, comme les autres ganglions, sont de petite taille, non activés. Les bactéries commensales colonisant l'intestin, coopèrent avec le système immunitaire dès la naissance et tout au long de la vie : au départ pour la mise en place des structures immunitaires et ensuite pour le maintien d'un bon équilibre.

Le microbiote intestinal orchestre la maturation post-natale de la réponse immunitaire : les bactéries et leur hôte coévoluent toute la vie pour maintenir des interactions à bénéfice mutuel. Dans l'intestin, les antigènes sont essentiellement les germes constituant le microbiote qui colonisent les muqueuses dès la naissance ainsi que la flore cutanée de la mère acquise par exemple lors de la tétée. Ces antigènes favorisent des réponses immunitaires tolérogènes ou inflammatoires régulées rapidement, limitant le développement excessif de certaines espèces bactériennes. Ce qui explique, en dehors des facteurs nutritionnels ou la présence d'oxygène, les modulations de composition de la flore dans les premières années de vie. Les structures isolées (follicules lymphoïde isolés) ne se développent qu'après la naissance pendant la colonisation par les bactéries. C'est une des caractéristiques les plus remarquables du GALT : une grande flexibilité qui permet d'adapter le nombre de site inducteur de réponse immune à la taille de la flore et également à la présence de germes pathogènes.

Depuis la meilleure connaissance de la nature des germes de la flore commensale intestinale, de nombreuses études montrent les activités immunomodulatrices directes ou indirectes du microbiote et de leurs métabolites. La maturation des réponses T intestinales paraît être la prérogative d'un nombre restreint d'espèces commensales capables de développer des interactions avec son hôte. Dans des modèles de souris gnotobiotiques, il a été montré de nombreuses interactions entre microbiote et système immunitaire: par exemple, les bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, parmi les premières à coloniser l'intestin du nouveau-né, ont des propriétés anti-inflammatoires en inhibant les facteurs de transcription de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6.

Le polysaccharide A (PSA) métabolite synthétisé par les *Bacteroides spp*, en particulier *B fragilis*, favoriseraient la production d'IL-10 et un profil de lymphocytes T régulateurs induits après activation de récepteurs à la surface des cellules dendritiques et de lymphocytes. Mais c'est au sein de la classe des *Clostridiae*, que l'on trouve les éléments du microbiote ayant des actions décisives sur le développement des réponses immunitaires au sein du GALT. Les Bactéries Filamenteuses Segmentées (SFB), installées dans l'iléon au moment du sevrage, sont de puissants inducteurs de cellules effectrices TH17, produisant de faible quantité d'IL-17 et d'IFN- γ donc une inflammation à bas bruit, suffisante pour éliminer des

germes compétiteurs potentiellement pathogène et créer leur propre microniche au sein des muqueuses, mais trop faible pour induire des dommages intestinaux. Cette production d'IL-17 et d'IFN- γ optimise les mécanismes locaux antibactériens, comme la synthèse d'IgA spécifiques et de peptides anti-bactériens (tel que le RegIII γ par les entérocytes), et permet de diminuer les risques infectieux. Inversement, ces réponses induites par les SFB peuvent servir à limiter leur population, évitant ainsi une colonisation excessive par cette bactérie.

Les SFB favorisent également l'activation et le recrutement des lymphocytes intra-épithéliaux, impliqués dans les défenses anti-virales des cellules épithéliales muqueuses.

Toutes ces actions permettent la mise en place des réponses effectrices des muqueuses chez le nouveau né, cette espèce disparaissant du microbiote adulte.

Il est donc mis en évidence une co-évolution du microbiote et de son hôte, responsable de l'homéostasie intestinale. Elle favorise dès la naissance la colonisation, suffisante mais pas excessive, des muqueuses par certaines espèces créant un écosystème équilibré non pathogène. Cette symbiose permet la tolérance de la flore et de nombreux éléments de l'environnement et la résistance à la colonisation par des espèces pathogènes en développant des réponses effectrices parfaitement régulées.

Après la mise en place des réponses immunes muqueuses chez le nouveau-né, les relations hôte-microbiote perdurent toute la vie et nous permettent de supporter notre environnement sans réactions excessives dans les conditions physiologiques. Ce sont les acteurs de l'immunité innée qui jouent un rôle prépondérant dans les réponses de tolérance, mais des réponses effectrices parfaitement régulées au niveau des muqueuses nous protègent des germes pathogènes.

Un déséquilibre de la flore et des réponses immunitaires muqueuses, innées et spécifiques, sont impliqués dans le développement des pathologies inflammatoires intestinales comme nous allons voir dans les chapitres qui suivent. De nouvelles pistes de traitements de ces pathologies sont développées autour de la modulation du microbiote [20].



Partie II :
**Enjeux de l'étude du microbiote
intestinal humain**



1. Dysbiose : implication dans certaines pathologies :

À partir de la naissance, chaque être humain établit une symbiose avec son microbiote qui joue un rôle clef dans le maintien de sa santé et de son bien-être. Cette co-existence symbiotique individuelle est le résultat d'une succession d'enrichissements de la diversité des microorganismes commensaux par des apports extérieurs. Cette diversité se trouve néanmoins menacée depuis peu par des changements drastiques dans nos habitudes de vie comme la prise en charge des naissances, l'environnement extérieur, l'alimentation et les pratiques médicales. Les deux dernières générations ont été le cadre de modifications importantes des modes de vies et d'alimentation, avec une augmentation de la sédentarité, une suralimentation et une exposition importante aux médicaments et aux polluants. Nous sommes maintenant en mesure d'évaluer l'impact de ces changements sur la diversité du microbiote intestinal. Parallèlement à ces modifications du mode de vie, on a pu observer une explosion de l'incidence de maladies liées à un dysfonctionnement du système immunitaire comme les maladies métaboliques, les allergies et les maladies inflammatoires et plus étonnamment des maladies neurodégénératives et des désordres psychiatriques [21].

La question qui se pose : c'est quoi le lien entre dysbiose et pathologies ? C'est ce qu'on va essayer d'expliquer dans les lignes qui suivent.

1.1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

Des modifications de la composition bactérienne au sein du microbiote intestinal humain ont été fortement associées avec certaines pathologies telles que les MICI. Le concept de la « dysbiose » - un déséquilibre au sein des populations bactériennes du microbiote intestinal - comme facteur déclenchant et/ou aggravant les MICI a été introduit il y a déjà plus d'une décennie. Cette dysbiose peut se décrire à la fois en termes de composition microbienne, mais aussi de fonctions, de diversité et de structure de l'écosystème [22].

La prévalence des MICI qui regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, est en constante augmentation ces dernières années. Ces pathologies sont caractérisées par une atteinte inflammatoire du tractus digestif dont l'étiologie, multifactorielle, demeure encore méconnue. Plusieurs gènes de susceptibilité ont été mis en

évidence mais une prédisposition génétique ne permet pas d'expliquer à elle seule l'apparition de la maladie ainsi que les phases de poussée entrecoupées par des périodes de rémission. En effet, des facteurs immunologiques et environnementaux (tabac, appendicectomie) et des facteurs liés au microbiote intestinal peuvent être impliqués dans la survenue de la maladie. Ces dernières années, il a été mis en évidence, l'implication du microbiote intestinal dans leur physiopathogénie. L'hypothèse actuelle serait que les MICI résulteraient d'une réponse immunitaire inadaptée vis-à-vis d'une modification du microbiote intestinal chez des patients génétiquement prédisposés. Cette modification de la composition du microbiote intestinal est appelée dysbiose.

Des études moléculaires, indépendantes de la culture, basées pour la plupart sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, ont permis de mettre en évidence certaines anomalies du microbiote intestinal au cours des MICI. Ces anomalies sont :

- Une forte instabilité du microbiote au cours du temps.
- La présence d'environ 30 % de bactéries inhabituelles.
- Une restriction de la biodiversité généralement aux dépens du phylum des Firmicutes.
- Et une augmentation de la concentration bactérienne muqueuse.

1.1.1. Description de la dysbiose dans la maladie de Crohn :

Cette dysbiose est caractérisée par un déficit en certaines bactéries, telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, du groupe C leptum, mais aussi par une augmentation de certains pathogènes tels que *E coli* ou *Mycobacterium avium paratuberculosis*. La perte de *F. prausnitzii* associée au développement de la MC a suggéré un rôle anti-inflammatoire de cette bactérie. Cela a pu être vérifié in vitro sur des modèles cellulaires épithéliaux intestinaux et in vivo sur un modèle de colite murine.

La dysbiose est donc un élément clé dans la physiopathologie de la MC. En comparant le profil du microbiote intestinal des MICI en rémissions aux sujets en poussée par qPCR sur les selles des patients, la dysbiose, et particulièrement le déficit en *F. prausnitzii*, semble plus

marquée. Cette observation nous incite à penser qu'une dysbiose plus marquée pourrait être prédictive de rechute. Récemment, une étude microbiologique, insérée dans la cohorte STORI du GETAID, a permis de mettre en évidence la dysbiose associée à la MC comme facteur prédictif de récurrence clinique après arrêt du traitement par infliximab au cours d'une maladie de Crohn bien contrôlée. Ces travaux mettent en évidence une dysbiose au cours de la MC plus marquée chez les futurs rechuteurs avant même l'arrêt du traitement par infliximab. La quantité de bactéries appartenant aux groupes C coccoides et Bacteroides (et apparentés) ainsi que la prévalence de l'espèce *F. prausnitzii* dans les selles permet de discriminer les patients qui resteront en rémission des futurs rechuteurs.

1.1.2. Description de la dysbiose dans la rectocolite hémorragique :

Une diminution de la représentativité des Firmicutes et des Bacteroidetes accompagnée d'une augmentation de celle des Proteobacteria et des Actinobacteria est la modification la plus souvent observée. Chez les patients ayant une RCH en poussée, il a également été observé une augmentation de bactéries réduisant les sulfates.

Une étude récente sur un groupe de 127 patients avec RCH a permis de montrer que la signature microbienne observée chez les patients MC n'était pas retrouvée chez les patients RCH. Cette analyse a montré une plus faible abondance d'espèces bactériennes produisant du butyrate (*Roseburia hominis* et *F. prausnitzii*) chez les sujets RCH vs les contrôles sains.

1.1.3. Mécanismes métaboliques :

La modification de la composition du microbiote intestinal impacte sur la physiologie de l'hôte. Les conséquences d'une dysbiose peuvent être médiées par les bactéries elles mêmes ou par biotransformation et la modulation de molécules présentes dans la lumière intestinale (peptides antimicrobiens, acides biliaires, ou encore molécules du quorum sensing impliquées dans la communication bactérienne) (Fig.10).

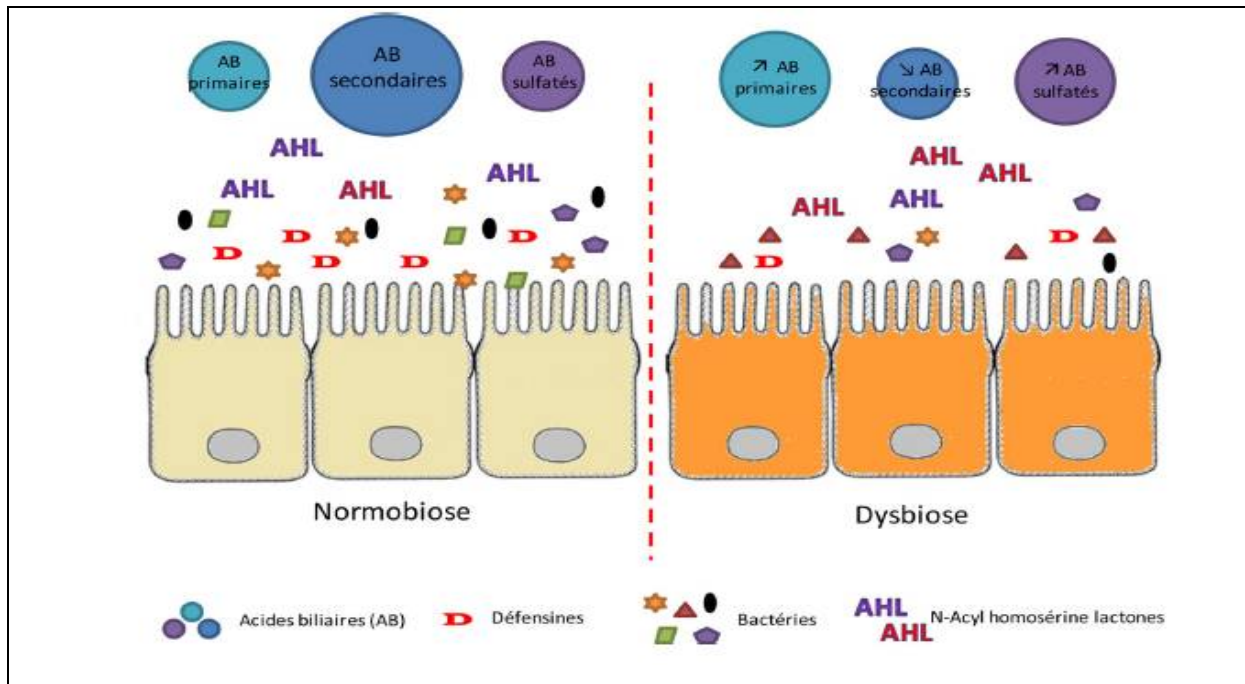


Figure 10: Représentation schématique de l'impact de la dysbiose sur le contenu luminal chez les patients souffrant de la maladie intestinale chronique de l'intestin [23]

Connaissant le rôle du microbiote dans la déconjugaison et la transformation des acides biliaries (AB), l'équipe du Pr. Philippe Seksik a montré que la dysbiose du microbiote intestinal s'accompagne d'une « dysmétabolose » des AB, caractérisée par une diminution des AB secondaires, une augmentation des AB conjugués et une augmentation du pool des AB sulfatés dans les selles des patients ayant la MC. Ces travaux mettent en évidence des anomalies du pool d'AB fécal et sérique chez des patients atteints de MICI correspondant à un déficit de la déconjugaison et de la transformation des AB par le microbiote intestinal. *F. prausnitzii* est impliqué dans la déconjugaison des AB, étape préalable à leur transformation. La diminution de *F. prausnitzii* dans le microbiote fécal des patients atteints de MICI suggère une relation entre la dysbiose et le « dysmétabolisme » des AB observés au cours des MICI.

Les défensines sont des peptides antimicrobiens (PAM) qui participent à l'immunité innée de par leur propriétés bactéricides et immunomodulatrices. Les défensines sont des peptides cationiques amphiphiles de 30 à 40 acides aminés.

Du fait de leurs caractéristiques physicochimiques, leur spectre d'activité antimicrobienne est très large incluant les bactéries gram positif et gram négatif, les mycobactéries, les virus, les parasites et les levures. Les défensines se divisent en deux sous-groupes chez l'homme : les α - et les β -défensines. Il existe six α -défensines : HNP1 à 4, HD5 et HD6. Les défensines HD5 et 6, majoritairement présentes dans le tube digestif humain, sont sécrétées par les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes de l'intestin grêle et dans le côlon (métaplasie Paneth-like). Les β -défensines sont sécrétées majoritairement par les cellules épithéliales.

Il existe six β -défensines : hBD1 à 6.

Certains travaux ont mis en évidence une défaillance de la barrière intestinale dont un déficit en défensines au cours de la MC. En effet, l'expression iléale des α -défensines, notamment HD5, est diminuée chez les patients atteints de MC iléale, et ce d'autant plus lorsqu'il existe une mutation NOD2. Un déficit en hBD1, synthétisée par les colonocytes, est incriminé dans la physiopathologie des MICI. L'expression de la β -défensine HBD2 est faiblement induite chez les patients ayant une MC colique, comparée aux patients atteints de RCH comme s'il existait un défaut d'induction de la synthèse de cette défensine colique au cours de la MC. L'accumulation d'altérations de la barrière muqueuse intestinale, comme la diminution de production de défensines, pourrait être responsable de la dysbiose observée au cours de la MC. Il a donc été mis en évidence une « dysmétabolose » des PAM chez des patients atteints de MC. Cette dysmétabolose se caractérise par une diminution de la défensine HBD1 et de la défensine HD5 qui est corrélée avec la dysbiose (variation de certains groupes bactériens, dont *F. prausnitzii*).

L'équipe du Pr Philippe Seksik s'est intéressée aux molécules impliquées dans la communication bactérienne et a recherché leur signature chimique dans l'écosystème intestinal et les relations éventuelles existant entre ces molécules et la dysbiose.

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication existant chez de nombreuses populations bactériennes, qui repose sur la production de petites molécules diffusibles dites auto-inductrices (AI) telles que les N-acyl homosérine lactones (AHLs). Ce mode de communication (le plus souvent intra-espèces) permet, à partir d'une certaine densité

bactérienne (le quorum), une coordination entre cellules bactériennes au niveau d'une population et joue un rôle dans l'accès aux nutriments, la croissance bactérienne (biofilms, surfactant...), la virulence et la défense contre d'autres micro-organismes (production de peptides antimicrobiens). Le QS impliquant la production d'AHLs à ce jour peu décrit dans l'écosystème complexe que représente le microbiote intestinal humain, soulève un intérêt grandissant. Des arguments expérimentaux indirects suggèrent que le QS impliquant les AHLs est en jeu au cours des MICI. En effet, des études concernent la paraoxonase-1 (PON-1), une enzyme extracellulaire (estérase) de l'épithélium digestif de l'hôte, qui possède des activités d'hydrolyse des AHLs (quenching du QS). Ces travaux ont montré que l'activité de l'enzyme PON-1 est significativement diminuée chez les patients présentant une MICI active.

Dans ce contexte, il a été montré, par des analyses en spectrométrie de masse associées à l'utilisation de systèmes rapporteurs bactériens, la présence d'AHLs dans l'écosystème intestinal. Des profils d'AHLs différents en fonction du statut normobiose/dysbiose (Fig.10) suggèrent que le quorum sensing impliquant les AHLs pourrait être mis en jeu dans la dysbiose [23].

1.2. Syndrome de l'intestin irritable:

1.2.1. Définition :

La définition du syndrome de l'intestin irritable a deux mérites: être extrêmement simple et correspondre à une réalité quotidienne de clinicien. Il se caractérise par une douleur ou un inconfort chronique de l'abdomen sans anomalie anatomique caractérisée, associée à des perturbations du transit intestinal qui sont plus marquées lors des poussées douloureuses. L'indissociable couple « douleur abdominale et trouble du transit » est encadré précisément par les critères de Rome III, qui définissent des sous-groupes de patients en fonction de la consistance des selles (Fig.11) selon l'échelle validée de Bristol: constipé, diarrhéique, ou alternant. Derrière une définition simple d'un « trouble fonctionnel », la réalité de cette pathologie chronique est aussi douloureuse qu'elle peut l'être pour les malades : altération de la qualité de vie, absentéisme, nomadisme médical, coûts de santé élevés, et une pharmacopée relativement pauvre – avec toujours rien de curatif en vue [24].








<i>Type 1</i>		Selles dures et morcellées (en billes) d'évacuation difficile
<i>Type 2</i>		Selles dures, moulées en saucisse et bosselées
<i>Type 3</i>		Selles dures, moulées en saucisse, à surface craquelée
<i>Type 4</i>		Selles molles mais moulées, en saucisse (ou serpentín)
<i>Type 5</i>		Selles molles morcellées, à bords nets et d'évacuation facile
<i>Type 6</i>		Selles molles morcellées, à bords déchiquetés
<i>Type 7</i>		Selles totalement liquides

Figure 11: Echelle de Bristol permettant d'apprécier la forme et la consistance des selles [25]

Des progrès récents sont intervenus dans la compréhension de la physiopathologie des symptômes en soulignant le rôle potentiel de la flore et en ouvrant, de ce fait, de nouvelles perspectives thérapeutiques [26].

1.2.2. Physiopathologie : implication de la flore intestinale :

Le SII est une affection multifactorielle. L'accent a été mis successivement sur les troubles de la motricité digestive, puis sur l'hypersensibilité viscérale, les perturbations des voies neuro-immuno-hormales bi-directionnelles qui connectent le système nerveux central au système nerveux entérique, et le rôle d'un état « inflammatoire » intestinal a minima avec des perturbations de l'immunité digestive. Ces différents facteurs sont impliqués à des degrés divers selon les malades dans la genèse de la symptomatologie. De façon plus récente, l'attention s'est portée sur le rôle de l'écosystème intestinal dans les troubles du transit (diarrhée, constipation ou alternance des deux) mais aussi dans le déclenchement et l'entretien de la douleur abdominale et la survenue d'une production locale de cytokines pro-inflammatoires sans lésion de la muqueuse.

Les arguments pour impliquer le microbiote intestinal sont de plusieurs ordres :

- Les bactéries intestinales influencent la physiologie digestive.
- Chez certains patients, le SII apparaît au décours d'une gastro-entérite aiguë (syndrome de l'intestin irritable post-infectieux).
- Des différences qualitatives et quantitatives dans la composition de la flore colique et grêlique ont été observées entre patients SII et sujets contrôles.

Chez les animaux génétiquement dépourvus de flore, plusieurs anomalies digestives ont été démontrées : une gastroparésie, un transit dans le grêle significativement ralenti, une importante dilatation caecale. La reconstitution d'une flore s'associe à la réapparition d'une motricité grêlique organisée avec la survenue de phases III des complexes moteurs migrants se propageant jusque dans l'iléon. Elle provoque également l'expression accrue d'enzymes impliqués dans la synthèse de neuro-modulateurs (tel que l'acide gamma aminobutyrique) et la stimulation de la synthèse de protéines musculaires spécifiques. Ces effets pourraient découler de l'activité catabolique que la flore, essentiellement colique, exerce vis-à-vis de nombreux substrats exo- ou endogènes.

Les produits de cette fermentation colique, gaz (H₂ et/ou CH₄) et acides gras à chaînes courtes, modulent également la motricité digestive, notamment au niveau de la région iléo-colique, affectent le fonctionnement des cellules épithéliales et immunitaires intestinales, et peuvent influencer la sensibilité digestive avec l'apparition parfois d'une hypersensibilité.

