

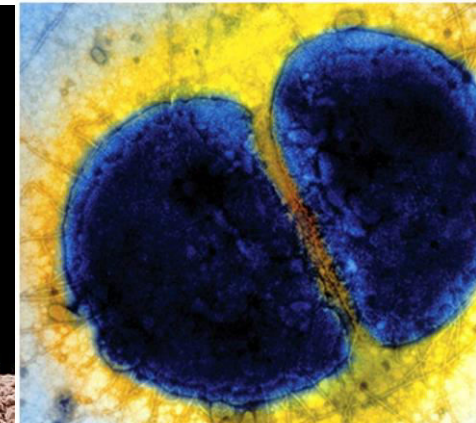
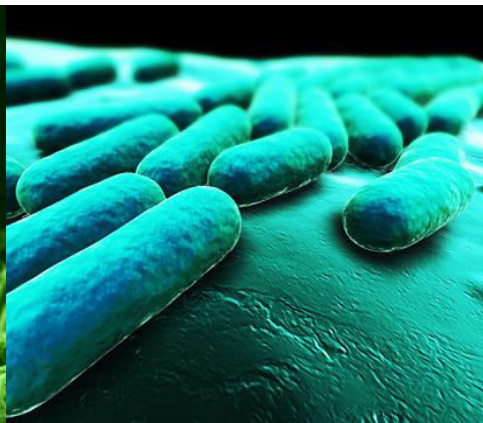
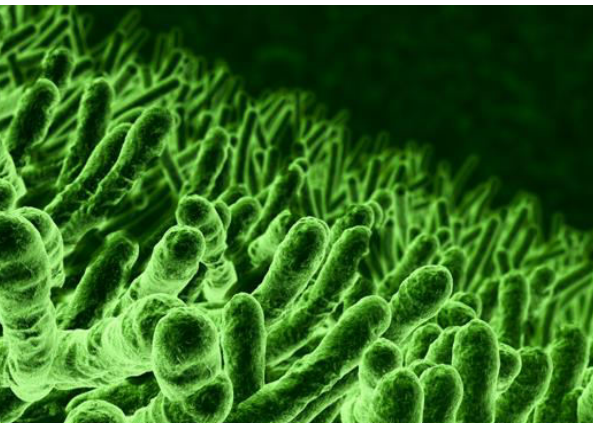
Microbiote intestinal de la théorie à la pratique

Pr Christophe Burucoa,
Bactériologie CHU Poitiers

GFTF

Groupe Français de Transplantation Fécale

27^{ème} Congrès National de la Société Tunisienne de Pathologie Infectieuse
Tunis 4 et 5 mai 2017



Le microbiote humain

- très vaste sujet découvert très récemment
- les connaissances évoluent très vite suivant les progrès technologiques du séquençage haut débit
- l'importance de cet univers bactérien que nous hébergeons, qui nous accompagne dans notre vie, qui nous aide à vivre est prépondérante
- de nombreux axes de recherche émergent et questionnent sur les relations entre les perturbations de notre microbiote et des maladies jusque là inexplicables, des traitements sont testés

Notre corps est une planète habitée



Quand on regarde notre planète depuis l'espace, on ne nous voit pas, nous, les êtres humains.

Pourtant, en se rapprochant on constate que les êtres humains peuplent des endroits très différents de la planète











WILLS

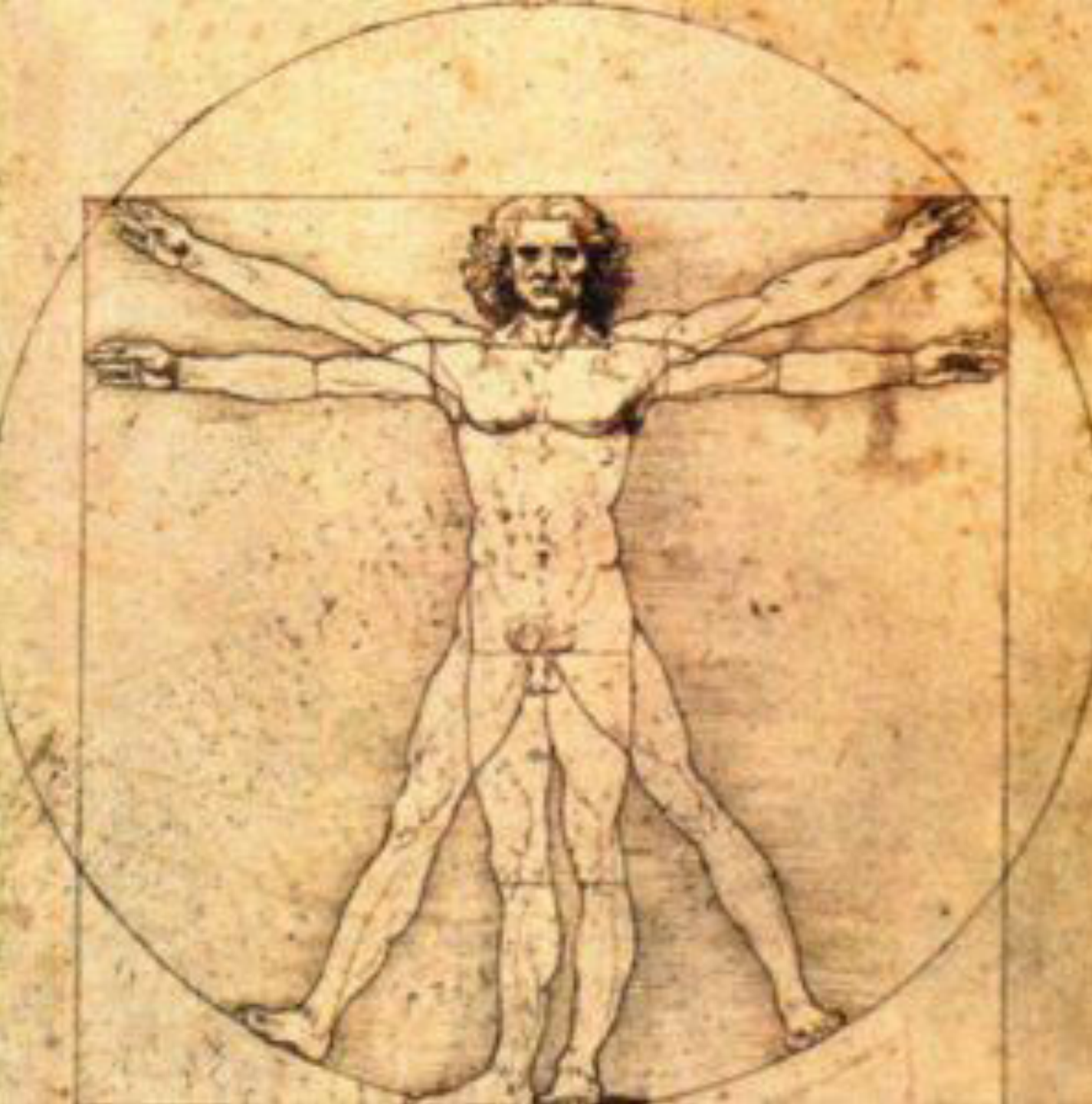
WILLS

639

819

JOHN MILLER

JOHN MILLER

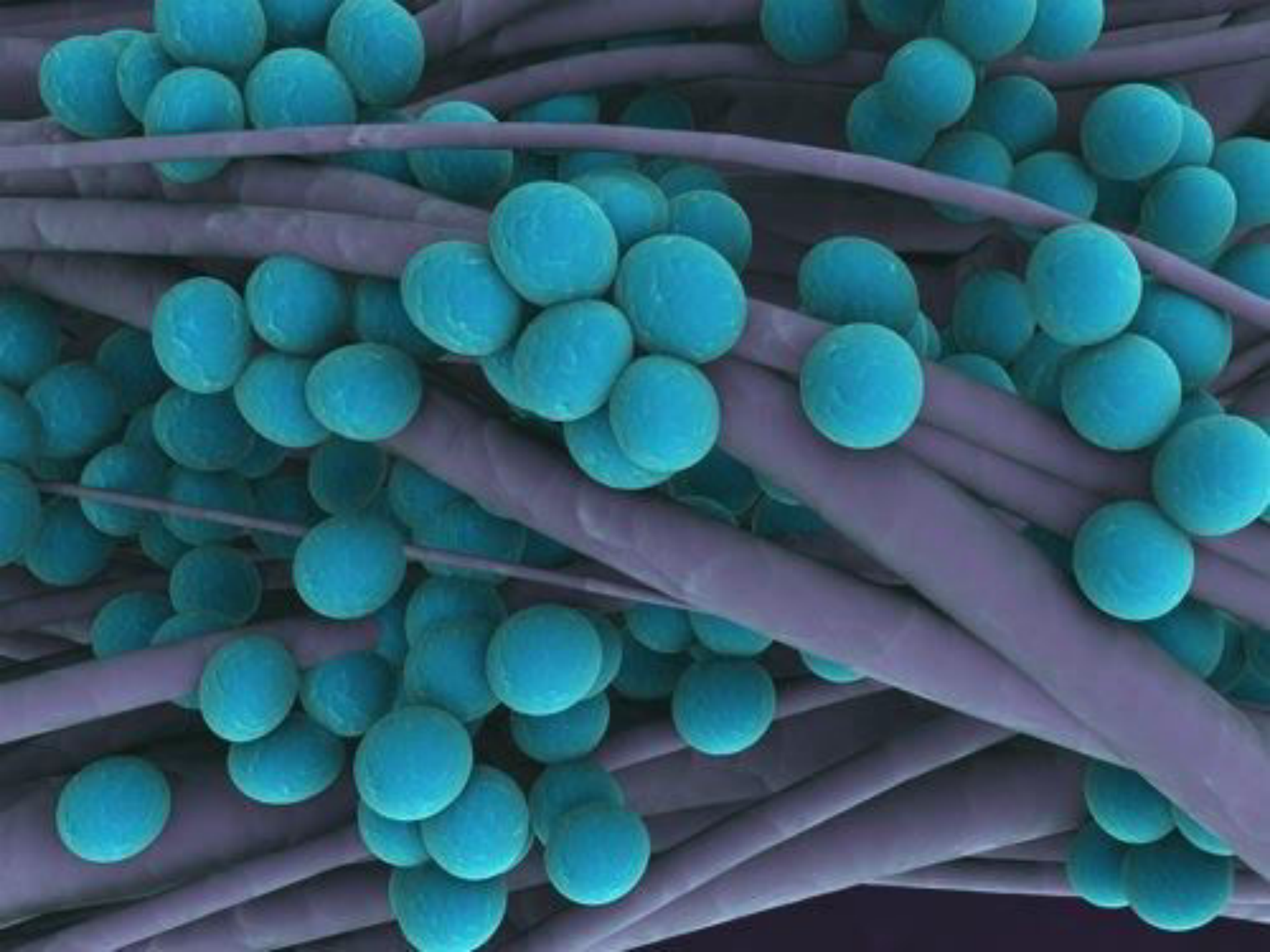


C'est la même chose avec nos bactéries
Quand on se regarde, nous, les êtres humains, on ne voit pas nos bactéries

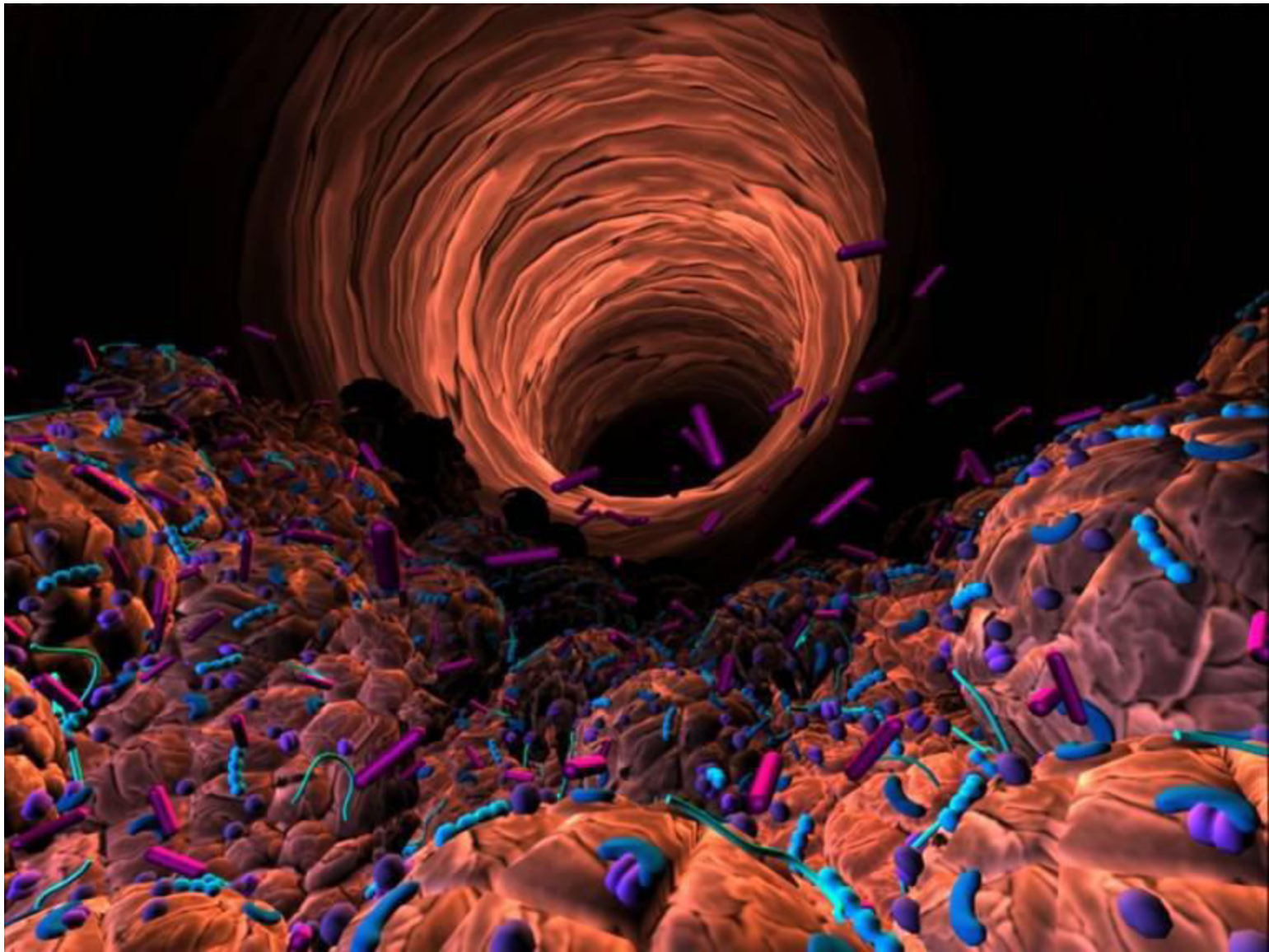


En examinant les
êtres humains
de plus près :
chacun de nous
est une planète
Nous sommes
peuplés d'une
multitude
d'êtres vivants









