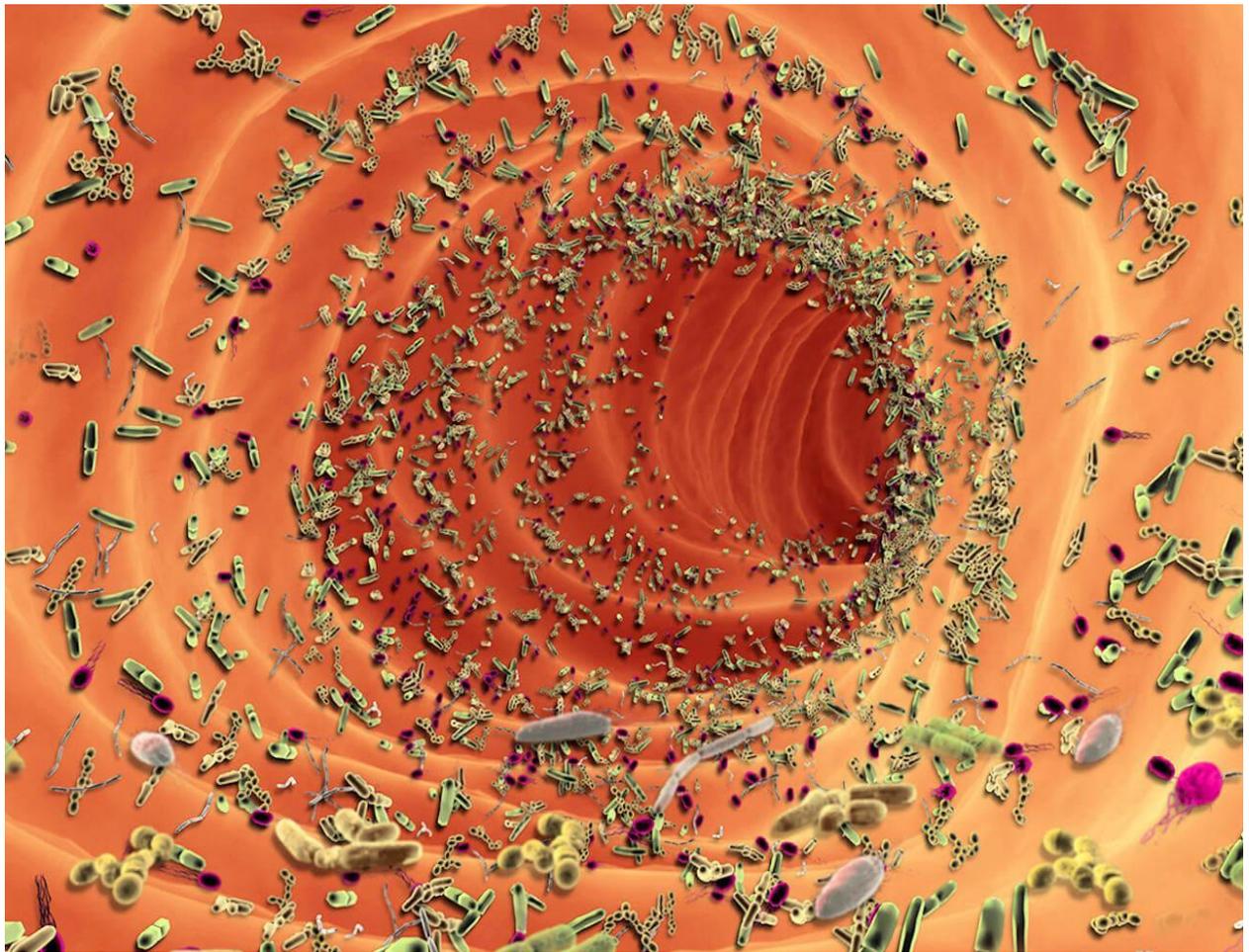


**SCIENCES DU VIVANT ET SOCIÉTÉ**

**LE MICROBIOTE INTESTINAL :  
« Ces bactéries qui nous gouvernent »**



**Colloque du mardi 30 janvier 2018**

**Institut de France Paris**



**INSTITUT DE FRANCE  
Académie des sciences**



# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>2</b>
<b>Le rôle du microbiote intestinal humain dans la santé et la maladie.....</b>	<b>6</b>
<b>Agir sur le microbiote dans les maladies métaboliques.....</b>	<b>20</b>
<b>Interactions entre l'hôte et son microbiote à travers le système immunitaire intestinal.....</b>	<b>40</b>
<b>Immunité homéostatique vis-à-vis du microbiote.....</b>	<b>60</b>
<b>L'axe microbiote intestin-cerveau acteur de notre santé et de nos maladies.....</b>	<b>76</b>
<b>Microbiote intestinal : de corrélation à causalité de « descriptomique » à « expérimentomique » .....</b>	<b>91</b>



LE MICROBIOTE INTESTINAL :  
« CES BACTERIES QUI NOUS GOUVERNENT »

Mardi 30 janvier 2018

(10h00-16h20)

## Introduction

**Jean-Pierre DÉCOR** - Mesdames, Messieurs, bonjour.

Quelques mots pour situer le contexte de cette journée.

Les deux Fondations Mérieux et Bullukian se sont associées pour créer une instance d'information et de dialogue entre la société civile et le monde de la recherche. Les thèmes choisis pour ces réflexions concernent les découvertes scientifiques récentes relatives au vivant ayant un impact potentiel dans le domaine de la santé, de l'alimentation ou de l'environnement.

Dans un contexte sociétal anxiogène, concernant particulièrement l'alimentation et l'environnement, le microbiote intestinal présenté comme un véritable organe a fait l'objet d'un emballement médiatique exceptionnel.

Il était donc important de faire un point précis et rigoureux sur les connaissances à ce jour. C'est ainsi qu'il est devenu le sujet à traiter cette année.

Pour cela, je tiens à remercier les éminents spécialistes qui ont pris sur leur temps précieux pour nous informer.

Nous remercions l'Académie des Sciences de s'être associée à notre initiative et l'Institut de France qui nous permet d'intervenir dans ce cadre prestigieux.

J'espère qu'à l'issue de cette journée, nous aurons les idées plus claires sur ces découvertes et leur développement possible.

Au fil de l'évolution, notre organisme a établi avec ces microbes un processus symbiotique que l'on peut qualifier de gagnant/gagnant.

Comment s'organise cette symbiose, avec quelles conséquences et, *in fine*, le microbiote intestinal est-il seulement révélateur des maladies ou pourra-t-on l'utiliser à des fins thérapeutiques ?

Voilà sommairement présentés les attendus de cette journée.

*(Applaudissements)*

**Alain MÉRIEUX** - Je remercie l'Institut de France. Il m'est personnellement très cher pour de nombreuses raisons. C'est avec beaucoup de plaisir que j'assiste à cette réunion. Je vous remercie pour l'accueil toujours exceptionnel que vous nous réservez pour une journée qui, je l'espère, sera celle d'échanges fructueux.

Je remercie l'Académie des Sciences pour sa présence à nos côtés qui donne à cette journée un rôle très particulier.

*(Applaudissements)*

**Jean-François BACH** - C'est à notre tour, cher Alain MÉRIEUX, de vous remercier pour votre générosité et l'aide que vous apportez à la science en général et au développement des recherches sur les maladies infectieuses en particulier. Vous avez mis à la disposition de l'Institut la possibilité de créer un grand prix sur les maladies infectieuses dans les pays tropicaux, c'est un succès remarquable et je profite de cette occasion pour vous en remercier.

Et maintenant, quelques mots de présentation de cette journée. L'idée de Jean-Pierre DECOR était de couvrir de façon assez large, sans rentrer dans tous les détails, le microbiote intestinal, sujet de grande actualité.

Nous avons réussi à réunir un aréopage de grands spécialistes internationaux de ce sujet pluridisciplinaire. Nous allons aborder successivement la métagénomique des bactéries, les maladies métaboliques, l'immunologie de l'intestin et plus généralement des microbiotes, les relations avec le système nerveux central et enfin les approches thérapeutiques.

La question fondamentale est de savoir quelle est l'importance du microbiote dans l'apparition des maladies métaboliques et celles qui touchent au système nerveux central. Il existe aussi toute une littérature sur son rôle dans la genèse des maladies auto-immunes et allergiques.

Où en sommes-nous ? Peut-on affirmer aujourd'hui qu'il existe un effet direct de la composition du microbiote sur ces maladies ? C'est probablement vrai pour certaines, mais peut-être pas pour toutes ...

L'objet de cette réunion est de faire le point scientifique, destiné à éclairer des personnes qui ne sont pas nécessairement des spécialistes.

Avant de terminer, j'aimerais saluer Yasmine BELKAID qui nous a fait le plaisir et l'honneur de venir de Washington pour nous présenter l'exposé qu'elle fera cet après-midi. Je voulais la remercier personnellement.

**Pascale COSSART** - Cher Monsieur MÉRIEUX, cher Monsieur DÉCOR, cher Monsieur CLAVERANNE, chers confrères, chers amis, Mesdames et Messieurs, soyez les bienvenus dans cette grande salle des séances pour un colloque qui se présente magnifiquement bien par son actualité, par la qualité et le renom international de ses orateurs et par la variété des thèmes abordés. Nous avons beaucoup de chance.

Je remercie Jean-Pierre DÉCOR, les Fondations Mérieux et Bullukian d'avoir permis ce colloque qui a pour titre :

« *Le microbiote intestinal : Ces bactéries qui nous gouvernent.* »

C'est une thématique relativement nouvelle mais qui explose littéralement, révolutionnant la microbiologie, certes, mais surtout qui nous fait découvrir une facette totalement nouvelle de notre physiologie, reliant nutrition, immunologie, génétique et aussi neurobiologie.

L'essor de la « microbiotologie » ; permettez-moi ce néologisme ; est dû essentiellement au développement des méthodes d'analyses des génomes et des

transcriptomes. Elle a vu le jour au début des années 2000, avec des publications très importantes dès 2005. De nos jours, il n'y a pas un numéro de «*Nature*» ou «*Science*» qui ne contiennent un article sur cette thématique.

Nous avons, en une dizaine d'années, appris beaucoup sur ces cent mille milliards de bactéries qui cohabitent sur de nombreuses parties de notre corps.

On a pris l'habitude de dire que ce super organisme, possède 10 fois plus de bactéries que de cellules de notre corps. Nous y reviendrons.

Le programme de séquençage américain, HLP (Health Human Microbiome Project), celui du projet européen (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract - MetaHIT*) dirigé par Dusko EHRlich, nous ont appris, que les microbiotes diffèrent considérablement selon les populations, que leur composition varie pendant la jeune enfance, se stabilise pendant l'âge adulte et se dégrade au cours de la vieillesse. Un microbiote diversifié est un signe de bonne santé et de jeunesse.

Nous avons également appris que ceux des personnes obèses sont très différents de ceux des personnes minces. Les travaux de Karine CLÉMENT notamment montrent que l'on peut contrecarrer l'obésité en jouant sur la nutrition et indirectement sur la composition du microbiote.

Il été mis en évidence que les traitements aux antibiotiques affectent énormément sa composition. Martin BLASER a montré que des traitements répétés dans la petite enfance, sans doute en déstabilisant sa mise en place, semblent prédestiner à l'obésité.

Mais quelle est donc le rôle des bactéries, des archées, des virus ou des amibes qui habitent notre corps ? Beaucoup d'observations et de corrélations ont été établies entre un phénotype et un genre bactérien particulier de ce microbiote. Mais attribuer un rôle à une bactérie particulière a été rarement possible. Ce fut le cas pour la SFB (Segmented Filamentous Bacteria), qui induit une réponse immunitaire TH17 dont nous parlera peut-être Nadine CERF-BENSUSSAN.

Egalement pour *Faecalibacterium prausnitzii* dont l'action anti-inflammatoire a été bien démontrée par le groupe de Philippe LANGELLA.