L'un des rôles de la flore colique est la transformation des résidus glucidiques. Cette fermentation aboutit à la production de gaz, principalement hydrogène et méthane. Au cours d'une diète standard, la production d'hydrogène est excessive au cours du SII alors que le volume des gaz produits est normal. Ce fait a été démontré par la mesure de cette production sur 24 heures, grâce à un calorimètre corps entier, au cours d'une alimentation normale. La production nyctémérale d'hydrogène était deux fois plus élevée au cours du SII que dans une population contrôle avec une vitesse de production de ce gaz beaucoup plus rapide après un repas. Les auteurs du travail ont également démontré une corrélation entre la survenue des symptômes et la vitesse de production d'hydrogène. Lors d'un régime excluant les céréales autres que le riz ainsi que les produits laitiers, la production d'hydrogène était significativement réduite chez les mêmes sujets SII mais pas chez les contrôles. Cette réduction de la production entraînait une amélioration des symptômes déclenchés habituellement par la prise alimentaire.

L'existence de SII-PI est désormais admise. Suggérée sur des observations anecdotiques dans les années 60-70, cette hypothèse s'est trouvée confirmée par plusieurs études épidémiologiques ultérieures. Le SII-PI représenterait 15 à 20 % des SII et il peut succéder à une infection bactérienne (salmonellose, shigellose, gastroentérite à *Campylobacter jejuni*) mais aussi parasitaire (*Giardia intestinalis*). Le risque relatif de développer un SII est multiplié par 5 après une infection intestinale. Plusieurs facteurs influencent ce risque. Le plus important d'entre eux est la durée de l'infection initiale avec une corrélation entre l'augmentation de ce risque et la durée de l'infection : la probabilité de voir apparaître un SII au décours de l'infection est multipliée par 11 lorsque l'infection initiale dure plus de 3 semaines alors qu'elle est non différente de celle d'une population contrôle pour une infection brève (moins de 7 jours). Les autres facteurs de risque de SII-PI sont liés au terrain : un âge jeune lors de l'infection ainsi que l'existence d'un terrain anxieux et/ou dépressif sous-jacent

augmentent le risque. Le SII-PI résulterait avant tout de la persistance d'un état « inflammatoire » local après l'infection aiguë. En analysant sur les biopsies muqueuses la production d'interleukine 1 β , cytokine pro-inflammatoire, l'équipe de Nottingham a montré que les patients qui développaient un SII-PI étaient ceux qui conservaient un taux élevé en cette cytokine, 3 mois après l'infection. La co-existence d'un infiltrat par des cellules inflammatoires n'est pas constamment rapportée. Elle a été observée au niveau du rectum.

Deux types de dysbioses ont été décrits en cas de SII :

- Des modifications quantitatives : Certains auteurs avancent l'hypothèse de perturbations quantitatives de la flore avec l'existence d'une pullulation bactérienne au niveau grêle, sur la base des résultats anormaux d'un test respiratoire mesurant la production d'hydrogène après charge en lactulose. Cette colonisation bactérienne chronique du grêle est une cause de production accrue d'hydrogène et de méthane puisque la zone de fermentation des résidus glucidiques n'est plus limitée au côlon mais se produit aussi dans l'iléon et même le jéjunum distal. Cette pullulation favorise l'apparition d'une inflammation intestinale et déclenche des troubles moteurs grêliques. Le gaz majoritairement produit influencerait le profil symptomatique des malades avec une production accrue de méthane particulièrement fréquente chez les patients décrivant un SII avec constipation et une corrélation entre la quantité de méthane produite et la sévérité du ralentissement du transit.

- Des modifications dans la répartition des populations bactériennes : des données font état, au cours du SII, on observe une diminution des coliformes, des lactobacilles et des bifidobactéries et une augmentation des entérobactéries, des coliformes et des bactéroïdes.

Les différences de composition de la flore sont importantes à prendre en compte, notamment depuis que des arguments de plus en plus convaincants plaident en faveur d'une activation immunitaire muqueuse avec production accrue de cytokines pro-inflammatoires au cours du SII. L'effet anti-inflammatoire de certaines souches de lactobacilles et de bifidobactéries a été démontré. La réduction de certaines colonies bactériennes pourrait être un des facteurs entretenant l'activation du système immunitaire de l'hôte, notamment après une première infection intestinale. D'autre part, les différentes colonies bactériennes n'ont pas les mêmes propriétés métaboliques. A titre d'exemple, les bifidobactéries transforment

principalement les oligosaccharides alors que les bactéroïdes ont une action à la fois protéolytique et saccharolytique. Les différences dans la production des gaz intestinaux, De plus, une production accrue de gaz ou de butyrate peut induire une hypersensibilité rectale ou colique à la distension. Parallèlement, le développement de colonies bactériennes plus grandes productrices de gaz et d'acides gras, et donc plus aptes à déconjuguer les acides biliaries est un facteur susceptible d'altérer les transferts d'eau et d'électrolytes, la sensibilité et la motricité du côlon et de favoriser l'apparition d'une diarrhée [27].

1.3. Cancer colorectal :

1.3.1. Description de la dysbiose dans le cancer colorectal :

Le lien entre microbiote intestinal et cancer colorectal apparaît naturel, en raison de la localisation tumorale. Néanmoins les premières démonstrations de l'existence d'un lien fonctionnel entre microbiote et cancer colorectal ne remontent qu'à deux décennies. Des expériences menées sur un modèle de souris hétérozygotes pour la mutation du gène suppresseur de tumeur *Apc* ($Apc^{min/+}$) ont mis en évidence un risque plus faible de développer un adénome dans l'intestin de souris exemptes de tous germes (axéniques) en comparaison à des souris « contrôle ».

Des études récentes se sont intéressées à la composition des microbiotes humains, comparant notamment le microbiote intestinal de sujets sains et de patients atteints de cancer colorectal. D'importantes différences ont été mises en évidence dans la répartition des différentes bactéries, aussi bien dans la muqueuse colique que dans les selles. Ces différences semblent toucher un certain nombre de taxons, désormais bien identifiés. Burns et al. ont ainsi séquencé puis comparé les microbiomes de 44 patients sains et 44 patients atteints de cancer colorectal, d'après des échantillons de tissus coliques, et ont observé un enrichissement en Proteobacteria (*Providencia* notamment) ainsi qu'une déplétion en Firmicutes et Bacteroidetes dans la population malade.

Un enrichissement dans le phylum des Fusobacteria (*Fusobacterium nucleatum* notamment), ainsi qu'une déplétion en *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* et *F. prausnitzii* (appartenant au Firmicutes) ont également été mis en évidence dans le microbiome tumoral. Il

a été découvert que le microbiome des patients atteints de cancer était enrichi en gènes de virulence, corrélés à la présence notamment de *Fusobacteria* et de *Providencia*. Ces découvertes suggèrent que le microbiote pourrait être un contributeur du cancer colorectal, et ne serait pas uniquement le témoin passif de l'évolution de la maladie. Il reste cependant à identifier clairement et à quantifier ces facteurs de virulence, qui pourraient constituer une cible thérapeutique potentielle.

D'autres bactéries ont pu être identifiées comme associées à la carcinogénèse colique (*Parvimonas micra*, *Solobacterium moorei* et *Peptostreptococcus stomatis*) mais avec des signaux biologiques bien plus faibles.

Des différences de composition des microbiotes ont également été mises en évidence selon le stade évolutif de sa néoplasie (absence de tumeur, adénome, carcinome). Des taux élevés de *Bacteroides*, d'*E coli* et de *Streptocoques* ont été observés au stade carcinome.

Z. Wei et al. ont quant à eux étudié les compositions des microbiotes de patients atteints de cancer à différents stades de la maladie (survie, récurrence, décès). Dans chaque groupe, 4 phyla dominaient : *Proteobacteria* (33,8–49,4 %), *Firmicutes* (16,9–22,7 %), *Bacteroidetes* (21,1–27,9 %) et *Fusobacterium* (3,38–10,8 %), confirmant les données de Burns et al. Un enrichissement en *B fragilis* était observé chez les patients non-survivants en comparaison aux survivants. Une plus grande abondance de *F nucleatum* était notée chez les patients en récurrence de leur cancer en comparaison aux survivants. Parallèlement, l'abondance en *F prausnitzii* était plus importante chez les survivants que chez les non-survivants. Des taux élevés de *F nucleatum* et *B fragilis* ont également été associés à une diminution de la survie globale, établissant l'hypothèse que des bactéries du microbiote pourraient constituer des biomarqueurs prédictifs de la survie au cours du cancer colorectal, péjoratifs dans le cas de *F nucleatum* et *B fragilis*, tandis que la présence de *F prausnitzii* constituerait plutôt un marqueur de bon pronostic.

1.3.2. Mécanisme physiopathologique :

Les bactéries du microbiote pourraient être impliquées dans la carcinogenèse selon un modèle « driver-passenger ». La première étape consistant en la colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes « driver » à potentiel pro-inflammatoire et pro-carcinogène (*B fragilis*, *E coli* notamment) qui contribueraient à l'initiation du cancer colorectal.

La progression tumorale entraînerait alors une modification dans le micro-environnement tumoral, permettant une colonisation par des bactéries opportunistes « passager » (*F nucleatum*, *Streptococcus gallolyticus* notamment) favorisant le développement de la tumeur.

Le cancer colorectal résulte le plus souvent de la transformation d'un adénome en carcinome, on parle alors de « séquence adénome-carcinome ». À l'échelle moléculaire, l'initiation et le développement de cette séquence correspondent à l'accumulation de mutations génétiques, avec activation d'oncogènes (KRAS, MYC, PI3KCA) et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (APC, TP53). Par ailleurs, 15 % des cancers colorectaux, dont une majorité localisée au côlon droit, sont liés au phénotype microsatellites instables (MSI), résultant d'une déficience du système de réparation de l'ADN. Bien que le microbiote ne puisse être considéré par lui-même comme carcinogène, le cancer étant d'origine multifactorielle, des études ont récemment montré en quoi le microbiote pouvait générer des modifications génétiques et influencer l'apoptose et l'inflammation, favorisant le développement du cancer colorectal.

Des expériences menées sur un modèle murin de cancer colorectal induit par l'injection intrapéritonéale d'azoxyméthane, composé carcinogène, ont montré qu'un traitement antibiotique induisait une diminution du nombre et de la taille des tumeurs, suggérant le rôle de certaines bactéries du microbiote intestinal dans la carcinogenèse et qu'une dysbiose constituerait un des facteurs contribuant au développement de la tumeur. Cette dysbiose peut en outre être influencée par l'âge, l'alimentation ou le mode de vie, qui sont autant de facteurs de risques de cancer colorectal.

Les découvertes récentes sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal et son implication dans la survenue et le développement du cancer colorectal permettent aujourd'hui d'envisager le microbiote comme outil important dans la prise en charge du cancer colorectal. Les modifications initiales de la composition du microbiote au cours de la carcinogénèse colique en font un potentiel outil de dépistage précoce du cancer colorectal [28].

1.4. Risque cardiovasculaire :

1.4.1. Microbiote et maladies métaboliques :

Le microbiote intestinal est impliqué dans le développement des maladies cardiovasculaires mais aussi dans la physiopathologie des facteurs de risque, qui sont une cible thérapeutique privilégiée à corriger pour réduire de manière significative le risque d'évènements cardiovasculaires. L'implication du microbiote dans la régulation de diverses voies métaboliques a permis de décrire ses implications dans de nombreux facteurs de risque (Fig.12).

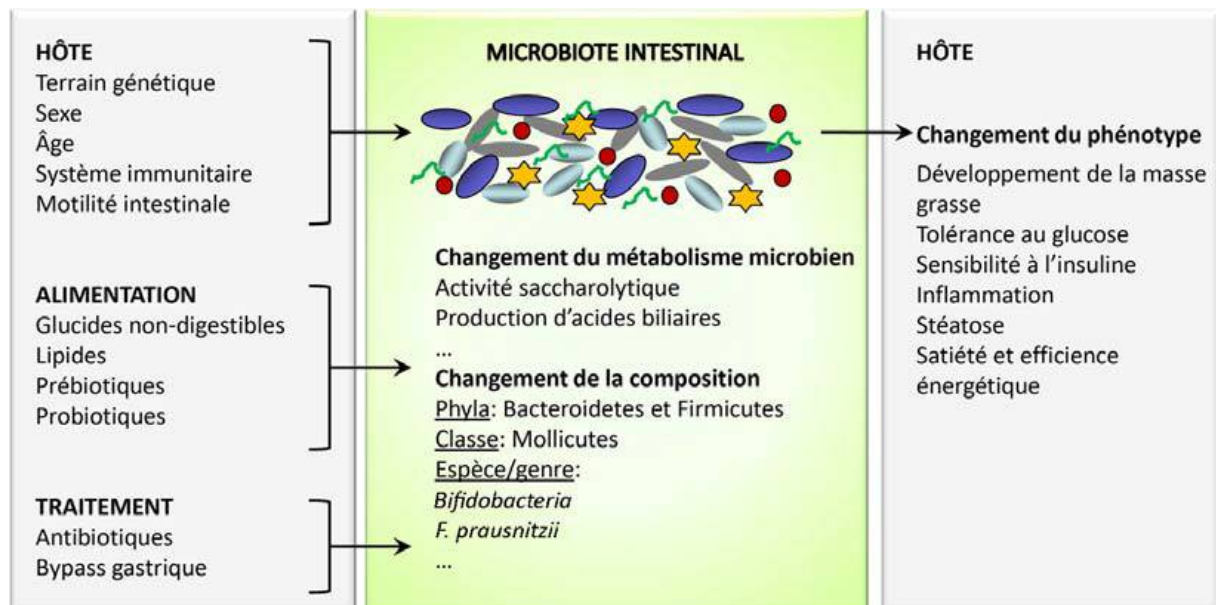


Figure 12: Comment les caractéristiques intrinsèques, l'alimentation, l'environnement ou des traitements influencent la composition et l'activité métabolique de l'hôte [29]

Le microbiote intestinal est un élément central qui conditionne le phénotype de l'hôte, les caractéristiques intrinsèques, l'alimentation, l'environnement, ou des traitements chirurgicaux ou pharmacologiques, influencent la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal. Ces changements de l'écosystème microbien influencent l'immunité et le métabolisme de l'hôte, notamment en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'adiposité et dans les altérations métaboliques associées [30].

Dans l'obésité, on observe chez l'enfant obèse une altération de la composition du microbiote par restriction de sa biodiversité [31]. Un travail dans la revue Science a souligné l'importance du microbiote dans le développement de l'obésité : en utilisant une approche fonctionnelle de transplantation de microbiote de jumeaux humains discordants pour l'obésité, à des souris génétiquement identiques, les animaux transplantés avec le microbiote de l'obèse sont devenus obèses, et ceux transplantés avec le microbiote du jumeau mince sont restés à leur poids de départ [32].

Dans le diabète de type 2, des altérations structurelles et fonctionnelles du microbiote de patients par rapport à des sujets sains ont été retrouvées. La composition du microbiote est modifiée avec une prédominance de *Protéobactérie* et une augmentation des gènes impliqués dans le stress oxydatif et l'inflammation est observée. L'excès de production d'IL-6, IL-1 et TNF α induit une insulino-résistance par un défaut d'interaction entre l'insuline et son récepteur. Les acides biliaires secondaires, métabolites du microbiote intestinal, sont également diminués dans le diabète de type 2 alors qu'ils sont connus protecteurs contre l'inflammation et favorables à l'insulino-sensibilité. L'hypothèse consensuelle uniciste "microbiote et maladies métaboliques" est associée au fond physiopathologique d'inflammation chronique des maladies telles que l'obésité, l'insulino-résistance et l'athérome. Le microbiote intestinal constitue notamment un large réservoir naturel de LPS (Lipo-polysaccharides), un composant de la paroi des bacilles gram négatif, et dont les taux circulants chez l'homme sont associés au diabète de type 2 et à l'obésité. Cette "inflammation métabolique" est médiée par les Toll-Like Receptors (TLR) (récepteurs de l'immunité innée dédiés à l'identification de pathogènes par les macrophages). TLR4, récepteur spécifique du LPS, possède un rôle pro-inflammatoire et athérogène. Chez l'homme, certains polymorphismes génétiques de TLR4 sont associés à une

réduction du risque d'athérosclérose, confirmant les résultats chez l'animal montrant que les souris TLR-4 KO sont protégées contre le développement de l'inflammation et l'insulino-résistance. L'altération de la flore intestinale modifie la perméabilité épithéliale induisant un passage de fragment microbien activant une inflammation hépatique et systémique (y compris dans les tissus adipeux) chronique.

1.4.2. Microbiote et hypertension artérielle :

L'HTA est le facteur de risque le plus fréquent. Il a été observé chez la souris hypertendue une diminution de la richesse et de la diversité du microbiote et une augmentation du ratio Firmicutes/Bactériodetes . Une étude récente a observé une résistance au traitement anti-hypertenseur chez les patients traités concomitamment par antibiotique [33]. Le microbiote intestinal semble intervenir dans la régulation de la pression artérielle et son altération peut être associée à l'apparition d'une HTA. Une méta-analyse a démontré une diminution significative de la pression artérielle chez les patients traités par probiotiques.

Actuellement, peu d'études corrélient le microbiote et l'HTA mais ces premiers résultats semblent impliquer fortement le microbiote dans la régulation de la pression artérielle.

1.4.3. Microbiote et dyslipidémie :

Quelques études récentes suggèrent également un lien entre le microbiote intestinal et son impact sur le métabolisme lipidique. Les acides biliaires secondaires peuvent moduler le métabolisme lipidique et glucidique hépatique et systémique à travers FXR (Farnesoid X Receptor : récepteur nucléaire) et les récepteurs couplés à la protéine G (GPR 131).

Le TMAO (triméthylamine N-oxide) réduit le transport inverse du cholestérol, altère les métabolismes du cholestérol et du stérol et modifie la composition des acides biliaires, la taille du pool et leur transport dans le foie et les intestins. Enfin, le métabolisme direct du cholestérol par les bactéries intestinales est possible et pourrait également jouer un rôle. Il reste encore à élucider les mécanismes biologiques reliant le microbiote intestinal et le métabolisme lipidique [34].

1.5. Troubles psychiatriques majeurs :

Les troubles de l'humeur et les troubles psychotiques apparaissent parmi les premiers maladies du système nerveux central qui représentent les coûts directs et indirects les plus importants dans le monde [35]. Alors que les prévisions annoncent une augmentation de la prévalence des troubles mentaux à travers le monde, le taux de réponse aux traitements actuels peut encore être amélioré et les cas de résistances aux traitements ne sont pas exceptionnels. Des facteurs cliniques, pharmacologiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pourraient expliquer cette résistance, mais ne semblent pas suffisants pour expliquer l'ensemble des variations idiosyncrasiques. Le chaînon manquant pour comprendre la variabilité de la réponse individuelle, en termes d'efficacité et de tolérance (comme la prise de poids par exemple) pourrait provenir de l'influence du microbiote sur le développement et le fonctionnement du système nerveux central.

1.5.1. Conséquences potentielles de la dysbiose sur fonctionnement du système nerveux central :

Quatre mécanismes entremêlés ont été invoqués pour décrire ce que l'on appelle communément l'axe « microbiote-intestin-cerveau » :

- La modification de la perméabilité intestinale, qui conduit à une augmentation de la perfusion de certaines endotoxines comme le LPS dans la circulation sanguine. Le LPS est un composé inflammatoire contenu dans les parois des bactéries Gram négatif, il peut altérer le fonctionnement du système limbique en augmentant l'activité amygdalienne, il peut également activer la microglie, contribuant ainsi à une inflammation chronique du système nerveux central de l'hôte dans des modèles animaux. Restaurer la perméabilité intestinale initiale permettrait donc potentiellement de limiter le passage de produits inflammatoires bactériens dans la circulation générale et ainsi de réduire l'inflammation chronique du SNC. Il a été démontré chez l'animal que la pré-exposition à un stress physique et psychologique potentialiserait les effets du LPS sur l'inflammation du système nerveux central. Les endotoxines sécrétées par le microbiote jouent un rôle fondamental dans la formation de l'axe corticotrope chez les rongeurs [36].

- La modulation de l'inflammation locale et périphérique. Le microbiote intestinal module le développement des structures lymphoïdes et la différenciation des cellules immunitaires. Étant donné les effets anti-inflammatoires du butyrate, la diminution des espèces produisant du butyrate pourrait possiblement contribuer à l'inflammation du tube digestif. La contribution de l'inflammation chronique au déclenchement et/ou à l'entretien de maladies psychiatriques a fait l'objet de nombreuses études dans la décennie passée : des anomalies inflammatoires et immunologiques ont été détectées chez une proportion importante de patients souffrant de troubles de l'humeur ou psychotiques.

- La diminution de l'absorption de nutriments bénéfiques ou essentiels (comprenant les acides aminés, les vitamines, les acides gras polyinsaturés) et l'augmentation de la synthèse de composés délétères (l'ammoniaque, les phénols, les indoles, les sulphides).

- L'activation/désactivation du système nerveux autonome qui est directement connecté au noyau du tractus solitaire. Chez la souris comme chez l'humain, ce noyau envoie à son tour des projections noradrénergiques des aires impliquées dans la régulation de l'anxiété : l'amygdale, le système cholinergique et le cortex.

1.5.2. Microbiote et autisme :

La dysbiose intestinale en psychiatrie a majoritairement été étudiée dans les troubles du spectre autistique (autism spectrum disorder ASD), un trouble neurodéveloppemental caractérisé par la diminution des interactions sociales, de la communication, des comportements stéréotypés et répétitifs. Ce trouble s'accompagne très fréquemment de troubles digestifs [37]. Comparés aux sujets sains, les enfants souffrant d'autisme auraient 10 fois plus de bactéries de type Clostridium, une augmentation des Bacteroidetes et Desulfovibrio, et une diminution des Firmicutes et Bifidobacterium. Une augmentation de la perméabilité intestinale a également été décrite dans l'autisme ainsi qu'une élévation des taux sanguins de LPS et d'interleukine 6 (IL-6). Certaines études ont retrouvé également une perméabilité intestinale chez les apparentés de premier degré des enfants autistes, suggérant que ces changements seraient impliqués dans la genèse du trouble.

L'histologie, l'immunohistochimie et la cytométrie de flux ont montré une infiltration panentérique subtile de cellules immunitaires (de type lymphocytes, monocytes, cellules « natural killer » et éosinophiles) chez des enfants souffrant d'autisme en comparaison d'enfants présentant des symptômes gastro-intestinaux. Des taux élevés d'acide propionique, un acide gras à chaînes courtes produit par certaines espèces bactériennes entériques (notamment de type Clostridia, Desulfovibrio et Bacteroidetes) ont été retrouvés dans les fèces des enfants souffrant d'autisme. L'acide propionique pourrait avoir de multiples actions potentiellement délétères sur le système nerveux central, notamment la synthèse et le relargage de neurotransmetteurs, le maintien du pH intracellulaire, la régulation des flux de calcium, le fonctionnement mitochondrial, l'activation immunitaire liée à une neuro-inflammation et la régulation de l'expression de certains gènes. Les modèles animaux ont révélé qu'une administration d'acide propionique chez le rat créait des stéréotypies, des déficits cognitifs, des modifications électro-encéphalographiques et une diminution des interactions sociales [38].