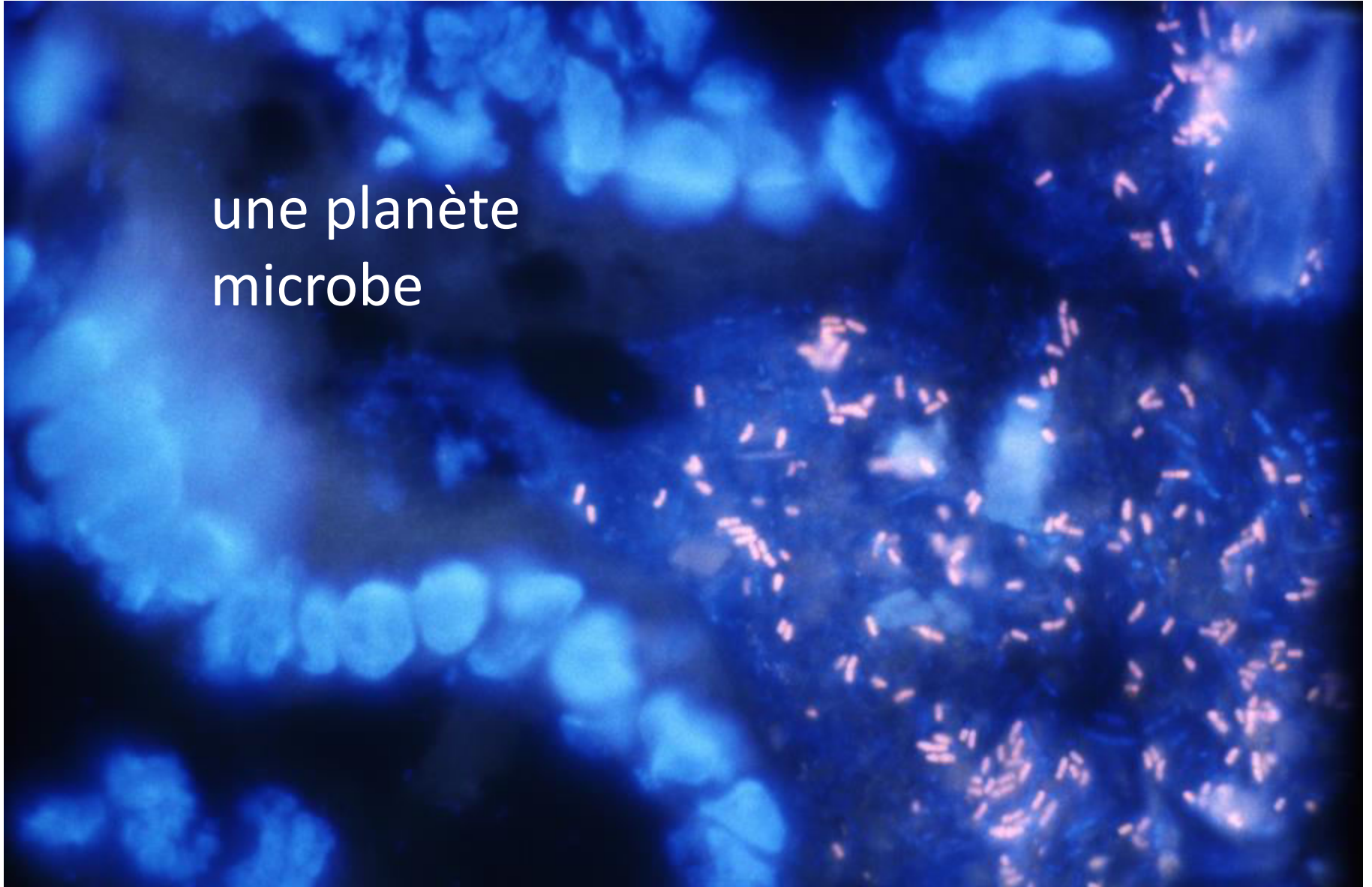
Nous habitons
une planète
terre





Nous sommes
une planète
habitée

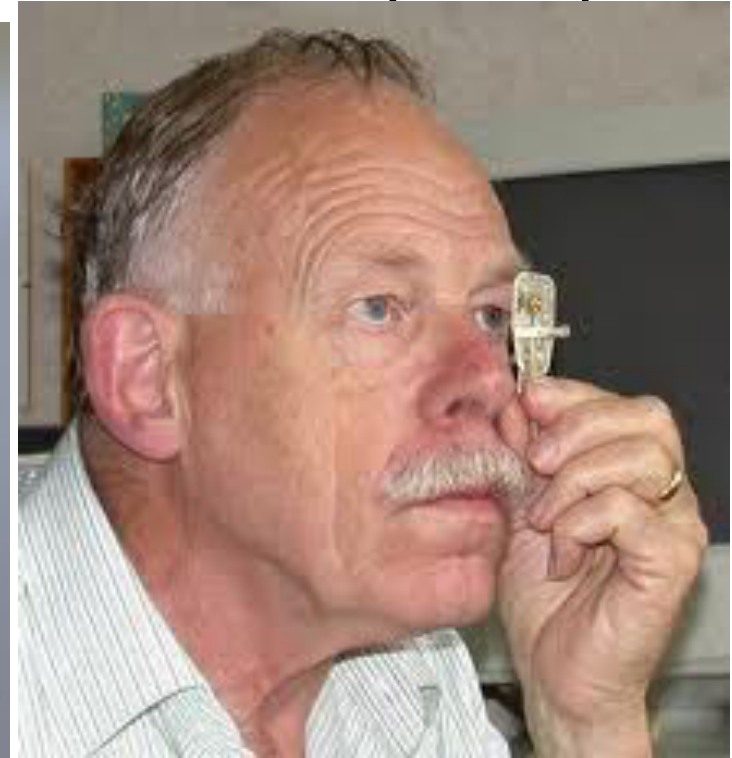
une planète
microbe





Un ensemble
de microbiotes

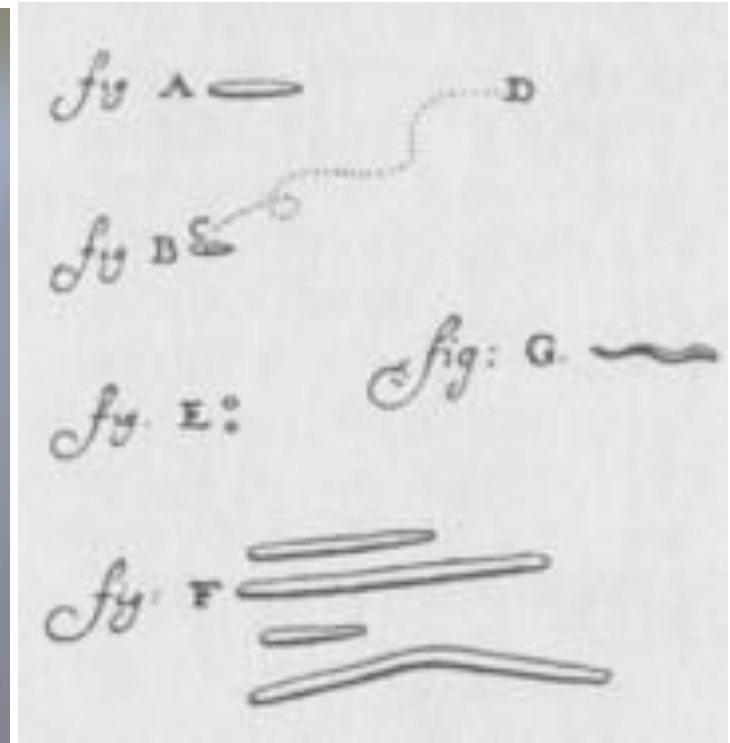
Le pionnier : Antonie van Leeuwenhoek (1675)



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

« Il y a plus d'animaux qui vivent
dans les dépôts qui s'accumulent
sur les dents dans la bouche de
chacun qu'il n'y a d'êtres humains
dans un royaume entier, en
particulier chez ceux qui ne se
lavent jamais les dents. »

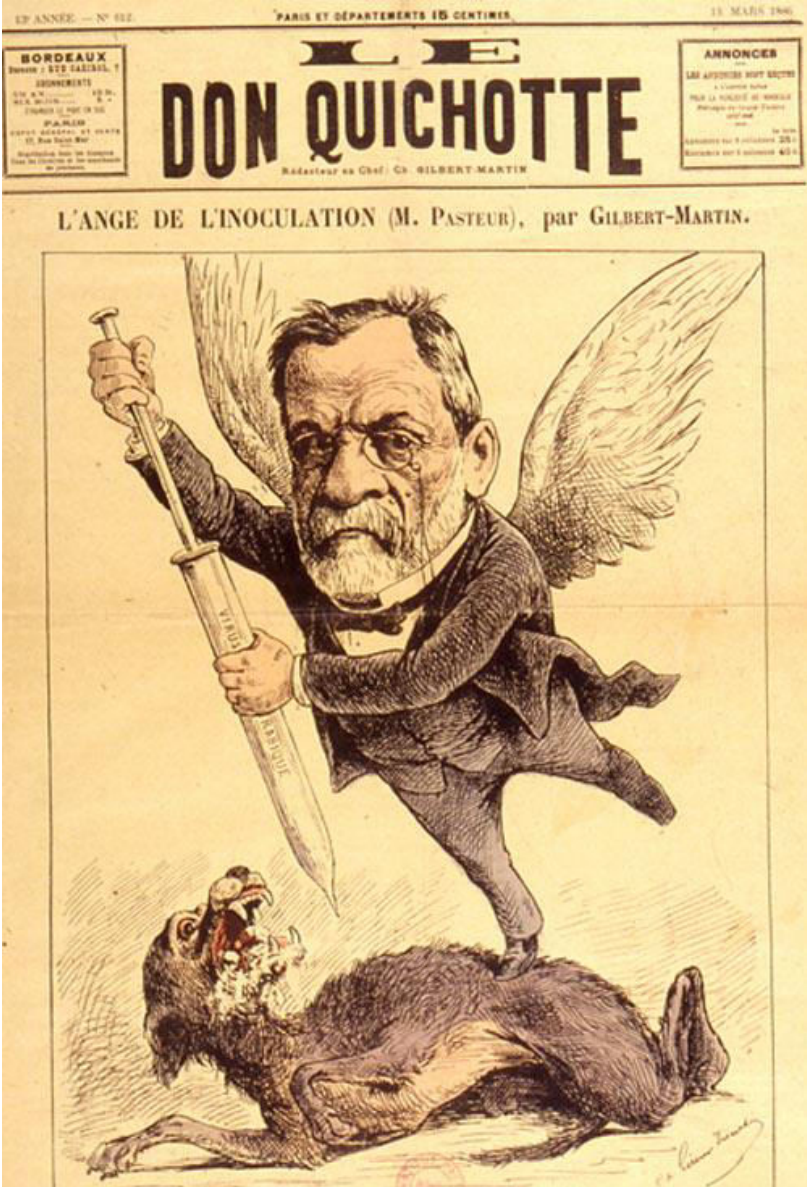
Le pionnier : Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)



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

« Il y a plus d'animaux qui vivent
dans les dépôts qui s'accumulent
sur les dents dans la bouche de
chacun qu'il n'y a d'êtres humains
dans un royaume entier, en
particulier chez ceux qui ne se
lavent jamais les dents. »

Les pères ennemis de la Microbiologie : Pasteur et Koch ne s'intéressent pas a notre flore