Notre corps est tolérant vis-à-vis de toutes ces bactéries comme nous le dira Yasmine BELKAID. Il évolue en totale symbiose avec ce microbiote qui lui apporte des vitamines et autres molécules importantes capables de stimuler la réponse immunitaire. Il induit la sécrétion d'hormones qui peuvent stimuler une réponse neuronale comme nous l'expliquera M. Michel NEUNLIST dans la relation intestin-cerveau.

Les recherches sont entrées dans une deuxième phase : le passage de la description à l'étude des fonctions, comme le discutera Philippe SANSONETTI, de la «*descriptomique*» à «*l'expérimentomique*».

En parallèle les recherches sur la nature du microbiote doivent être affinées

Par exemple, le chiffre de 10 fois plus de bactéries par rapport à notre nombre de cellules a été révisé à la baisse jusqu'à dire autant de bactéries que de cellules dans notre corps.

Deuxième réévaluation, on s'est rendu compte que des variations entre microbiotes pouvaient être dues à de simples problèmes techniques. Dans un article publié en octobre 2017, Dusko EHRLICH et ses collaborateurs ont montré que lors d'analyses d'échantillons fécaux, des différences importantes peuvent être dues à la façon de traiter les échantillons. Des méthodes standards doivent être mises en place afin de pouvoir comparer des résultats d'analyses faites dans des laboratoires différents.

Enfin, on s'est rendu compte que la classification des microbiotes en 3 différents entérotypes comme proposé originellement par Dusko EHRLICH devrait être étendue et modulée.

En résumé, le domaine avance vite, il se structure, se systématise, s'organise. Il établit des règles. Celles-ci sont indispensables. Elles permettront de comprendre toutes les interactions qui prennent place dans l'intestin, sur la peau ou ailleurs.

Je crois que nous allons beaucoup apprendre aujourd'hui.

*(Applaudissements.)*



*Stanislav Dusko EHLICH*

*MetaHIT – INRA Jouy-en-Josas*

**Jean-Pierre DÉCOR** - Monsieur EHLICH, vous êtes directeur de recherche à l'INRA de la fameuse équipe pionnière qui a publié en 2011 le premier séquençage des bactéries du tube digestif humain. Vous êtes professeur au King's College de Londres et naturellement, coordinateur du consortium international MetaHIT.

Grâce à la métagénomique, par séquençage global *shotgun* ou plus ciblé par l'ARN ribosomique de la sous unité 16S des bactéries, vous avez pu, pour la première fois au monde, dresser un inventaire des 100 milliards de bactéries qui peuplent notre intestin. Puis, vous avez fait leur connaissance grâce aux souris axéniques dont il sera question tout au long de la journée.

Monsieur EHLICH, nous sommes impatients de connaître votre petit monde.

**Dusko EHLICH** - Merci beaucoup de l'invitation et de pouvoir intervenir dans ce lieu prestigieux, devant les collègues que j'estime beaucoup. Merci à Jean-Pierre DÉCOR et à la Fondation Mérieux, d'avoir rendu cela possible.

A propos de la controverse concernant le nombre de cellules microbiennes, j'aimerais vous rappeler que 80 % de nos cellules sont des érythrocytes et qu'il en meurt plusieurs dizaines de milliards par jour. Savoir s'il y en a plus ou moins n'est pas primordial. Je pense personnellement qu'il y a plus de cellules microbiennes que celles du corps humain.

Le génome humain est composé de 23 000 gènes, l'intestin contient 600 000 gènes microbiens...

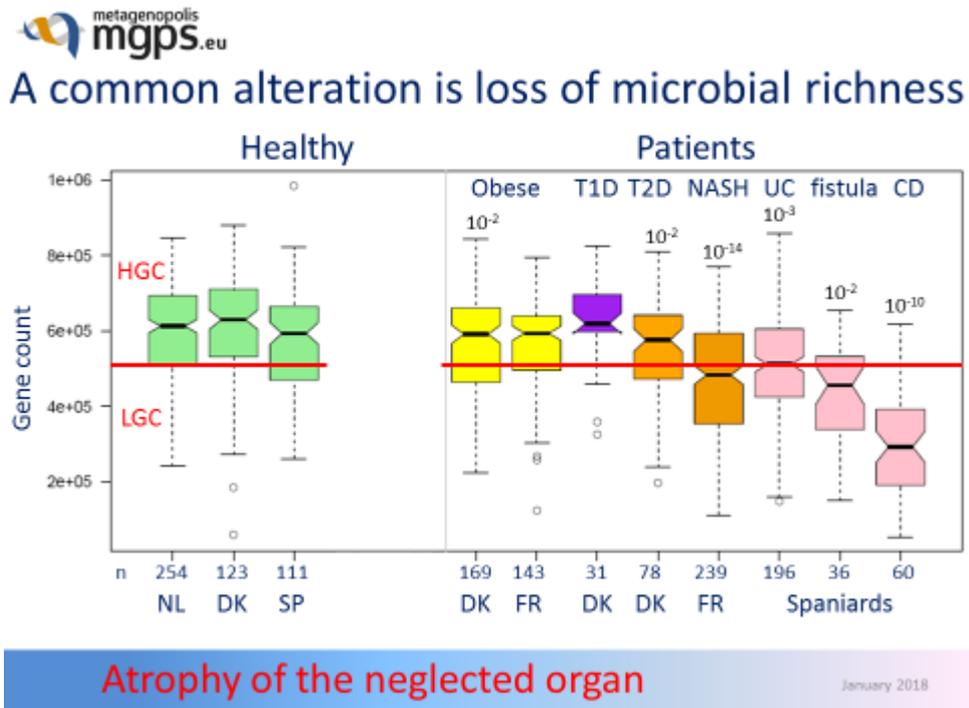
Le microbiote représente une interface entre les nutriments et l'épithélium contenant des cellules immunitaires et neurales. Il peut être considéré comme un « organe négligé ».

Il possède une grande capacité métabolique et doit être en bon état car un organisme entier ne peut bien fonctionner que si c'est le cas pour tous ses organes.

Le microbiote apparaît impliqué dans un grand nombre de maladies chroniques, maladies inflammatoires et même la cirrhose, l'athérosclérose en passant par les problèmes d'obésité et les syndromes métaboliques dont Karine CLÉMENT parlera tout à l'heure.

L'altération de cet organe dans les maladies chroniques semble assez générale. C'est une perte de la diversité microbienne ce que nous appelons « la richesse ».

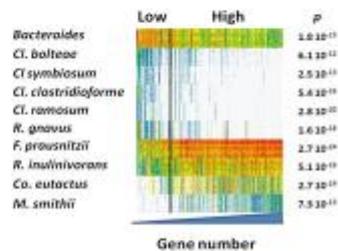
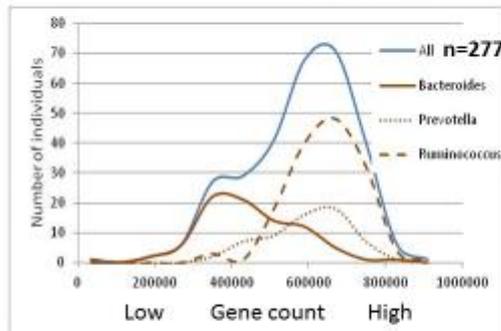
En analysant différentes cohortes d'individus, chez les personnes en bonne santé, on trouve à peu près 600 000 gènes en moyenne. Les malades ont tendance à perdre cette richesse.



Il est intéressant de constater que cette perte de la richesse peut être aussi constatée chez des personnes en bonne santé.

Dans une cohorte de près 300 personnes en bonne santé, la distribution bimodale du nombre de gènes montre que près d'un quart des individus ont un *low gene count*, comme si cet organe s'était atrophié

## Microbial richness can be lost even in healthy people



Low gene count individuals (1/4) have increased adiposity, insulin resistance, dyslipidaemia & inflammation – a risk for chronic diseases

Le Chatelier et al. Nature 2013, doi: 10.1038/nature12506.

January 2014

Cette altération est caractérisée par des communautés microbiennes différentes. Nous avons rangé les individus selon le nombre de gènes qu'ils portent. On constate que les gens qui ont peu de gènes (*low gene count*) ont de nombreuses *Bactéroïdes*. Chez les gens riches en gènes, il y a d'autres bactéries, notamment les *Faecalibacterium prausnitzii*.

Les phénotypes, les paramètres cliniques des individus *low gene count*, sont une adiposité accrue, une insulino-résistance plus élevée, une dyslipidémie et une inflammation qui représentent un risque pour diverses maladies chroniques.

Si nous examinons le potentiel fonctionnel de ce microbiote pauvre, nous constatons que sa capacité à produire du butyrate est diminuée, C'est une substance très importante pour notre corps qu'il ne sait pas synthétiser. En revanche, la production de substances pro-inflammatoires liposaccharidiques (LPS) ou sulfure d'hydrogène est plus élevée. Nous pouvons constater également une résistance plus élevée au stress oxydatif qui va de pair avec une inflammation plus forte chez ces individus.

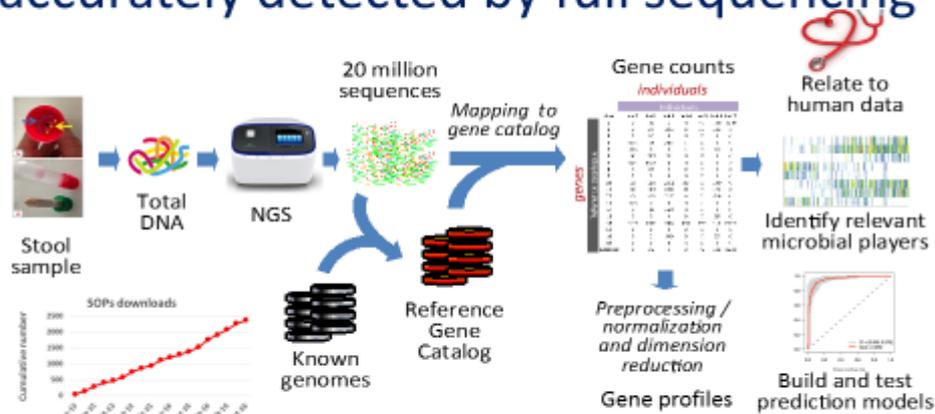
Nous pouvons désormais détecter ces altérations grâce à la méthodologie qui a été élaborée lors du projet MetaHIT. A partir d'échantillons de selles, on identifie les bactéries qui pourraient jouer un rôle et *in fine* construire les algorithmes d'intérêt clinique.

Pour cela, tout l'ADN est extrait de ces échantillons puis séquencé. Les séquences sont regroupées entre elles par similarité en clusters et peuvent être annotées grâce à une base de données ou rester comme telle définissant une espèce inconnue

La nature et le nombre de gènes qu'un individu porte permet d'établir des profils et en les comparant aux bases de données humaines, nous pouvons identifier les microbes qui sont associés à certains de ces paramètres.

MetaHIT

# Microbiome alterations can be very accurately detected by full sequencing



## Standardization is critical

<http://www.microbiome-standards.org/#SOPS>

Costea et al. NatBiotech, in press



Comme le disait Pascale COSSART, cela semble assez simple, mais la standardisation est absolument critique. Nous avons au sein d'un consortium européen travaillé pour établir des protocoles standards que nous avons mis à disposition.

Nous en sommes à 4 500 téléchargements. Nous pouvons donc espérer une certaine cohérence.