1.5.3. Microbiote, troubles de l'humeur et troubles psychotiques :

Chez la souris, le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans la régulation du stress, de l'anxiété et de l'humeur. Il existe toutefois des arguments indirects chez l'humain : l'administration expérimentale de LPS chez des sujets sains provoque des niveaux augmentés d'anxiété et de dépression, une augmentation du cortisol salivaire, de l'adrénaline plasmatique et de cytokines pro-inflammatoires. Le LPS module également la mémoire émotionnelle dans cette même étude avec une relation dose-effet. Une faible sécrétion d'acide gastrique a été rapportée chez les patients souffrant de troubles dépressifs majeurs.

La diminution de l'acidité gastrique a été associée à la croissance réversible du microbiote au niveau de l'intestin grêle (small intestinal bacterial overgrowth SIBO) ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité intestinale, de la malabsorption, des épisodes de diarrhée ou des constipations. Un autre argument pour le rôle du microbiote intestinal dans la régulation ou le déclenchement des troubles anxio-dépressifs est la sécrétion d'acide gamma-aminobutyrique (GABA) par certaines souches de *Lactobacillus*, de *Bifidobacterium*. Les genres *Escherichia*, *Bacillus*, et *Saccharomyces* produisent de la noradrénaline.

Candida, *Streptococcus*, *Escherichia*, et *Enterococcus* produisent de la sérotonine, alors que *Bacillus* et *Serratia* peuvent produire de la dopamine. Tous ces neurotransmetteurs jouent un rôle majeur dans la dépression et le mécanisme d'action des agents antidépresseurs.

L'un des champs majeurs de recherche concernant le rôle du microbiote en psychiatrie pourrait être la prédiction de la prise de poids sous psychotropes. Un modèle chez le rat a révélé que l'administration d'olanzapine (l'un des antipsychotiques qui induit le plus de prise de poids) altérerait le microbiote intestinal des rats traités. Toutefois, l'implication du microbiote intestinal dans la prise de poids sous antipsychotiques n'a pas été établie à ce jour chez l'homme. D'autres études sont nécessaires pour déterminer le rôle exact du microbiote dans la réponse aux antipsychotiques [39].

2. Perspectives thérapeutiques :

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, le microbiote intestinal est au cœur de nombreuses fonctions essentielles à la bonne marche de l'organisme, et son implication a été montrée dans diverses pathologies.

La modulation du microbiote par différentes approches constitue une piste sérieuse comme thérapie.

2.1. Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques :

2.1.1. Définitions :

2.1.1.1. Probiotiques :

Les probiotiques sont les micro-organismes vivants (le plus souvent des bactéries, mais il peut s'agir aussi de levures) dont la consommation a un effet bénéfique sur notre santé.

La définition précise des probiotiques établit par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture / Organisation mondiale de la santé (FAO/OMS) en 2001 est : « Micro-organismes vivants qui, une fois ingérés en quantité adéquate, confèrent une bénéfice de santé à l'hôte. »

En 2013, un groupe d'experts a permis d'établir de grandes lignes directrices sur les probiotiques à partir des publications et a confirmé la définition établie initialement.

La transcription du terme scientifique probiotique dans un cadre réglementaire européen se fait par l'obtention d'allégations santé qui établissent une relation de cause à effet entre la consommation d'un produit et l'effet allégué. Ainsi, ne peut être défini comme probiotique qu'un micro-organisme spécifique dont le bénéfice sur la santé a été prouvé par des études contrôlées. Ceci explique que les micro-organismes vivants des aliments qui en contiennent naturellement (exemple des aliments fermentés) ne peuvent être considérés comme des probiotiques s'ils n'ont pas fait la preuve de leurs bénéfices sur la santé par la réalisation d'études spécifiques.

Aussi dans le domaine alimentaire, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) n'a pas encore autorisé d'allégations santé pour les probiotiques, sauf pour le yaourt.

Les micro-organismes (*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) utilisés pour la fabrication du yaourt sont, pour le moment, les seuls qui ont reçu une allégation santé. Il a été reconnu que les ferments du yaourt permettent une meilleure digestion du lactose contenu dans cet aliment pour les individus digérant mal le lactose.

Il est interdit d'utiliser le mot « probiotique » à des fins commerciales car il induit implicitement un bénéfice santé. Ce terme est donc davantage utilisé par la communauté scientifique. Même si l'EFSA ne reconnaît pas aujourd'hui que les bénéfices santé des bactéries du yaourt favorisant la digestion du lactose, il existe de bons niveaux d'évidence concernant les effets d'autres micro-organismes sur la santé.

Légalement, les probiotiques ne sont pas considérés comme un médicament, aussi cette définition ne permet pas d'emblée de les destiner à des personnes malades. Il y'a un décalage entre le fait que le terme « probiotique » soit souvent utilisé par les scientifiques ou les acteurs de santé et son absence de reconnaissance réglementaire qui limite sa connaissance par le grand public [40].

2.1.1.2. Prébiotiques :

Les prébiotiques sont décrits pour la première fois par Gibson et Roberfroid en 1995 comme « des ingrédients alimentaires non digestibles influençant de manière bénéfique la santé de l'hôte en stimulant l'activité d'une ou plusieurs bactéries commensales du côlon ». L'acquisition de nouvelles données scientifiques sur leur mode d'action et leur spécificité a permis d'affiner cette définition, ils sont alors requalifiés en 2017 par l'Association scientifique international des probiotiques et prébiotiques (ISAPP) comme « des substrats sélectivement utilisés par les micro-organismes de l'hôte conférant des bénéfices pour sa santé ». Les prébiotiques doivent remplir 3 critères :

- 1 : Etre résistants à la digestion dans l'estomac et la partie haute de l'intestin,
- 2 : Fermentescibles par le microbiote de l'intestin et
- 3 : Stimuler spécifiquement la croissance et/ou l'activité des bactéries intestinales bénéfiques pour notre santé.

Cependant, les bénéfices des prébiotiques ne sont pas réduits exclusivement à l'intestin, ils peuvent également agir de manière systémique dans certains traitements thérapeutiques.

Les prébiotiques sont des substrats alimentaires non viables contrairement aux probiotiques. Ils sont généralement composés de sucres liés comme les oligosaccharides et les polysaccharides à chaînes courtes. Ces molécules ont pour caractéristique chimique d'être indigestibles par les enzymes présentes dans le tractus intestinal. Elles vont donc pouvoir servir de substrats nutritionnels aux micro-organismes considérés « bénéfiques » comme *Bifidobacterium* et *Bacteroides* ou entrer en contact directement avec les cellules environnantes.

Les fructanes tels que les fructo-oligosaccharides (FOS) et l'inuline, ainsi que les galactanes comme les galacto-oligosaccharides (GOS) ont été les prébiotiques les plus étudiés pour leurs effets modulateurs sur le microbiote. Aujourd'hui de nouveaux composés sont considérés comme des prébiotiques: les oligosaccharides présents dans le lait humain (human milk oligosaccharides : HMO), de nouveaux oligosaccharides comme les acides gras polyinsaturés ou encore les acides linoléiques conjugués. Les prébiotiques les plus présents dans nos aliments sont les FOS et l'inuline, retrouvés dans certains légumes comme le

poireau, l'oignon, l'ail, l'artichaut, la chicorée ou l'asperge, et dans certains fruits comme la banane et dans des céréales.

Les FOS, GOS et l'inuline sont présents dans certaines préparations pour nourrissons.

Les effets des prébiotiques sont souvent confondus avec les effets d'une consommation de fibres. Ceci est dû à une confusion quant à leurs définitions. En effet, la plupart des fibres alimentaires sont faiblement digestibles et influencent de manière globale l'ensemble du microbiote de l'intestin, contrairement aux prébiotiques qui eux ont un effet s'appliquant exclusivement à certaines espèces, qu'on appelle bifidogènes.

Enfin, les prébiotiques vont avoir un effet sur le fonctionnement de différents systèmes comme le microbiote, les muqueuses et le système immunitaire par différents mécanismes [41].

2.1.1.3. Symbiotiques :

L'association entre un probiotique et un prébiotique, nutriment qui lui est favorable, s'appelle un symbiotique. Cette association a pour objectif d'aider à améliorer la survie du probiotique et d'accroître ses propriétés biologiques. De plus en plus de couples probiotique-prébiotique sont actuellement expérimentés. C'est par exemple le cas pour l'association *bifidobactéries*/FOS, *lactobacilles*/lactilol ou encore *bifidobactéries*/GOS. La flore intestinale doit être stimulée, en particulier par l'apport de certains nutriments dont elle se nourrit volontiers. Une supplémentation associant raffinose et bacilles lactiques s'est montrée efficace pour contribuer à rééquilibrer la flore intestinale [42].

2.1.2. Mécanismes d'action et effets sur la santé :

2.1.2.1. Probiotiques :

Les effets bénéfiques des probiotiques habituellement observés sur la santé sont : la régulation du transit intestinal, la production de métabolites bactériens bénéfiques, l'exclusion compétitive de pathogènes, etc. On comprend néanmoins que selon le type de micro-organismes, certaines souches probiotiques peuvent avoir des effets spécifiques pouvant inclure la synthèse de vitamines, le renforcement de la barrière intestinale, une action sur le métabolisme, des sels biliaires et/ou certaines activités enzymatiques [40].

Les propriétés probiotiques d'une souche lui sont spécifiques et ne peuvent en aucun cas être attribuées par extrapolation à d'autres souches du même genre ni de la même espèce. Il est donc indispensable d'identifier précisément et de façon aussi exhaustive que possible les souches ayant une activité probiotique. La plupart des probiotiques actuellement commercialisés appartiennent seulement à quelques espèces de bifidobactéries et de bactéries lactiques, essentiellement du genre *Lactobacillus*, avec 2 exception notables que sont *E coli* Nissle 1917 et la levure *Saccharomyces boulardii*. Plus récemment, plusieurs souches appartenant à des groupes bactériens différents des bactéries lactiques, pour la plupart isolées du microbiote humain, ont aussi montré des effets très prometteurs dans le traitement et la prévention de certaines pathologies in vitro et sur modèles animaux.

Il est indispensable que les probiotiques destinés à une administration à l'humain aient auparavant démontré leur absence de pathogénicité. La recherche de gènes codant des facteurs de virulence déjà décrits dans des souches pathogènes du même genre et la détermination du profil de résistance aux antibiotiques de chaque probiotique potentiel paraissent indispensables. Les facteurs de virulence n'étant pas tous connus, l'absence de virulence des souches doit être confirmée par des tests complémentaires réalisés in vitro et sur modèle animal in vivo. La connaissance du profil de résistance aux antibiotiques des souches présente un double intérêt.

Le choix de cribler de préférence des souches appartenant aux bifidobactéries et aux bactéries lactiques pour d'éventuelles activités probiotiques vient probablement en grande partie du prérequis essentiel qu'est l'absence de pathogénicité. Ces bactéries sont en effet présentes dans de nombreux aliments fermentés traditionnels consommés par les populations humaines depuis des millénaires. De fait, à l'exception de certains genres et espèces qui font encore parfois débat comme le genre *Enterococcus*, la plupart des bifidobactéries et des bactéries lactiques sont considérées comme sans danger aucun pour l'humain. Pour ces groupes bactériens en particulier, mais aussi pour quelques autres genres de bactéries et de levures, certaines espèces se sont vues conférer un statut particulier de présomption d'innocuité reconnue en fonction de leur long historique d'utilisation chez l'être humain et de l'existence ou non de pathogènes en leur sein.

Ainsi, le statut QPS (« qualified presumption of safety ») récemment créé est l'équivalent européen du statut GRAS (« generally recognised as safe ») existant déjà aux Etats-Unis. Les souches appartenant à des espèces n'ayant pas acquis l'un de ces statuts doivent subir une évaluation complète de leur innocuité. Au contraire, les souches dont l'identification taxonomique prouve qu'elles appartiennent à une espèce à laquelle ces statuts ont été conférés sont dispensées d'une partie, voire de la totalité des études citées ci-dessus (selon l'espèce), à l'exception du profil de résistance aux antibiotiques. La liste des espèces ayant ces statuts est régulièrement mise à jour et réévaluée en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques.

Toute allégation de santé doit être dûment justifiée en apportant des preuves scientifiques de l'effet bénéfique apporté par le probiotique. La mise en évidence des effets bénéfiques des probiotiques passe par un certain nombre de tests in vitro tels que l'étude de la production d'enzymes, de métabolites et de substances antimicrobiennes, l'inhibition de la croissance ou de l'adhésion cellulaire de pathogènes en coculture ou l'analyse des effets sur les cellules épithéliales ou immunitaires humaines. Les résultats obtenus au cours de ces études préliminaires doivent ensuite être confirmés sur des modèles animaux de la pathologie ciblée par le produit afin de vérifier l'efficacité du probiotique in vivo et d'estimer les doses à administrer pour obtenir l'effet escompté. En conséquence, il est fortement recommandé de réaliser ces études sur les préparations probiotiques telles qu'il est prévu de les administrer afin de tenir compte de l'interaction des souches avec leur matrice. La mise en évidence de l'effet du probiotique sur la santé nécessite de choisir judicieusement les marqueurs biologiques les mieux adaptés au type d'action du probiotique et de suivre leur évolution en réponse à son administration (scores histologiques, concentrations sériques, etc.).

Les effets bénéfiques des probiotiques ont longtemps été considérés comme provenant de la restauration de l'équilibre de la flore. Cette idée a été abandonnée étant donné leur faible impact sur la composition du microbiote et l'impossibilité de définir une « bonne flore » au vu des larges variations interindividuelles observées. Les probiotiques sont cependant capables de restaurer ou d'améliorer le microbiote, mais en terme de fonctions physiologiques et non de composition. De nombreux probiotiques ont d'ailleurs été isolés de la flore de

personnes saines comparativement à des sujets présentant une pathologie ou une susceptibilité plus importante. Le rôle des probiotiques est donc généralement de compenser ou de prévenir les effets délétères des dysbioses ou simplement de se mêler transitoirement au microbiote pour renforcer ses fonctions naturelles. Le mécanisme d'action précis des probiotiques reste cependant souvent méconnu, malgré la démonstration de leur efficacité dans une très large gamme d'affections (Tableau I)

Tableau I : Affections humaines et principaux probiotiques d'efficacité démontrée [4]

Affections humaines	Souches probiotiques
Troubles physiologiques et métaboliques	
Intolérance au lactose	Yaourt = <i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i>
Constipation chronique	<i>L. casei</i> Shirota; <i>L. rhamnosus</i> LC705 + <i>Propionibacterium freudenreichii shermanii</i> JS
Diarrhées fonctionnelles	<i>L. rhamnosus</i> GG; <i>Saccharomyces boulardii</i> ; <i>L. rhamnosus</i> Lcr35 (diarrhées radio-induites)
Syndrome du côlon irritable	VSL#3; 2 <i>L. rhamnosus</i> (GG + LC705) + <i>Bifidobacterium breve</i> Bb99 + <i>P. freudenreichii</i> JS
Hyperoxalurie	<i>Oxalobacter formigenes</i> ; <i>L. acidophilus</i> + <i>L. brevis</i> + <i>S. thermophilus</i> + <i>B. infantis</i> ± <i>L. plantarum</i>
Hypercholestérolémie	<i>L. acidophilus</i> L1; <i>B. longum</i> BL1; <i>Enterococcus faecium</i> M-74; <i>L. acidophilus</i> LA-5 + <i>B. lactis</i> BB-12 + yaourt; 2 <i>S. thermophilus</i> + <i>E. faecium</i>
Infections	
Diarrhées infectieuses	<i>Saccharomyces boulardii</i> ; <i>L. rhamnosus</i> GG; <i>Escherichia coli</i> Nissle, 1917; <i>L. acidophilus</i> + <i>B. bifidum</i> + yaourt
Portage d' <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i> ; <i>L. rhamnosus</i> GG; <i>L. casei</i> ; <i>L. acidophilus</i> + <i>B. lactis</i>
Infections de la sphère ORL	<i>L. rhamnosus</i> ; <i>L. reuteri</i> ; <i>B. lactis</i> (caries); 2 <i>L. rhamnosus</i> (GG + LC705) + <i>P. freudenreichii</i> JS (candidoses); streptocoques α-hémolytiques (angines, otites moyennes aiguës)
Infections urinaires	<i>L. acidophilus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>L. crispatus</i> GAI 98322; <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. fermentum</i> B-24
Infections vulvovaginales	<i>L. rhamnosus</i> Lcr35; <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. reuteri</i> RC-14; <i>L. gasseri</i> Lba EB01 + <i>L. rhamnosus</i> Lbp PB01
Défenses immunitaires affaiblies	
Infections respiratoires et (ou) saisonnières	<i>L. rhamnosus</i> GG; <i>L. rhamnosus</i> Lcr35; <i>L. reuteri</i> ATCC 55730; 2 <i>L. rhamnosus</i> (GG + LC705) + <i>B. breve</i> Bb99 + <i>P. freudenreichii</i> JS; <i>L. rhamnosus</i> GG + <i>B. lactis</i> Bb-12; <i>L. casei</i> DN-114001 + yaourt; <i>L. gasseri</i> PA 16/8 + <i>B. longum</i> SP 07/3 + <i>B. bifidum</i> MF 20/5
Réponse vaccinale faible	<i>L. rhamnosus</i> GG; <i>L. paracasei</i> CRL431; <i>L. fermentum</i> CECT5716; 2 <i>L. rhamnosus</i> (GG + LC705) + <i>B. breve</i> Bb99 + <i>P. freudenreichii</i> JS; bifidobactéries + <i>L. johnsonii</i> La1
Réactions immunitaires délétères	
Allergies et eczéma	<i>L. rhamnosus</i> GG; <i>L. rhamnosus</i> HN001; <i>L. fermentum</i> VRI-033 PCC; <i>L. reuteri</i> ATCC 55730; 2 <i>L. rhamnosus</i> (GG + LC705) + <i>B. breve</i> Bb99 + <i>P. freudenreichii</i> JS; <i>B. longum</i> BB536 + yaourt; <i>L. rhamnosus</i> 19070-2 + <i>L. reuteri</i> DSM 122460; <i>L. gasseri</i> TMC0356 + <i>L. rhamnosus</i> GG
Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	VSL#3; <i>Saccharomyces boulardii</i> ; <i>E. coli</i> Nissle, 1917; <i>L. rhamnosus</i> GG; <i>B. breve</i> + <i>B. bifidum</i> + <i>L. acidophilus</i>

Divers probiotiques apportent une amélioration lors d certains troubles des fonctions physiologiques et métabolique humaines. Ces effets sont surtout liés aux caractéristiques enzymatiques propres à ces souches et à leur activité métabolique in situ.

L'intolérance au lactose se traduit par des ballonnements des flatulences, des spasmes intestinaux, des douleurs abdominales et des diarrhées osmotiques suite à l'ingestion de produits laitiers. Cette pathologie est due à une déficience partielle ou totale de la production de lactase intestinale.

D'autres facteurs encore mal connus s'ajoutent à l'hypolactasie, car les symptômes ne sont pas toujours corrélés au degré de malabsorption du lactose : les sujets hypolactasiques

ne présentent pas tous d'intolérance, et l'amélioration de la digestion du lactose ne se répercute pas forcément sur les symptômes. Une amélioration des symptômes de l'intolérance au lactose a cependant été observée chez des personnes consommant des laits fermentés ou des yaourts contenant des bactéries vivantes, en particulier *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *S thermophilus*. Cet effet serait surtout lié à l'activité lactasique des bactéries, d'autant plus qu'elles sont lysées par l'acidité gastrique et les sels biliaires et libèrent ainsi des quantités importantes de β -galactosidase active dans l'intestin. Des effets bénéfiques ont également été relatés pour diverses souches probiotiques de lactobacilles et de bifidobactéries, bien que l'activité lactasique de ces bactéries soit moindre comparée aux bactéries du yaourt préalablement citées (*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et *S thermophilus*). Il est probable que l'influence des probiotiques s'exerce aussi de façon indirecte via la régulation de différents facteurs comme la production de gaz dans l'intestin, en particulier de H_2 , le pH intra-luminal ou le temps de transit.

La constipation chronique est un phénomène relativement fréquent dans les pays industrialisés, en particulier chez les personnes âgées. Les probiotiques peuvent soulager les symptômes liés à la constipation chronique et participer à la régulation du transit.

Cet effet serait surtout associé à la production d'acides diminuant le pH intra-luminal et stimulant la motilité intestinale, entraînant ainsi une amélioration de la consistance des selles et de la fréquence de défécation. La souche probiotique *Lactobacillus casei Shirota* a en particulier montré un effet bénéfique sur les manifestations de constipation chronique chez l'adulte.

Les probiotiques ont également démontré leur efficacité dans la prévention et le traitement des diarrhées fonctionnelles, plus particulièrement dans le cas des diarrhées induites par les antibiotiques. Cet effet bénéfique est probablement dû majoritairement à la digestion des carbohydrates osmotiquement actifs présents dans la lumière intestinale. Les probiotiques ayant le plus clairement montré leur efficacité dans ce type d'affections sont *Lactobacillus rhamnosus GG* et *S boulardii*.

La consommation d'un mélange probiotique comprenant 2 souches de *L rhamnosus*, une souche de *Bifidobacterium breve* et une souche de *Propionibacterium freudenreichii* a permis de diminuer globalement les symptômes du syndrome du côlon irritable. Concernant les essais effectués avec une seule souche bactérienne probiotique, certains lactobacilles se sont avérés efficaces, en particulier des *Lactobacillus plantarum*, ainsi que des bifidobactéries appartenant aux espèces *Bifidobacterium infantis* et *Bifidobacterium animalis*.

L'hyperoxalurie, c'est-à-dire la présence d'oxalate en excès dans les urines, est un facteur de risque important des néphrolithiases via la formation de cristaux d'oxalate de calcium. L'hyperoxalurie peut être due à une absorption excessive de l'oxalate au niveau intestinal suite à un défaut de dégradation par le microbiote. Certains probiotiques se sont avérés capables de limiter l'hyperoxalurie chez les patients, probablement grâce à leur capacité de dégradation de l'oxalate. La consommation d'un mélange de lactobacilles, streptocoque et bifidobactérie (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *S thermophilus*, *B infantis* ± *L plantarum*) a ainsi permis de réduire l'excrétion urinaire d'oxalate chez des sujets hyperoxalurique.