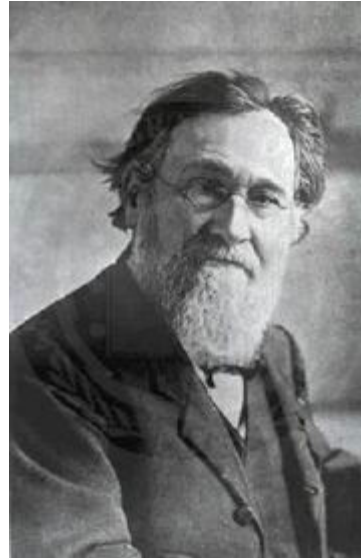


La galerie des ancêtres du microbiote

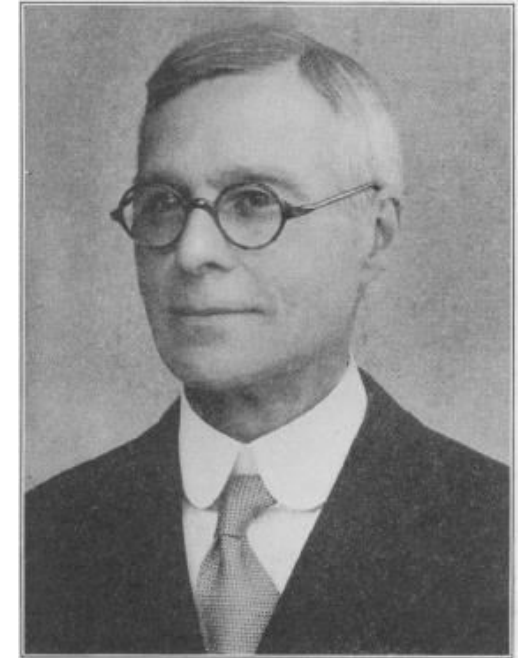


1883

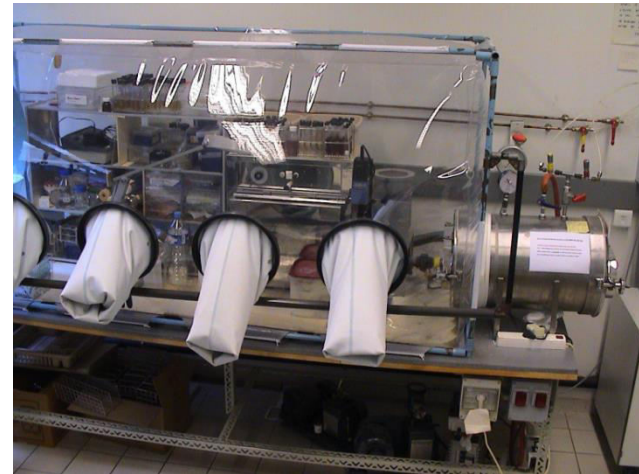
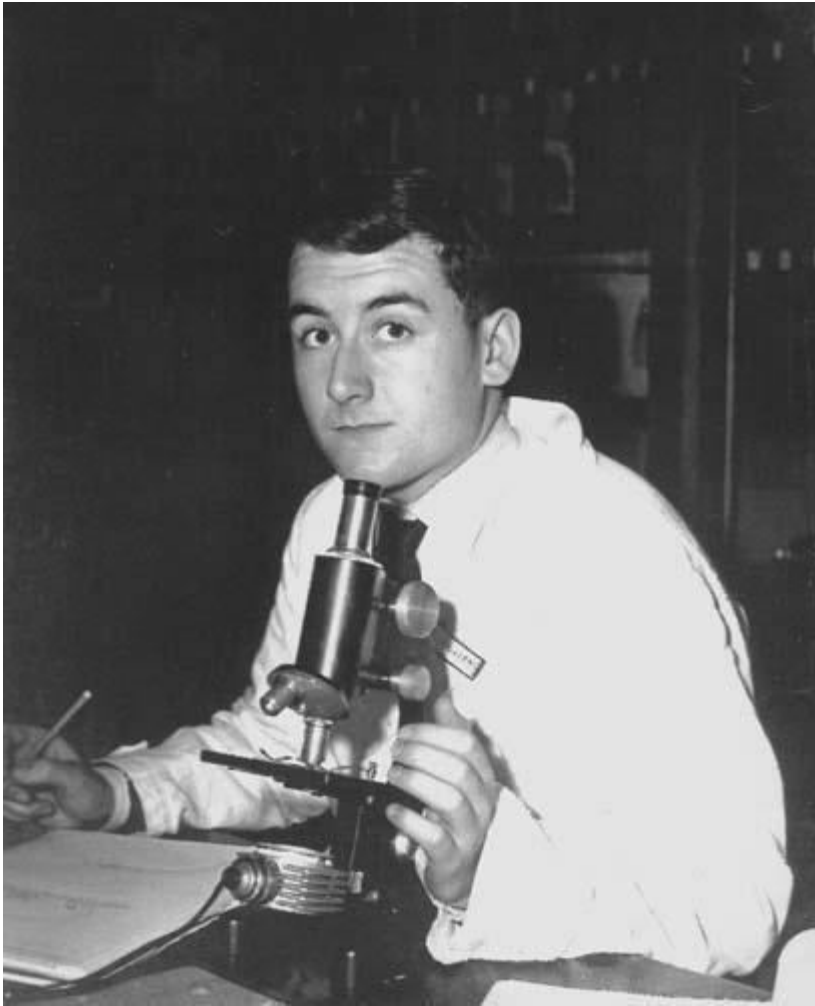
Theodor
Escherich
1857---1911



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



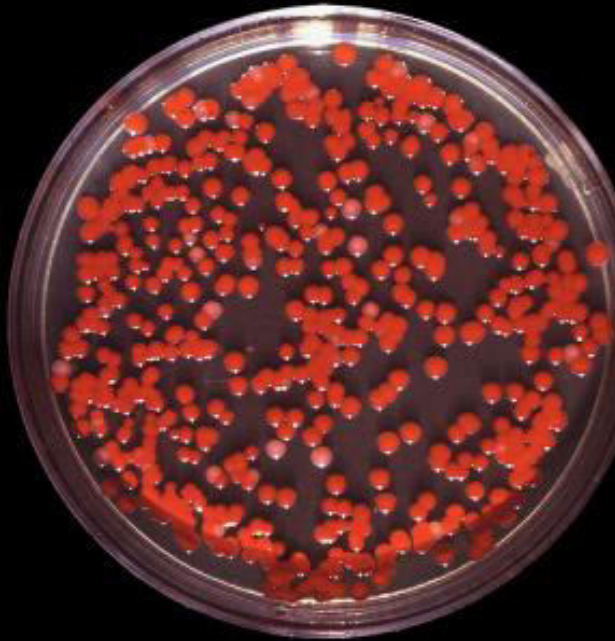
Arthur I Kendall
Northwestern U.,
Chicago



Robert Ducluzeau (1964) et Pierre Raibaud : pionniers des études sur l'écologie microbienne sur le centre INRA de Jouy en Josas



On pensait en cette fin de 20^{ème} siècle que notre maîtrise de la culture nous permettait de bien appréhender la complexité de notre flore



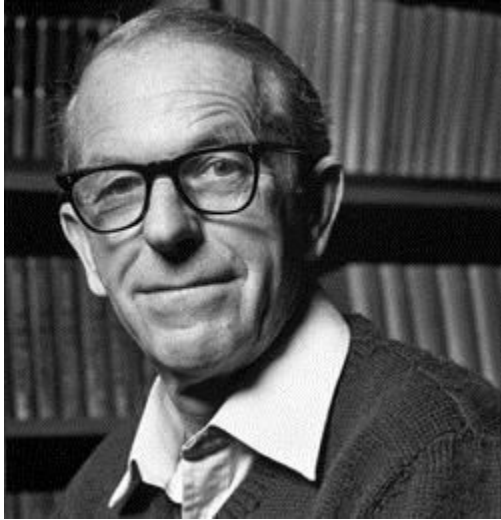
© L. Trzoda



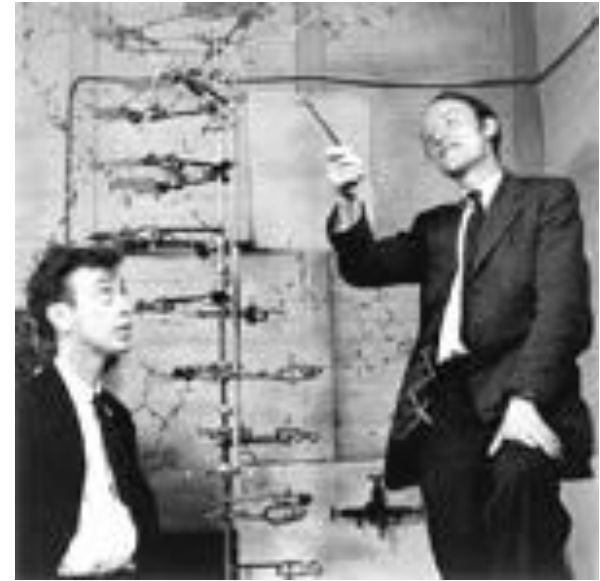
ASM Microbiology.org © Daniels



Progrès du 20^{ème} siècle



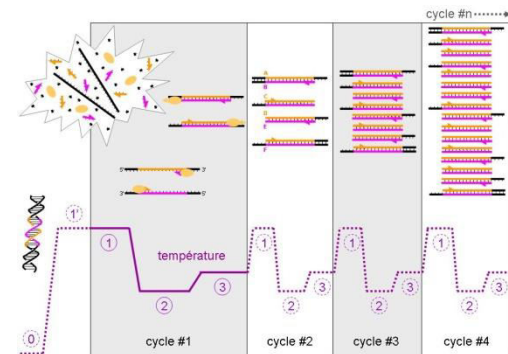
Frederick Sanger
Nobel de Chimie 58
et 80



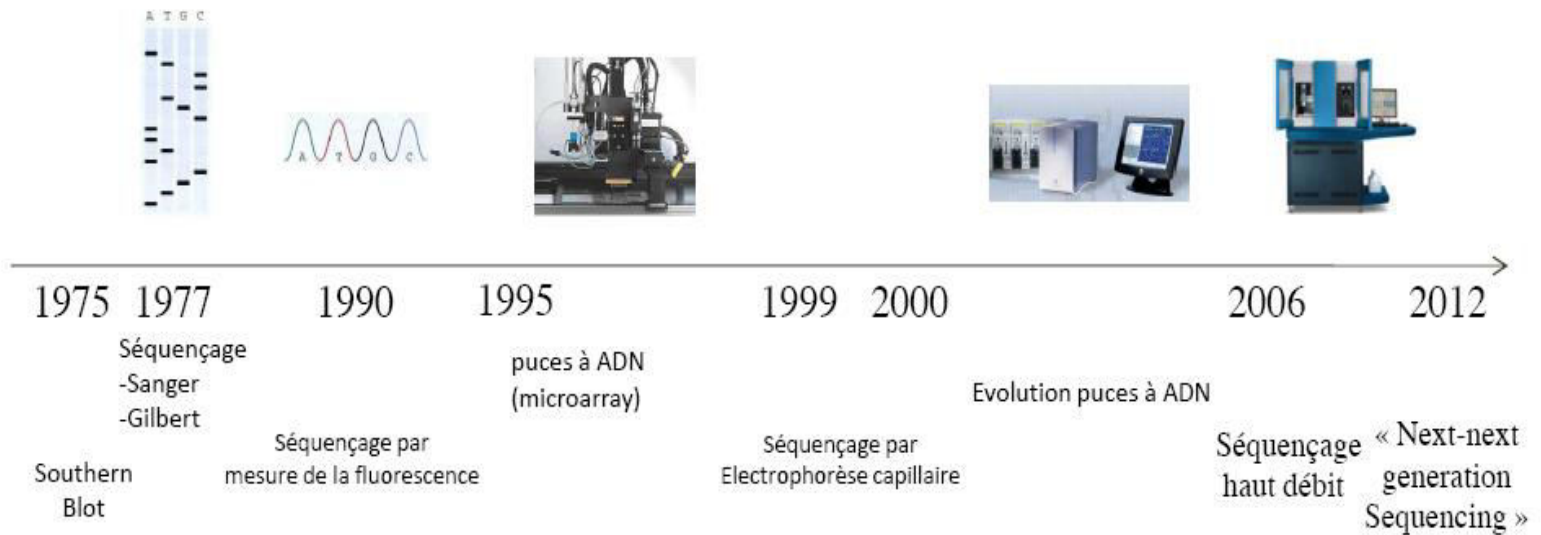
Watson et Crick
La double hélice (1953)
Nobel médecine 1962

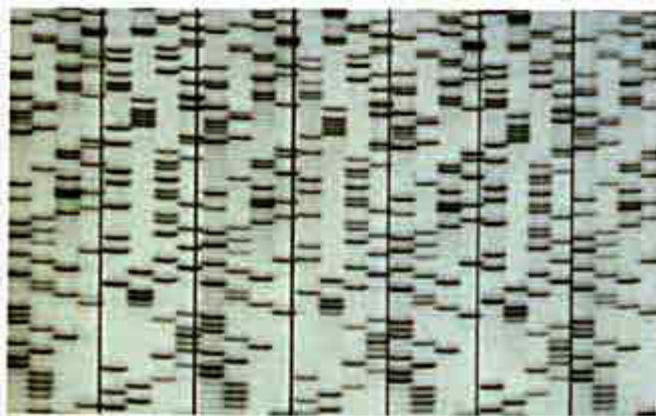


Kary Mullis
PCR (1984)
Nobel chimie 1993



Révolution des technologies de séquençage





Des séquenceurs de plus en plus :