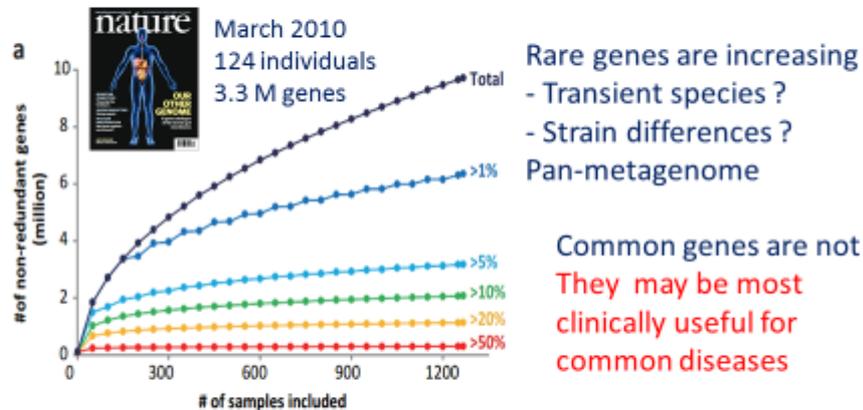
La partie cruciale de cette méthodologie est ce catalogue de gènes. Le premier publié en 2010 par MetaHIT était basée sur 124 individus. Nous avons ainsi repéré 3,3 millions de gènes.

Nous en avons publié un deuxième à partir de 10 fois plus de personnes, des Européens, Chinois et Américains. Il comporte 10 millions de gènes.

Il faut noter que leur nombre continue d'augmenter. Ce sont principalement des gènes rares portés par des espèces qui ne font que transiter dans l'intestin. Par exemple, la consommation de yaourt entraîne la détection des bactéries associées dans les selles. Mais il ne s'agit pas dans ce cas d'espèces résidentes.

Cela peut aussi être dû à des différences de souches dans la même espèce.

## An integrated 9.9 M genes reference catalog



Individuals from MetaHIT, Chinese and HMP studies, n=1267  
Sequenced reference gut genomes

Li et al. Nature Biotech, 2014



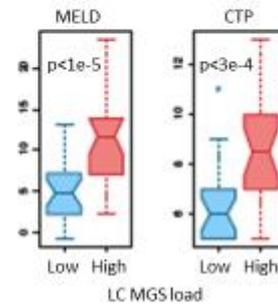
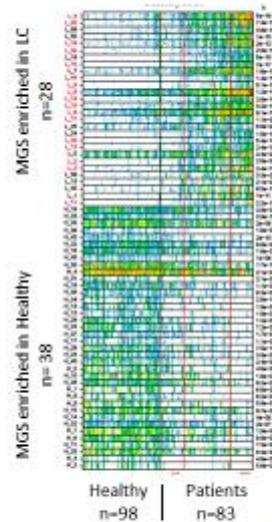
En revanche, les gènes communs à plusieurs populations c'est-à-dire au moins présents dans 5 % des individus, n'augmentent plus tellement.

**Ils peuvent donc être utilisés à des fins de diagnostic de maladies à caractère général.**

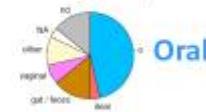
Par exemple avec l'analyse du microbiote, nous pouvons dresser un diagnostic très précis pour la cirrhose du foie. Cela seulement avec un petit échantillon de selle ; donc plus de biopsie, plus d'intervention lourde, nous arrivons à détecter la maladie et même le risque de la développer. Nous pouvons aussi suivre sa progression, évaluer sa sévérité.

Une expérience a été réalisée avec une cohorte de 150 individus pour lesquels nous avons identifié les bactéries enrichies ou, a contrario, perdues. C'est une analyse dite AUC. Elle a une précision diagnostique de 95 %. Dans le panneau suivant, chaque colonne est un individu. Chaque boîte est une espèce bactérienne. L'intensité des couleurs montre l'abondance de ces bactéries. Chez les malades, il y a une accumulation de certaines espèces qui sont rares chez les individus en bonne santé. De plus ces espèces en chassent d'autres.

## Severity of the disease – liver cirrhosis



### Invasion of the gut by oral bacteria



### Overproduction of NH<sub>3</sub> & GABA; impact on Mn<sup>2+</sup>

Qin N. et al. Nature 2014

January 2014

Les quantités de ces bactéries envahissantes sont variables chez chaque patient. La sévérité de la maladie peut être estimée en utilisant 2 paramètres assez standards, MELD et CTP ; ceux avec peu de ces bactéries envahissantes ont une maladie moins grave que ceux qui en ont beaucoup.

On a pu déterminer leur nature. Ce sont principalement des bactéries de la bouche. Elle est parfaitement située pour inoculer l'intestin. Dans la cirrhose, ces microbes tendent à s'établir dans l'intestin. Leur potentiel métabolique est une surproduction d'ammoniac, de GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) et la modification du métabolisme des ions manganèse. Ces éléments sont effectivement observés dans une complication grave de la cirrhose, l'encéphalopathie hépatique.

Les traitements actuels, laxatifs, énémas, antibiotiques, ciblent le microbiote. Malheureusement, une fois que l'on a chassé par ces moyens le microbiote altéré, il se régénère aussitôt et les patients rechutent. Ne pourrait-on pas faire quelque chose de plus permanent comme une transplantation fécale ?

Une première étude vient d'être publiée. Elle comprend une dizaine de patients traités. Après 6 mois de suivi il n'y a pas de rechute. Même si nous ne comprenons pas encore les relations, ces interventions permettent de soigner des patients.

En effet nous savons pertinemment que la cirrhose du foie n'est pas due à un microbiote altéré. Les causes principales sont des affections virales, l'alcool, l'obésité, parfois l'auto-immunité. La conséquence de cette altération du foie est la perte d'hépatocytes et une production réduite de la bile.

Or pour qu'une bactérie vive dans l'intestin humain, elle doit résister à la bile. Sans celle-ci l'intestin commence à être permissif. Le résultat est une invasion par les bactéries orales et par les pathogènes portés par l'aliment. De cette façon, un microbiote largement toxique s'établit pouvant aggraver la maladie.

Ce n'est plus une cause ou conséquence linéaire, mais quelque chose d'un peu plus sophistiqué dans lequel l'altération de l'hôte et l'altération des micro-organismes peuvent constituer un cycle vicieux.

En corolaire, il faudrait traiter la partie humaine et la partie microbienne de notre corps pour préserver de façon optimale la santé et pour peut-être mieux guérir la maladie.

Si les altérations du microbiote peuvent aggraver la maladie, sa restauration devrait être bénéfique. Différentes pistes peuvent être considérées. Mais je n'ai absolument pas le temps de les développer.

Je vous ai présenté une intervention possible sur le microbiote par la transplantation fécale. Actuellement, ce ne sera pas le premier acte de votre médecin !

Nous allons examiner les possibilités par des interventions nutritionnelles. Il s'agit d'une étude en collaboration avec Karine CLÉMENT où des patients obèses ou en surpoids ont été placés sous un régime restreint en calories, renforcé en fibres avec peu de gras. Au bout de 6 semaines, leurs paramètres cliniques se sont améliorés et les patients initialement pauvres en microbiote (*low gene count*) ont récupéré une partie substantielle de la richesse en gènes.

Ainsi les interventions nutritionnelles peuvent moduler le microbiote et réduire les risques de développer des maladies plus graves.

Comment se développe cette richesse en gènes ? Ce n'est pas le fait d'une espèce seule, même si des articles le prétendent, ce sont des communautés beaucoup plus complexes.

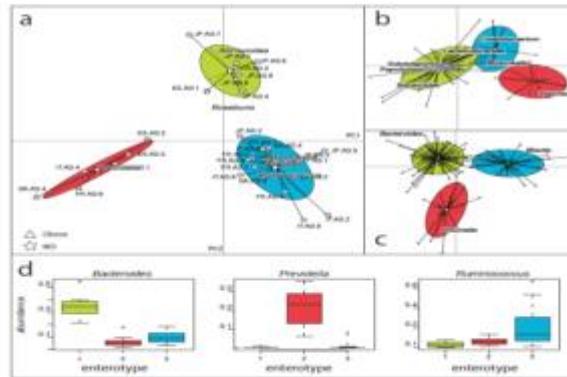
Dans un premier travail, jugé comme faisant partie des 10 découvertes de l'année nous avons divisé le microbiote humain en 3 entérotypes : *Bactéroïdes*, *Prevotella*, *Ruminococcus*.

Enterotypes of the human gut microbiome

Watanabe A, Aronson A, Greenbaum A, ... (list of authors)

Based on genus-level analysis  
Named after the dominant genus

Europeans,  
Americans,  
Asians, n=33.



Danes  
n=85

US  
n=154



Ensuite, par une méthode tout à fait différente, nous avons essayé de décrire les communautés microbiennes qui peuvent y exister.

Un réseau a été élaboré par une post doctorante au laboratoire. La communauté connectée par les liens bleus montre qu'ils aiment bien vivre ensemble. Tous les liens rouges dénotent une répulsion. Ainsi, la communauté rouge n'aime pas être avec la communauté verte.



Species-based gut microbial communities

RESEARCH ARTICLE  
Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks

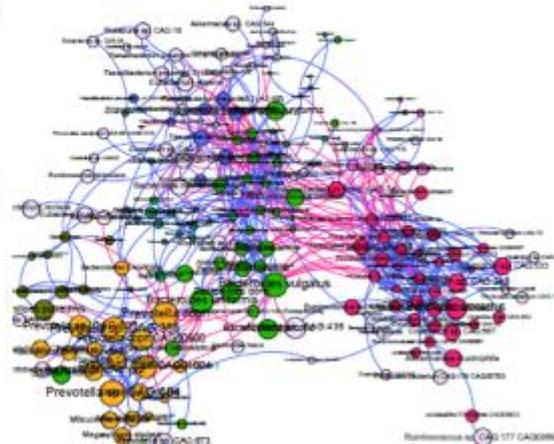
Zachary D. Kurtz<sup>1,2</sup>, Christian L. Miller<sup>1,2,3</sup>, Emily R. Mearns<sup>1,2,3</sup>, Jean R. Littman<sup>1</sup>, Martin J. Blaser<sup>1</sup>, Richard A. Shadmehr<sup>1,2,3,4</sup>



Graphical Lasso (Glasso) method; metagenomic species are represented by Gaussian Markov random field

1800 samples  
306 species in the graph  
8 robust communities

Hanna Julienne et al. in prep



Les communautés ont une certaine composition taxonomique. Nous essayons de représenter combien d'espèces elles comportent. Cela peut aller de 4 ou 5 à près d'une cinquantaine avec des abondances différentes.

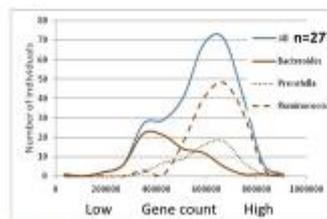
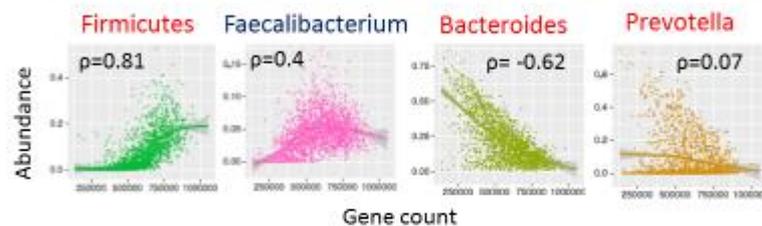
Les trois communautés qui sont notées, *Firmicutes*, *Prevotella* et *Bacteroides*, ressemblent beaucoup aux trois entérotypes que nous avons décrits. Nous les retrouvons ainsi par des méthodes totalement différentes.

Il y en a d'autres et cela se complexifie. Certaines de ces communautés corrélient de façon extraordinaire avec la richesse. Par exemple pour celle dénommée *Faecalibacterium prausnitzii*, quand le nombre de gènes augmente, son abondance augmente. Cette communauté correspond à l'entérotipe *Ruminococcus* que nous avons vu enrichi dans l'étude que je vous ai présentée.

A contrario, la communauté dite *Bacteroides* est inversement proportionnelle à la richesse, comme ce que nous avons observé pour l'entérotipe *Bacteroides* qui était enrichi chez les gens qui ont un microbiote pauvre.