L'hypercholestérolémie constitue un facteur de risque majeur des pathologies cardiovasculaires, notamment de l'athérosclérose. Plusieurs probiotiques ont démontré leur capacité à dégrader le cholestérol in vitro, mais cette propriété n'a pas nécessairement été corrélée à un effet hypocholestérolémiant chez l'humain. Un effet hypocholestérolémiant chez des sujets présentant une hypercholestérolémie modérée a néanmoins été mis en évidence après consommation de certains laits fermentés contenant des probiotiques. Une diminution significative des taux sériques de cholestérol total a été observée après ingestion quotidienne pendant 4 à 6 semaines de laits fermentés par une souche de *L acidophilus*, un mélange de *L acidophilus* et *Bifidobacterium lactis* additionné aux bactéries du yaourt, ou une souche de *Bifidobacterium longum*.

Certains probiotiques se sont avérés efficaces dans la prévention et le traitement de pathologies infectieuses. Cet effet est surtout lié à leurs capacités d'exclusion compétitive et à la stimulation de la fonction de barrière et des défenses immunitaires innée et adaptative. Les probiotiques peuvent en effet, selon les souches, produire une variété des substances antimicrobiennes comme des SCFA, de l'acide lactique, des bactériocines et autres molécules apparentées, du peroxyde d'hydrogène ou du monoxyde d'azote. Ils vont de plus entrer en compétition avec les pathogènes vis-à-vis des nutriments et des sites d'adhésion disponibles dans le milieu. Certains probiotiques participeraient à l'effet de barrière des muqueuses en stimulant la production de mucines et de peptides antimicrobiens mais aussi en améliorant l'intégrité de l'épithélium, notamment la formation des jonctions serrées.

Enfin, les probiotiques agiraient sur le système immunitaire et pourraient ainsi augmenter, par exemple, l'activité phagocytaire dans les muqueuses ou stimuler la production d'anticorps spécifiques en réponse aux pathogènes, entre autres, des IgA sécrétoires qui seront libérées à la surface de l'épithélium.

Dans le domaine de l'allergie, la plupart des essais cliniques réalisés ont eu trait à sa prévention chez les enfants à haut risque, en raison de leur historique atopique familial, avec des résultats très variables. Dans l'une de ces études, les mères ont consommé la souche *L rhamnosus GG* pendant leur dernier mois de grossesse, puis les nouveaux-nés ont reçu le probiotique per os jusqu'à l'âge de 6 mois. En comparaison du groupe placebo, un risque d'eczéma significativement réduit a été rapporté chez ces enfants à l'âge de 2 ans.

Des suivis ultérieurs de l'étude réalisés à l'âge de 4 et 7 ans ont montré la persistance de la protection vis-à-vis de l'eczéma [4].

En psychiatrie, Un traitement par *L casei* pendant deux mois a montré une amélioration significative de l'anxiété et des symptômes dépressifs chez 39 patients souffrant d'un syndrome de fatigue chronique [43]. Un traitement probiotique a également montré une efficacité dans l'amélioration des symptômes du syndrome SIBO associé avec les troubles anxiodépressifs [44]. Les études ne sont pas toutes positives néanmoins : une administration de lait riche en *L. casei* n'a pas montré d'efficacité dans l'amélioration de l'anxiété et de l'humeur chez 132 adultes sains et a été associée à des effets négatifs sur la mémoire de

rappel. Les individus inclus avaient toutefois en moyenne un niveau relativement élevé d'humeur à l'inclusion et il a été suggéré – comme beaucoup de principes actifs agissant sur l'humeur – que l'effet était d'autant plus important que le niveau d'humeur de base était bas [45].

2.1.2.2. Prébiotiques et symbiotiques :

Les prébiotiques peuvent influencer l'organisme de deux façons (Fig.13).

Ils peuvent être utilisés de manière indirecte comme substrat pour certaines bactéries commensales et les produits de cette fermentation, les AGCC, peuvent ensuite influencer les différents processus moléculaires et cellulaires des tissus de l'hôte. De nouvelles recherches suggèrent que les prébiotiques peuvent agir de manière directe en se fixant sur les récepteurs des cellules cibles.

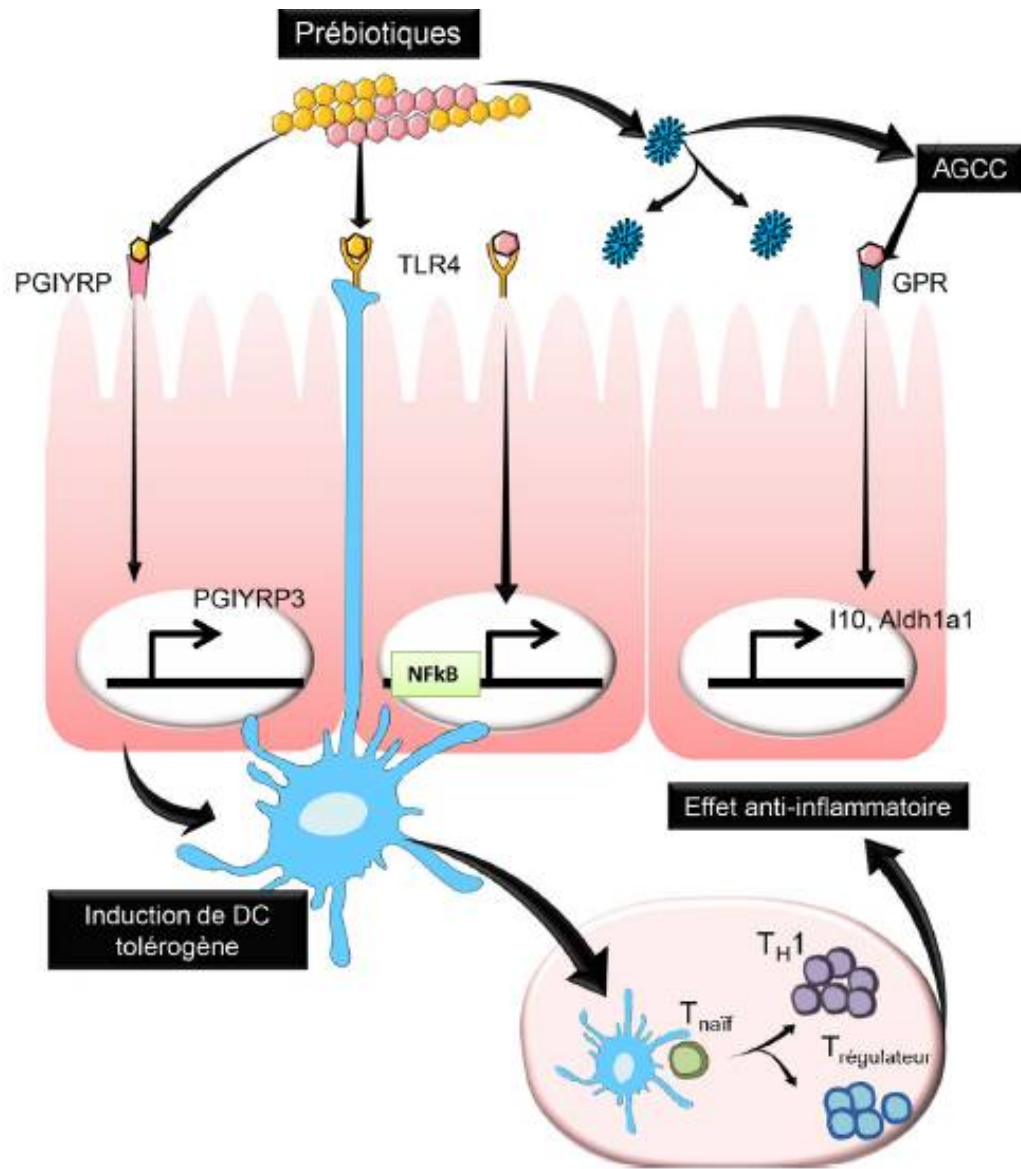


Figure 13: Effets directs et indirects des prébiotiques sur l'épithélium intestinal et le système immunitaire [46]

La majorité des effets indirects des prébiotiques sont médiés par les AGCC comme le butyrate, le pyruvate, l'acétate et le propionate. En effet, à l'issue de la fermentation microbienne des prébiotiques, des AGCC sont produits dans la lumière intestinale. Ils entrent alors en contact avec les cellules environnantes telles que les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée et adaptative pour stimuler certaines voies de signalisation. Ces métabolites vont se fixer aux récepteurs couplés aux protéines G et induire une voie de signalisation qui à l'heure actuelle n'est pas clairement définie [46]. Cela a pour conséquence de moduler l'action d'enzymes et de facteurs de transcription comme les histones déacétylases et l'hypoxiainducible factor qui vont jouer un rôle sur la régulation de l'expression des gènes. Les prébiotiques remodelent l'homéostasie microbienne de l'intestin en augmentant la sécrétion d'AGCC par le microbiote. En particulier l'acétate et le butyrate améliorent la tolérance orale et protègent de l'allergie alimentaire en augmentant l'activité de la *retinal deshydrogenase* des DC CD103+. Cette protection dépend de la vitamine A présente dans l'alimentation. Ce régime alimentaire stimule également la production d'IgA impliquées dans la tolérance. Les souris dépourvues du GPR43 ou du GPR109A, récepteurs pour les AGCC, présentent une allergie alimentaire exacerbée et une plus faible fréquence de DCCD103+. Ces apports diététiques, y compris les fibres et la vitamine A, régulent donc de nombreuses voies protectrices dans le tractus gastro-intestinal, nécessaires à la tolérance aux antigènes alimentaires [47].

Quant aux effets directs des prébiotiques sur l'organisme, Les prébiotiques sont principalement connus pour leur impact sur la modulation du microbiote intestinal. Plus que la composition, c'est surtout le nombre de bactéries qui est modifié. Il est admis que les bactéries des taxons *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont significativement plus représentés à des doses moyennes de 5-8 g/j de prébiotiques. L'expansion des bactéries bénéfiques empêche l'implantation des bactéries pathogènes et réduit le nombre de certaines bactéries commensales par effet de compétition [48]. Hopkins et son équipe ont montré que la croissance des bifidobactéries suite à la consommation de prébiotiques est corrélée avec une diminution de la population de *C difficile*. Dans un deuxième temps, les bactéries vont également augmenter leur production de peptides antimicrobiens empêchant la colonisation de l'épithélium intestinale par les pathogènes [41].

En bref, le marché des probiotiques, prébiotiques et symbiotiques est en pleine expansion, on en trouve actuellement pour une multitude de troubles. Toutefois, seules quelques indications ont fait l'objet de preuves scientifiques rigoureuses.

2.2. Transplantation de microbiote fécal :

2.2.1. Définition et techniques :

2.2.1.1. Définition :

Le concept de transfert de flore digestive n'est pas nouveau. Il est décrit dans le «Handbook of Emergency Medicine », il y a plus de 1700 ans, par le chinois Ge Hong pour traiter des patients ayant une diarrhée sévère. Au XVIIe siècle, le transfert de flore digestive a été utilisé par voie orale ou rectale en médecine vétérinaire sous le terme de « transfaunation». Plus proche de nous, la consommation de selles fraîches de chameaux a été une pratique des bédouins pour guérir la dysenterie bacillaire et son efficacité a été documentée chez les soldats allemands en poste en Afrique pendant la Seconde Guerre mondiale.

La première description scientifique de transfert de flore digestive a été publiée par Eiseman en 1958 chez 4 patients souffrant de diarrhée post-antibiotique et traités par des lavements de selles d'un donneur sain. Le transfert de flore par lavement dans le cadre de l'infection à *C difficile* a été rapporté pour la première fois par Schwan et al. en 1983.

Aujourd'hui, l'administration thérapeutique de selles est appelée transplantation de microbiote fécal [49].

La transplantation fécale désigne l'infusion d'une suspension fécale d'un sujet sain vers le tube digestif d'un autre individu, Son efficacité et sa tolérance ont été rapportées dans plus de 40 études dans différentes affections digestives mais aussi extra-digestives, Les termes « transplantation fécale » sont aujourd'hui associés à plus de 1000 citations dans Pubmed [50].

2.2.1.2. Cadre législatif :

En France :

A ce jour, le Code de la Santé publique ne prévoit pas de statut particulier pour le microbiote fécal. Toutefois, dans la mesure où le microbiote fécal est utilisé à visée curative à l'égard de maladies humaines, il doit être considéré comme un médicament conformément à l'article L. 5111-1 du Code de la Santé publique, qui définit un médicament comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. [...] ». A ce stade précoce de développement de ce produit et en l'absence d'autorisation de mise sur le marché, celui-ci peut être utilisé dans le cadre législatif et réglementaire applicable aux préparations magistrales et hospitalières (article L. 5121-1 du Code de la Santé publique), ou aux médicaments expérimentaux destinés à un essai clinique (article L. 5121-1-1 du même code).

Au niveau international :

Il existe une hétérogénéité entre les différents pays concernant le statut du microbiote fécal. Les Etats-Unis considèrent qu'il s'agit d'un médicament alors que certains Etats membres (RoyaumeUni, Danemark et Pays-Bas) ne le qualifient pas comme tel (certains comme un tissu).

2.2.1.3. Techniques :

Préparation du produit :

Le microbiote répondant à la définition d'un médicament, sa préparation doit être réalisée sous la responsabilité d'une pharmacie à usage intérieur (PUI) d'un établissement de santé. Au vu des nombreux contrôles microbiologiques requis et de l'accueil des donneurs pour le don de selles au laboratoire de microbiologie de l'hôpital, il est envisageable que le contrôle des préparations de selles notamment soit effectué au laboratoire de microbiologie.

A ce stade précoce de développement et au vu du faible degré de complexité du procédé de fabrication (mise en suspension \pm filtration et mise en seringues), il n'apparaît pas nécessaire de standardiser les modalités de préparation. Cependant le protocole de fabrication (notamment les locaux, le matériel utilisé, les étapes du procédé de fabrication) relève de la responsabilité de la PUI et doit être décrit dans le dossier du médicament expérimental correspondant à celui déposé dans la demande d'autorisation d'essai clinique et qui aura fait l'objet d'une autorisation d'essai clinique délivrée par l'ANSM. Il importe que le protocole de fabrication garantisse le maintien de la qualité du don et l'absence de contamination depuis son obtention jusqu'à son administration. Les recherches permettant de comprendre quels éléments composant le microbiote fécal sont doués d'effets thérapeutiques sont à encourager. Elles sont indispensables au développement de produits contenant ces éléments actifs purifiés, et dont la fabrication garantirait la reproductibilité et la stabilité.

Donneur :

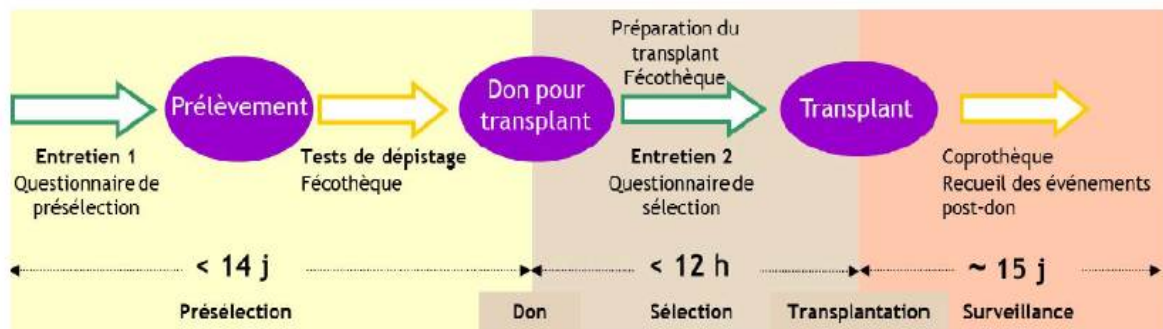


Figure 14: Chronologie (versant "donneur") de la transplantation fécale (en l'absence de congélation) [51]

En application du principe de précaution, les candidats au don doivent être interrogés minutieusement, par le biais d'un questionnaire associé à un entretien médical, afin de diminuer la probabilité d'une transmission d'agents pathogènes (infectieux et autres).

Le questionnaire existant tel que prévu pour le dépistage réalisé dans le cadre du don de sang représente une base solide permettant de limiter le risque infectieux. Toutefois, des mesures additionnelles doivent être envisagées afin d'adapter ce questionnaire au don de selles et au contexte de la TMF. Notamment, il est important de recueillir, en sus des informations prévues pour le don de sang, les informations mentionnées dans le tableau II

Tableau II: Questionnaire de présélection (item spécifique au don de selles) [51]

INFORMATIONS	CRITERES DE NON INCLUSION ABSOLUE	CRITERES DE NON INCLUSION « RELATIVE » (à justifier)
Co-morbidités	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Donneur avec une pathologie chronique connue ▪ Antécédent de fièvre typhoïde ▪ Troubles digestifs (diarrhée aiguë ou chronique) dans les 3 mois précédant le don 	Donneurs avec antécédents familiaux : <ul style="list-style-type: none"> - MICI (lien de parenté) - maladies auto-immunes (lien de parenté) - cancer colique (lien de parenté et âge d'apparition)
Traitement médicamenteux	Donneur suivant un traitement curatif au long cours	Donneur traité par anti-infectieux au cours des 3 mois précédant le don ³
Voyages	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Séjour en zone intertropicale au cours des 3 mois précédant le don ▪ Résidence de plusieurs années en zone intertropicale ▪ Hospitalisations à l'étranger de plus de 24h dans les 12 derniers mois (y compris membres de l'entourage du donneur)¹ 	/
Âge	Donneur mineur ²	Donneur âgé (>65 ans) ⁴
Statut pondéral	/	Donneur avec IMC>30 ⁵

¹ Afin d'éviter le portage de bactéries multirésistantes - cf. Recommandations pour la prévention de la transmission croisée des «Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes » (BHRé), Haut Conseil de Santé Publique, Juillet 2013

² En l'absence d'arguments scientifiques, il convient de ne pas inclure les mineurs, en application des principes généraux régissant le don et l'utilisation des éléments et produits du corps humain (art. L. 1241-2 du CSP) et de l'art. L. 1121-7 du CSP applicable dans le cadre des recherches biomédicales

³ Pour des raisons d'efficacité : le microbiote pouvant être altéré

⁴ Chez le sujet âgé d'une part, le microbiote peut être modifié et d'autre part, le risque de co-morbidités est plus important

⁵ D'une part, les personnes obèses présentent un microbiote modifié et d'autre part, de premiers résultats précliniques ont montré qu'il est possible de transférer via le microbiote des pathologies telles que l'obésité et le diabète

Considérant la fenêtre de contamination possible entre le jour de la présélection et le jour effectif du don, un second questionnaire « allégé » accompagné d'un entretien médical est requis immédiatement avant le don. Les items listés dans le tableau ci-après (tableau III) doivent être recueillis. A l'issue du second entretien médical, le donneur sera ou non sélectionné définitivement pour le don, selon l'appréciation de l'investigateur ayant conduit cet entretien. Un recueil des évènements cliniquement pertinents survenant après le don (environ 2 semaines) est fortement recommandé (par exemple, maladie infectieuse déclarée chez le donneur).

Tableau III: Questionnaire de sélection / Evénements depuis la visite de présélection [51]

CRITERES DE NON INCLUSION	INCLUSION SUR LA BASE D'UNE APPRECIATION INDIVIDUELLE
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Episode de diarrhée (>3 selles molles à liquide /j) chez le donneur ou les membres de son entourage ▪ Situations à risque de contamination : <ul style="list-style-type: none"> - Voyage à l'étranger - Contact avec du sang humain (piercing, tatouage, piqûre, plaie, projection, soins dentaires...) - Comportement sexuel à risque - Présence de lésions anales (afin de limiter le risque de transmission du virus du papillome humain et des virus de l'herpès) 	<p>Recherche des évènements suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Consultation médicale (motif) ▪ Maladie contractée (laquelle, date et durée) ▪ Prise de médicaments (lesquels, date de la dernière prise)

Le don doit être caractérisé par un aspect normal c'est-à-dire :

- Selles moulées ;
- Et examen macroscopique normal (absence d'urine, de sang, ou de pus).

Dans le cadre d'un don de selles, sont réalisés auprès du donneur, les tests de dépistage de maladies transmissibles (Tableau IV et V). Un test de dépistage du cancer colorectal est

également préconisé chez les donneurs de plus de 50 ans. Cette liste est évolutive et devra être réévaluée en fonction des données disponibles. Elle a été établie en prenant en compte à la fois la probabilité du risque de transmission d'agents infectieux, les moyens disponibles pour dépister ces agents sur des selles moulées issues de personnes asymptomatiques et la gravité d'une hypothétique transmission au receveur. Toute dérogation à cette liste devra impérativement être justifiée. La prévention de la transmission d'agents infectieux issus d'un donneur vers un receveur bénéficiant d'une TMF repose sur des données d'anamnèse et des tests microbiologiques. Aucune des procédures décrites (Tableau IV) ne garantit totalement contre une éventuelle transmission d'un agent présent en très faible quantité et/ou excrété de façon intermittente. La probabilité d'une telle présence résiduelle est impossible à quantifier mais est considérée comme très faible. Ses conséquences éventuelles doivent être mentionnées dans le consentement éclairé du receveur.