- performants
- automatisés
- miniaturisés
- abordables



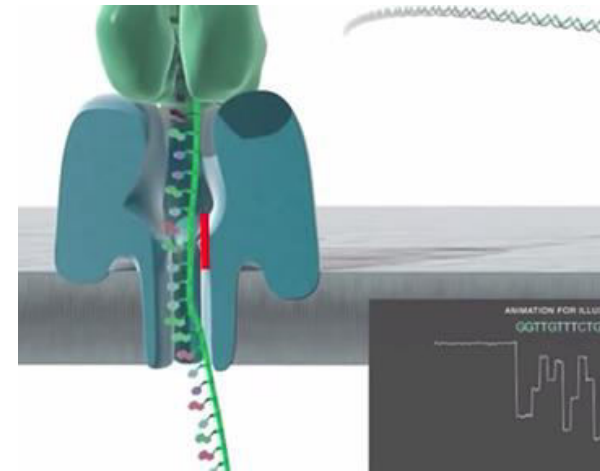
illumina



ion torrent
♦ ★ ▲ ○ × □ + ≈

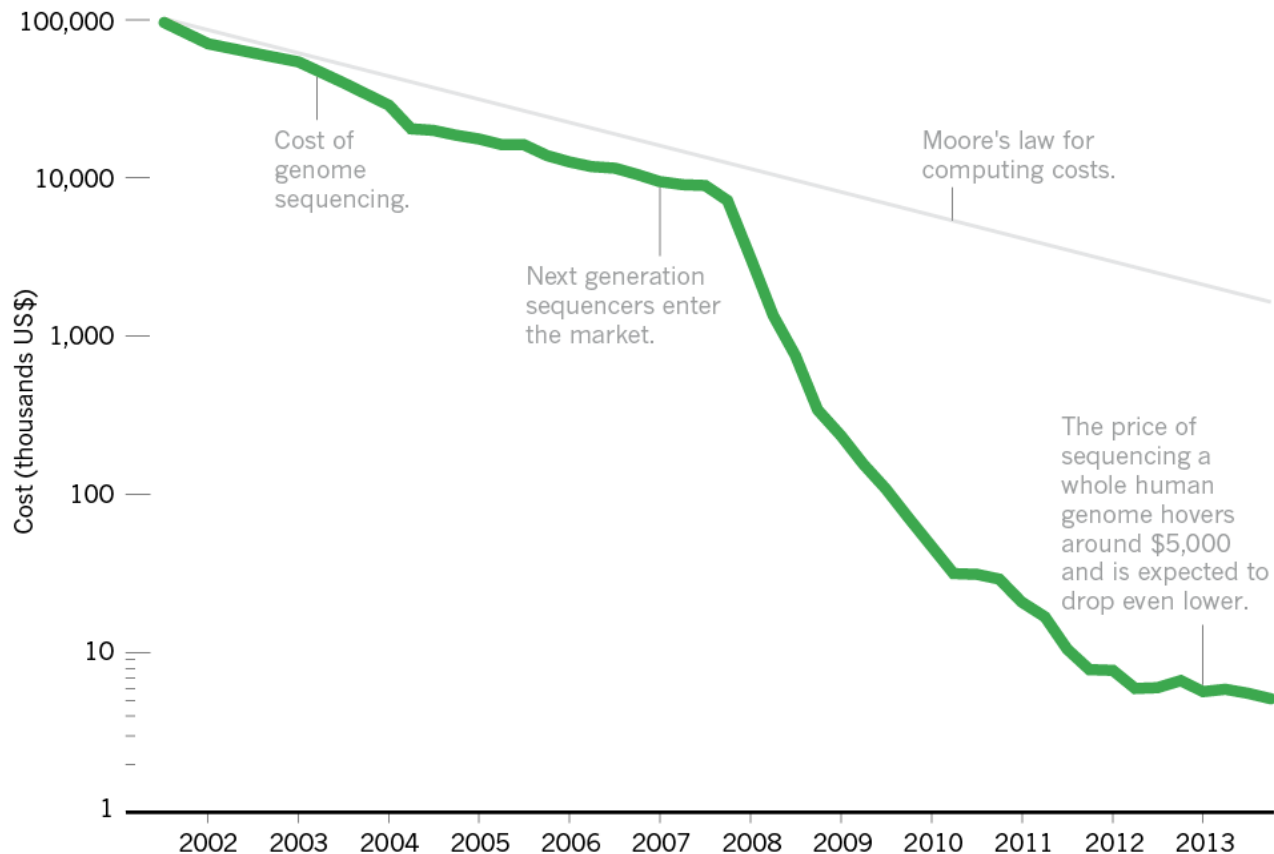


Roche

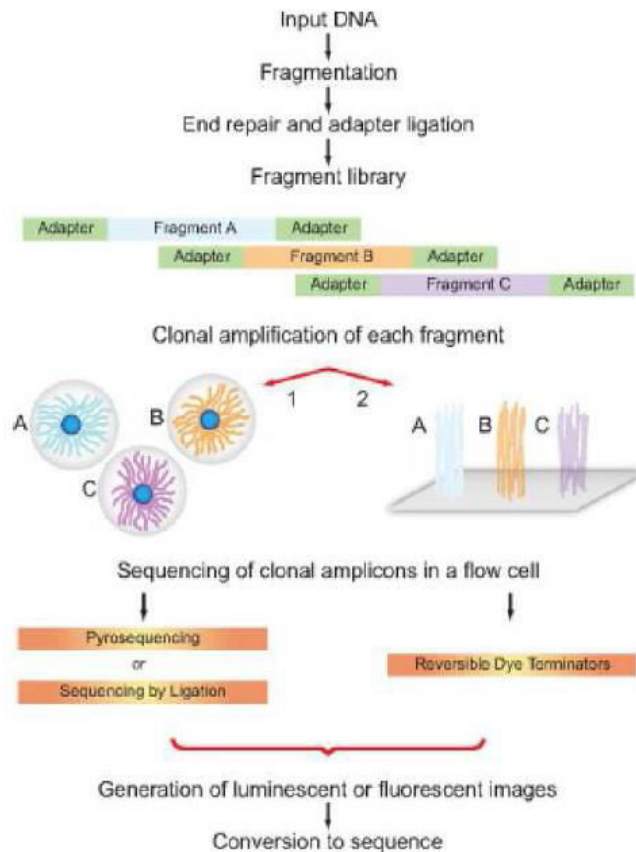


Le prix du séquençage : en baisse !

Loi de Moore : doublement des capacités informatiques à prix constant



Séquençage haut débit : Principe



Matériel biologique : ADN , ARN

Etapes communes aux différentes technologies :

- Fragmentation enzymatique de l'ADN

- Préparation d'une banque d'ADN (library) par ligation d'adaptateurs

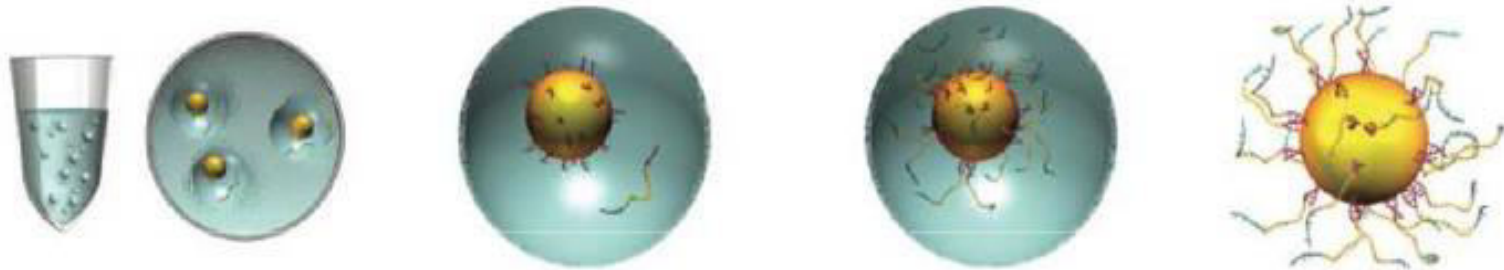
- Amplification clonale

- Séquençage générant des signaux (luminescent ou fluorescent)

- Détection des signaux émis et conversion en séquence

Amplification clonale

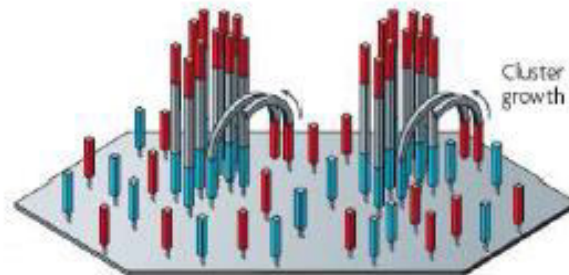
- Emulsion huile/eau puis ePCR (emulsion PCR) [SOliD](#) , [Roche](#), [Ion torrent](#)



Emulsion et création de microréacteurs

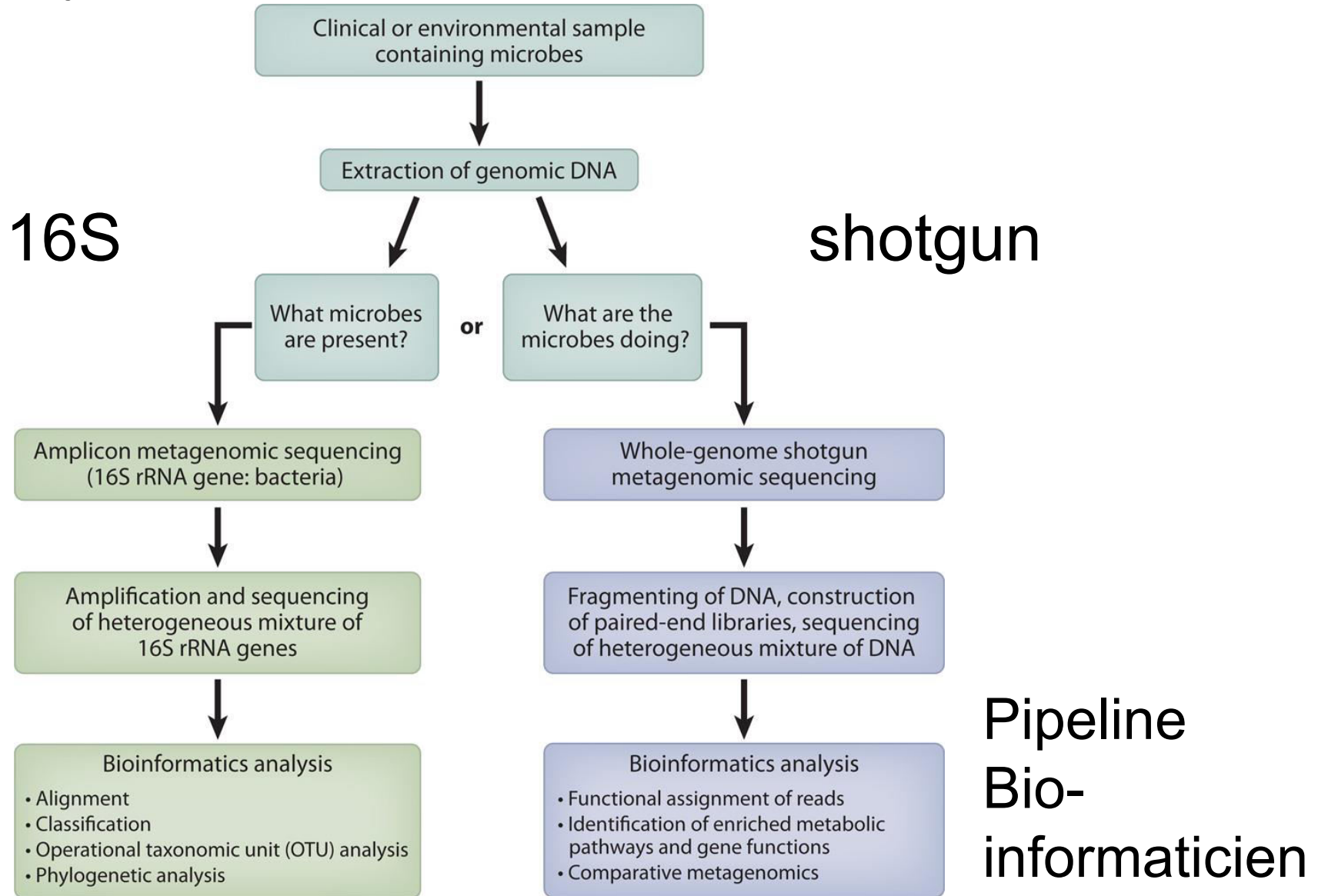
Emulsion PCR

- Immobilisation sur phase solide puis bridge amplification [Illumina](#)



- Crée jusqu'à 1000 copies identiques de chaque molécule (« clusters »)
- jusqu'à 10 millions de clusters par cm^2

Etapas du séquençage métagénomique et analyse des données





Fraction cultivable

20%

Fraction non
cultivable

80%

Les études basées sur la culture ne permettaient d'explorer que 20% des bactéries qui nous colonisent. Nous n'observons que la partie émergée de l'iceberg bactérien. 80% des bactéries de notre microbiote sont non cultivables

Microbiote : *mikros* petit et *bios* vie

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

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

Le plus étudié des microbiotes humains est le microbiote intestinal.

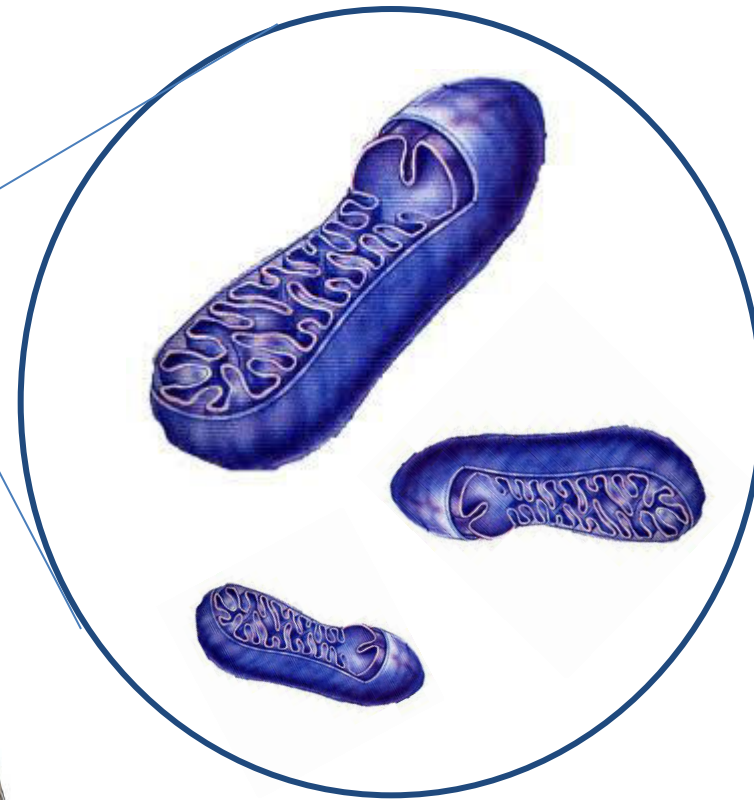
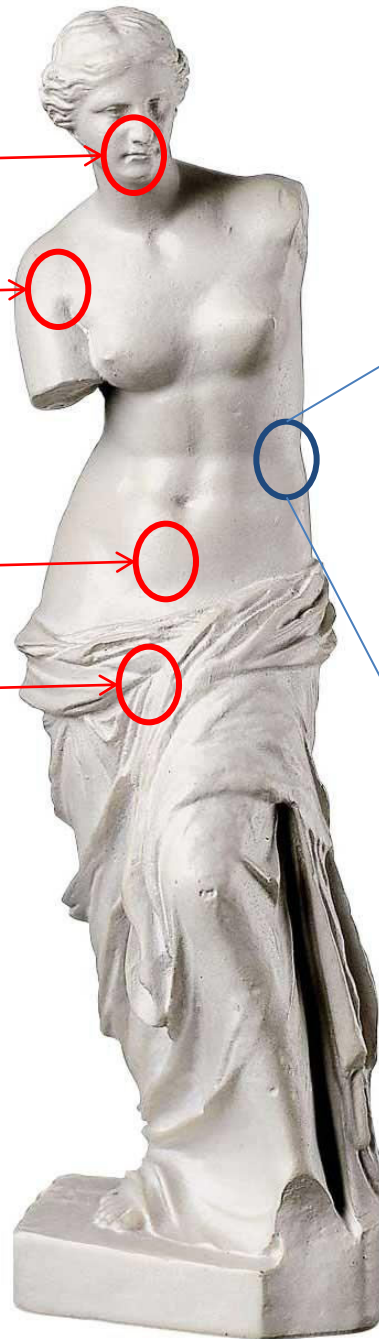
Bouche : 10^8 /ml salive

Peau: 10^5 /cm²

Colon: 10^{11} /g de selles

Vagin : 10^8 /ml sécrétion

Les microbiotes humains

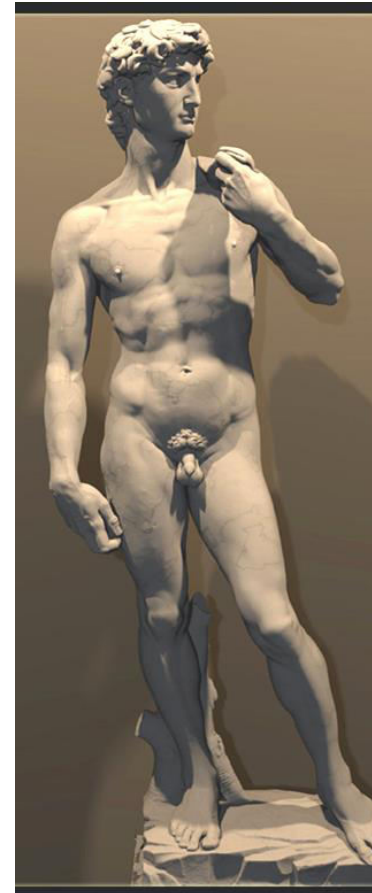
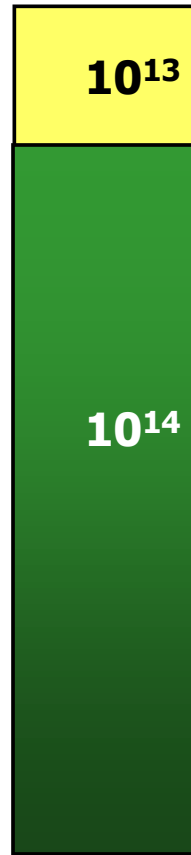


Mitochondries 10^{17}

Vous vous croyez humains, nous sommes bactériens !