## Correlation of communities with richness



**Ruminococcus**  
enterotype is enriched  
in HGC, Bacteroides in  
LGC individuals

Hanna Julienne et al. in prep

January 2018

Ces communautés permettent de dresser un diagnostic qui est peut-être plus pertinent que celui que nous avons pu faire jusqu'à maintenant. Ainsi par l'examen des selles, nous pouvons déclarer qui est maigre et qui est obèse avec une précision qui approche 90 %.

Cela ne fonctionne pas toujours aussi bien. Dans le diabète, cela marche moins bien, mais mieux que le modèle basé sur les espèces. Si nous réfléchissons au mécanisme, faut-il se focaliser sur les espèces ou faut-il plutôt regarder la communauté ? Un nombre croissant de données sont intégrées, notamment celles métabolomiques.

Dans une étude sur des individus prédiabétiques et diabétiques, nous avons trouvé des métabolites enrichis chez les gens qui ont une insulino-résistance plus élevée en même temps que des fonctions bactériennes enrichies. Le plus important nous semblait être le très grand potentiel à synthétiser les acides aminés à chaîne branchée, accompagné d'une diminution de leur utilisation.

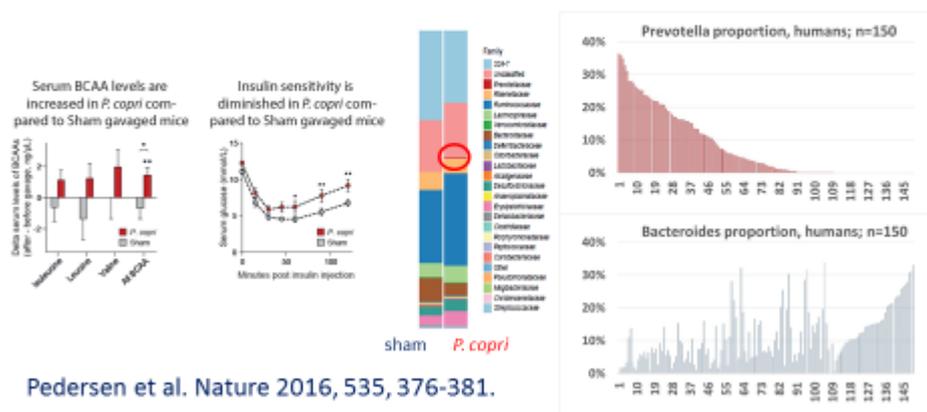
Ce phénotype semblait être lié à un petit nombre d'espèces : *Prevotella copri*, *Bacteroides vulgatus*. Nous avons testé *Prevotella* chez les souris. Celles qui ont été gavées avec la *Prevotella* ont effectivement présenté une quantité accrue de ces acides aminés accompagnée d'une insulino-résistance plus élevée.

Nous avons procédé de façon à moduler aussi peu que possible le microbiote. Des souris ont reçu un placebo, la différence est nette. Elle vient essentiellement d'une petite quantité de *Prevotella*, mais cela suffisait pour donner des phénotypes détectables.



## A few species are main actors

Positive correlations between microbial functions and IR are largely due to a few species, notably *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus*. A high fat diet supplemented with *P. copri* led to increased circulating serum levels of BCAAs and insulin resistance in mice.



Pedersen et al. Nature 2016, 535, 376-381.

January 2018

Qu'en est-il chez les êtres humains ? Nous ne pouvons pas faire la même intervention...

Mais sur une cohorte de 150 personnes diabétiques, le résultat est toujours à peu près le même : *Prevotella* peut représenter jusqu'à un tiers du microbiote. Il y a des personnes qui n'en ont pas, mais elles ont tendance à avoir beaucoup de

*Bacteroides*. La quantité de ces microorganismes potentiellement perturbateurs peut être assez grande.

Quelques espèces peuvent jouer un rôle important, mais il est très probable que beaucoup y contribuent.

Il faudrait essayer de moduler ces microbiotes pour casser le cercle vicieux : cause/conséquence/contribution. Par exemple dans la cirrhose, des microbes peuvent être toxiques chez les personnes qui ont perdu de la richesse microbienne. Cette toxicité pourrait être due à une sélection d'espèces résistantes à l'inflammation qui sont en retour pro-inflammatoires.

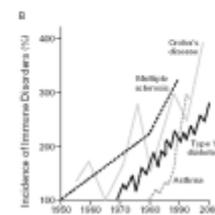
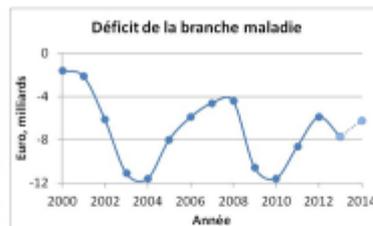
En santé publique, l'impact de ces études sur un microbiote pourrait être très grand avec pour objectif le maintien en bonne santé et un meilleur traitement de la maladie.

Les maladies coûtent très cher et amènent en plus de beaucoup de souffrance. Concernant la « richesse perdue » du microbiote, nous savons la diagnostiquer très simplement. Des interventions pourraient la corriger et cela aurait un impact majeur, notamment sur la prévalence du diabète de type 2.



## Chronic diseases are frequent and costly

type 2 diabetes	prevalence	cost
France	4,4%	12 billion €
UK	6,0%	10 billion £



Bach JF, N Eng J Med 2002

Seven of the top 10 causes of death in 2010 were chronic diseases. Heart disease and cancer accounted for nearly 48% of deaths in the US

Could they be retarded by systematic analysis and treatment of microbiota (risk detection & alleviation)?

January 2018

Retarder l'apparition de ces maladies par analyse et traitement du microbiote est notre objectif.

Dans le cadre de MetaGenoPolis, à Jouy-en-Josas, nous travaillons avec un démonstrateur préindustriel. Nous avons un financement de 19 M€ pour 2012-2019. Cette période vient d'être prolongée de 5 ans, sans financement supplémentaire.

La structure de MetaGenoPolis est une plateforme de traitement des échantillons, de la génération de données et de leur interprétation.

Nous avons aussi une plateforme fonctionnelle dont la structure a été conçue par trois fondateurs : INRA, ICAN, Université Catholique de Lyon qui nous aide à agir en respectant la dignité humaine. Nous nous sommes adossés au laboratoire expérimental MICALIS. Cela fonctionne relativement bien.

Outre nos recherches académiques, nous allons aussi démarrer ENTEROME, la première société de microbiote dans le monde.

Il me reste à remercier beaucoup de collaborateurs en particulier du projet Micro-Obèse avec Karine CLÉMENT, ainsi que toutes les personnes qui travaillent avec moi à MetaGenoPolis, dont la moitié sont des informaticiens.

Merci beaucoup et occupez-vous bien de votre microbiote !

*(Applaudissements)*

**Jean-François BACH** - Vous avez expliqué comment chaque individu est caractérisé par son microbiote intestinal. Vous avez même parlé d'entérotype. Quels sont les facteurs qui conditionnent la composition du microbiote d'un individu ? Quelle est l'influence du régime alimentaire. Pascale COSSART rappelait dans son introduction le rôle des traitements antibiotiques. Quel est le rôle de la colonisation initiale et quel est le rôle de la génétique ? Que savons-nous sur le contrôle génétique de la composition du microbiote ?

**Stanislav Dusko EHRlich** - Nous avons tant de choses encore à découvrir ! Il y a des pistes mais il nous manque une vision globale des facteurs qui auraient pu induire cette altération du microbiote, cette perte de la richesse sur laquelle j'ai insisté.

Un de mes collègues met en cause des traitements répétés par les antibiotiques. C'est tout à fait possible.

D'autres considèrent la naissance par césarienne, dont le nombre devient très important dans bien des pays : 80 % dans certaines régions en Chine ou au Brésil.

L'hygiène excessive pourrait être un facteur, mais ce n'est pas à vous que je peux l'apprendre.

Quant aux facteurs génétiques, je dirai, comme mes collègues anglophones, « *the jury is still out* ». Les études chez les jumeaux montrent qu'il y a un impact, mais il n'est pas très grand. Il y a peut-être un certain nombre d'espèces qui sont impactées.

Le facteur principal à mon avis, sans éliminer ces différentes contributions, serait l'alimentation. Nous mangeons différemment et cela pourrait être une raison majeure.

**Yasmine BELKAID** - Je travaille sur la relation entre le microbiote et les infections. Ce sont des éléments très perturbateurs qui peuvent avoir des conséquences à long terme. C'est un point supplémentaire à ajouter à la longue liste déjà citée.

**Yves AGID** - Merci beaucoup pour les travaux que vous nous avez présentés, ils sont souvent très corrélatifs. Le microbiote peut jouer un rôle dans l'apparition des maladies et l'inverse est possible. J'imagine qu'il y a beaucoup de travaux expérimentaux pour essayer de changer des communautés bactériennes dans l'intestin et examiner leur incidence sur certaines maladies.

**Stanislav Dusko EHRlich** - J'ai juste présenté une liste des différentes approches qui vont de l'intervention nutritionnelle jusqu'à la transplantation fécale.

Il y a d'autres tentatives, comme les prébiotiques, à savoir les fibres qui sont supposées stimuler le microbiote. Cela peut fonctionner. Il y a des interventions avec des probiotiques. C'est intermédiaire entre la transplantation de tout un microbiote et une intervention avec une ou deux espèces.

Nous ne connaissons pas encore les règles pour intervenir d'une façon tout à fait rationnelle.

Lors d'une transplantation fécale, si les changements sont bénéfiques, C'est que le microbiote joue un rôle. Pour le moment, nous n'avons pas encore compris les règles. Les communautés sont complexes. Comment savoir s'il faut favoriser l'une ou l'autre ? Un travail expérimental est nécessaire, en espérant comprendre...

**Maxime SCHWARTZ** - Vous avez dit qu'un quart des personnes en bonne santé avait un microbiote appauvri. Un suivi est-il fait sur ces personnes pour examiner l'incidence sur des pathologies éventuelles par la suite ?

**Stanislav Dusko EHRlich** - La découverte date de 2012, c'est une cohorte relativement petite. Nous avons examiné ces individus 5 ans après, il y a en effet plus de diabète de type 2. A ce stade cela n'a pas de signification statistique. Nous constatons cependant une insulino-résistance.

L'étude des maladies chroniques prend plus de temps et nécessite beaucoup de personnes. Il faut des études longitudinales à une échelle suffisante.

**Jean-François BACH** - Sur ce sujet, des études remarquables sont faites, notamment chez les patients ayant des antécédents de diabète de type 1, avec le suivi de cohorte dès la naissance. Une étude finlandaise a été récemment publiée : ils ont pu suivre tous les trois mois sur plusieurs années des enfants qui avaient un risque de diabète.

**Pascale COSSART** - Quand vous extrayez l'ADN, vous avez aussi des virus, des amibes, quelle en sont les proportions ?

**Stanislav Dusko EHRlich** - Pour l'analyse phylogénique des bactéries du microbiote, c'est l'ARN de la petite sous unité du ribosome bactérien 16S qui a été utilisée, c'est donc plus de 99 % de bactéries que nous détectons. Il y a un peu de virus, qui sont le plus souvent macrophages. Par métagénomique globale (*shotgun*). Nous détectons aussi des petits mondes. Ce n'est pas facile. Il faudrait une profondeur plus grande.

En collaboration avec le King's College, nous venons d'établir un catalogue dans lequel il devrait y avoir des champignons. En fait, après alignement sur les génomes connus, nous en voyons très peu.

Nos méthodes ne sont peut-être pas optimisées pour détecter les champignons. Nous travaillons pour écarter cette hypothèse. Il y a certainement tout un petit monde qui nous échappe. La profondeur de nos analyses n'est pas suffisante.

**Pascale COSSART** - Quand il est dit qu'une seule espèce de bactérie va jouer un rôle, nous pouvons tout à fait imaginer qu'un microbe mineur, qui n'est pas une bactérie, pourrait avoir un rôle très important.