Pour résumer : le profil « idéal » du donneur :

- Age : 18-65 ans
- IMC < 30
- Absence de pathologies chroniques
- Absence de traitement curatif au long cours
- Absence de prise d'antibiotiques dans les 3 mois précédant le don
- Absence de séjour à l'étranger dans les 3 mois précédant le don
- Absence de résidence de plusieurs années en zone intertropicale
- Absence d'hospitalisation à l'étranger dans les 12 mois précédant le don
- Absence de troubles digestifs à type de diarrhée aiguë ou chronique dans les 3 mois précédant le don
- Absence d'antécédents de fièvre typhoïde
- Aspect macroscopique normal des selles
- Dépistage négatif d'agents infectieux (Tableau IV)

Tableau IV: Liste des agents infectieux à dépister chez les donneurs [51]

	SANG	SELLES
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Treponema pallidum</i> 	<p>Coproculture standard et orientée:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Clostridium difficile</i> ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> ▪ <i>Vibrio cholerae</i> / <i>Vibrio parahemolyticus</i> ▪ <i>Salmonella</i> ▪ <i>Shigella</i> ▪ Bactéries multirésistantes aux antibiotiques ▪ <i>Campylobacter sp</i>
Virus ¹	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Virus de l'immunodéficience humaine (HIV)² ▪ Virus T-lymphotropique humain (HTLV) ▪ Virus des hépatites B et C (HVB² HVC²) ▪ Cytomégalovirus (CMV) / Virus Epstein-Barr (EBV)³ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adénovirus ▪ Astrovirus ▪ Calcivirus (norovirus, sapovirus) ▪ Picomavirus (entérovirus, Virus Aichi) ▪ Rotavirus ▪ Virus des hépatites A et E
Parasites	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Strongyloides stercoralis</i> ▪ <i>Toxoplasma gondii</i>³ ▪ <i>Trichinella sp.</i> ▪ Amibiase 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Strongyloides stercoralis</i> ▪ <i>Cryptosporidium sp.</i> ▪ <i>Cyclospora sp.</i> ▪ <i>Entamoeba histolytica</i> ▪ <i>Giardia intestinalis</i> ▪ <i>Isospora sp.</i> ▪ <i>Microsporidies</i> ▪ <i>Blastocystis hominis</i> ▪ <i>Dientamoeba fragilis</i>

¹Les virus sont recherchés dans les selles à l'aide de tests de biologie moléculaire par PCR

²Charge virale (PCR) en plus de la sérologie

³Uniquement pour vérifier l'absence de séro-discordance avec le receveur

Tableau V: Méthodes de dépistage des bactéries dans les selles de donneurs sains [51]

Bactéries	Méthode recommandée (sur selle) ¹
Bactéries productrices de carbapénémases	Culture sur deux milieux spécifiques différents
Bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)	
Entérocoques résistants aux glycopeptides	
<i>Campylobacter sp.</i>	Recherche d'antigènes par technique ELISA ²
<i>C. difficile</i>	Culture sur milieu spécifique permettant la germination des spores
<i>E. coli</i> producteur de vérotoxine	Recherche des gènes stx1 et stx2 par PCR ²
<i>Listeria sp.</i>	Culture d'une selle sur milieu spécifique ALOA (Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti)
<i>Salmonella sp.</i>	Culture sur milieu spécifique après enrichissement en bouillon spécifique commercialisé
<i>Shigella sp.</i>	Culture sur milieux spécifiques
<i>Vibrio sp.</i>	Culture sur milieu spécifique après enrichissement en bouillon spécifique commercialisé
<i>Yersinia sp.</i>	Culture sur milieu CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)

¹Chaque procédure fait appel à du matériel commercialisé et sera réalisée en suivant les recommandations du fabricant

²L'utilisation de tests immunochromatographiques n'est pas jugée assez spécifique

2.2.2. Indication : infections à *Clostridium difficile* :

Ce bacille à Gram positif anaérobie a comme caractéristique de pouvoir passer d'une forme végétative à une forme sporulée. De plus, seules les souches toxigènes sont pathogènes. La transmission se fait à partir des mains contaminées ou de l'environnement où les spores, résistantes aux désinfections classiques, peuvent persister plusieurs mois.

La première étape est une perturbation du microbiote intestinal, souvent liée à un traitement antibiotique, ce qui va faciliter l'implantation et la multiplication de *C. difficile*. La seconde étape repose sur la sécrétion par les souches toxigènes des toxines A et B et beaucoup plus rarement la toxine binaire CDT. Ces toxines modifient les signaux intracellulaires intéressant le cytosquelette des entérocytes, détruisent les jonctions serrées et induisent une réponse inflammatoire avec recrutement de polynucléaires responsables de lésions intestinales. La réponse de l'hôte est également primordiale : en effet, un taux d'anticorps anti-toxine A élevé lors d'un premier épisode d'ICD est associé à une protection contre les récidives.

Un des enjeux majeurs de la prise en charge des infections à *C. difficile* est la réduction du risque de récurrence. Les antibiotiques seuls ne permettent pas toujours une guérison prolongée puisque la récurrence est de 20 à 30% après un premier épisode et de 40 à 60% après un deuxième épisode. Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont proposés pour expliquer ces récurrences:

- La persistance des spores de *C. difficile* ;
- La diminution du taux des anticorps dirigés contre la toxine;
- Une dysbiose du microbiote intestinal.

La transplantation du microbiote fécal consiste en l'introduction de selles d'un donneur sain dans le tube digestif d'un patient receveur afin de rééquilibrer le microbiote intestinal altéré de l'hôte. Trois voies d'administration sont possibles : au moyen d'un lavement, pendant une coloscopie et au moyen d'une sonde naso- duodénale [52].

À ce jour, la TMF apparaît comme une technique sûre ayant peu d'effets indésirables. Après avoir réalisé plus de 3000 TMF au Centre for Digestive Diseases à Sydney en Australie et plus de 200 à l'Academic Medical Centre à Amsterdam, aucun effet indésirable grave n'a été rapporté [53].

2.2.3. Autres indications potentielles :

2.2.3.1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

La TMF a été utilisée expérimentalement mais l'expérience clinique est encore limitée et la preuve de son efficacité est très inférieure à celle que l'on a pour les infections récidivantes à *C difficile*. Le microbiote intestinal des patients atteints de MICI est caractérisé par une moindre diversité bactérienne comparé à celui des sujets sains (25 % de gènes microbiens en moins) comme nous l'avons montré précédemment. En particulier, la proportion des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* est diminuée au profit de celle des *Actinobacteria* et *Proteobacteria* [54].

Dix enfants souffrant de RCH ont été traités par TMF : une réponse clinique a été observée dans 78 % des cas dans la semaine qui a suivi la TMF et une rémission clinique dans 33 % des cas (55). Chez les patients ayant conjointement une MICI et une infection à *C difficile*, la TMF a permis une rémission totale des symptômes dans 100 % des cas sur une période d'observation allant de 3 mois à 13 ans [56]. Une dizaine d'essais cliniques randomisés sont actuellement en cours ou prévus dans le cadre des MICI et de la TMF.

2.2.3.2. Syndrome de l'intestin irritable :

D'un point de vue physiopathologique, le SII est une affection multifactorielle caractérisée, en particulier, par des anomalies de la composition du microbiote (diminution de la diversité et du nombre de *Bacteroidetes*) comme montré précédemment. Il convient de distinguer deux types d'IBS : ceux à prédominance de diarrhées (D-IBS), et ceux à prédominance de constipation (C-IBS). Actuellement, plus de 50 cas de TMF ont été publiés dans le cadre du D-IBS avec des résultats satisfaisants mais moins concluants que ceux obtenus dans les IRCD. Concernant les C-IBS, plusieurs publications font état de l'utilisation de TMF [57]. Mais tous ces essais doivent être confortés par des essais cliniques contrôlés randomisés pour établir leur efficacité et leur sécurité.

2.2.3.3. Syndromes métaboliques :

Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité est de plus en plus étudié. Les premières études expérimentales chez la souris obèse ont montré un ratio en faveur des *Firmicutes* aux dépens des *Bacteroidetes* [58]. Les expériences de transfert de microbiote ont montré que la colonisation de souris obèses par un microbiote digestif de souris maigre entraînait une diminution significative (-30 %) de la masse grasseuse et une modification de l'équilibre de son microbiote. Chez l'homme, des dysbioses ont également été rapportées en lien avec l'obésité. Un essai clinique a été réalisé en 2012 au cours duquel des patients souffrant de syndrome métabolique ont reçu une TMF de donneurs « maigres ». Les résultats ont montré une réduction transitoire de la résistance à l'insuline impliquant un effet important sur le métabolisme du glucose. L'effet de la TMF sur le métabolisme peut s'expliquer par une augmentation de la production d'acides gras à courtes chaînes (par exemple l'acide butyrique) produit par les bactéries présentes dans les selles du donneur [49].



Partie III : **La culturomique**



1. Rappel historique de l'étude des micro-organismes : méthodes culture-dépendants :

1.1. Caractérisation phénotypiques :

1.1.1. Microscope optique et les premières classifications des micro-organismes :

L'observation et la caractérisation d'organismes microscopiques démarrent au début du 17^{ème} siècle avec l'utilisation par les biologistes du microscope optique, mais la première classification rapportée se situe vers la fin du 18^{ème} siècle, basée sur la morphologie du micro-organisme [59]. Cette classification fut ensuite étendue en empruntant les bases de la systématique de Carl Von Linné (classification hiérarchique en Règne ou Kingdom, Embranchement ou Phylum, Classe ou Class, Ordre ou Order, Famille ou Family, Genre ou Genus, Espèce ou Species, ici du plus large au plus restreint). Elle connut un tournant majeur après le développement des méthodes d'isolement des micro-organismes en culture pure sur gel d'agar vers la fin du 19^{ème} siècle.

Le terme « bactérie » (signifiant bâtonnet en grec) apparaît pour la première fois en 1828. On décrit des bactéries alors comme des organismes unicellulaires de petite taille, généralement compris entre 0,5 et 5 µm. De nombreux tests de caractérisation bactérienne furent développés, tels que la méthode de coloration de Gram en 1884, permettant de distinguer par microscopie optique des bactéries ou colonies bactériennes selon leur type de coloration. Cette méthode distingue les bactéries disposant d'une simple paroi enrichie en peptidoglycane dites Gram positives, et des bactéries moins riches en peptidoglycane mais disposant d'une membrane externe supplémentaire dites Gram négatives, souvent associées aux bactéries pathogènes [60].

Ces méthodes enrichissent les connaissances sur les micro-organismes, et de nombreux recueils étaient publiés, classifiant et listant les micro-organismes selon leurs propriétés visuelles, dites **phénotypiques**.

1.1.2. Microscope électronique :

Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, le microscope optique continue de se perfectionner à tous les niveaux (le type et l'angle d'ouverture des objectifs, la forme de la lame recueillant l'échantillon, l'ajout d'éclairage, l'utilisation de rayonnement ultraviolet pour les méthodes de visualisation par fluorescence...), permettant de grossir l'image jusqu'à 2000 fois, et observer un objet de 0,2 μm , d'épaisseur. Il était alors possible d'observer des entités beaucoup plus petites que les bactéries : les virus.

Le terme virus (poison en latin) est introduit en 1898 lors de l'étude de la destruction des végétaux de la mosaïque du tabac. Le terme bactériophage (consommateur de bactérie en grec) ou phage, est ensuite proposé en 1911 par Frédéric Twort pour décrire les virus spécifiques aux bactéries, au cours de l'étude de colonies bactériennes décimées par l'ajout de virus. Cependant, du fait de la petite taille des virus, généralement comprise entre 0,02 à 0,3 μm , la plupart sont restés non identifiés ou confondus avec des bactéries. Ce n'est qu'après 1931 avec la construction du microscope électronique que les virus sont devenus morphologiquement identifiables. Les microscopes électroniques utilisent des faisceaux d'électrons concentrés par des lentilles électrostatiques et électromagnétiques qui amplifient l'image et affichent les contours d'un objet de moins de 0,01 μm . Cette nouvelle technologie confirma l'absence de noyau chez les bactéries en 1935, et les termes procaryote (combinaison du grec et du latin signifiant avant - noyau) et eucaryote (signifiant vrai noyau en grec), furent admis à cette époque comme les deux grands règnes de classification du vivant.

1.1.3. Découverte de la structure de l'ADN : Classification phylogénétique

Entre 1869 et 1889, une nouvelle substance acide est identifiée, et définie par Richard Altmann comme de « l'acide nucléique ». Puis en 1929, Phoebus Levene nomma les 4 bases : Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G) et Thymines (T) qui composent entre autres cette molécule et la renomme acide désoxyribonucléique ou ADN.

En 1934, Caspersson montre que l'ADN est un polymère de nucléotides. Il transmettra la même année au biophysicien Astbury un échantillon purifié d'ADN de bonne qualité qu'il eut l'idée de visualiser par microscopie électronique à rayon-X (ou rayon de Röntgen). Ces rayons ont la particularité de traverser différemment la matière selon sa densité. Le rayonnement sortant peut être alors dirigé vers une plaque photographique pour visualiser l'ombre de l'objet.

Les photos d'Atsbury n'étaient pourtant pas suffisamment précises et c'est avec le montage du microscope par le physicien Wilkins et les photos prises par le physicien Raymond Gosling et la biologiste Rosalind Franklin que la structure de l'ADN fut observée en 1952.

Elle fut ensuite interprétée la même année comme une spirale en double hélice par Watson et Crick, dont chaque marche correspondait à un couple de liaison guanine-cytosine et adénine-thymine. Ces travaux permirent l'observation et la caractérisation de la structure génomique des organismes, conduisant à la classification **phylogénétique**.

1.2. Caractérisation génotypique :

1.2.1. Les premiers séquençages de l'ARN/ADN et la classification phylogénétique :

En 1965, une molécule d'ARN (l'ARN de transfert de l'alanine de *S cerevisiae*, constitué de 77 bases et synthétisé à partir d'ADN) fut séquencée par le biochimiste Robert Holley, ce qui a participé à la compréhension du mécanisme de synthèse des protéines par l'ARN messager. De nombreuses molécules d'ARN furent ainsi séquencées et publiées, et en 1975 Carl Woese mis en évidence les propriétés de conservation de certaines régions de la séquence des ARN ribosomiaux 16S (ou ARNr 16S), par alignement et comparaison manuelle de 27 séquences d'ARNr 16S de procaryotes [61]. Ce fut alors un tournant dans la classification par utilisation de marqueurs moléculaires ou phylogénétique, montrant que l'on pouvait classer les micro-organismes selon la composition de leurs séquences ARNr 16S.

1.2.2. Du séquençage de l'ADN vers la caractérisation des gènes :

Le séquençage de l'ADN fut établi en dernier, en raison de sa grande taille et sa conformation en double brin. En 1972, Walter Fiers publia la première séquence complète d'un gène codant pour une protéine de la membrane d'un bactériophage [62]. Ceci permis de comprendre comment les 49 différents codons - des triplets de nucléotides – composant ce gène codaient pour les 129 acides aminés de sa séquence.

Une méthode de séquençage à ADN fut publiée en 1975 par Sanger, utilisant l'ADN polymérase I – une enzyme participant à la répllication de l'ADN - et des nucléotides marqués radioactivement, permettant de visualiser la composition de l'ADN par autoradiographie [63]. Elle fut utilisée pour séquencer les 5375 nucléotides du bactériophage phi X174 dont 9 protéines étaient déjà connues. Ce travail montrait également qu'une même région de l'ADN peut coder pour deux protéines différentes selon le cadre de lecture choisit. Une seconde méthode de séquençage à ADN fut proposée par Sanger en 1977, appelée « dideoxy method » ou Méthode Sanger, permettant de séquencer de longs fragments d'ADN de 300 nucléotides.

A l'époque, les différents fragments séquencés sont révélés par autoradiographie et ensuite reconstitué en génome par assemblage manuel pour former une séquence complète. Cette méthode restait cependant complexe et longue à mettre en place, avec de nombreuses imprécisions dans la lecture et la reconstitution des séquences générées.

1.2.3. Premier génome bactérien complet :

La première génération de séquenceur à ADN automatisé est apparue en 1986 (le ABI Prism 370A), basée sur une amélioration de la méthode de Sanger. Cette méthode remplace l'utilisation d'isotopes radioactifs instables par des sondes de 4 couleurs différentes (pour les 4 différentes bases), qui sont ensuite lues par un laser et stockées dans un ordinateur, augmentant la précision et la vitesse de lecture des séquences. Cette machine séquençait environ 1000 bases par jour [64]. C'est également au cours des années 1980 que les ordinateurs se généralisent au sein des laboratoires de microbiologie, permettant de stocker plus facilement les résultats des analyses, photographies, séquences, protocoles, mais aussi de traiter les données avec des méthodes bioinformatiques.

Pour centraliser les informations de séquençage génique généré par les premiers séquençages, le Centre National pour l'Information Biotechnologique (ou NCBI) aux Etats-Unis crée la banque de données publique Genbank en 1982. Dans un premier temps, les séquences proviennent uniquement de la collaboration des fondateurs de Genbank. A partir de 1986, cette banque s'enrichit des données de la communauté scientifique par l'envoi des séquences via le réseau Bionet qui propose des ordinateurs connectés aux réseaux téléphoniques et contenant des interfaces de soumissions et différents outils d'analyse bioinformatique [65].

Enfin, la soumission des séquences fut facilitée par l'apparition du world wide web (ou web) et des navigateurs web associés en 1990.

1.2.4. Séquences multicapillaires et concept de « pan » et « core-genome » :

Plusieurs projets de séquençage de génome complet ont été réalisés, mais ce n'est qu'après les années 2000 que ce nombre explose, comme indiqué dans la figure 15, notamment grâce aux séquenceurs à ADN multi-capillaires comme le ABI Prism 3700, permettant de générer en un jour l'équivalent d'un an de séquençage d'un laboratoire, entre autres parce qu'ils ne nécessitent plus d'étape d'électrophorèse sur gel et permettent de séquencer plusieurs génomes à la fois.

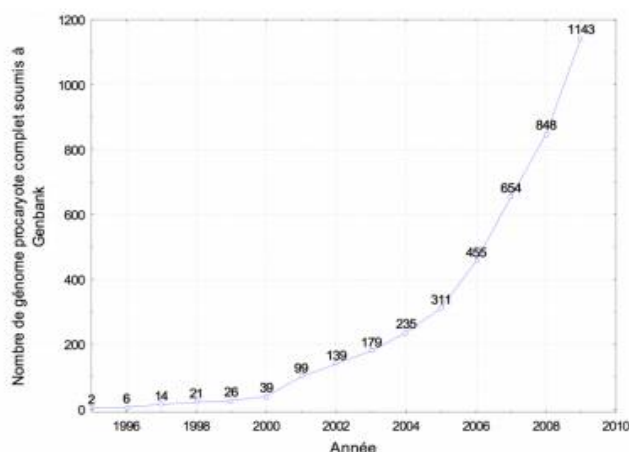


Figure 15: Graphique de l'évolution du nombre de génomes complets séquencés soumis à la banque de données Genbank au cours du temps [66]

A gauche nombre de soumission de génomes procaryotes complets à la Genbank de 1995 à 2009. Le décrochage observé en 2001 est dû en partie à la sortie du séquenceur multi-capillaires ABI PRISM 3700 en 1999 (à droite), permettant de séquencer ~1000000 nucléotides par jour.

En 2005, le genre *Streptococcus* était un des plus séquencés (15 génomes complets disponibles en 2005), grâce notamment au séquençage de 7 différents isolats ou souches de *Streptococcus agalactiae* [66]. La comparaison de ces 7 souches, contenant chacune 2000 gènes, a montré que près de 1800 gènes étaient systématiquement présents, définissant alors le cœur de l'espèce ou core-genome. Ces gènes du core-genome codent généralement pour des fonctions connues ou essentielles à la vie bactérienne comme les fonctions associées à la régulation, au transport ou à l'ancrage des protéines. De plus, chaque souche disposait d'environ 400 gènes spécifiques, définis comme la partie accessoire du génome enrichie en gènes associés à des éléments mobiles tels que les phages, transposons, ou des gènes de fonction inconnue.

La notion de core-genome est à comparer à une autre notion, qui est celle du nombre minimal de gène pour la viabilité d'une bactérie. Le nombre de gène minimal de la bactérie modèle *Bacillus subtilis* a été estimé expérimentalement en 2002. Parmi les 4100 gènes de cette bactérie, seuls 271 gènes ont été trouvés indispensables à la survie de cette bactérie. De plus, 70% de ces gènes se retrouvent également dans la plupart des bactéries, archées et eucaryotes séquencés en 2002 [67].

Ces travaux indiquent que certains gènes pourraient être systématiquement conservés au sein des micro-organismes cellulaires, et pourraient alors être utilisés comme **marqueur phylogénétique** et/ou utilisé pour sonder la présence d'une espèce microbienne.

1.2.5. Séquençage de marqueurs phylogénétiques et l'arbre de la vie :

Le séquençage du génome complet est une méthode fiable de caractérisation et classification d'un micro-organisme, mais reste difficile à mettre en place. L'ADNr 16S a déjà été montré comme un bon classificateur, mais présente également ses limites car un génome

peut posséder plusieurs copies d'ARNr 16S hétérogènes. C'est le cas par exemple de la bactérie *E coli* ATCC 10798, possédant 7 opérons ADNr pouvant contenir plus de 1% de différences entre eux.

Après 2005, de nombreuses études ont montré l'intérêt d'utiliser d'autres marqueurs que l'ADNr 16S pour affiner la classification des espèces [68]. Ces marqueurs, tels que les gènes *rpoB*, *argS* ou *leuS*, sont choisis pour leur propriété d'universalité dans les différents domaines connus du vivant, leur présence en copie unique dans le génome, et la présence de domaines conservés permettant de créer des amorces spécifiques pour l'amplification de ces gènes.

En 2006, une étude comparative de tous les gènes de 191 génomes complets repartis entre eucaryotes, archées et bactéries a été effectuée [68]. Cette comparaison a révélé 31 gènes conservés chez toutes les espèces en copie unique (sur la base de 50% d'identité sur 50% de la longueur du plus petit marqueur). Les protéines des 31 gènes des 191 espèces ont ensuite été alignées (avec un outil d'alignement tel que MUSCLE [69]), puis concaténées en un seul alignement protéique. Cet alignement a été utilisé pour calculer la distance relative entre les différents génomes par utilisation de l'outil PHyML [70], et générer un arbre phylogénétique à haute résolution, présenté en figure 16.