**Cellules
Humaines
22 000 gènes**

**Cellules
Bactériennes
1000 espèces
3,3 M de gènes**



Résultats du match :

Bactéries 5/ Humains 0

<	Humains	Bactéries
cellules	10^{13}	10^{14}
gènes	22 000	3,3 M
Sur terre depuis	200 000 ans	3,8 milliards d'années
Nombre sur terre	$7,35 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^{30}$
Temps de génération	30 ans	30 minutes

Le microbiote intestinal est notre microbiote le plus important, il est caractérisé par un gradient oro-anal

- PH augm.
- PO2 dim.
- Vitesse du transit dim.

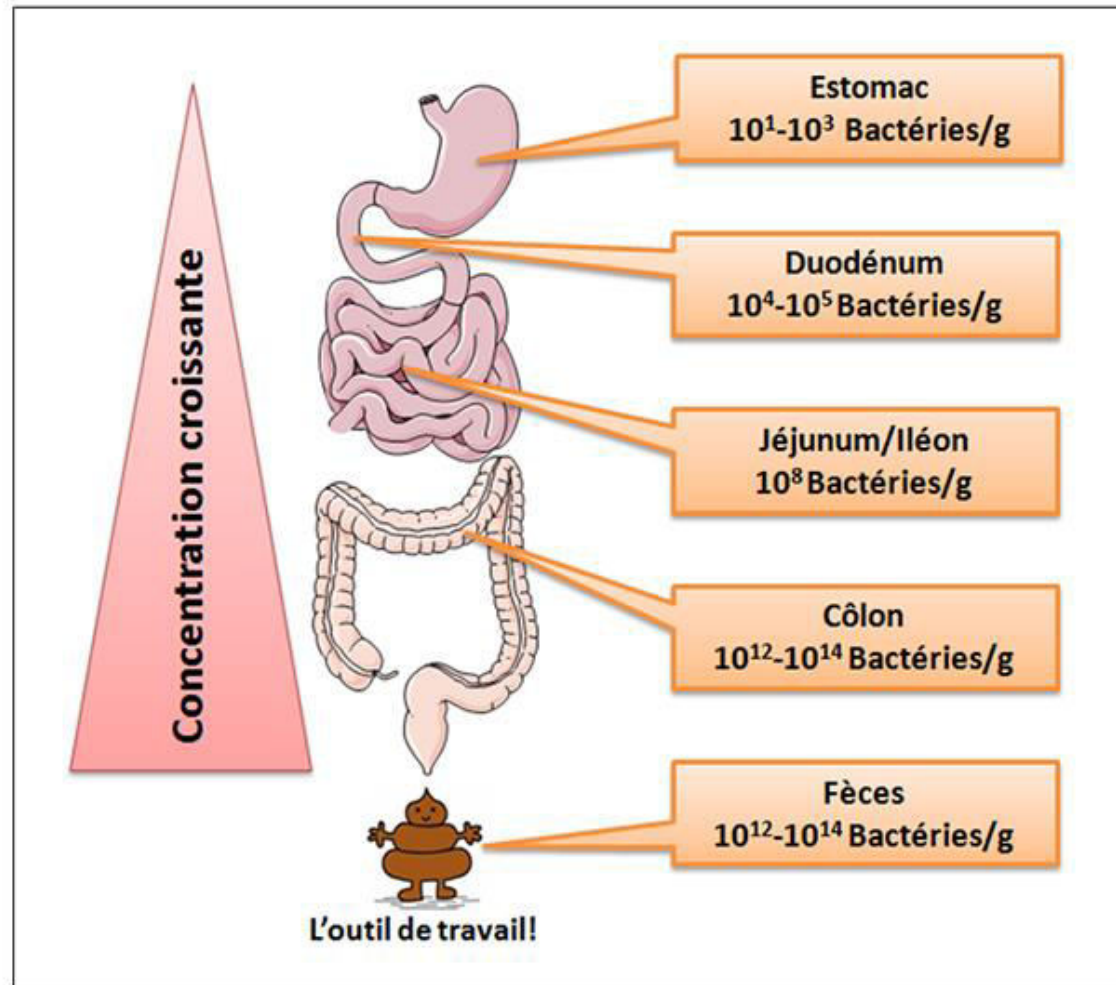


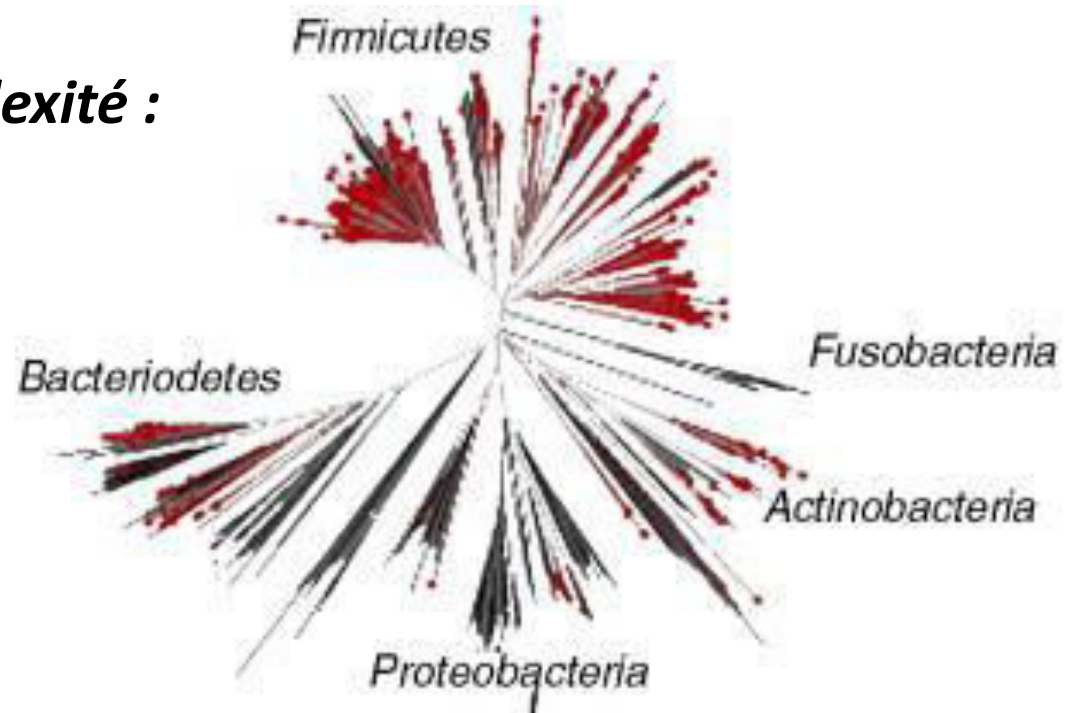
Figure 1: Répartition de la quantité de bactéries le long du tractus digestif

Composition du microbiote intestinal

1000 espèces différentes

*Pour visualiser cette complexité :
regroupements*

- *espèces*
- *genres*
- *familles*
- *classes*
- *phylum*



Composition du microbiote intestinal

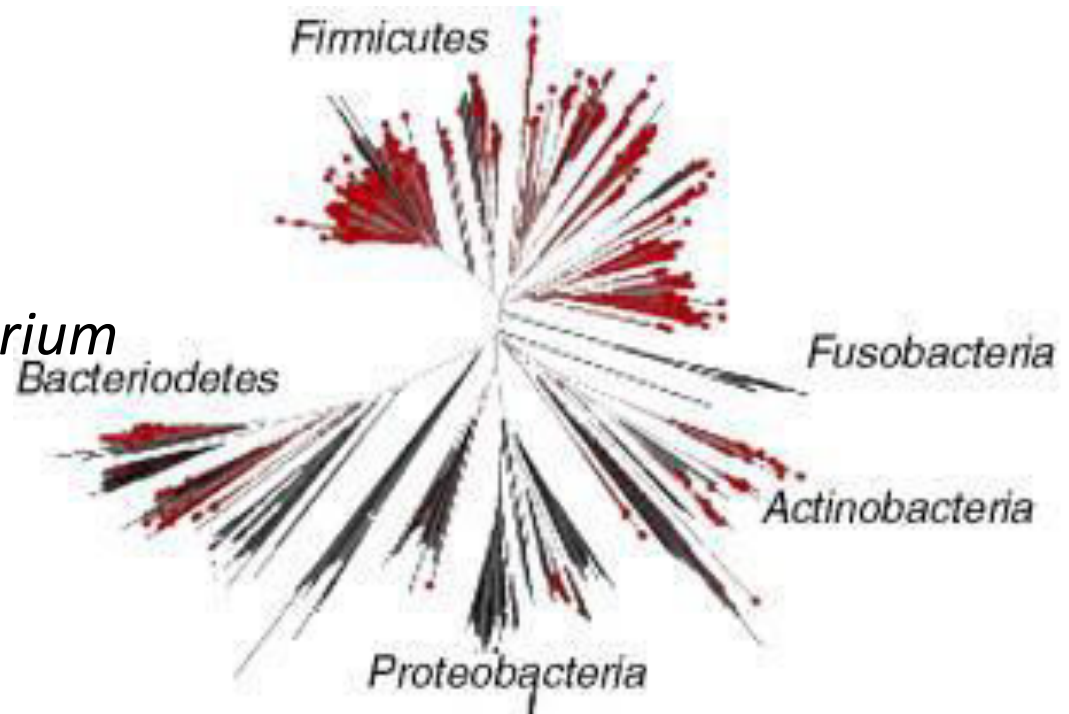
3 phylums prépondérants / 50 connus

- **Firmicutes** : genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Butyrivibrio* et *Faecalibacterium*

- **Bacteroidetes** : genres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*

- **Actinobacteria** : *Bifidobacteria*

- **Proteobacteria** : *Escherichia*



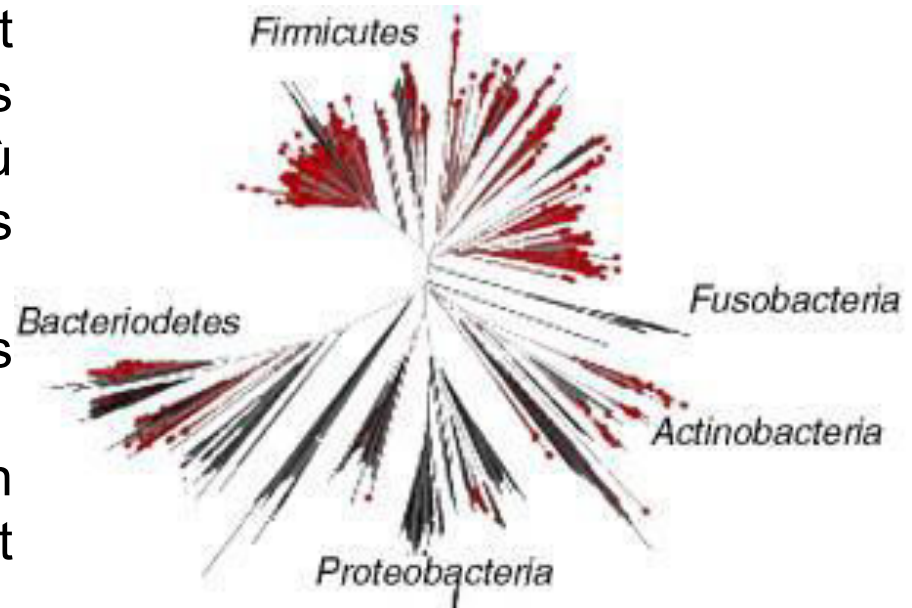
99,9% d'anaérobies

Identité métagénomique

Les bactéries dominantes du microbiote peuvent être réparties en 3 phyla bactériens majeurs (Bacteroidetes, Firmicutes et Actinobacteria) qui sont identifiées chez tous les individus d'où ressortent deux grandes catégories d'espèces :

celles qui sont présentes chez tous les individus (**noyau central**)

et celles qui sont propres à chacun d'entre nous et qui représentent **l'identité métagénomique**.