**Stanislav Dusko EHRLICH** - Une personne demandait : combien de divisions ? C'est un commentaire de bon sens. Certes, même une toute petite quantité de ces bactéries peut produire des substances qui ont une activité extraordinaire. Pour le moment, nous sommes plutôt avec les grosses divisions.

**Pierre CORVOL** - La prématurité peut-elle altérer la richesse du microbiote ? En France il y a une étude remarquable sur une cohorte, Epipage, qui montre qu'elle entraîne souvent une insulino-résistance altérée à l'âge adulte. Y a-t-il aussi une relation éventuelle avec le microbiote ?

**Stanislav Dusko EHRLICH** - Il faudrait regarder, mais je n'ai pas de réponse. Si nous comparions les enfants nourris au sein et au biberon, il y aurait certainement des différences.

*(Applaudissements)*



*Karine CLÉMENT*

*MD, PhD - Hôpital Pitié Salpêtrière, ICAN, Sorbonne Université / Inserm*

**Dr Jean-Pierre DÉCOR** - Vous êtes professeur de nutrition à l'université Pierre et Marie CURIE. Vous avez contribué à la création de l'Institut de Cardio-métabolisme et Nutrition (ICAN) à l'hôpital Pitié Salpêtrière.

ICAN est partie prenante d'un grand programme européen, MetaCardis, concernant les gènes de la flore intestinale. Par leur activité enzymatique, non codée dans notre génome, ces bactéries extraient l'énergie provenant de notre alimentation et synthétisent des molécules indispensables à notre santé.

Quel est le rôle particulier des bactéries du microbiote sur notre métabolisme et quelles sont les corrélations que nous pouvons établir avec notre santé, de son déséquilibre, de sa perte de diversité ?

**Karine CLÉMENT** - Merci beaucoup, Monsieur DECOR ainsi que le comité scientifique pour cette invitation. A l'Institut de Cardio-métabolisme et Nutrition, j'ai contribué à sa création et désormais, je me reconcentre sur les aspects scientifiques.

Je vous propose de revoir le microbiote dans le contexte de l'obésité avec les risques associés. Je suis médecin ; voir des patients obèses est un sujet sensible. En médecine nous sommes assez démunis, pour la prise en charge des obésités. J'insiste sur le pluriel.

Les maladies cardio-métaboliques sont extrêmement liées et associées. À peu près tous les 2 ou 3 ans, l'Organisation Mondiale de la Santé publie des chiffres. Le trio de tête pour ces pathologies communes dites non transmissibles concerne les maladies cardiovasculaires, les cancers et les maladies respiratoires.

Le diabète est aussi un élément important. Bien que l'obésité soit considérée depuis plus de 20 ans comme une maladie par l'Organisation Mondiale de la Santé, elle apparaît souvent comme un facteur de risque. Je vais essayer de vous convaincre qu'elle est réellement une maladie complexe.

Elle a progressé dans le Monde, à la fois dans les pays industrialisés, mais également dans ceux en voie de développement. Dans ces pays, nous assistons à une transition d'un état de dénutrition et de maladies infectieuses vers des pathologies métaboliques.

La tendance partout dans le Monde, y compris dans les pays en voie de développement, est la progression des formes extrêmement sévères d'obésités : plus de 2 % des hommes et 5 % des femmes dans le monde.



## Progression of severe obesity?

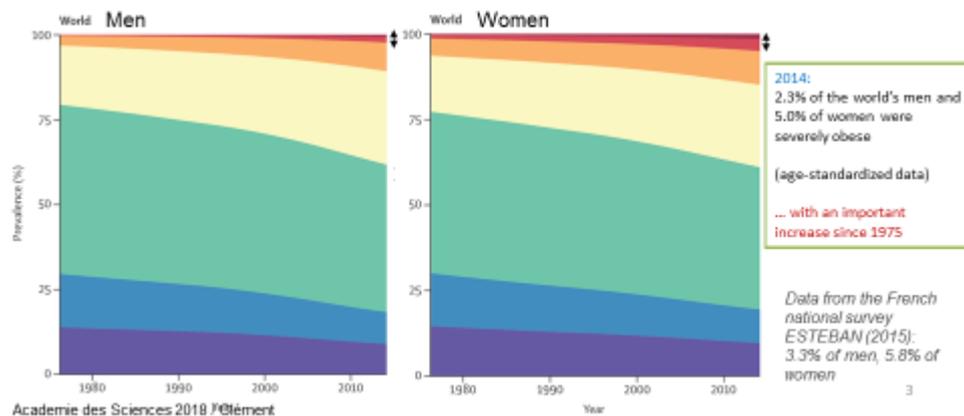
### obesity epidemiology:

Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants

BMI (kg/m<sup>2</sup>)



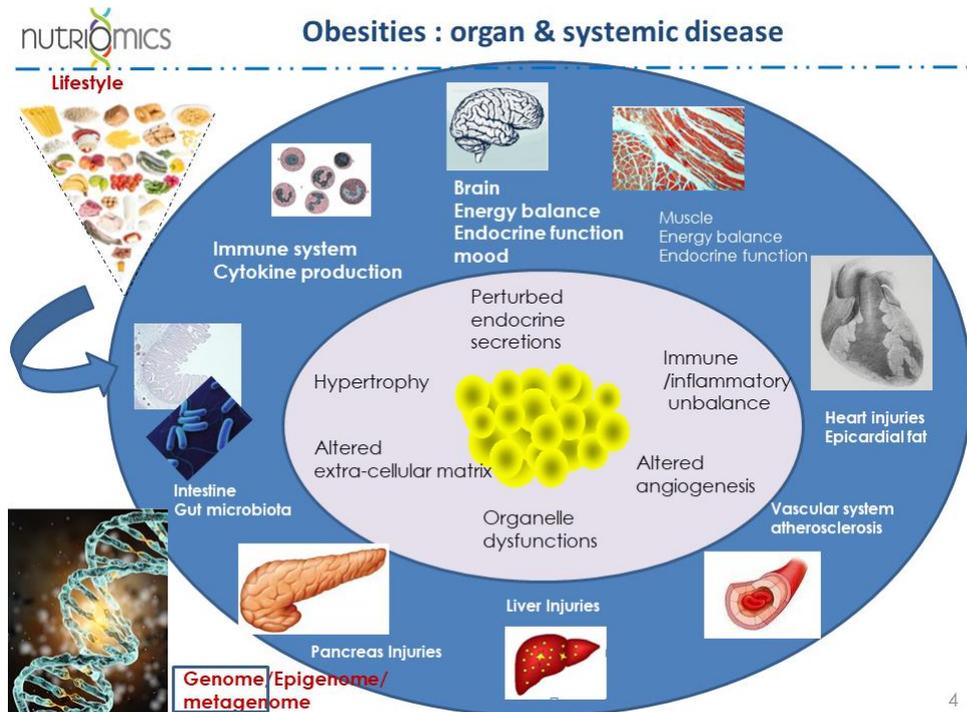
Lancet 2016; 387: 1377-96 NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)\*



L'obésité est une augmentation de la masse grasse, du tissu adipeux, s'accompagnant généralement de conséquences sur la santé.

Un des grands progrès ces 20 dernières années a été de montrer qu'il existe une pathologie d'organes et de la relation entre ces organes. L'augmentation de la masse grasse, de la taille des adipocytes, va être associée à des perturbations immunitaires extrêmement importantes, des modifications des vaisseaux, des organelles, de la matrice extracellulaire dans le tissu adipeux.

Tout cela va perturber considérablement les signaux et les sécrétions hormonales, en particulier les dialogues avec les autres tissus ou organes comme le cerveau, mais également les muscles, le foie, les systèmes immunitaire et vasculaire.



Nous pouvons nous étonner que, pendant de très nombreuses années, les personnes qui s'intéressent à ces aspects, et en particulier au métabolisme, aient négligé le système intestinal et le microbiote.

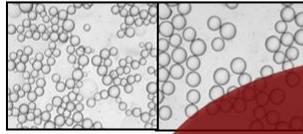
Cette prise de masse grasse dépend d'un certain nombre de facteurs et en particulier des aspects génomiques.

Le tissu adipeux des personnes obèses, outre les adipocytes, présente des modifications de cellules inflammatoires macrophages et lymphocytes.

Tout cela est associé à des changements de matrice extracellulaire avec de la fibrose dans le foie et le tissu adipeux. Nous avons montré qu'il existe des problèmes de balance entre ces pro-géniteurs qui vont soit aller vers la voie de la différenciation adipocytaire soit vers la fibrose. Certains ont des récepteurs au TLR 4 et pourraient donc être stimulés par des produits dérivés des bactéries.

Quand le microbiote est évoqué, on parle souvent des phénomènes immuno-inflammatoires. Dans ce domaine, l'inflammation est probablement extrêmement importante.

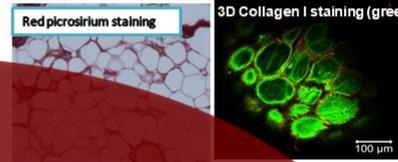
Adipocyte hypertrophy



Lean

Obese

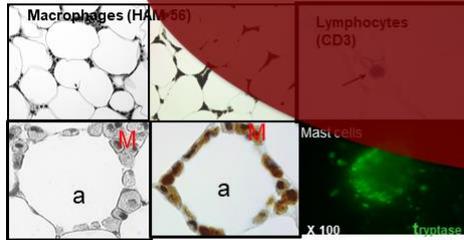
Fibrosis (pericellular)



Divoux, Diabetes 2010

Pellegrinelli, U872

Inflammatory cell accumulation

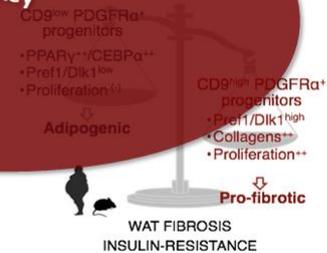


Macrophage (M) accumulation Other immune cells  
Cancello, Tordjman, Diabetes 2010 U872

Liu, Divoux Nature Medicine, 2009

Inflammation is key

Profibrotic Progenitors



Marcelin et al, Cell Metabolism, 2017

Il existe un cycle naturel du développement de l'obésité : Une situation préclinique à la prise de poids. Communément, les personnes disent : « Je prends du poids. Ensuite, j'essaie d'en perdre puis c'est difficile. Au bout d'un moment, le phénomène se chronicise ».

Ce qui caractérise l'obésité chronicisée est le fait que ces personnes, malgré des interventions répétées, ont une difficulté à perdre du poids et une facilité accrue à la reprise.

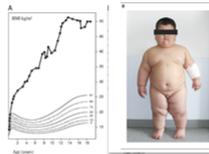
Il y a des choses que nous ne comprenons pas sur cette dysfonction du bilan énergétique. Nous sommes en face de différents patients avec des différentes trajectoires cliniques.