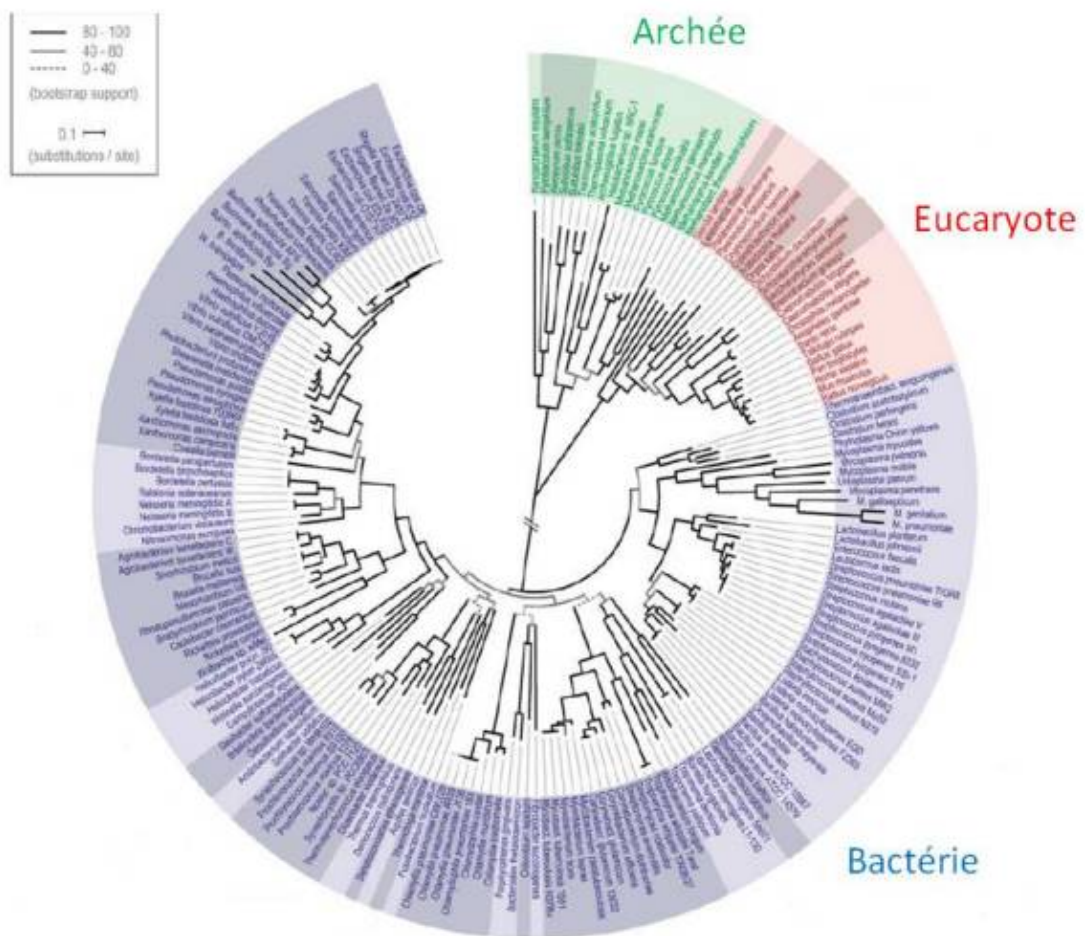


Figure 16: Caractérisation phylogénétique du vivant par création d'un arbre phylogénétique utilisant 31 protéines marqueurs [70]

L'arbre phylogénétique est obtenu après alignement et concaténation de 31 protéines présentes chez 191 espèces, dont des espèces eucaryotes (en rouge), bactériennes (en bleu) et archées (en vert)

Cette étude a permis de créer un système de classification des 3 grands domaines du vivant avec des distances comparables, basé sur 31 protéines marqueurs et non la totalité du génome ou juste l'ADNr 16S. Elle montre également que la classification des eucaryotes est cohérente avec cet arbre à haute résolution, alors qu'elle ne l'est pas toujours pour les

procaryotes. Ceci peut être dû aux méthodes de classification des procaryotes, basées essentiellement sur des études morphologiques ou des analyses de l'ARNr 16S, moins résolutive que la classification des eucaryotes, dont la grande diversité au niveau morphologique facilite la classification.

1.3. Avantages et limites de la caractérisation des flores par méthodes culture-dépendants :

Les méthodes cultures dépendantes de caractérisation de flore microbienne ont permis de poser les grands principes de la microbiologie actuelle, de la classification des microorganismes au niveau phénotypique par utilisation de différents milieux sélectifs ou de microscopes optiques et électroniques, jusqu'à leur classification génotypique par le biais des méthodes de séquençage de leur ADN et ARN.

Cependant, toutes ces méthodes nécessitent d'obtenir un isolat de ces organismes, en leur permettant de croître sur des milieux simplifiés de laboratoire. Malheureusement, la grande majorité des microorganismes de flores complexes telles que la flore intestinale humaine ne peuvent être isolées et cultivées facilement du fait de leur dépendance à des conditions très restrictives de vie : anaérobie, combinaison complexe de substrats pour la survie, symbiose avec un hôte, etc.

Puisque la culture était l'outil ultime de caractérisation des flores, il est apparu que ce microbiote était sujet à variation même dans des flores considérées comme relativement simples telle la flore cutanée même si les populations majoritaires de base se sont avérées relativement stables d'un individu à l'autre [71]. Jusqu'aux années 1980, la caractérisation du microbiote intestinal était exclusivement réalisée à l'aide de techniques de culture, ne prenant en compte que 20 % environ des micro-organismes présents [72].

2. Méthodes culture-indépendantes : la métagénomique :

2.1. Historique :

Après les années 1995, de nombreuses études ont montré l'intérêt d'étudier les flores microbiennes par utilisation de méthodes cultures indépendantes appelées méthodes de caractérisation métagénomique [73]. Ces nouvelles stratégies de dénombrement d'espèces visent à caractériser le matériel génétique contenu dans un échantillon sans passer par des étapes d'isolement cellulaire.

C'est au cours des années 1980 que Norman Pace, s'appuyant sur les résultats de séquençage d'ARN ribosomiques (ARNr) 16S de Carl Woese, commença à s'affranchir de l'obstacle de la culture en analysant, par PCR (polymerase chain reaction) et séquençage, les gènes d'ARN ribosomiques à partir de l'ADN extrait de communautés microbiennes. Les ARN ribosomiques jouent un rôle central dans la synthèse protéique, ce qui limite leur dérive évolutive et rend pratiquement impossible leur transfert horizontal. Ils constituent donc un identifiant très stable et fiable des organismes procaryotes et eucaryotes. C'est même autour de cette stabilité que s'est ancrée la notion d'espèce chez les bactéries ainsi que la classification phylogénétique. L'étude des communautés microbiennes, ou microbiotes, fut ainsi (re)lancée. Elle a connu, depuis une vingtaine d'années, un essor remarquable.

2.2. Principe de la métagénomique :

2.2.1. Etapes de caractérisation d'échantillons :

La figure 17 présente les différentes étapes dans l'analyse de la composition microbienne d'un milieu par utilisation de méthodes cultures indépendantes, ainsi que les deux méthodes les plus utilisées pour dénombrer le nombre d'espèces présentes dans un milieu.

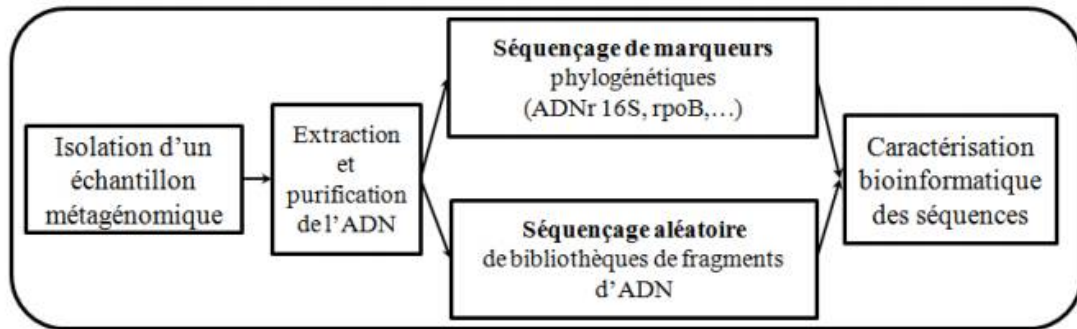


Figure 17: schéma représentant les étapes principales des méthodes de caractérisation culture-indépendante [74]

La première étape consiste à récupérer un échantillon représentatif de l'écosystème étudié. Une concentration d'ADN élevée est généralement conseillée pour réduire le nombre de cycle d'amplification de l'ADN, pouvant biaiser les analyses quantitatives du milieu. De plus, l'échantillon doit être conservé dans des conditions optimales afin de réduire la dégradation des cellules et de l'ADN associé.

L'extraction de l'ADN est effectuée par dégradation membranaire chimique, thermique ou mécanique. L'ADN est purifié par élimination des débris cellulaires et des protéines, puis digestion enzymatique des molécules d'ARN par utilisation de RNase. L'ADN purifié est finalement conservé à basse température (-20°C). Ainsi l'extraction de l'ADN constitue une étape critique dans la caractérisation d'une flore.

L'ADN doit ensuite être préparé pour le séquençage. Deux méthodes de préparation de l'ADN seront détaillées :

- Une méthode effectuant une amplification directe de régions phylogénétiques marqueur comme par exemple l'ADNr 16S,
- Et une méthode effectuant une cassure aléatoire de l'ADN, puis une ligation d'amorces de séquençage et enfin une amplification des fragments contenant des amorces.

Les amplifications sont effectuées par utilisation de réactions de polymérisation en chaîne ou PCR. Le principe de la PCR est de dénaturer l'ADN en simple brin, hybrider des amorces d'amplification, ajouter une ADN polymérase et des dNTP pour synthétiser le brin d'ADN complémentaire, réitérer le cycle jusqu'à atteindre la concentration d'ADN voulue.

L'ADN préparé est chargé dans un séquenceur à ADN. Enfin les données générées sont numérisées et sauvegardées dans des fichiers de séquences, dont le format est spécifique au séquenceur. Ces données seront utilisées pour caractériser les espèces présentes dans les échantillons.

2.2.2. Séquençage d'échantillons :

Les méthodes les plus utilisés sont :

- Séquençage par amplification dirigée des régions ADNr 16S :

L'ADNr 16S est une région de l'opéron ribosomique, composée d'environ 1500 nucléotides et constituée de 9 régions variables, flanquées par des régions conservées. Ces régions variables sont utilisées pour évaluer la distance entre les espèces de bactéries et d'archées. L'ADNr 16S est ainsi séquençé par amplification de régions d'intérêts conservées parmi les bactéries et archées.

Comme les régions variables de ces régions sont distancées par plus de 100 nucléotides, il est préférable de séquençer de longs fragments de plus de 500 nucléotides avec moins de 1% de positions de mauvaise qualité [74]. Le séquenceur 454 FLX Titanium est ainsi un bon compromis pour atteindre cette longueur et qualité de séquence. En 2012, un séquençage générant ~10000 séquences de ~500 nucléotides de longueur, avec deux erreurs maximum sur toute la longueur de la séquence était utilisé pour analyser les régions marqueurs 16S des échantillons de flore intestinale [74].

En 2013, les banques de données telles que NCBI ou RDP comptent plus de 2 millions de séquences d'ADNr 16S, provenant de nombreux écosystèmes, ce qui permet de comparer les séquences générées avec une large banque de référence. Pour cela, des chaînes de traitement bioinformatique sont utilisés pour caractériser les séquences générées, évaluer le nombre d'espèces dans un échantillon, et leur abondance relative.

Bien que le séquençage des régions 16S soit couramment utilisé et simple dans l'interprétation des résultats, il reste des limitations qui ne permettent pas d'estimer de manière optimale la composition des espèces microbiennes. Tout d'abord, les amorces de PCR amplifiant ces régions sont plus adaptées aux espèces bactériennes en général. Ainsi, certains genres d'archées sont difficilement détectables, comme *Methanobrevibacter* qui est pourtant une espèce abondante dans certaines flores intestinales. De plus, de nombreux cycles de PCR sont nécessaires pour amplifier spécifiquement la région 16S. Enfin, certaines espèces de genres bactériens restent difficiles à caractériser uniquement par la séquence ADNr 16S, comme les espèces du genre *Streptococcus* ou *Enterobacter* [74].

- Séquençage aléatoire de l'ADN de l'échantillon :

Cette méthode s'est largement répandue depuis 2009 pour la caractérisation d'échantillons métagénomiques, avec notamment le séquençage global de plusieurs centaines d'échantillons de flore intestinale comme dans le projet MetaHIT (Metagenomics of the human intestinal tract), un projet qui a pour objectif d'étudier le métagénome d'individus sains et de le comparer à celui d'individus atteints de maladies dans lesquelles on sait que la flore intestinale joue un rôle important (obésité, MICI) afin de caractériser des profils spécifiques de ces maladies au niveau du métagénome, et de développer des outils de diagnostic [75]. Cette méthode permet de séquencer directement le contenu global de la partie dominante et sous-dominante des génomes de la flore microbienne. Il est alors possible d'évaluer la présence et l'abondance relative de fragments génomiques au sein d'un échantillon. Le principe du séquençage global est quasi similaire à celui de l'ADNr 16S, mais nécessite cette fois-ci un découpage aléatoire de l'ADN chromosomique pour ajouter des amorces de séquençage aux extrémités.

Il est possible de visualiser la variabilité au sein des gènes lorsque les séquences générées sont suffisamment abondantes. Cependant les longueurs des séquences sont plus faibles que celles du 454 FLX Titanium, avec une longueur comprise entre 35 à 150 nucléotides seulement.

2.2.3. Traitements bioinformatiques et caractérisation :

Nous présentons ici les deux méthodes pour caractériser les séquences d'un écosystème en espèces microbiennes.

- Méthode par alignement des séquences sur référence connue :

Lorsque les séquences générées sont courtes (moins de 100 nucléotides) et que des génomes de référence représentatifs de l'écosystème étudié existent, il est possible d'identifier des millions de courtes séquences générées par alignement sur des références génomiques, aussi appelé mapping.

Les méthodes d'alignement des courtes séquences sur des références génomiques permettent de détecter les espèces présentes dans une flore. La qualité de la référence choisie est déterminée par le nombre de séquences alignées sur la référence. Cependant, comme certaines flores comme la flore intestinale ou la flore alimentaire sont peu caractérisées, il est difficile d'établir une référence exhaustive de ces échantillons. Une solution serait de sélectionner tous les génomes actuellement disponibles dans les banques de référence, soit 8000 génomes bactériens, 2000 génomes eucaryotes, 200 génomes d'archées et 5000 génomes de virus (en janvier 2013) et d'évaluer leur présence dans les échantillons. Cependant, le temps de calcul d'alignement sera d'autant plus long, ce qui pose problème sur les projets à plusieurs centaines d'échantillons.

- Méthode par assemblage des courtes séquences en catalogue de référence :

Une autre solution pour la caractérisation des courtes séquences est d'établir une référence de novo d'une flore étudiée par utilisation de séquences plus longues pour créer un catalogue de fragments de référence adapté à la flore étudiée.

2.3. Avantages et limites de la métagénomique :

Les méthodes de caractérisation basées sur le séquençage de régions phylogénétiques comme l'ADNr 16S sont largement utilisées pour estimer le nombre d'espèces et leur abondance relative au sein d'un échantillon. Cependant, ces marqueurs ne sont pas toujours suffisants pour obtenir une résolution taxonomique au niveau de l'espèce, et l'abondance

relative de différentes espèces détectées peut être biaisée dans le comptage car l'ADNr 16S est en multiples copies, variables au sein des génomes et que la méthode nécessite une amplification par plusieurs cycles de PCR.

Les méthodes de caractérisation d'échantillons métagénomiques basées sur le séquençage global de l'ADN sont récentes et apportent de nouvelles informations, comme la présence des gènes et leur abondance. Cependant, il faut une bonne profondeur de séquençage et des références génomiques représentatives de l'écosystème étudié pour utiliser ces méthodes. Dans le cas où il n'existe pas de référence adaptée, une alternative est d'effectuer un assemblage de novo des séquences de l'échantillon, comme dans le projet MetaHIT.

Toutefois, les fragments reconstitués resteront non structurés en espèces microbiennes et ne peuvent être directement utilisés pour dénombrer le nombre d'espèces d'un échantillon.

Ainsi, malgré les progrès considérables que la métagénomique a permis pour étendre la définition du répertoire, une grande partie de ce dernier, dénommée usuellement la « *dark matter* » et qui correspond à un nombre incalculable de séquences nucléotidiques n'étant assignées à aucun microorganisme connu, résiste à cette avancée technologique et demeure totalement inconnue [76].

3. La culturomique :

3.1. Introduction :

Depuis quelques années, la culture microbienne a connu un renouveau important, en premier lieu grâce aux microbiologistes de l'environnement qui ont développé des conditions de culture pour imiter l'environnement naturel d'une bactérie facilitant ainsi sa croissance afin de cultiver des microorganismes auparavant considérés comme non cultivables [77].

La révolution de l'identification bactérienne a également permis des progrès rapides. L'identification à haut débit par spectrométrie de masse MALDI-TOF, technique complétée par l'identification systématique par séquençage du gène de l'ARN 16s ribosomique a autorisé l'identification à haut débit de rares espèces et la détection de nouvelles espèces.

En utilisant ces méthodes et en augmentant le nombre de conditions culturelles –plus de 200 conditions de culture différentes, nous avons entrepris d'étudier à nouveau le microbiote humain par culture en commençant par le microbiote digestif [78].

3.2. Chambres de diffusion :

Les composés chimiques permettant d'augmenter le nombre d'espèces bactériennes pouvant être cultivées restent difficiles à caractériser; cependant, plusieurs auteurs ont appliqué une approche empirique en utilisant une «chambre de diffusion».

Kaeberlein et al. Ont introduit une méthode de culture in situ qui évite les difficultés de reproduction de l'environnement naturel causées par les approches habituelles basées sur des boîtes de Pétri. Les auteurs ont placé des bactéries dans une chambre de diffusion qui a ensuite été réintroduit dans l'environnement à l'origine de l'échantillon. La chambre de diffusion était composée d'un mélange d'agar et d'un échantillon environnemental dilué, pris en sandwich entre deux membranes collées sur une rondelle (Fig.18).

Cette chambre de diffusion permettait de cultiver jusqu'à 40% des cellules bactériennes provenant de sédiments marins, contre 0,05% sur les boites de Pétri.

Pour la culture de 3 échantillons d'environnement différents, Aoi et al. Ont comparé la performance de cultures standards avec celle d'un système utilisant une chambre à membrane poreuse à fibres creuses, permettant l'échange rapide de composés chimiques de l'environnement naturel. Au total, 10 à 48% des isolats étaient potentiellement de nouvelles espèces bactériennes identifiées à l'aide de la chambre de diffusion, contre 0 à 4% à l'aide d'une culture standard.

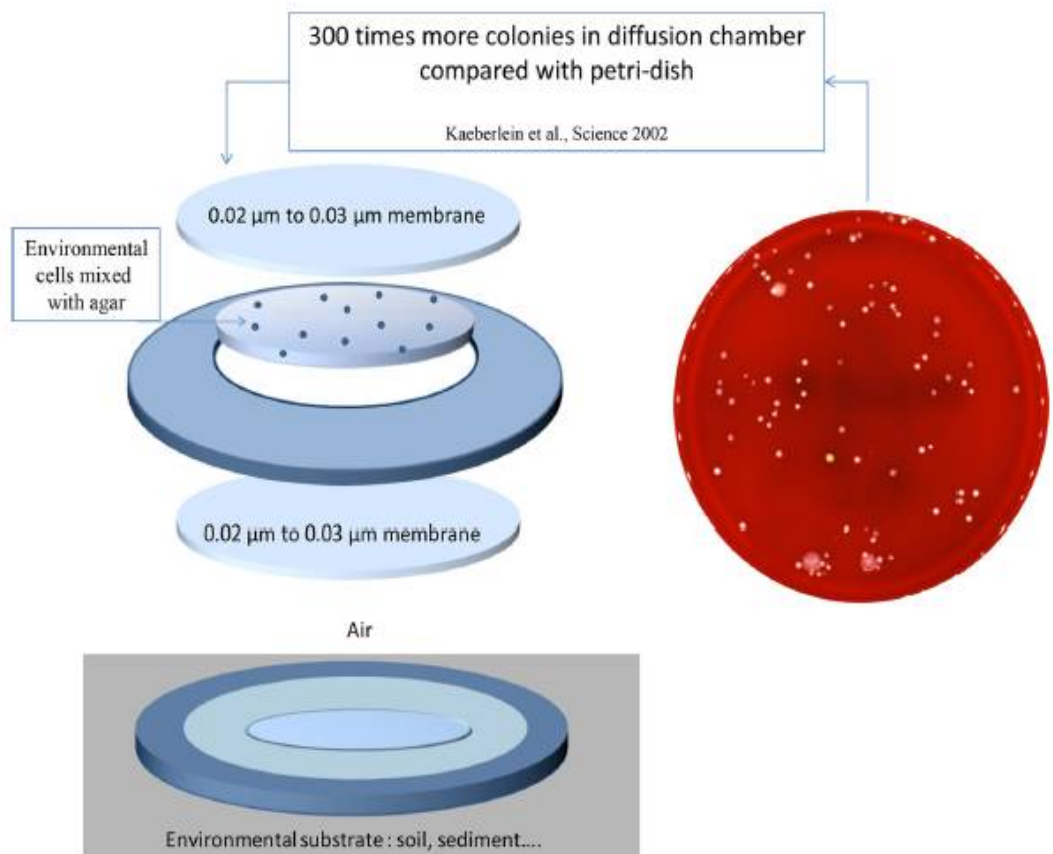


Figure 18: Contribution des microbiologistes de l'environnement à l'amélioration de la culture bactérienne grâce aux chambres de diffusion, permettant au nombre de colonies cultivées d'augmenter 300 fois en imitant l'environnement naturel [77]

Les chambres de diffusion peuvent être utilisés pour l'étude du microbiote intestinal humain [77].

3.3. Milieux de culture :

3.3.1. Les premiers milieux utilisés :

Aussi bien des milieux sélectifs que non sélectifs ont été utilisés.

Les selles diluées en tampon stérile ont ensuite été inoculées en dilution jusqu'à 10^{-10} afin d'essayer de repérer certaines colonies minoritaires.

Le premier milieu non sélectif était le Columbia enrichi de 5% de sang de mouton (Fig.19) dans différentes conditions d'incubation : aérobie Sous 5 % de CO₂, anaérobie, microaérophilie a des températures allant de 4 à 55 °C dans des jarres humidifiées afin d'éviter le dessèchement des géloses. Cette procédure est dérivée de la technique que utilisé pour isoler les *Bartonella* qui sont les bactéries axéniques à la croissance la plus longue sur lesquelles on travaille en routine. Les premières colonies identifiées l'étaient après 24 et 48 h d'incubation mais cette incubation a été prolongée 2 mois avec un examen hebdomadaire à la recherche de bactéries à croissance lente. La présence d'espèces très majoritaires qui masquent la croissance d'autres espèces de culture plus difficile limite cette approche, néanmoins cela a permis de découvrir 4 nouvelles espèces [79]. Ainsi, les efforts des réalisateurs de cette étude se sont portés par la suite sur des stratégies permettant d'éliminer les populations majoritaires pour essayer d'isoler les espèces minoritaires. Divers antibiotiques et inhibiteurs ayant été déjà utilisés à cet effet et qui ont été testés : colimycine, kanamycine, vancomycine, éosine, extrait de bile, bleu de méthylène, citrate de sodium ou thiosulfate de sodium. La squalamine a été en outre utilisée dans cette indication à des doses comprises entre 5 et 15 g/l, cette molécule ayant un effet antimicrobien sur les membranes des bactéries a Gram positif et à Gram négatif [78].