Flore dominante/flore sous-dominante

Flore DOMINANTE

10-20 espèces avec
Niveau de population
élevé

10^9-10^{11} ufc/g

Bactéries Anaérobies

Surtout BGN non sporulés

Bacteroides +++

BG+ = eubacteria, clostridia

Bifidobacterium

Catenabacterium

Cocci GP

Flore SOUS- DOMINANTE

10^6-10^8 ufc/g

Bactéries aero/anaérobies

facultatives

Enterobacteries, strepto,

Flore de passage

$<10^5-10^6$ ufc/g

Entérobacteries

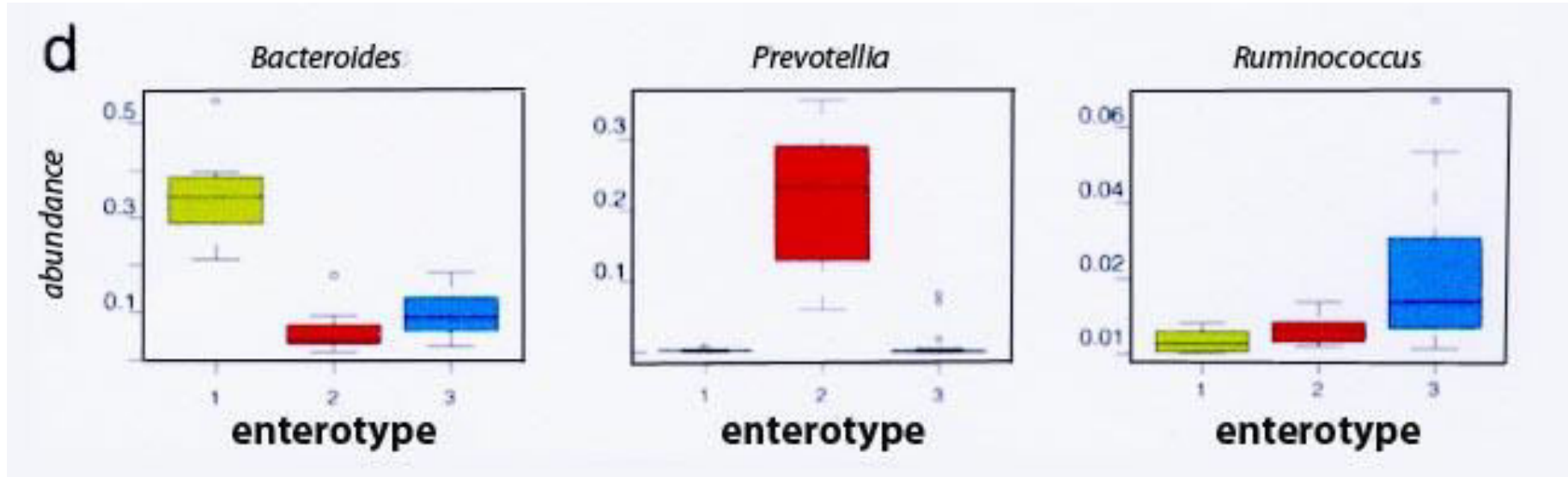
*Citrobacter, klebsiella,
proteus*

Levures

Candia albicans

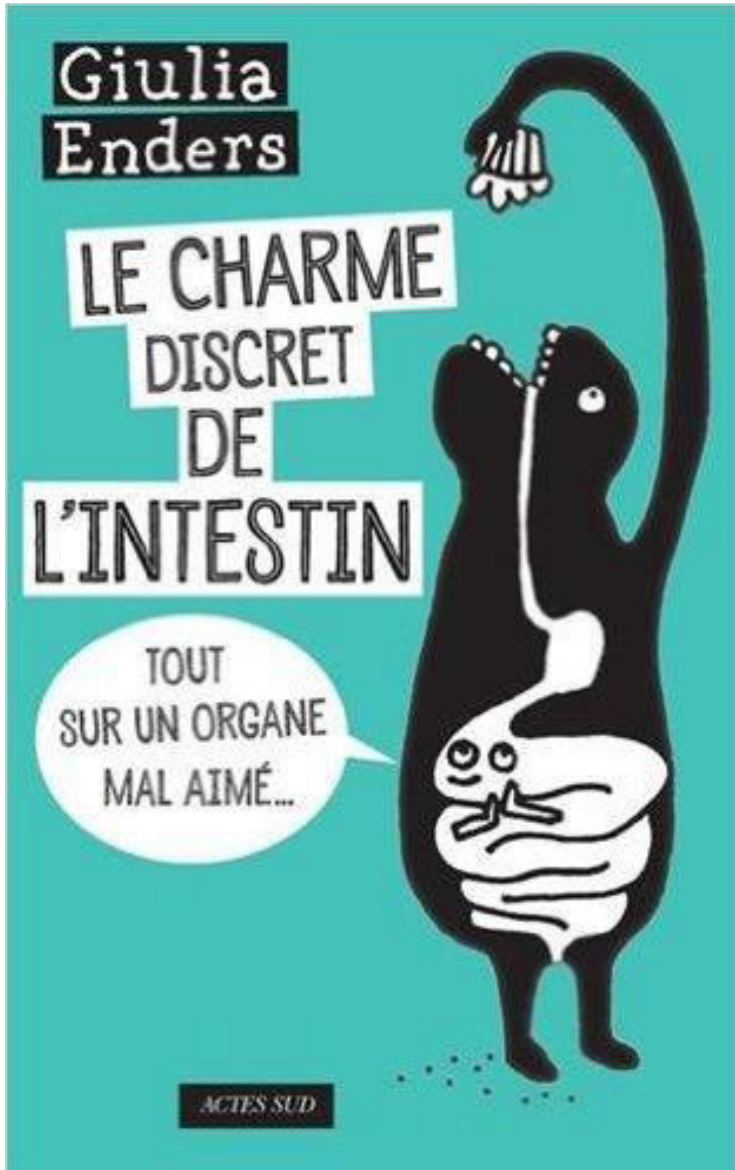
présent dans 50-60%

Malgré la présence quasi universelle des 3 principaux phylums, leurs proportions varient considérablement d'un sujet à l'autre



Cohorte de 242 volontaires américains (human microbiome project) les proportions des différents phylums varient (90%-10%) Nature 2012

Les rôles de l'intestin

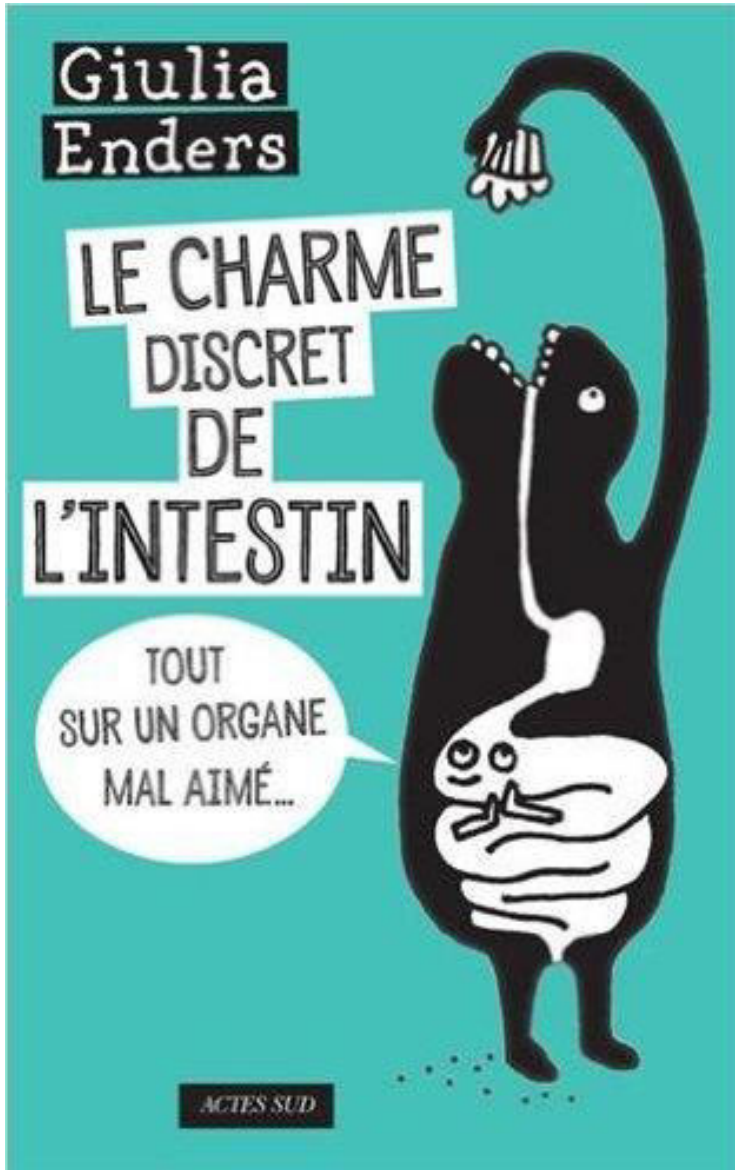


- site de la digestion
- organe de l'Immunité : 70% de nos cellules immunitaires
- 100 millions de neurones : 2^{ème} cerveau
- 400 m² de muqueuses

- au contact de notre microbiote



Les rôles du microbiote intestinal



3 fonctions capitales :

- Conversion des aliments en nutriments et en énergie : 10% des calories, vitamines K B12
- effet barrière vis-à-vis des bactéries pathogènes
- maturation du système immunitaire



Digestion de l'indigestible

Humain
 10^{13} cellules
22 000 gènes
< 17 enzymes

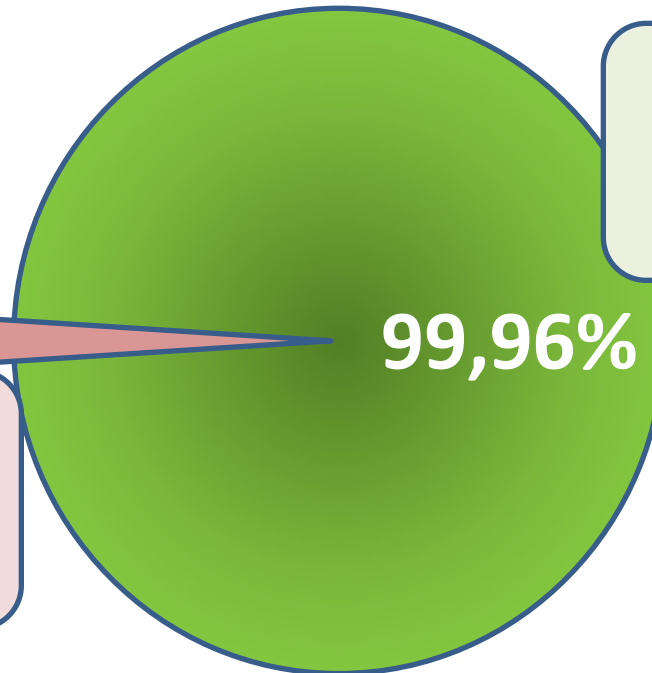
Microbiote intestinal
 10^{14} bactéries, 1000
espèces 3,3 M de gènes
> 56 000 enzymes

0,03%

Lactose
Saccharose
Amidon

99,96%

Amidon
Glycanes
Mucines
Glycoprotéines



Peut-on vivre sans microbiote?



Le modèle des souris axéniques

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

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



Peut on vivre sans microbiote?

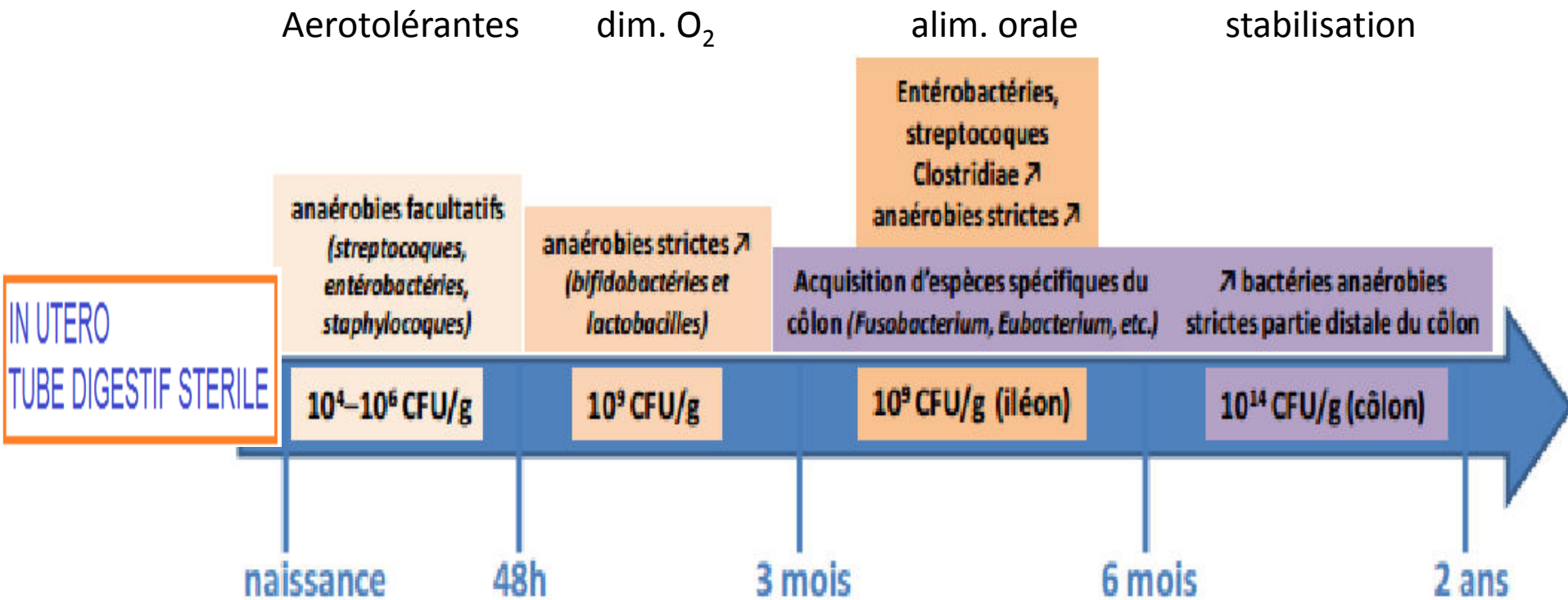
Oui, on a réussi à créer des animaux axéniques, mais...