Dans l'approche génétique de l'obésité certaines voies biologiques ont été identifiées dans des formes rares : un lien entre les tissus adipeux et des cibles cérébrales via les mélanocortines

Quand cette voie est stimulée, cela contribue à baisser la prise alimentaire. Il existe des situations cliniques caractérisées par une prise de poids exponentielle extrêmement tôt dans la vie. Ce sont des obésités graves. Aujourd'hui, après 20 ans de recherche, nous pouvons soigner ces enfants qui ont des anomalies en aval de la voie leptine, du récepteur et de la voie mélanocortine (MC4R)

**MC4R et MC3R**

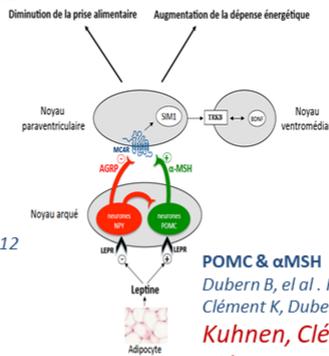
Vaisse C, Clement K, *Nature Genetics* 1998  
 Dubern B, Clément K *J Pediatr*, 2001  
 Lubrano-Berthelier C, Dubern B, *JCEM* 2006  
 Dubern B, *J Pediatr* 2007  
 Roubert P, Dubern B, *J Endocrinol* 2010  
 Mencarelli, Dubern, *Hum Mol Genet* 2011  
 Valette M, Poitou C, *Plos one* 2012  
 Collet, Dubern, *Mol Metab* 2017



**Severe early-onset obesity  
 Hyperphagia  
 +/- endocrine /  
 Neurodevelopmental abnormalities**

**LEPR**

Clément K, *Nature*. 1998  
 Lahlou N, Clement K, *Diabetes*. 2000  
 Rolland V, Clément K, *Obes Res*.  
 Le Beyec J, *JCEM*. 2013  
 Nizard, Dommergue, Clement *NEJM*, 2012  
 Huvenne H, et al, *JCEM*, 2015



**Prader-Willi Syndrome**  
 Lloret-Linares C, *IJO* 2013  
 Coupaye M, *JCEM* 2013  
 Lacroix D, *JCEM* 2015  
 Coupaye M, 2016  
 Burnett LC, *JCI* 2017

**POMC & αMSH**

Dubern B, et al. *Pediatr Res*. 2008  
 Clément K, Dubern B, ET AL.. *JCEM* 2008.  
 Kuhnen, Clément et al, *NEJM*, 2016  
 Clément et al, in revision 2018

**New therapies (agonists MC4R)**

*Deep phenotypes, New genes*

Academie des Sciences 2018 / Clément

Nous sommes dans une situation rare d'obésité monogénique mais qui n'explique pas l'obésité plus commune.

Si finalement l'obésité est une maladie de l'adaptation dans un contexte de perturbation du bilan énergétique, ne faut-il pas rechercher des racines qui peuvent être identifiées dans des gènes, des protéines, des métabolites sensibles aux variations de l'état nutritionnel ?

Dans ce cas un nouvel acteur sur la scène est bien sûr le microbiote intestinal.

**Le microbiote contribue-t-il réellement au mécanisme de l'expansion du tissu adipeux, à cette difficulté accrue à la perte de poids, au développement des comorbidités ? Dans le futur, pourra-t-on avoir des actions ciblées qui permettraient d'améliorer les choses chez ces patients ?**

Aujourd'hui, nous sommes en face d'un grand nombre d'informations qui viennent de variables cliniques, génomiques fonctionnelles et de « omics » comme décliné par Pascale COSSART tout à l'heure dans l'introduction.

Nous sommes également en face de changements sociétaux extrêmement nombreux. Certains sont résumés dans le tableau suivant Nous avons évoqué, lors de la discussion précédente, l'infection, les toxiques, l'urbanisation, les changements alimentaires et d'activité physique, cela dans un contexte de vie moderne et de stress psychologique.



Academie des Sciences 2018 / Clément

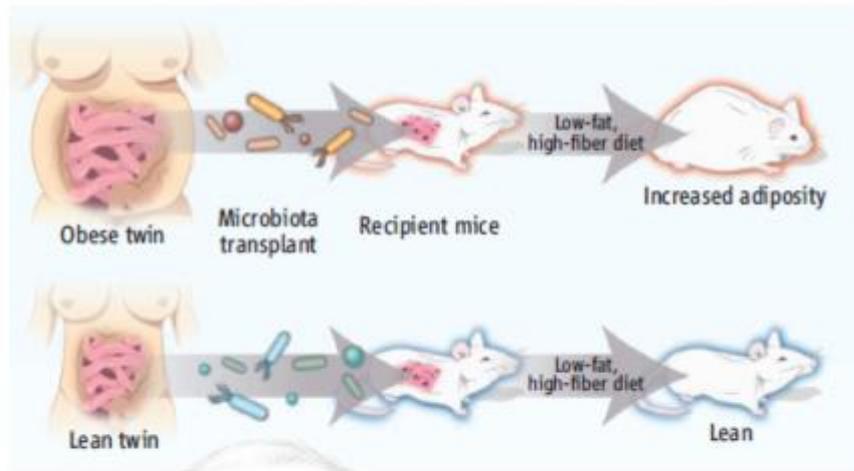
Nous avons mentionné l'importance de la littérature dans ce domaine. Nous avons l'impression que chacun de ces composants peut en soi agir sur le microbiote.

Ces nombreux facteurs environnementaux agissent sur notre biologie, et potentiellement sur ces pathologies d'organes. Nous pouvons voir le microbiote intestinal comme un lien entre ces effets.

Il y a maintenant près d'une dizaine d'années, que le groupe de Jeff GORDON a montré son importance. Il s'agissait dans ce travail de transférer du microbiote de jumeaux, dont l'un des deux est obèse, chez des souris sans germe. Il y a eu une prise de poids accrue chez les souris qui ont reçu celui du jumeau obèse.

En fait on ne transfère pas l'obésité mais seulement une susceptibilité à la prise de poids : une aggravation métabolique cela dans un contexte où les animaux sont nourris avec un régime pauvre en graisse et riche en fibres.

Protective role of gut microbiota from lean donor in presence of healthy diet, Protection lost with unhealthy diet



Is obesity/diabetes a non communicable ?

Académie des Sciences 2018 / Clément

Ridaura et al. Science 2013; Walker and Parkhill. Science 2013

Les concepts ont évolué concernant les phénomènes immuno-inflammatoires tissulaires. L'équipe de Patrice CANI a bien montré l'importance de l'alimentation sur les modifications immuno-inflammatoires permettant le passage de lipopolysaccharides (produit des membranes bactériennes). Ils vont aller activer les cellules immunitaires circulantes et pouvoir ainsi s'infiltrer dans certains tissus, comme le tissu adipeux.

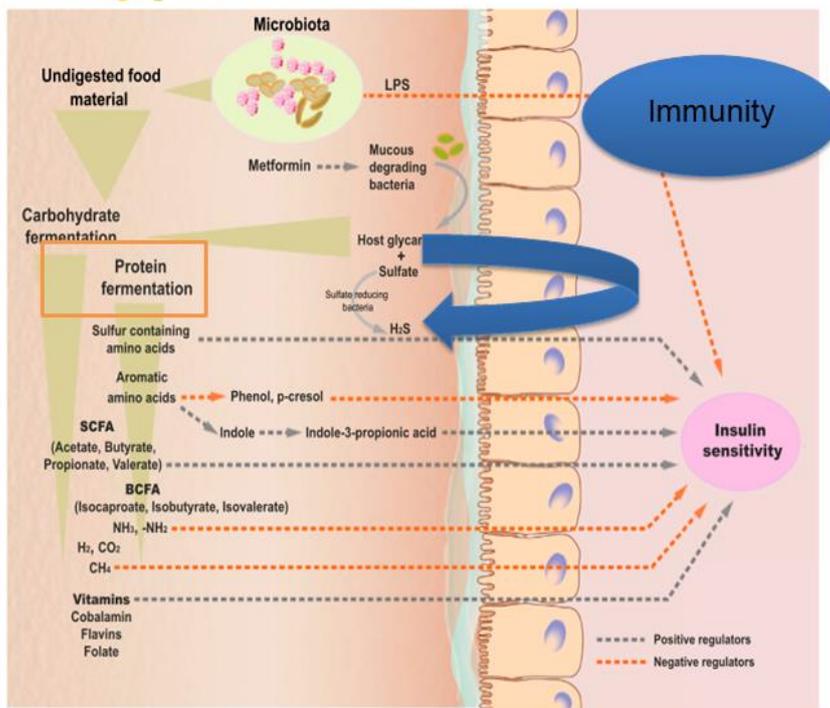
On parle d'intestin dont la perméabilité est augmentée. Toutefois ces travaux reposent sur les modèles animaux. Aujourd'hui, il existe finalement peu de preuves dans le domaine de l'obésité d'un intestin hyper-perméable. Il y a des enjeux méthodologiques pour identifier ces changements de perméabilité et aussi les marqueurs circulants de ces changements.

Beaucoup de ces réactions métaboliques sont associées à des molécules chimiques produites par les bactéries du microbiote : les acides gras à chaîne courte associés à la sensibilité à l'insuline et les aspects anti-inflammatoires, les acides aminés branchés à l'insulino-résistance et le triméthylamine-N-oxyde.

Il existe aujourd'hui beaucoup de travaux qui visent à caractériser ces produits dérivés du microbiote, agissant sur un certain nombre de récepteurs et qui peuvent avoir des actions métaboliques.

L'alimentation est le paramètre important. C'est probablement un domaine de recherche à développer mais c'est extrêmement difficile de caractériser la nutrition des populations.

Les produits de ces réactions chimiques issues de la nutrition vont être fermentés dans le colon. Il existe la fermentation des hydrates de carbone, des changements lipidiques, des fermentations protéiques.



Intestinal barrier

Diet matters

Host metabolism & Inflammation matter

Adapted from Khan MT, et al, Cell Metab 2014

Academie des Sciences 2018 / Clément

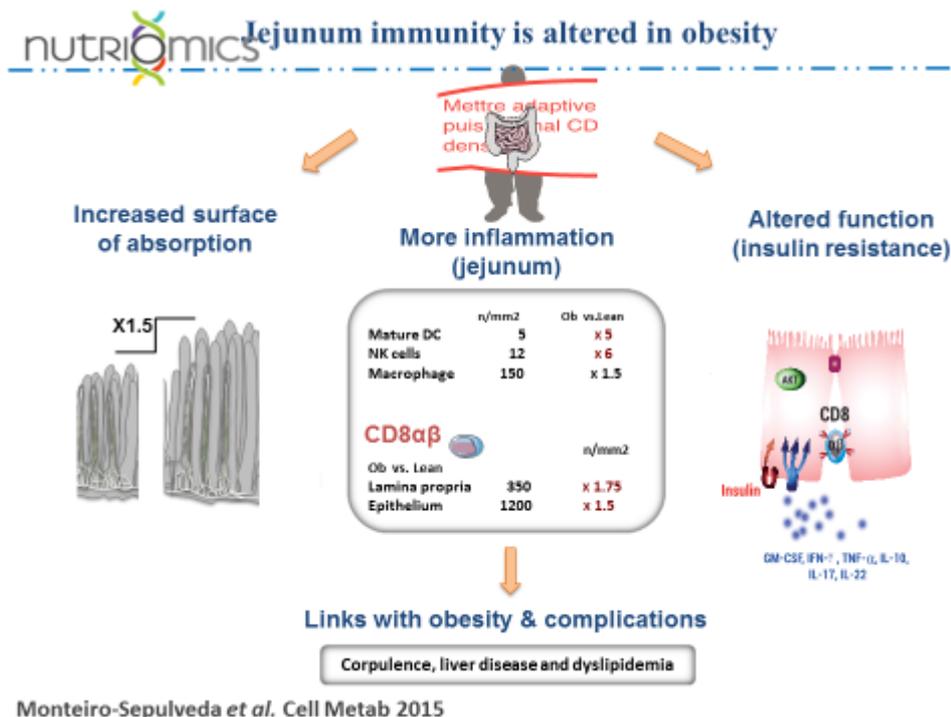
En fait, il va y avoir production d'un certain nombre de métabolites qui peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur la sensibilité à l'insuline. Au niveau de la barrière intestinale, il existe également des changements immunitaires extrêmement importants.

L'interaction entre les changements alimentaires, les processus biochimiques et l'inflammation nécessite d'être regardée de plus près chez l'homme.

Pour cela, nous avons réalisé une expérience à partir de morceaux de jéjunum intestinal humain. Il s'agit de patients obèses opérés en chirurgie bariatrique, de type bypass. Nous avons réalisé l'étude de leur épithélium intestinal et également de la *Lamina propria*.

Par rapport à des sujets non obèses, ces patients ont une augmentation de la surface d'absorption de leur intestin, mais également des changements de cellules immunitaires, de l'immunité innée ou adaptative, avec un phénotype assez caractéristique. Le jéjunum des personnes obèses présente une accumulation de lymphocytes CD8αβ au niveau de l'épithélium.