Figure 19: Isolement sur gélose Columbia 5% de sang de mouton [78]

3.3.2. Méthodes de sélection sur échantillon de départ :

Afin de sortir des populations minoritaires, les auteurs de cette étude ont pensé à éliminer les populations majoritaires avant l'étape de culture par divers modes de sélection :

- Sélection par la taille et la mobilité comme cela a déjà été fait pour les spirochètes en utilisant une filtration active et passive sur des filtres successifs compris entre 5 et 0.2 μm . Deux nouvelles espèces qui ont été nommés *Herbaspirillum massiliensis* et *Cellulomonas massiliensis* ont été isolées ainsi.
- Sélection des bactéries sporulées par choc Thermique, technique communément employée comme le traitement par l'alcool pour isoler les *Clostridium*. Plusieurs protocoles ont été utilisés avec des températures comprises entre 65 °C et 80 °C pour des durées allant de 20 min à 1 h.

- La méthode de sélection la plus originale a consisté en l'utilisation de cocktails de phages lytiques destinés à éliminer là encore les populations majoritaires. A côté d'applications en thérapeutique, longtemps utilisées dans les anciens pays de l'Est et qui connaissent un certain regain d'intérêt actuellement pour lutter contre les bactéries multi résistantes, les phages ont déjà été utilisés pour décontaminer des prélèvements.

Dans une selle particulièrement riche en *E. coli*, l'utilisation de phages T1 et T4 lysant la moitié de la population d'*E. coli* a permis de « démasquer » une nouvelle espèce d'entérobactéries qui a été nommée *Enterobacter massiliensis* [80].

3.3.3. Enrichissement des milieux :

La méthode ayant permis l'augmentation la plus significative du nombre de bactéries isolées a été l'inoculation des selles diluées en tampon sur des flacons pour hémoculture.

Cette approche a en effet permis l'isolement de 50 des 91 nouvelles espèces identifiées. Contrairement à la procédure utilisée pour isoler *Kingella kingae* des prélèvements ostéo-articulaires et pour laquelle cette méthode améliore très significativement l'isolement, dans ce cas le milieu a été enrichi de 5 % de sang de mouton. Outre un milieu riche et une atmosphère optimale pour ce qui est de l'anaérobiose, on suppose que cette inoculation permet une dilution d'inhibiteurs potentiels dans le prélèvement.

Des flacons aérobie et anaérobie ont été inoculés, incubés à 37 °C puis repiqués sur un panel de géloses à intervalles réguliers entre 1 et 30 jours.

Un autre système d'enrichissement a été de rajouter du fluide de rumen, un promoteur de pousse bactérienne utilisé de longue date pour isoler les tréponèmes intestinaux et autres bactéries anaérobies.

L'ajout de ce fluide dans les flacons d'hémoculture en plus de sang a permis d'isoler 17 espèces supplémentaires par rapport aux conditions précédentes sans fluide et de plus à isoler et identifier 30 nouvelles espèces bactériennes.

En revanche, la procédure de préparation de ce fluide de rumen, qui n'est pas disponible commercialement, est longue et fastidieuse [78].

Certaines bactéries, telles que *Mycoplasma*, Nécessitent l'ajout d'acides gras pour leur croissance. Les échantillons de selles ont été dilués au 1/10 dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), puisensemencés avec 6 ml de Medialipid à 20% : composé riche en triglycérides à chaîne moyenne et en huile de soja, dans des flacons d'hémoculture anaérobies pendant 2 à 60 jours. Le bouillon a ensuite été inoculé dans une gélose au sang de mouton à 5% dans des conditions anaérobies à 37 ° C. À l'aide de ce nutriment, *Bacillus okuhidensis* a été isolé pour la première fois chez l'homme [77].

L'acide ascorbique a été utilisé comme facteur de croissance pour *Spirochaeta gallinarum*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus* et plusieurs espèces anaérobies.

Pour analyser ses propriétés, un échantillon de selles a été inoculé dans un flacon d'hémoculture avec du liquide ruminal et 500 g / ml d'acide ascorbique. De plus, la même concentration d'acide ascorbique a été ajoutée à une gélose à 5% de sang de mouton. Cette stratégie a permis de cultiver *Enterococcus canintestini*, qui a été isolé pour la première fois de la flore intestinale humaine [77].

3.3.4. Réduction du nombre de conditions de culture :

Lagier et al. ont analysé 212 conditions de culture différentes et ont identifié 340 nouvelles espèces bactériennes, dont 174 espèces bactériennes détectées pour la première fois dans l'intestin. Néanmoins, une analyse affinée des résultats a montré que les 20 conditions de culture les plus efficaces permettaient d'identifier 73% des 340 bactéries cultivées dans leur étude, dans au moins un des 3 échantillons de selles analysés. De plus, toutes les bactéries identifiées dans la première étude ont été cultivées au moins une fois dans l'une des 70 conditions de culture et ont été utilisées pour les études suivantes avec divers échantillons de selles. Jusqu'à présent, entre 3 000 et 34 000 colonies différentes ont été analysées dans chaque échantillon de selles.

Avec 14 échantillons de selles déjà rapportés et complètement analysés par culturomique avec une vaste étude utilisant quelques conditions appliquées à 347 échantillons de selles et avec l'analyse de 170 000 colonies par MALDI-TOF MS, 559 espèces bactériennes ont été cultivées, dont 281 espèces de Phylum Firmicutes, 135 du phylum Actinobacteria, 82 du phylum Proteobacteria, 52 du phylum Bacteroidetes, 6 du Fylumbacterium Phylum, 2 du Phylum Synergistetes et 1 du Deinococcus-Thermus phylum. Parmi ces espèces, 304 espèces bactériennes ont été décrites pour la première fois dans l'intestin, y compris 59 nouvelles espèces bactériennes. En plus des projets en cours, la culturomique a permis d'identifier 717 espèces bactériennes différentes, dont 91 nouvelles bactéries, 168 espèces d'abord isolées chez l'homme et 155 espèces déjà décrites chez l'homme mais isolées pour la première fois de l'intestin.

La réduction de la charge de travail sera le premier objectif de la normalisation de la culturomique.

Actuellement, la culturomique nécessite une main-d'œuvre nombreuse et implique charge de travail considérable pour les analystes. Par conséquent, pour normaliser la culturomique, le nombre de conditions de culture utilisées doit être réduit. Les résultats préliminaires ont sélectionné 18 conditions de culture différentes pour standardiser la culturomique. Ces conditions ont été utilisées pour surveiller les cultures bactériennes dans un milieu liquide sur une période de 30 à 40 jours, avec des sous-cultures sur un milieu solide tous les 3 jours. L'objectif est d'analyser 12 000 colonies pour chaque échantillon de selles, car le nombre d'espèces bactériennes supplémentaires isolées pour chaque échantillon a diminué de manière significative lorsque ce nombre de colonies a été analysé [77].

3.4. MALDI-TOF pour l'identification :

Les applications de la spectrométrie de masse sont très vastes et concernent principalement l'identification de peptides ou de protéines, l'analyse de leur séquence en acides aminés ou encore la mise en évidence de modifications post-traductionnelles.

Cette technologie largement utilisée depuis longtemps, s'implante depuis quelques années en microbiologie. Le principe général du MALDI-TOF-MS est simple : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge (m/z).

La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, l'évaporation des solvants conduisant à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon.

Le mélange ainsi formé est déposé sur un support (plaque métallique). Plusieurs techniques de dépôt existent : les préparations en « couches minces » : l'échantillon est déposé sur une couche de matrice préalablement déposée sur la plaque cible pour former de larges films minces polycristallins ; les préparations en « gouttes épaisses » ou « gouttes sèches » : matrice et échantillon sont mélangés soit dans un tube puis déposés sur la plaque cible, soit directement sur la plaque cible ; les préparations en « sandwich » : l'échantillon est déposé sur un film de matrice avant d'être lui-même recouvert par une dernière couche de matrice. Une fois les échantillons déposés sur la cible, cette dernière est introduite dans le spectromètre de masse. Chaque dépôt est soumis à l'action du rayon laser UV. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes.

Les ions ainsi formés, généralement de charge +1 dans le cas du MALDI, vont être mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique, et l'analyseur va les séparer en fonction de leur rapport m/z . Ils traversent ensuite un certain nombre de grilles d'extraction avant d'atteindre le « tube de vol » à l'extrémité duquel se trouve le détecteur.

Les ions sont séparés selon leur temps de vol, ceux de petite taille atteignant les premiers le détecteur. Le temps de vol (*time of flight*) pour atteindre le détecteur est utilisé pour calculer la masse de chaque particule. La somme des ions analysés va former un spectre caractéristique de l'échantillon. Classiquement, l'axe des abscisses correspond au rapport masse sur charge (m/z) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal.

Les paramètres expérimentaux : méthode d'extraction des protéines, concentration en NaCl, composition des tampons utilisés, conditions de culture, nature du dépôt (goutte séchée, couche mince, etc.) influencent la qualité des spectres en modifiant la cristallisation de la

matrice avec l'échantillon et, par conséquent, l'efficacité d'ionisation des molécules testées. Maîtriser et standardiser ces variables permet d'optimiser l'identification et d'augmenter la reproductibilité. Le choix de la matrice utilisée est un paramètre important. Elle doit être adaptée à la nature de l'échantillon et répondre à certains critères physico-chimiques pour obtenir un bon rendement d'ionisation et un spectre de bonne résolution.

Les matrices les plus utilisées sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique ou DHB), l'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique ou SA) et l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (alpha-CHCA).

Dans son application en microbiologie, la technique du MALDI-TOF repose sur la détection de peptides ; les conditions de croissance des pathogènes jouent donc un rôle déterminant dans la variabilité et la qualité des spectres qui sont influencées de façon plus ou moins importante par les milieux de culture et le temps d'incubation. De même, la qualité du dépôt, le séchage et le mélange avec la matrice influencent la cristallisation. Le contrôle et la standardisation de ces paramètres permettent de limiter ces variations. La nature exacte des peptides détectés est mal connue.

Il s'agit essentiellement de protéines cytosoliques basiques, en quantité abondante, hydrophiles, dont les principales identifiées sont les protéines ribosomales ou les « *cold shock proteins* ».

L'identification des micro-organismes par cette technique repose sur la constatation que l'empreinte spectrale est différente d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre (Fig.20). La réalisation des banques de données doit prendre en compte les variations de spectres afin de développer une stratégie fiable permettant une identification précise [81].

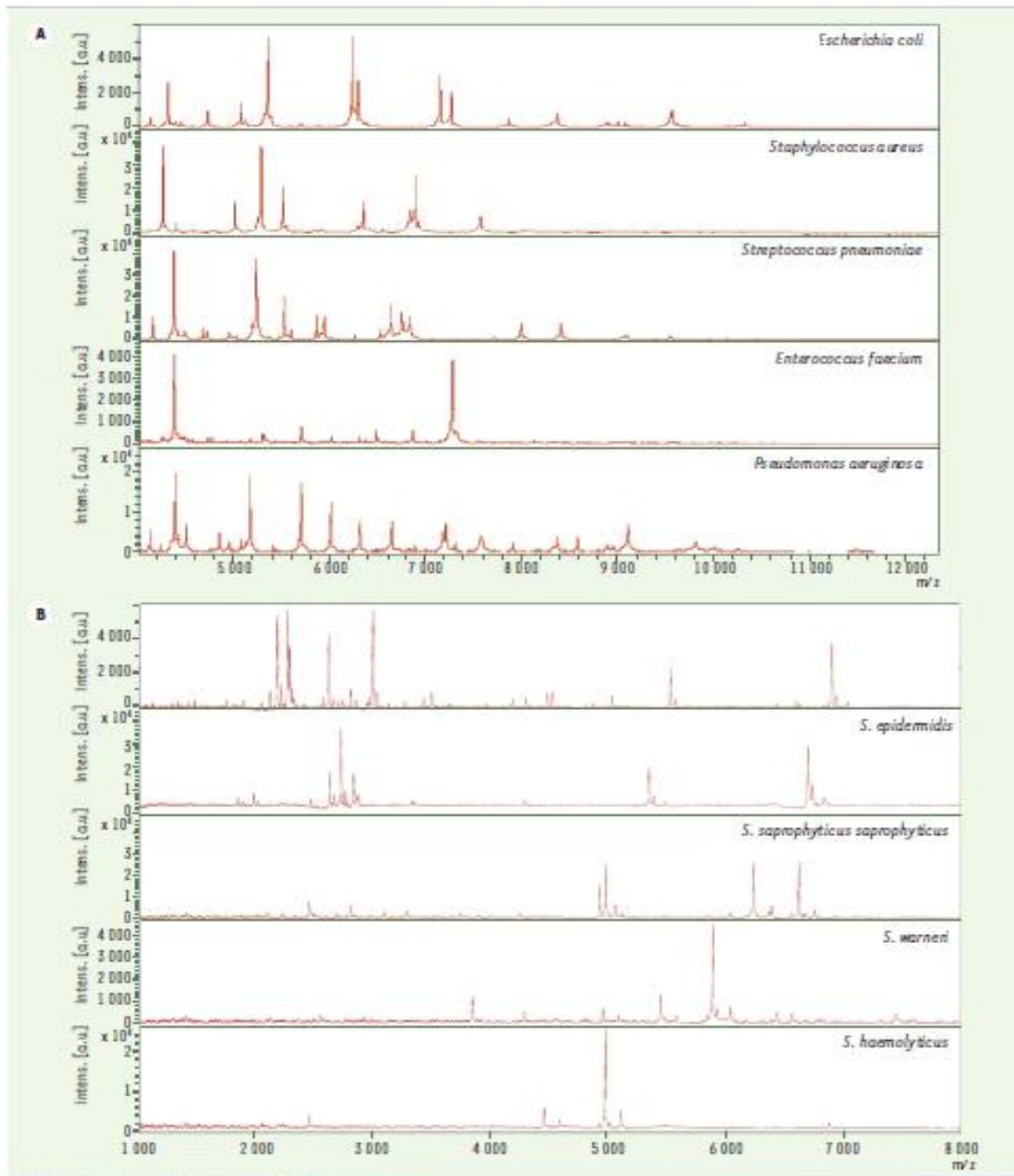


Figure 20: Exemples de spectres obtenus à partir de colonies entières de 5 espèces bactériennes différentes [81]

3.5. De la culturomique à la taxogénomique :

La classification actuelle des procaryotes, généralement appelé taxonomie polyphasique, repose sur une combinaison des caractéristiques phénotypiques et génotypiques. Toutefois, la validité de plusieurs des critères utilisés a été débattue. Actuellement, les critères génotypiques primaires utilisés en taxonomie bactérienne incluent l'hybridation ADN-ADN, contenu en GC et similarité de séquence ARNr 16S.

Bien que conçu de manière empirique, hybridation ADN-ADN est considérée comme le critère de l'étalon-golden pour estimer le degré de parenté génétique entre les procaryotes. Une valeur d'hybridation ADN-ADN de ≤ 70 % est considérée comme le seuil de décision permettant la définition de nouvelles espèces.

Cependant, diverses limitations ont été signalées, y compris son coût élevé ; le manque de reproductibilité inter-laboratoire et inter-essai, empêchant la création d'une base de données de référence ; et la valeur seuil n'étant pas applicable à tous les genres de procaryotes, comme c'est le cas pour les membres du genre *Rickettsia*. De même, le pouvoir discriminatoire d'identité de séquence de l'ARNr the16S varie beaucoup d'un genre à l'autre. A l'origine, les seuils utilisés pour classer les isolats bactériens au sein de nouvelles espèces ou genres ont été 97 % et 95 %, respectivement ; Toutefois, la valeur seuil au niveau de l'espèce a été réévaluée à 98,7 % en 2006.

Stackebrandt et autres ont proposé que les valeurs d'identité ARNr 16S pourraient remplacer l'hybridation ADN-ADN. Plus récemment, Meier-Kolthoff et autres ont proposé qu'un seuil d'entre 98,2 et identité de séquence d'ARNr 16S 99,0 % pourrait servir comme une alternative sûre à l'hybridation de l'ADN. Toutefois, le séquençage des ARNr 16 s présente aussi plusieurs biais, notamment un haut degré de conservation dans certains genres. Des séquences génomiques de micro-organismes constituent une source importante d'information génétique qui pourrait fournir des données sans égal pour le développement et l'identification des outils de génotypage, aussi bien en ce qui concerne la conception des milieux de culture. Nous croyons que microbiogénomique, qui se compose du séquençage des génomes de tous les micro-organismes cultivés pour lesquels aucune de ces séquences ne sont encore disponibles, sera une avancée majeure en microbiologie clinique (fig. 21).

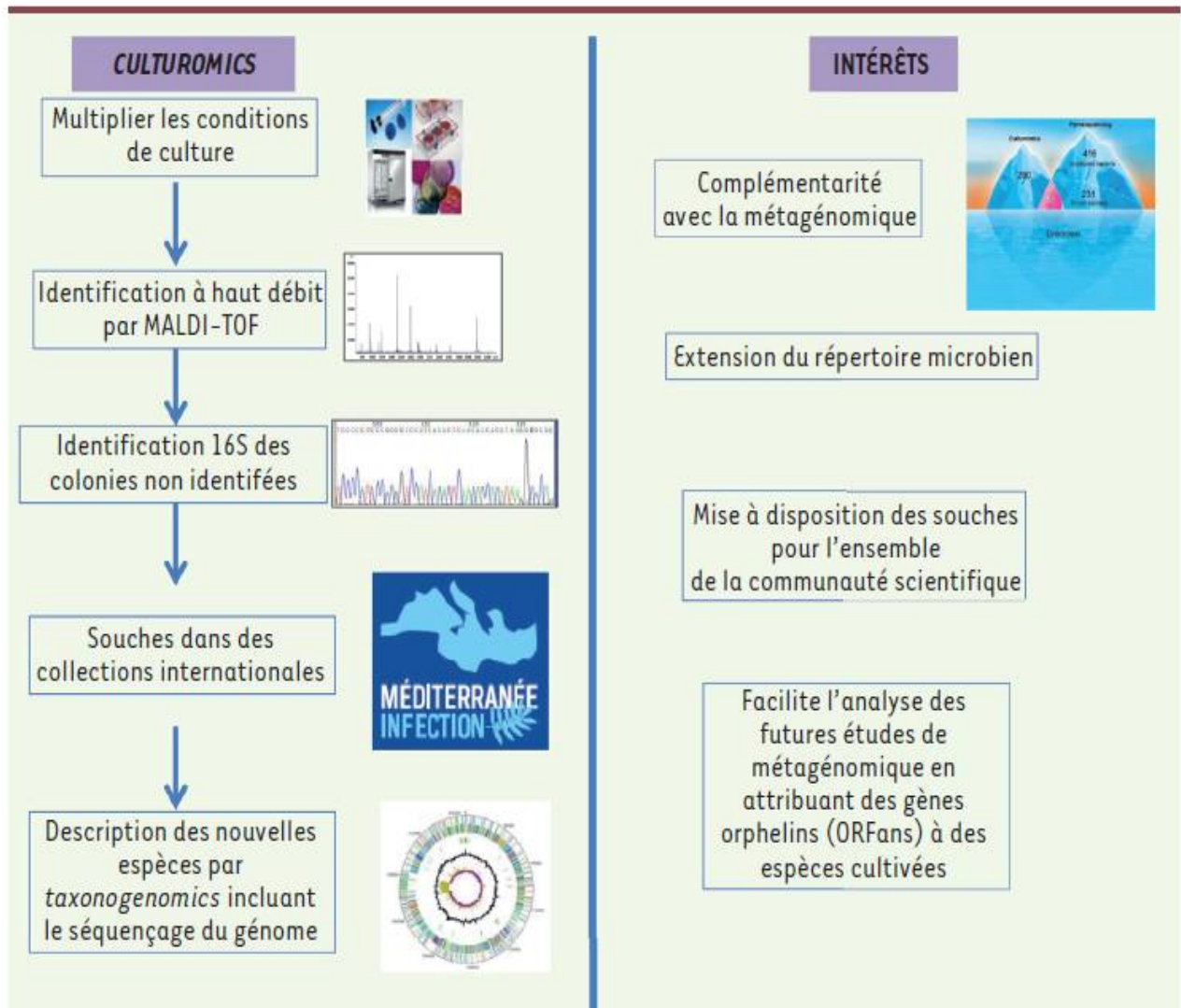


Figure 21: Schéma explicatif de la culturomique et son intérêt en taxogénomique [82]

Bien que le séquençage du génome entier constitue une révolution en donnant accès à l'ensemble des informations génétiques d'une souche bactérienne, cette méthode n'a pas encore été officiellement acceptée comme une source d'information taxonomique. Cependant, bien que cette technique était précédemment - et argent-temps, à cause des méthodes de séquençage de nouvelle génération haut débit (NGS), séquençage d'un génome bactérien complet exige actuellement que quelques jours et coût limité. À compter de janvier 2014, > 37, 000 projets de séquençage de génome bactérien ont été achevés ou sont en cours.

Ces séquences sont alors rendues disponibles dans des bases de données publiques, faciliter des comparaisons de séquences de génomes complets de nouvelles souches bactériennes.

Taxonogenomics consiste en une approche polyphasique, incorporant des données phénotypiques et génotypiques, pour décrire une nouvelle espèce bactérienne. Tout d'abord, nous considérons les souches bactériennes qui présentent une identité de séquence des ARNr 16S de < 98.7 % par rapport aux espèces phylogénétiquement plus proches ayant qualité pour agir dans la nomenclature, comme recommandé précédemment, comme appartenant à une espèce nouvelle putative, pourvu que cette valeur d'identité est dans la plage d'identités observées entre les espèces validement publiées au sein du même genre. Ensuite, nous étudions les principales caractéristiques phénotypiques de la souche bactérienne, comme habitat, coloration de Gram, microscopie, culture primaire et caractéristiques métaboliques ; protéiques spectres obtenus par MALDI-TOF MS ; et caractéristiques génomiques (taille du génome ; Contenu en GC ; pourcentage de codage de séquences ; contenu du gène ; distribution des gènes dans les catégories COG ; nombre et types de gènes d'ARN ; la présence ou l'absence d'éléments génétiques mobiles et peptides signaux transmembranaire Heli et moyenne identité génomique des séquences de gènes orthologues, par rapport aux caractéristiques de l'espèce étroitement apparenté ayant qualité pour agir dans la nomenclature [83].