- tous ne sont pas viables,
- certains ne peuvent pas se reproduire et des modifications importantes de certains organes et tissus apparaissent.

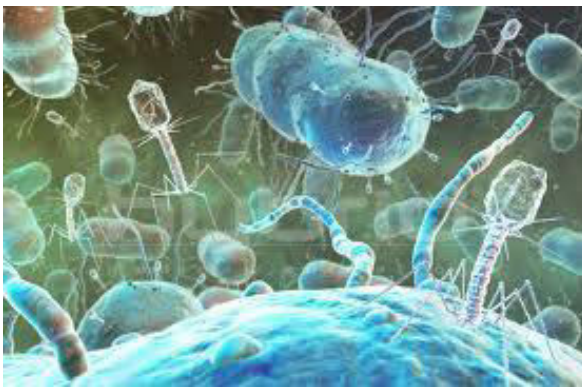
D'où vient notre microbiote ?



Établissement du microbiote par paliers successifs

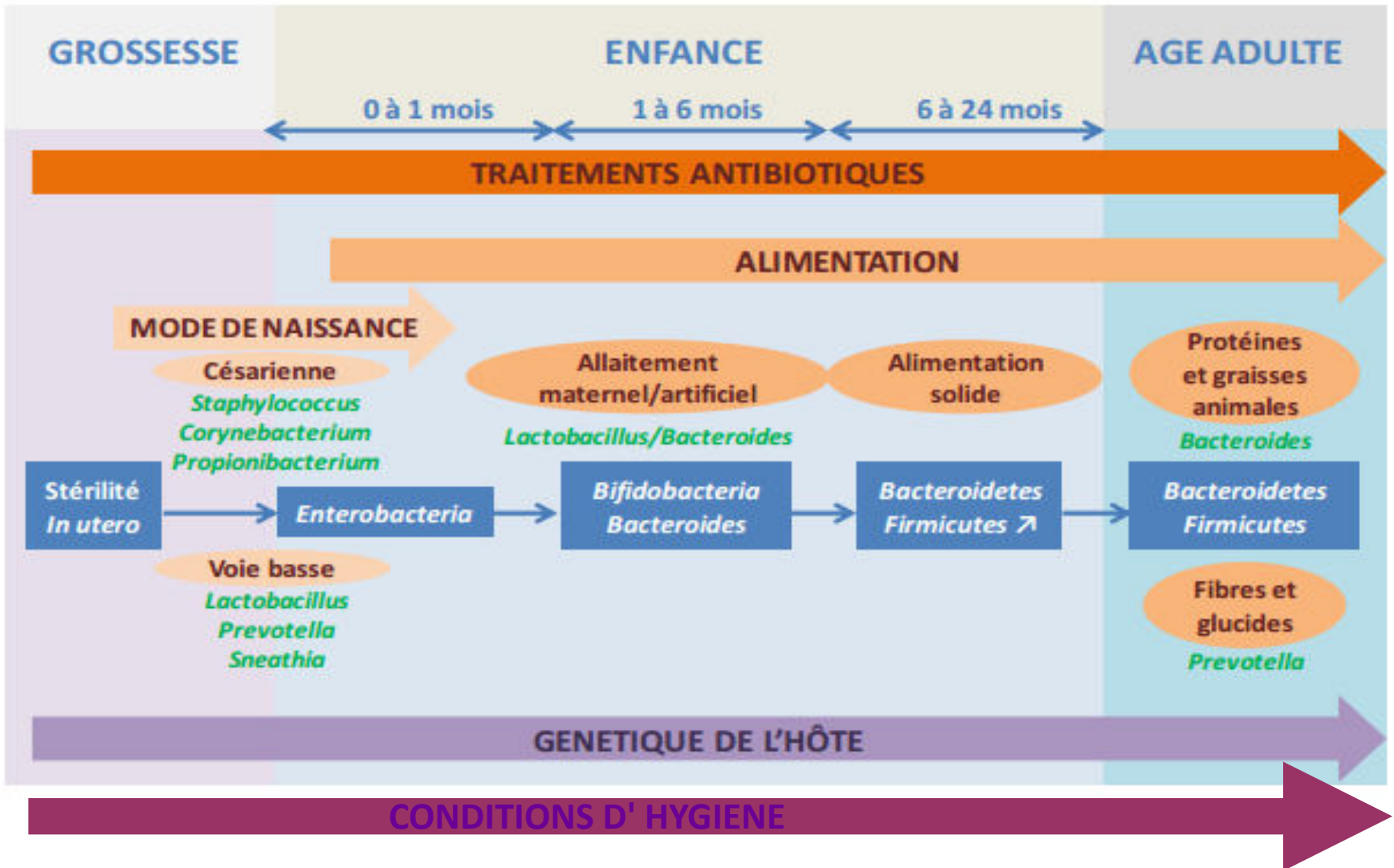


CFU/g: Unité de formation de colonies par gramme de contenu intestinal



Implication du virome : bactériophages

Facteurs influençant le microbiote



Microbiote intestinal

Écosystème dynamique dont la composition peut varier

- au cours du temps
- selon les états physiologiques
- selon les régimes alimentaires

Grande variabilité complique la compréhension

Relation microbiote-hôte : coévolution

Quand ça se passe mal chez nos
microbes : la dysbiose

ça se passe mal chez nous ?

Altération de l'écologie microbienne

- Obésité, diabète, dénutrition
- Maladie de Crohn, Rectocolite hémorragique
- Syndrome de l'intestin irritable, Pouchite
- Allergie, asthme
- GVH, PTI
- Troubles du spectre autistique : anxiété, stress, hyperactivité, activité sociale
- infection à *Clostridium difficile*

Microbiote et dysbiose

Chaque microbiote intestinal individuel est un écosystème complexe dont les composantes microbiennes sont en équilibre dynamique

Les liens de causalité entre composition/structure microbienne du microbiote intestinal et pathologies sont souvent suggérés, pas encore vérifiés et les résultats parfois contradictoires

Dysbiose : cause ou témoins de la maladie, changement de paradigme

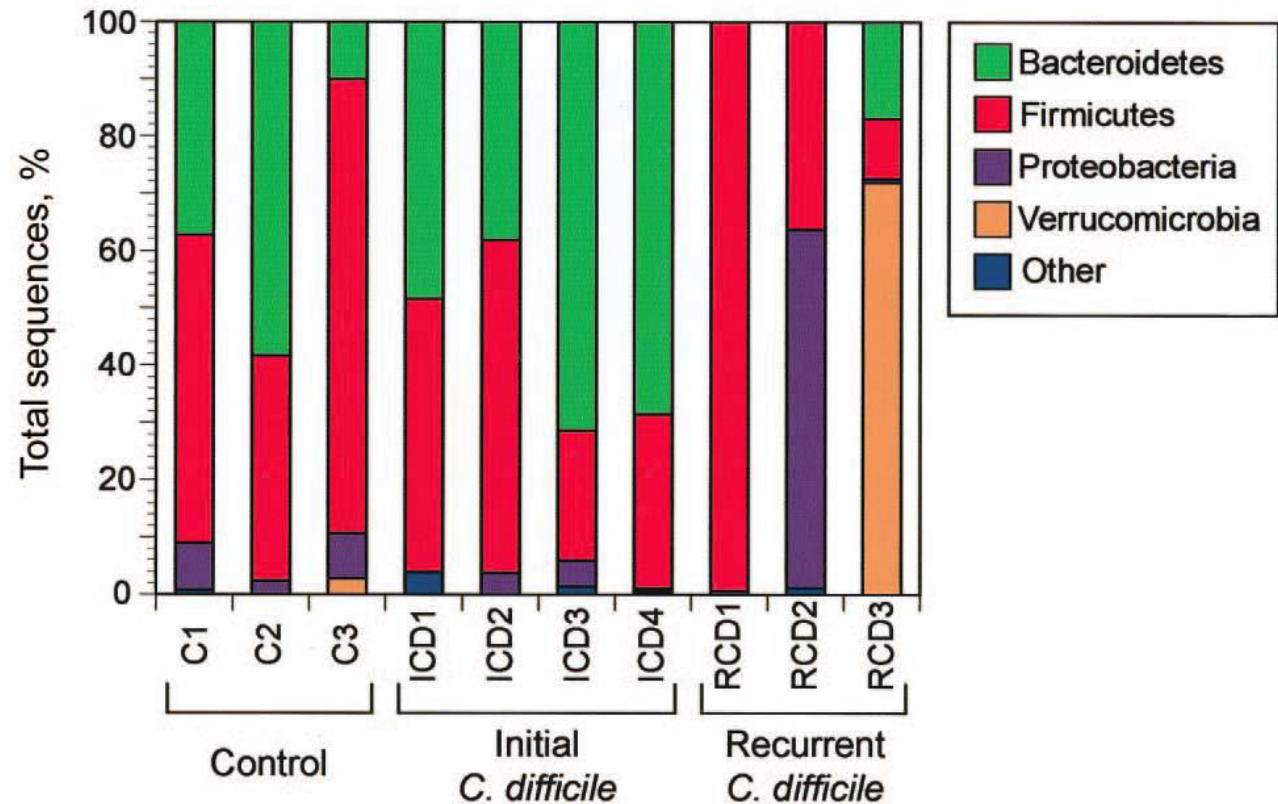
Perspectives

Le monde du microbiote s'ouvre à nous :

- Séquenceurs encore moins chers
- Techniques de plus en plus accessibles
- Développement de la recherche clinique
- Avancées majeures dans la prise en charge de plusieurs maladies : greffe de microbiote

Perte de diversité du microbiote intestinal en cas de récurrences de colites à *Clostridium difficile*

- 20% des patients récidivent
- Après une récurrence, le risque de récurrence ultérieure atteint 40-60%



Diminution de la richesse phylogénétique dans les récurrences

- Diminution des *Bacteroidetes*
- Pas retrouvé en cas d'épisode unique de *C. difficile*

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

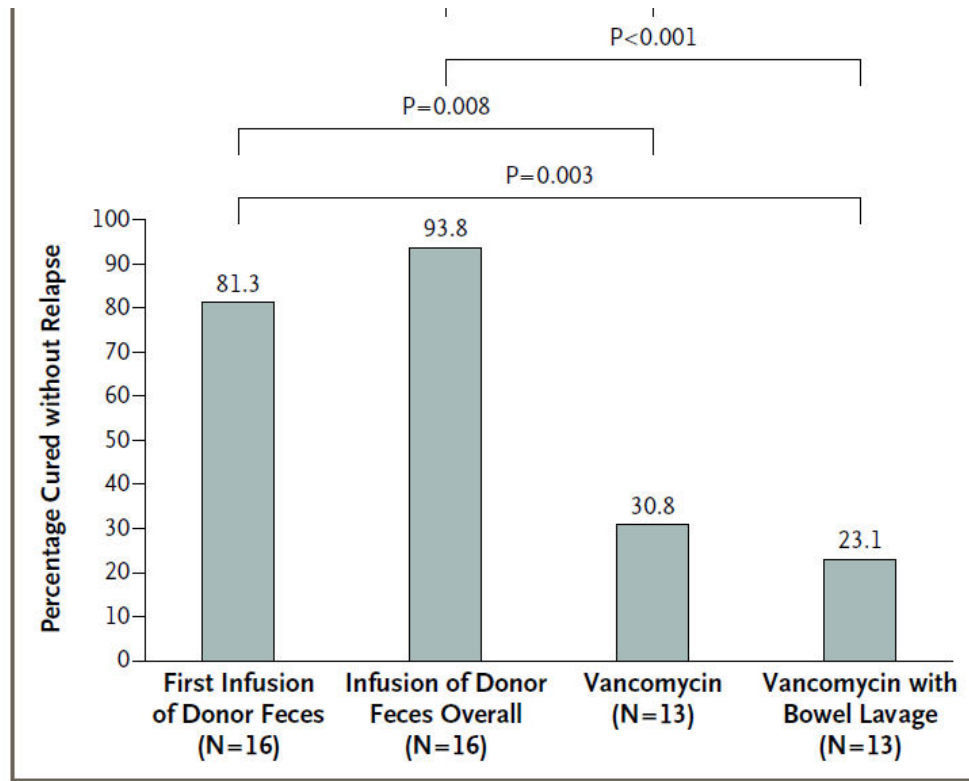
ESTABLISHED IN 1812

JANUARY 31, 2013

VOL. 368 NO. 5

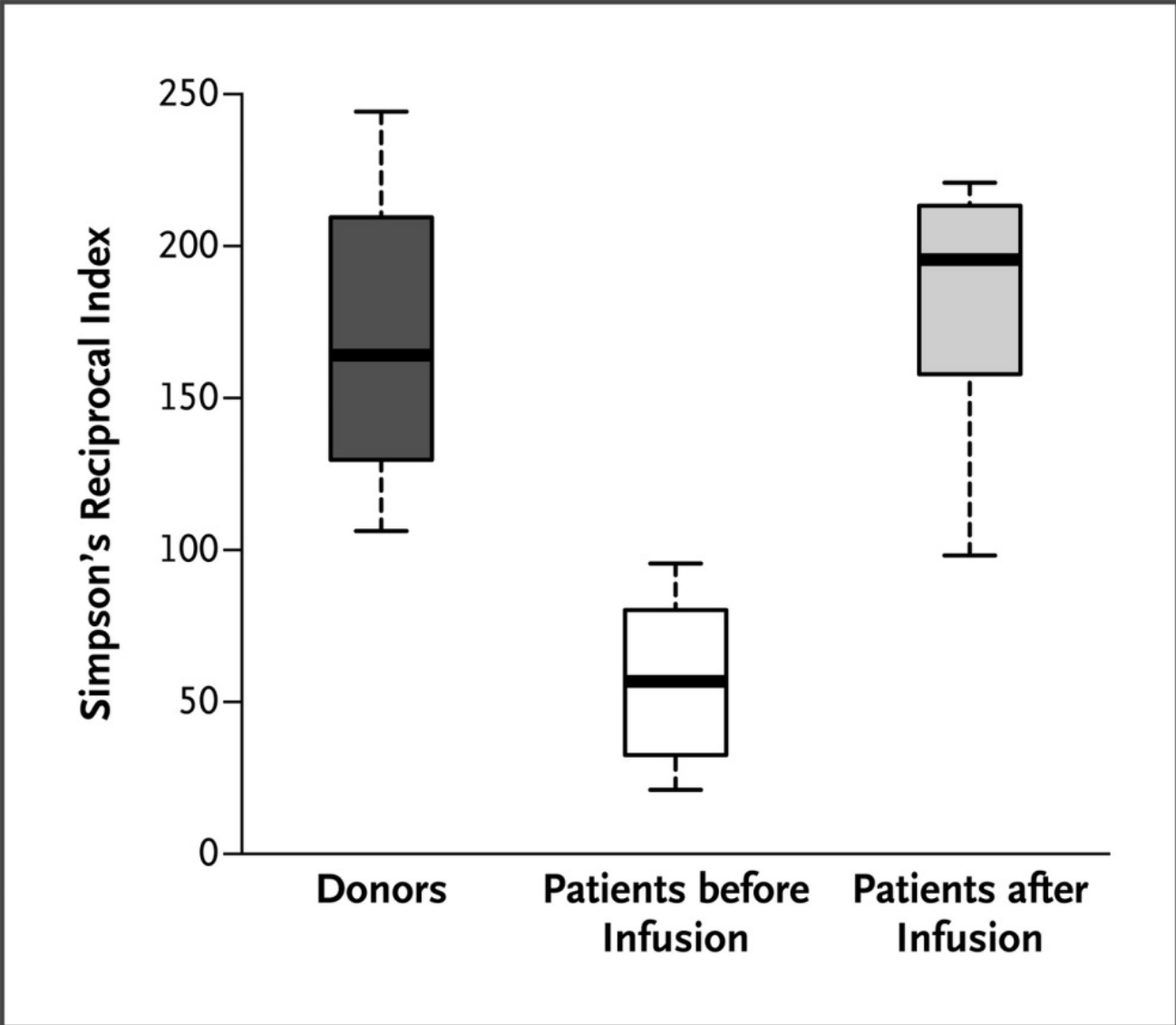
Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*