La *Lamina propria* de ces personnes est perturbée à la réponse à l'insuline.



Lors de pathologies d'organes, tissu adipeux, foie, mais également cerveau Stanislav Dusko EHRlich a montré des modifications de la composition du microbiote, de sa richesse et le rôle de certains groupes bactériens spécifiques. La production des métabolites bactériens et certains composants peuvent donc être liés à la nature des bactéries, qu'il s'agisse des LPS ou de composants membranaires. Ces modifications de métabolites ont certainement un lien avec les perturbations immuno-inflammatoires et également les changements métaboliques.

Si nous admettons que le microbiote est important pour le développement de ces maladies métaboliques, **comment agir sur le microbiote, chez quel type de patient, pour quel objectif et à quel stade ?**

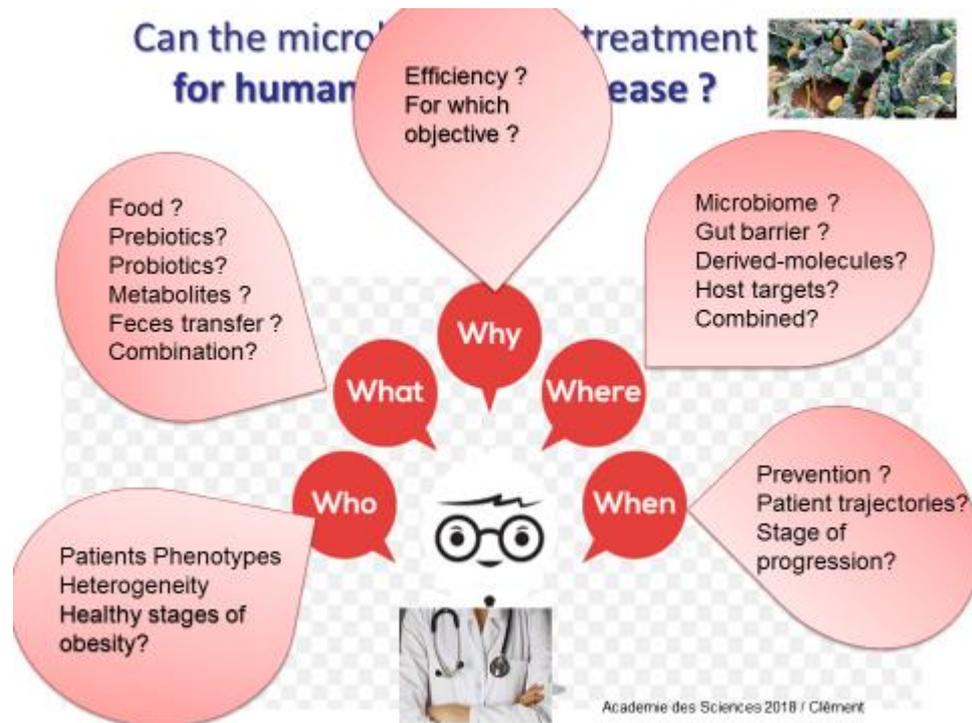
Nous avons aujourd'hui beaucoup d'options, alimentaire, les probiotiques avec des actions sur certains métabolites bactériens et le transfert fécal, mais finalement peu ont réellement démontré leur efficacité.

Beaucoup d'informations sont disponibles sur les modèles animaux, les souris, mais nous manquons de preuves d'efficacité sur les maladies métaboliques en particulier pour les probiotiques. Beaucoup de travail reste à faire avec des études bien conduites.

Doit-on agir sur le microbiote directement ou la barrière intestinale ? Concernant la perméabilité, il y a peu d'informations : peut-on envisager des stratégies combinées ? Quand et à quel moment intervenir sur la trajectoire des patients ?

Face à un patient, nous sommes en présence d'une personne avec différents modes de vie, d'habitudes alimentaires, d'activité physique. Il y a des facteurs inhérents

à sa condition : la génétique, l'âge, le sexe, des pathologies, des complications associées à l'obésité et son microbiote.



Nous voudrions agir sur les modulations pondérales en changeant la diversité ou l'abondance de certains microbes. Aujourd'hui, nous sommes au stade des effets espérés, mais pas encore démontrés d'un point de vue scientifique, en particulier sur l'amélioration métabolique, la sensibilité à l'insuline ou la modulation immuno-inflammatoire.

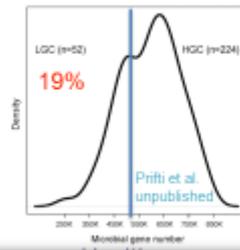
Pour définir l'obésité on utilise l'index de masse corporelle, le rapport entre poids sur la taille au carré. C'est probablement un critère non optimal. Il ne rend pas compte du changement de la distribution des graisses ni des pathologies d'organes. Pour certains patients, il existe une inflammation et de la fibrose du tissu adipeux. Avec le même index d'autres n'ont pas ces effets. Il en est de même pour les réponses à la même intervention diététique ou aux médicaments.

Si nous admettons que l'étude du microbiote peut aider à la stratification de ces phénotypes, il reste à définir pour quels traitements ciblés ?

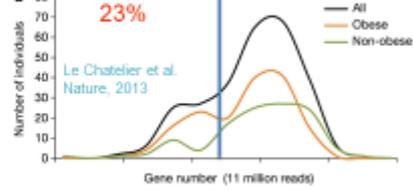
Stanislav Dusko EHRlich a montré tout à l'heure que la perte de richesse retrouvée chez des patients en surpoids ou obèses est associée à un basculement de certains groupes bactériens avec un enrichissement d'espèces aux propriétés pro-inflammatoires et une perte d'autres anti-inflammatoires.

Dans l'étude Micro-Obèse, ce sont 30 à 40 % des personnes en surpoids qui ont une perte de richesse et 75% des patients sévèrement obèses sont dans le groupe de faible diversité avec une profonde dysbiose. Il existe une augmentation de la prévalence de la faible richesse avec la sévérité de l'obésité.

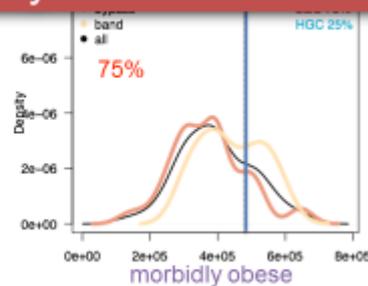
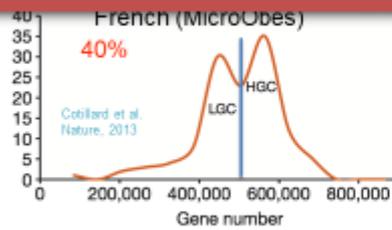
Healthy (NTR)



Overweight/obese Danish (MetaHIT)



LGC prevalence increases with obesity severity



Académie des Sciences 2018 / Clément

2  
1

En comparant ces patients sévèrement obèses à des personnes moins obèses, nous retrouvons une maladie métabolique plus sévère avec l'élévation des triglycérides, des paramètres liés à la résistance à l'insuline et également des modifications immuno-inflammatoires.

**nutriOMICS Microbial richness : A phenotype ?**

**METAHIT**  
292 subjects

**MicroObes**  
49 subjects

**nature**

LGC = Low gene count  
HGC = High gene count

**LGC: ↗ Pro-inflammatory**

- Cl. bolteae*
- Cl. symbiosum*
- Cl. clostridioforme*
- Cl. ramosum*
- R. gnovus*

**HGC: ↘ Anti-inflammatory**

- F. prausnitzii*
- R. inulinivorans*
- Co. eutactus*
- M. smithii*

**And healthier diet**

**LGC associates with CMD risks**

- ↑↑ dyslipidemia
- ↑ adiposity
- ↑ insulin resistance
- ↑ inflammation (circulating and adipose tissue)

Le Chatelier et al. Nature 2013  
Cotillard et al. Nature 2013  
Kong & Holmes et al. PLoS ONE, 2015

College de France 2018 / Clément

Ces personnes ont des formes d'obésité plus sévères avec des changements de la composition corporelle, une distribution des graisses au niveau abdominal associée à plus de diabète de type 2 et à de l'hypertension artérielle. Elles suivent également plus

de traitements médicaux. Nous pouvons d'ailleurs nous interroger sur l'effet de ces traitements sur les changements du microbiote.

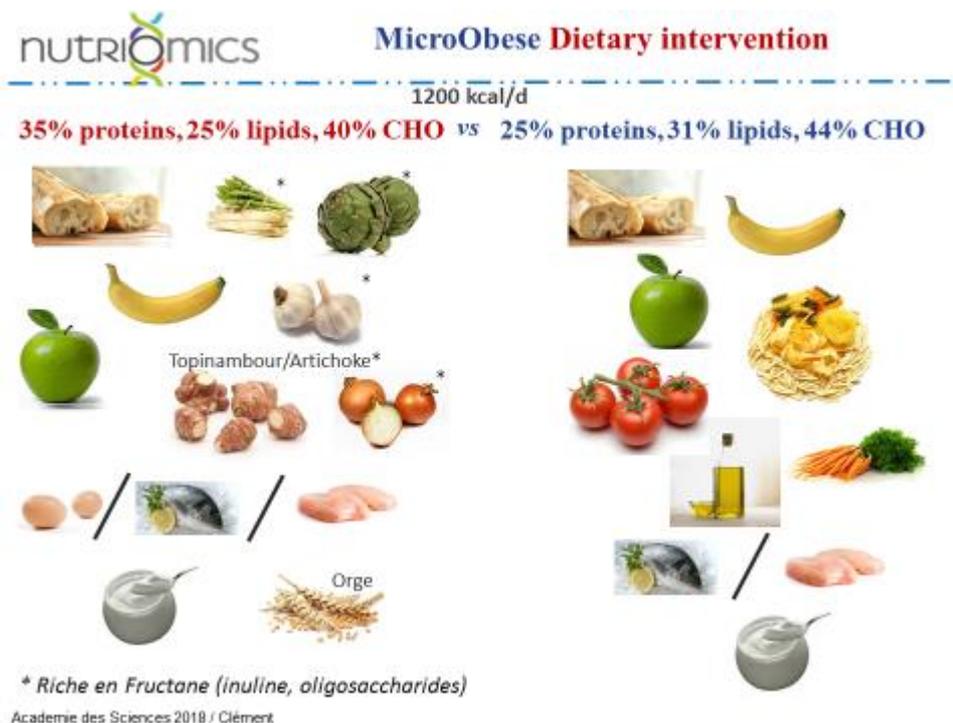
Pour agir sur ces pathologies, allons-nous cibler la perte de poids ? Je pense que les données sur le métabolisme énergétique et le microbiote aujourd'hui ne sont pas très convaincantes. Elles le sont plus pour les changements métaboliques du glucose et inflammatoires. Ces derniers sont probablement au cœur des complications associées à l'obésité qui sont extrêmement nombreuses comme les maladies cardiovasculaires, certains cancers et les maladies respiratoires.

La littérature mentionne de nombreux traitements médicaux. La Metformine, est la première ligne de traitement dans le diabète de type 2 avec certainement des effets sur le microbiote intestinal. Il avait été proposé que les modifications, notamment de la sensibilité à l'insuline, puissent aussi passer par des changements du microbiote. Je pense qu'il faut affiner ces travaux.

### **Dans les maladies métaboliques, pouvons-nous inverser le processus par un changement de microbiote ?**

Nous avons évoqué les interventions nutritionnelles. Il y a le développement de futurs probiotiques de troisième génération. Il y a aussi la chirurgie bariatrique.

Une intervention nutritionnelle avait été menée dans le cadre d'un programme soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche. Il s'agissait, dans notre centre, de proposer à des personnes en surpoids ou obèses une alimentation riche en fibres et en protéines avec un faible index glycémique, à savoir des glucides qui ne font pas élever d'une façon trop importante les glycémies. C'est une intervention de six semaines et il y avait une phase de stabilisation de six semaines.