3.6. Avantages et limites de la culturomique :

Le plus fascinant avec les résultats obtenus en culturomique, c'est non seulement l'importance de la diversité observée, avec notamment l'isolement d'espèces jamais isolées dans le tube digestif et surtout d'espèces ou genres complètement nouveaux, mais aussi le faible recouvrement observé avec l'analyse du même microbiote par la métagénomique 16S. Dans le premier travail, 212 conditions de culture ont été utilisées et 32 500 colonies bactériennes analysées. Par cette méthode, 340 espèces appartenant à 117 genres ont été identifiées. Parmi celles-ci, 174 espèces n'avaient jamais été décrites dans le microbiote humain, dont 31 représentaient de nouvelles espèces. L'analyse de la même selle par métagénomique 16S a permis d'identifier 698 phylotypes dont 282 espèces déjà connues mais

surtout un recouvrement de seulement 51 espèces avec l'étude en culturomique. Cette étude princeps a ainsi montré pour la première fois qu'une approche culturomique devait absolument être associée à une étude métagénomique si le but est d'étudier la diversité microbienne et non pas de faire l'inventaire des populations dominantes. L'étude ultérieure réalisée sur la selle d'une patiente atteinte d'anorexie mentale a confirmé ces données.

Les travaux qui ont suivi ont confirmé les résultats de cette première étude, notamment la capacité à mieux évaluer la diversité que la métagénomique. Dans un travail réalisé sur la selle d'une patiente atteinte de tuberculose multi-résistante, 70 conditions de culture ont été testées. Chez cette patiente, la faible diversité bactérienne était très marquée et dans ces conditions, alors que la métagénomique 16S permettait d'identifier 18 phylotypes, la culturomique a permis d'identifier 39 espèces bactériennes différentes dont une nouvelle espèce.

La supériorité de l'approche culturomique pour l'évaluation de la diversité d'une flore pauvre chez des patients traités par antibiotiques au long cours a été confirmée dans le travail suivant étudiant les selles de quatre patients en utilisant 77 conditions de cultures différentes et en analysant 32 000 colonies bactériennes différentes.

Pour deux patients, une baisse de la diversité microbienne était observée en culturomique alors qu'elle était suggérée pour les quatre par l'analyse métagénomique et à nouveau huit nouvelles espèces bactériennes ont été identifiées.

Une part de cette meilleure analyse de la diversité semblait associée, au moins pour un patient, au fait que l'espèce dominante/masquant (phylum des *Verruimicrobiae*) en métagénomique n'était pas cultivable [78].



Conclusion



Tous ces éléments appellent un certain nombre de réflexions, comme nous avons vu : des modifications structurales (perte d'espèces bactériennes « protectrices », implantation de bactéries pathogènes..) et, par conséquent, fonctionnelles du microbiote intestinale sont impliquées dans de nombreuses pathologies humaines, notamment digestives et métaboliques.

Devant ces constatations, la modulation du microbiote intestinal a été proposée comme approche thérapeutique. Nous avons présenté deux approches : la transplantation fécale et la supplémentation avec des probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques.

La transplantation fécale est un domaine en plein essor, qui a montré son efficacité clairement dans le traitement des récidives de colite à *Clostridium difficile*, constituant une véritable preuve de concept. La sécurité de la bactériothérapie fécale est un enjeu crucial, qui a été récemment encadré par l'agence nationale de sécurité des aliments

L'espoir est de mieux cibler les bactéries ou consortiums de bactéries spécifiques à chaque état pathologique, permettant une fécothérapie ciblée, qui constituera sans nul doute un des pans importants des thérapeutiques d'avenir.

Les probiotiques et prébiotiques sont actuellement confrontés à un paradoxe : le marché est en pleine expansion avec une gamme large, tandis que les études scientifiques, très prometteuses, ne sont néanmoins pas encore suffisamment significatives pour donner aux pré et probiotiques leur place dans les stratégies thérapeutiques. Devant ce constat, le pharmacien a un rôle clé, il doit guider et conseiller le patient sur le choix de la souche et son indication.

Et ainsi, se révèle l'importance de l'étude quantitative et qualitative du microbiote intestinale par les 2 méthodes complémentaires : métagénomique et culturomique, si la métagénomique évalue relativement bien la présence des différentes flores majoritaires, notamment s'agissant de bactéries non encore cultivables, la culturomique évalue probablement mieux la diversité des flores minoritaires, notamment quand il s'agit de flores relativement pauvres dominées par quelques espèces surreprésentées.



Résumés



Résumé

Titre : La Culturomique, une nouvelle méthode d'étude du microbiote intestinal

Auteur : HARKATI Salma

Directeur de thèse : Pr. SEKHSOKH Yassine

Mots clés : Culturomique - Dysbiose - Métagénomique - Microbiote intestinal - Transplantation fécale.

Le microbiote intestinal est l'ensemble des microorganismes - principalement des bactéries - qui colonisent notre tube digestif. Un être humain héberge 10^{14} bactéries dans son tractus digestif soit dix fois plus que de cellules eucaryotes. L'étude du microbiote intestinal est un domaine exploratoire de grande importance qui a dévoilé le rôle fondamental qu'il joue dans la physiologie intestinale mais aussi dans la santé humaine de façon plus générale.

Les humains peuvent être considérés comme des supra-organismes composés, d'une part, de leurs cellules humaines et, d'autre part, d'une grande diversité de micro-organismes qui colonisent tous les organes du corps en contact avec le compartiment extérieur. La perturbation de ce dialogue entre les bactéries et les cellules humaines constitue un facteur de risque, voire la cause de différentes maladies. La restauration de ce dialogue par la transplantation fécale ou la prise de probiotiques- prébiotiques et symbiotiques, constitue une nouvelle approche thérapeutique.

L'étude du microbiote intestinal a été rendue possible grâce à l'avènement des techniques de séquençage à haut débit des flores microbiennes normales et pathologiques, et par une approche basée sur l'utilisation de plus de 200 conditions de cultures différentes nécessitant l'identification de milliers de colonies par l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF : la culturomique.

Abstract

Title : culturomics, a new method for intestinal microbiota study

Author : HARKATI Salma

Director of the thesis : Pr. SEKHSOKH Yassine

Key words : Culturomics - Dysbiosis – Fecal transplantation -- Intestinal microbiota – Metagenomics .

The intestinal microbiota is the set of microorganisms - mainly bacteria - that colonize our digestive tract. A human being hosts 10^{14} bacteria in his digestive tract, ten times more than eukaryotic cells. The study of the gut microbiota is a very important field of exploration that has revealed the fundamental role it plays in intestinal physiology but also in human health more generally.

Humans can be thought of as supra-organisms composed, on the one hand, of their human cells and, on the other hand, of a great diversity of microorganisms that colonize all body organs in contact with the outer compartment. The disruption of this dialogue between bacteria and human cells is a risk factor, or even the cause of various diseases. The restoration of this dialogue by faecal transplantation or the taking of probiotics-prebiotics and symbiotics, constitutes a new therapeutic approach.

The study of the gut microbiota has been made possible by the advent of high throughput sequencing techniques of normal and pathological microbial flora, and by an approach based on the use of more than 200 different culture conditions requiring identification. thousands of colonies by the use of MALDI-TOF mass spectrometry: the culturomics.

ملخص

العنوان : الكلتروميكس, طريقة جديدة لدراسة جراثيم الامعاء

المؤلفة : الحركاتي سلمى

مدير الاطروحة : الاستاذ سخسوخ ياسين

الكلمات الاساسية : كلتروميكس – خلل في توازن جراثيم الامعاء - الميتاجينوميك – جراثيم الامعاء - زرع الميكروبات البرازية.

الجراثيم المعوية هي مجموعة من الكائنات الدقيقة - أساساً البكتيريا - التي تستعمر السبيل الهضمي. إن الإنسان يستضيف 10^{14} بكتيريا في جهازه الهضمي، أي أكثر بعشر مرات من الخلايا حقيقية النواة. تعتبر دراسة ميكروبات الأمعاء حقلاً مهماً للغاية من الاستكشافات التي كشفت عن الدور الأساسي الذي تلعبه في فسيولوجيا الأمعاء ولكن أيضاً في صحة الإنسان بشكل عام.

يمكن اعتبار البشر ككائنات فوق-عضوية تتكون ، من ناحية ، من خلاياها البشرية ، ومن ناحية أخرى ، من تنوع كبير في الكائنات الحية الدقيقة التي تستعمر جميع أعضاء الجسم التي تدخل في اتصال مع الوسط الخارجي. تعطل هذا التوازن بين البكتيريا والخلايا البشرية يشكل عامل خطر بل سببا للعديد من الامراض. إن إعادة هذا الحوار عن طريق الزرع البرازي أو تناول البروبيوتيك-البريبايوتكس و السامبيوتكس ، يشكل مقاربة علاجية جديدة.

لقد أصبحت دراسة الجراثيم الأمعاء ممكنة بفضل ظهور تقنيات تسلسلية عالية لمعدلات الجراثيم الطبيعية والمرضية، وبطريقة تعتمد على استخدام أكثر من 200 طريقة زراعة مختلفة تتطلب الكشف عن الاف المستعمرات الجرثومية باستخدام مقياس الطيف الكتلي TOF-MALDI : الكلتروميكس.



Bibliographie



- [1] **Corthier G, Doré J.** Une ère nouvelle dans le domaine des interactions entre le microbiote et la santé humaine. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2010;34(4):1-6.
- [2] **Sokol H.** Microbiote, ce qu'il faut savoir. *Côlon & Rectum*. 2014;8(3):136-40.
- [3] **Corthier G, Sokol H, Doré J.** Diversité du microbiote et de ses fonctions. *Obésité*. 2007;2(3):215-20.
- [4] **Coudeyras S, Forestier C.** Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology*. 2010;56(8):611-50.
- [5] **Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al.** Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
- [6] **Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Tims S, Zoetendal EG, de Vos WM.** Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition: Long-term monitoring of the human intestinal microbiota. *Environmental Microbiology*. 2013;15(4):1146-59.
- [7] **Hoyen C.** Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Yearbook of Neonatal and Perinatal Medicine*. 2007;2007:202-3.
- [8] **Gérard P, Bernalier-Donadille A.** Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cah Nutr Diét*. 2007;9.
- [9] **Nicolas S.** Modulation de l'homéostasie glucidique par transfert de microbiote intestinal chez la souris conventionnelle. :182.
- [10] **Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC.** The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(39):15064-9.

- [11] **Johansson MEV, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, et al.** Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(2):281-91.
- [12] **Jakobsson HE, Rodriguez-Pineiro AM, Schutte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al.** The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO reports*. 2015;16(2):164-77.
- [13] **Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, Kayama H, Kinoshita M, Motooka D, et al.** Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*. 2016;532(7597):117-21.
- [14] **El Aidy S, Derrien M, Merrifield CA, Levenez F, Doré J, Boekschoten MV, et al.** Gut bacteria–host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *The ISME Journal*. 2013;7(4):743-55.
- [15] **El Aidy S, Merrifield CA, Derrien M, van Baarlen P, Hooiveld G, Levenez F, et al.** The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut*. 2013;62(9):1306-14.
- [16] **Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA.** Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(2):121-31.
- [17] **Bernalier-Donadille A.** Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2010;34(4):17-23.
- [18] **Gérard P.** Les relations entre microbiote intestinal et lipides. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2014;49(5):213-7.

- [19] **Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al.** Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355-9.
- [20] **Kolopp-Sarda M-N.** Système immunitaire muqueux et microbiote intestinal : Histoire d'une symbiose. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2016;2016(484):39-47.
- [21] **Doré J, Multon M-C, Béhier J-M, Affagard H, Andremont A, Barthélémy P, et al.** Microbiote intestinal : qu'en attendre au plan physiologique et thérapeutique ? *Thérapie*. 2017;72(1):1-19.
- [22] **Lepage P.** Le microbiome digestif humain : interactions avec l'hôte et dysfonctions. *Revue des Maladies Respiratoires*. déc 2017;34(10):1085-90.
- [23] **Quévrain E.** Microbiote et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Côlon & Rectum*. 2014;8(3):141-5.
- [24] **Duboc H, Dior M, Coffin B.** Le syndrome de l'intestin irritable : nouvelles pistes physiopathologiques et conséquences pratiques. *La Revue de Médecine Interne*. 2016;37(8):536-43.
- [25] **Fathallah N, Bouchard D, de Parades V.** Les règles hygiéno-diététiques dans la constipation chronique de l'adulte : du fantasme à la réalité. *La Presse Médicale*. 2017;46(1):23-30.
- [26] **Duboc H.** Microbiote et syndrome de l'intestin irritable (SII): où en sommes-nous, où allons-nous ? *Côlon & Rectum*. 2013;7(2):81-5.
- [27] **Ducrotté P.** Flore et syndrome de l'intestin irritable. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2010;34 (4):56-60.

- [28] **Bruneau A, Baylatry M-T, Joly AC, Sokol H.** Le microbiote intestinal : quels impacts sur la carcinogenèse et le traitement du cancer colorectal? *Bulletin du Cancer.* 2018;105(1):70-80.
- [29] **Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD.** Implication du microbiote intestinal dans l'obésité et les pathologies associées : quelles perspectives thérapeutiques et nutritionnelles ? *Obésité.* 2012;7(4):234-9.
- [30] **Delzenne NM, Neyrinck AM, Bäckhed F, Cani PD.** Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology.* 2011;7(11):639-46.
- [31] **Karlsson CLJ, Önnarfält J, Xu J, Molin G, Ahrné S, Thorngren-Jerneck K.** The Microbiota of the Gut in Preschool Children With Normal and Excessive Body Weight. *Obesity.* 2012;20(11):2257-61.
- [32] **Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al.** Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science.* 2013;341(6150):1241214-1241214.
- [33] **Qi Y, Aranda JM, Rodriguez V, Raizada MK, Pepine CJ.** Impact of antibiotics on arterial blood pressure in a patient with resistant hypertension — A case report. *International Journal of Cardiology.* 2015;201:157-8.
- [34] **Chong-Nguyen C, Duboc H, Sokol H.** Le microbiote, un nouveau facteur de risque cardiovasculaire ? *La Presse Médicale.* 2017;46(7-8):708-13.
- [35] **Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D, Insel TR, Daar AS, et al.** Grand challenges in global mental health. *Nature.* 2011;475(7354):27-30.
- [36] **J. Kastin A, Pan W.** Concepts for Biologically Active Peptides. *Current Pharmaceutical Design.* 2010;16(30):3390-400.

- [37] **Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI.** Application of Novel PCR-Based Methods for Detection, Quantitation, and Phylogenetic Characterization of *Sutterella* Species in Intestinal Biopsy Samples from Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances. *mBio* [Internet]. 2012 [cité 11 nov 2018];3. Disponible sur: <http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00261-11>
- [38] **Shultz SR, MacFabe DF, Martin S, Jackson J, Taylor R, Boon F, et al.** Intracerebroventricular injections of the enteric bacterial metabolic product propionic acid impair cognition and sensorimotor ability in the Long–Evans rat: Further development of a rodent model of autism. *Behavioural Brain Research*. 2009;200(1):33-41.
- [39] **Fond G, Chevalier G, Eberl G, Leboyer M.** Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans les troubles psychiatriques majeurs : mécanismes, données fondamentales, comorbidités gastro-intestinales et options thérapeutiques. *La Presse Médicale*. 2016;45(1):7-19.
- [40] **Joly F, Nuzzo A, Kapel N, Thomas M.** Lien entre les probiotiques et le microbiote : vision du clinicien. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2017;52:S5-12.
- [41] **Selle A, Brosseau C, Barbarot S, Bodinier M.** Les prébiotiques : une stratégie nutritionnelle pour prévenir des allergies. *Revue Française d'Allergologie* [Internet]. 2018 [cité 16 nov 2018]; Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877032018304135>
- [42] Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques | PONROY [Internet]. [cité 16 nov 2018]. Disponible sur: <https://www.ponroy.com/conseils-sante/probiotiques-prebiotiques-et-symbiotiques>
- [43] **Rao AV, Basted AC, Beaulne TM, Katzman MA, Iorio C, Berardi JM, et al.** A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathogens*. 2009;1(1):6.

- [44] **Barrett JS, Canale KE, Geary RB, Irving PM, Gibson PR.** Probiotic effects on intestinal fermentation patterns in patients with irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(32):5020-4.
- [45] **Benton D, Williams C, Brown A.** Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007;61(3):355-61.
- [46] **Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR.** Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*. 2016;5(4):e73.
- [47] **Tan J, McKenzie C, Vuillermin PJ, Goverse G, Vinuesa CG, Mebius RE, et al.** Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Reports*. 2016;15(12):2809-24.
- [48] **Slavin J.** Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*. 2013;5(4):1417-35.
- [49] **Barbut F, Collignon A, Butel M-J, Bourlioux P.** Le transfert de flore digestive : une revue de la littérature. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2015;73(1):13-21.
- [50] **Fumery M, Corcos O, Kapel N, Stefanescu C, Thomas M, Joly F.** Intérêt et technique de la transplantation fécale. *Journal des Anti-infectieux*. 2013;15(4):187-92.
- [51] La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques - Point d'Information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 20 nov 2018]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/La-transplantation-de-microbiote-fecal-et-son-encadrement-dans-les-essais-cliniques-Point-d-Information2>

- [52] Prise en charge des infections à *Clostridium difficile*. Révolution thérapeutique. *La Revue de Médecine Interne*. 2017;38:A35-9.
- [53] **Smits LP, Bouter KEC, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M.** Therapeutic Potential of Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterology*. 2013;145(5):946-53.
- [54] **Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, et al.** Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011;17(1):179-84.
- [55] **Kunde S, Pham A, Bonczyk S, Crumb T, Duba M, Conrad H, et al.** Safety, Tolerability, and Clinical Response After Fecal Transplantation in Children and Young Adults With Ulcerative Colitis: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2013;56(6):597-601.
- [56] **Damman CJ, Miller SI, Surawicz CM, Zisman TL.** The Microbiome and Inflammatory Bowel Disease: Is There a Therapeutic Role for Fecal Microbiota Transplantation? *The American Journal of Gastroenterology*. 2012;107(10):1452-9.
- [57] **Borody TJ, Warren EF, Leis SM, Surace R, Ashman O, Siarakas S.** Bacteriotherapy Using Fecal Flora: Toying With Human Motions. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2004;38(6):475-83.
- [58] **Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI.** Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe*. 2008;3(4):213-23.
- [59] **Rosselló-Mora R, Amann R.** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001;25(1):39-67.

- [60] **Morgan XC, Huttenhower C.** Chapter 12: Human microbiome analysis. PLoS Comput Biol. 2012;8(12):e1002808.
- [61] **Woese CR, Fox GE.** Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977;74(11):5088-90.
- [62] **Jou WM, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W.** Nucleotide Sequence of the Gene Coding for the Bacteriophage MS2 Coat Protein. Nature. 1972;237(5350):82-8.
- [63] **Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, et al.** Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. Nature. 1977;265(5596):687-95.
- [64] **Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al.** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature. 1986;321(6071):674-9.
- [65] **Smith DH, Brutlag D, Friedland P, Kedes LH.** BIONET[™]: national computer resource for molecular biology. Nucleic Acids Research. 1986;14(1):17-20.
- [66] **Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, et al.** Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial « pan-genome ». Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(39):13950-5.
- [67] **Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, et al.** Essential *Bacillus subtilis* genes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(8):4678-83.
- [68] **Ciccarelli FD.** Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. Science. 2006;311(5765):1283-7.

- [69] **Edgar RC.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(5):1792-7.
- [70] **Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 2010;59(3):307-21.
- [71] **Li K, Bihan M, Methé BA.** Analyses of the Stability and Core Taxonomic Memberships of the Human Microbiome. White BA, éditeur. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63139.
- [72] **Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y.** Phylogenetic Analysis of the Human Gut Microbiota Using 16S rDNA Clone Libraries and Strictly Anaerobic Culture-Based Methods. *Microbiology and Immunology*. 2002;46(8):535-48.
- [73] **Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H.** Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *MICROBIOL REV*. 1995;59:33.
- [74] Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. Evaluation of 16S rDNA-Based Community Profiling for Human Microbiome Research. Ravel J, éditeur. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39315.
- [75] **Barbut F, Joly F, Saint-Antoine H.** Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. 2010;17(6):10.
- [76] **Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng J-F, et al.** Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*. 2013;499(7459):431-7.
- [77] **Lagier J-C, Hugon P, Khelaifia S, Fournier P-E, La Scola B, Raoult D.** The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(1):237-64.

- [78] **La Scola B.** Nouvelle technique d'étude du microbiote : la culturomique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2015;2015(469):83-7.
- [79] **Lagier J-C, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, et al.** Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(12):1185-93.
- [80] **Lagier J-C, El Karkouri K, Mishra AK, Robert C, Raoult D, Fournier P-E.** Non contiguous-finished genome sequence and description of *Enterobacter massiliensis* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*. 2013;7(3):399-412.
- [81] **Carbonnelle É, Nassif X.** Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences*. 2011;27(10):882-8.
- [82] **Lagier J-C, Raoult D.** Culturomics : une méthode d'étude du microbiote humain. *médecine/sciences*. 2016;32(11):923-5.
- [83] **Fournier P-E, Lagier J-C, Dubourg G, Raoult D.** From culturomics to taxonomogenomics: A need to change the taxonomy of prokaryotes in clinical microbiology. *Anaerobe*. 2015;36:73-8.



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرياض -

قسم الصيدلي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَأَحْسِنُ بِاللَّهِ الْعَظِيمِ

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاول مهنتي بوزع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس بالرباط
كلية الطب والصيدلة
الرباط



جامعة محمد الخامس بالرباط
Université Mohammed V de Rabat

أطروحة رقم: 21

سنة : 2019

الكلتروميكس، طريقة جديدة لدراسة جراثيم الأمعاء

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : / / 2019

من طرف

السيدة سلمى الحركاتي

المزادة في 21 نونبر 1994 بفاس

لنيل شهادة

دكتور في الصيدلة

الكلمات الأساسية : كلتروميكس؛ خلل في توازن جراثيم الأمعاء؛ الميتاجينوميك؛ جراثيم الأمعاء- زرع الميكروبات البرازية

أعضاء لجنة التحكيم:

رئيس

السيدة منى نزيه

مشرف

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيد ياسين سخسوخ

عضو

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

السيدة سعيدة طلال

عضو

أستاذة في الكيمياء الحيوية

السيد رشيد النجاري

أستاذ في علم الصيدلة النباتية