n= 43 patients

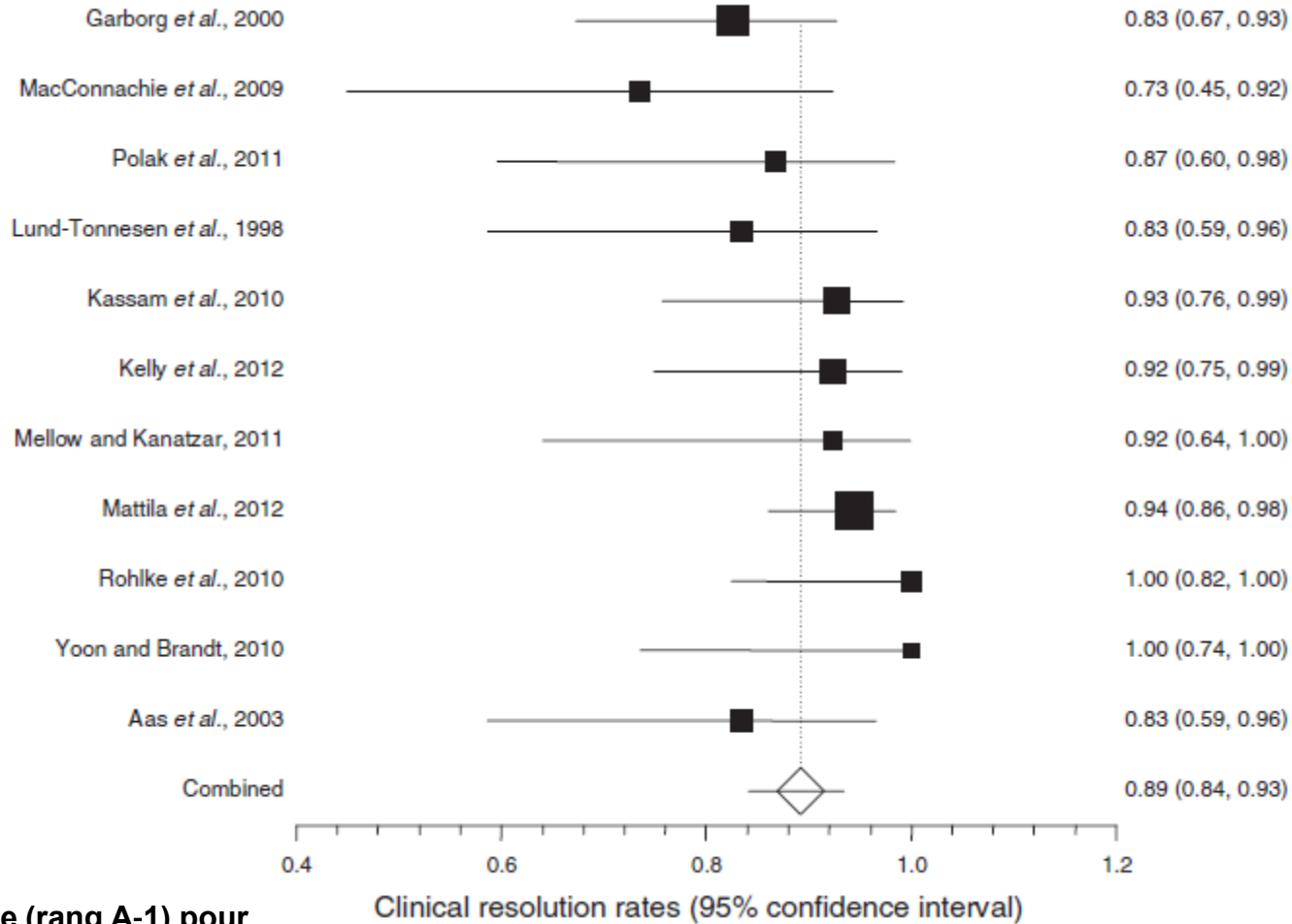


Étude arrêtée
précocement:
patients
dans le bras
vancomycine
pénalisés

Remplacement du microbiote du receveur par celui du donneur, sur le plan **quantitatif** comme **qualitatif**



89% efficacité



TF recommandée (rang A-1) pour
- les colites à *C. difficile* récurrentes ou
réfractaires malgré
des antibiothérapies répétées
- En 1ère ligne si signes de gravité

La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques

Mars 2014

Transplantation de microbiote fécal dans le cadre des infections à *Clostridium difficile* récidivantes : recommandations pour la pratique clinique courante
HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive vol. 22 n8 4, avril 2015

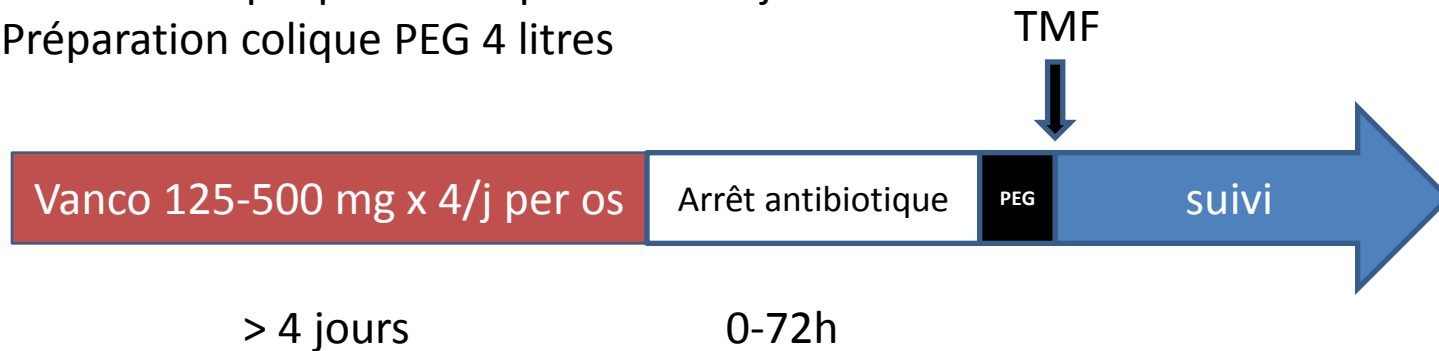
Harry Sokol(1), Tatiana Galperine(2), Nathalie Kapel(3), Pierre Bourlioux(4)(5),
Philippe Seksik(1), Frederic Barbut(6), Julien Scanzi(7), François Chast(4)(8),
Rui Batista(4)(8), Francisca Joly(9), Anne-Christine Joly(10), Anne Collignon(11),
Benoit Guery(2), Laurent Beaugerie(1), pour le [Groupe Français de Transplantation
Fecale \(GFTF\)\(12\)](#)

Indications

Infections à CD récidivantes : seconde récurrence=3^{ème} épisode
Après échec d'un traitement bien conduit par Vanco ou Fidaxo

Séquence thérapeutique

Antibiothérapie par vanco per os min 4j
Préparation colique PEG 4 litres



Quel est le cadre législatif et le contexte réglementaire applicable ?

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.

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).

En pratique : la recette

1. Dilution c

1. Homogéné

Dilution 1

↳ voie ha

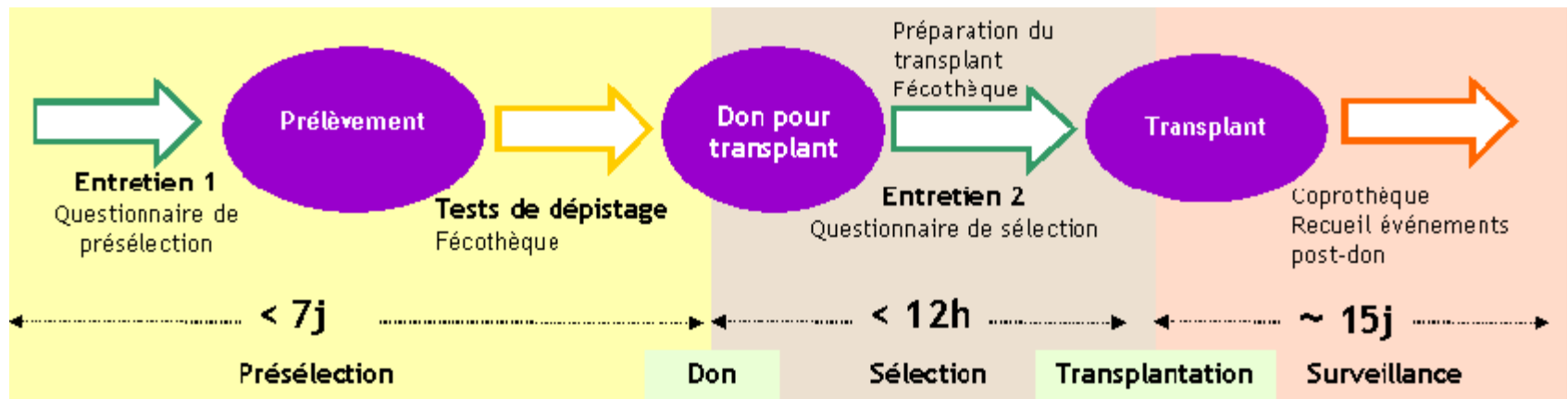
↳ voie ba

2. Filtration A

↳ élimina



Chronologie (versant « donneur ») de la transplantation fécale (en l'absence de congélation)



Profil « idéal » du donneur :

- Age : 18-65 ans
- IMC < 30
- Absence de pathologie chronique
- Absence de traitement curatif au long cours
- Absence de séjour à l'étranger (dans un pays à risque infectieux*) dans les 3 mois précédant le don
- Absence d'hospitalisation à l'étranger (dans un pays à risque infectieux*) dans les 12 mois précédant le don
- Aspect macroscopique normal des selles
- Dépistage négatif d'agents infectieux (cf. liste proposée en annexe 1)

Annexe 1 – Liste des agents infectieux à dépister chez les donneurs

Toute dérogation à cette liste devra impérativement être justifiée.

SANG

Bactéries

- *Treponema pallidum*

Virus¹

- Virus de l'immunodéficience humaine (HIV)²
- Virus T-lymphotropique humain (HTLV)
- Virus des hépatites A, B, C et E (HVA, B, C, E ²)
- Cytomégalovirus (CMV) / Virus Epstein-Barr (EBV)³

Parasites

- *Strongyloides stercoralis* ⁴
- *Toxoplasma gondii*³
- *Trichinella sp.*
- Amibiase ⁴

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

⁴ sérologie si séjour à risque

Annexe 1 – Liste des agents infectieux à dépister chez les donneurs

Toute dérogation à cette liste devra impérativement être justifiée.

SELLES

Coproculture standard **et orientée:**

- *Clostridium difficile*
- *Listeria monocytogenes*
- *Vibrio cholerae* / *Vibrio parahemolyticus*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia*
- Bactéries multirésistantes aux Antibiotiques

Virus

- Adénovirus
- Astrovirus
- Calcivirus (norovirus, sapovirus)
- Picornavirus (entérovirus, Virus Aichi)
- Rotavirus
- Virus des hépatites A et E

Parasites

Strongyloides stercoralis
Cryptosporidium sp.
Cyclospora sp.
Entamoeba histolytica
Giardia intestinalis
Isospora sp.
Microsporidies

Nouvelles indications

- Gastro-intestinales : MICI, Syndrome de l'Intestin Irritable, Pouchite
- Obésité , malnutrition
- Syndrome métabolique, encéphalopathie hépatique, hépatite B chronique
- Neuro-psychiatrie : sclérose en plaque, autisme
- Hématologie : PTI, GVH
- Infectiologie : Sepsis, décolonisation BMR, BHRe

De très nombreux essais cliniques en cours



Les débuts de la
bactériothérapie



1ère Journée du **Groupe Français de Transplantation Fécale** **Vendredi 16 Juin 2017 - Hôpital COCHIN - 9h -18h**

ACTUALITÉS DE LA TRANSPLANTATION FÉCALE EN FRANCE :
ÉTAT DES LIEUX, DERNIÈRES RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Hôpital COCHIN,
Amphithéâtre JEAN DAUSSET
27 rue du Faubourg St-Jacques
75014 PARIS

GFTF

Groupe Français de Transplantation Fécale

Accès :
Métro ligne 6 - Station Saint-Jacques
RER B station Port Royal



Académie nationale
de Pharmacie



www.gftf.fr