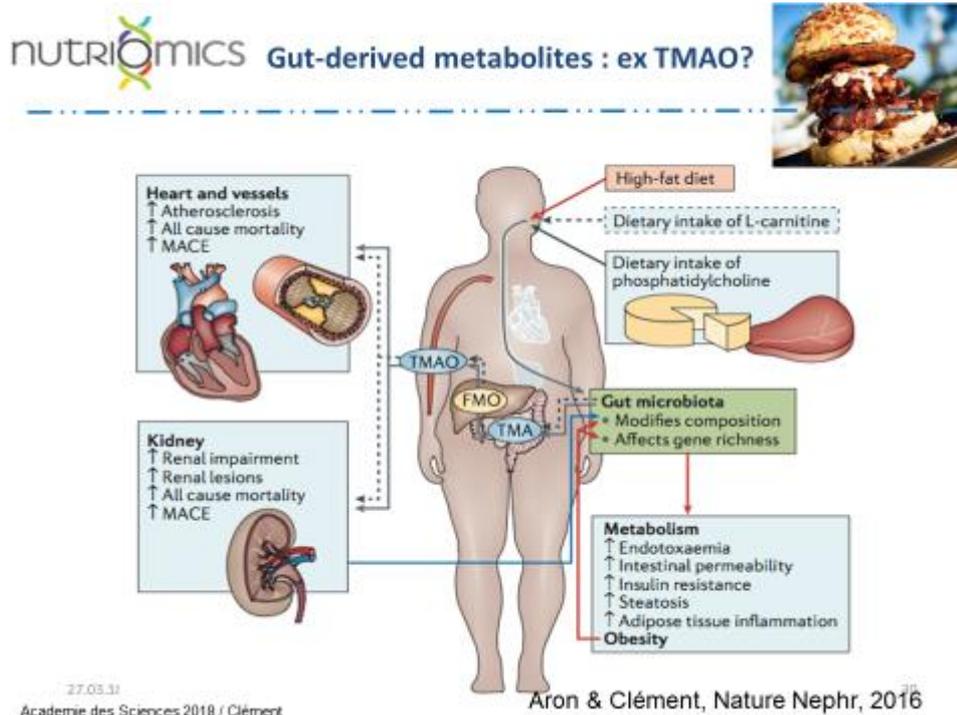
Les personnes qui avaient une faible richesse ont eu une élévation de 30 % de leur comptage de gènes, mais ce n'était pas suffisant pour atteindre le niveau des personnes à forte richesse bactérienne.

L'amélioration de leurs paramètres lors de l'intervention, la réponse à l'insuline, les taux de triglycérides ou l'inflammation bas grade n'était pas suffisante. Il restait un gap pour atteindre le profil des personnes avec un fort comptage de gènes.

D'un point de vue nutritionnel, ces personnes venaient pour perdre du poids, et nous leur proposons plus de protéines, certes moins de lipides, mais aussi des aliments riches en fructane, en inuline et en oligosaccharides, qui sont des prébiotiques.

Dans cette étude, il a été montré que l'augmentation des prébiotiques agissait sur la diversité du microbiote avec, en particulier, la production de certains acides gras.

Les métabolites ont un rôle important. Par exemple, une alimentation carnée fait consommer beaucoup de L-carnitine. Les bactéries vont la transformer en triméthylamine (TMA), un gaz qui va dans le foie, avec une enzyme appelée la FMO, être oxydé en triméthylamine oxyde (TMAO). L'équipe de Stanley HAZEN a montré que l'élévation du TMAO intervient dans le développement de l'athérosclérose et de maladie rénale.



Il reste, toutefois de nombreuses questions sur les mécanismes et également sur les modes de consommation alimentaire car ces résultats n'ont pas toujours été retrouvés en Europe.

Une étude d'intervention chez des personnes végan, qui ne consomment aucuns produits animaux, ne décèle pas d'élévation du TMAO.

Cet exemple confirme les liens entre l'alimentation et les changements du microbiote.

Concernant les probiotiques de troisième génération, *Akkermansia Muciniphila* est en cours d'expérimentation. C'est une verrucomicrobactérie située dans le mucus. L'équipe de Patrice CANI avait montré son importance dans l'homéostasie du glucose et dans la barrière intestinale. Chez les animaux, *Akkermansia Muciniphila* entraîne une diminution de la masse grasse, de la glycémie et des lipopolysaccharides.

Il a également été montré qu'une protéine membranaire issue de cette bactérie pouvait récapituler certains effets de la bactérie vivante.

Chez l'homme, avec Patrice CANI, nous avons identifié *Akkermansia Muciniphila* comme un facteur associé au profil métabolique.

Dans l'étude Micro-obèse, il existe des personnes avec différents taux d'*Akkermansia Muciniphila*. Celles qui ont un taux élevé ont plutôt un meilleur profil métabolique avec une diminution de leur tour de taille, associée à la graisse viscérale, une amélioration du bilan hépatique, des gamma-GT et une meilleure tolérance au glucose.

Il y a donc une relation entre *Akkermansia Muciniphila*, le taux de glucose, la sensibilité à l'insuline et la taille des adipocytes. C'est intéressant car les gros adipocytes sont plutôt pro-inflammatoires et métaboliquement peu actifs.

Des individus ont un taux élevé d'*Akkermansia Muciniphila*, d'autres un taux faible, certains ont une richesse bactérienne élevée et d'autres pauvre.

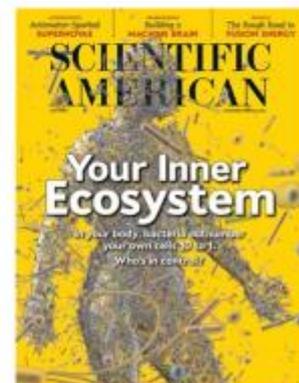
Dans un groupe de patients, on s'aperçoit cependant que ceux qui ont le meilleur profil métabolique caractérisé par une diminution de la graisse viscérale, une diminution du glucose et des triglycérides combinent beaucoup d'*Akkermansia Muciniphila* et un fort comptage de gènes (donc une plus grande richesse)



### **Is Akkermansia Muciniphila case : a candidate to improve metabolic health ?**

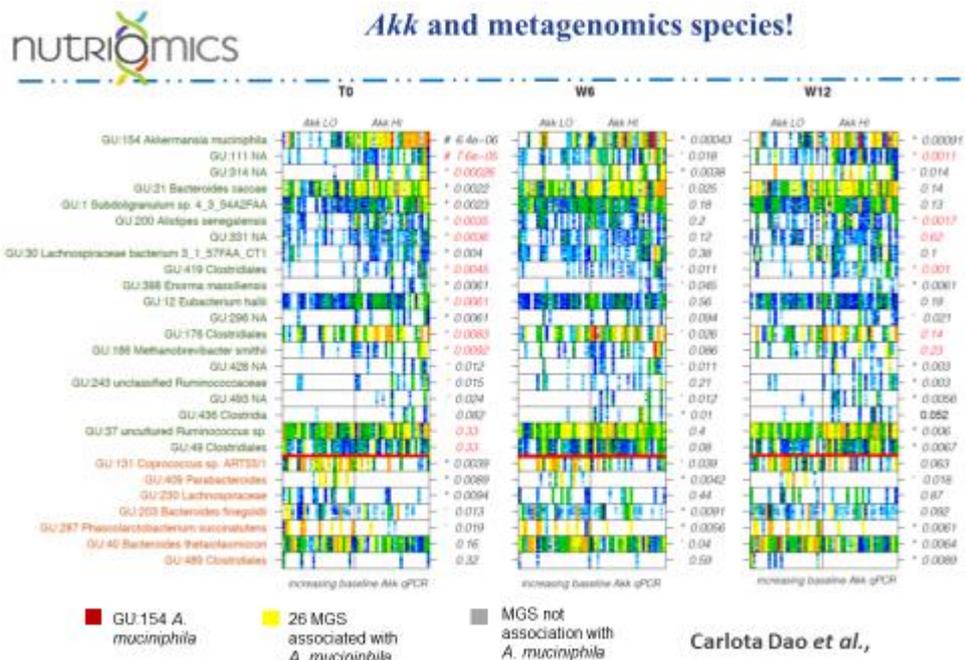
**Better Focus on ecosystem  
rather than one species?**

**Too follows...**



Académie des Sciences 2018 / Clément

Dans le futur pour certains probiotiques, il faudra considérer l'écosystème global. Dans le schéma suivant, selon la présentation de Dusko EHRlich, chaque ligne représente une espèce métagénomique et chaque colonne représente une personne. *Akkermansia* a d'autres espèces qui lui sont associées dans ces réseaux et cela persiste même lors de l'intervention nutritionnelle précédente.

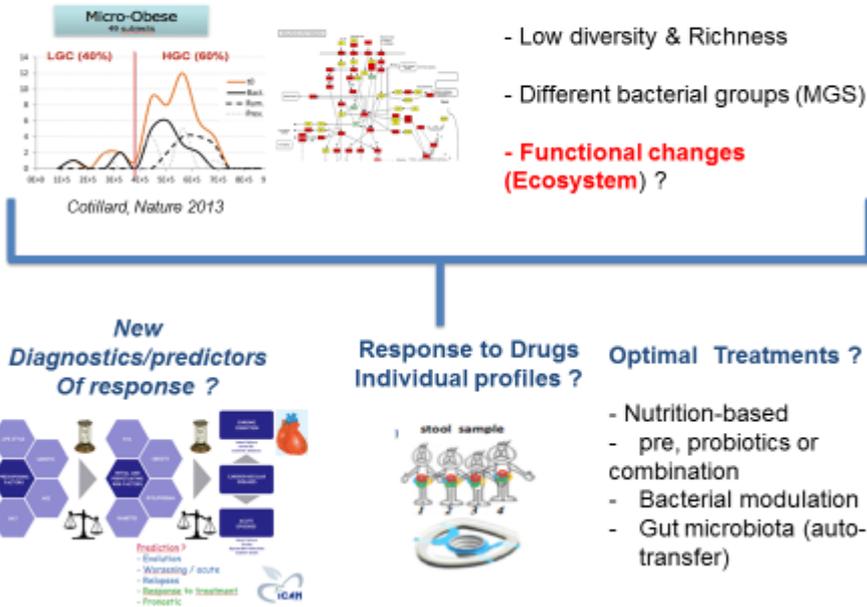


13 Firmicutes, 5 Bacteroidetes, 1 Actinobacteria and 1 Euryarchaeota

En d'autres termes, pour les développements des probiotiques de troisième génération, leur pertinence devra prendre en considération l'écosystème global des individus.

Peut-on envisager une nutrition dite de précision à partir de la richesse du microbiote, en certaines espèces spécifiques comme *Akkermansia Muciniphila* ou *Faecalibacterium prausnitzii* par exemple, des métabolites dérivés des bactéries et des facteurs environnementaux ?

Par la combinaison de données, en utilisant des méthodes mathématiques, on peut définir aujourd'hui des profils. Jens NIELSEN en Suède, en combinant la connaissance de l'alimentation et de la richesse du microbiote, a défini un profil encore plus précis des personnes qui avaient un faible comptage de gènes, par des changements très spécifiques de certains métabolites.

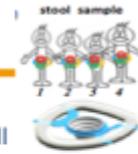


Par cette approche, on a pu moduler spécifiquement l'alimentation de ces personnes pour atteindre les niveaux de ceux qui ont un microbiote riche.

L'équipe israélienne a relié les données venant de l'alimentation et la réponse à la tolérance au glucose.

Nous pouvons aujourd'hui définir les enjeux de la diversité microbienne, le rôle de certains groupes, mais nous avons encore beaucoup de travail sur ces changements fonctionnels et un encore plus important pour la translation vers les malades, la réponse aux médicaments et pour le traitement optimal.

## Challenges toward the medicine of the future



- **Research challenges**
  - Understand dysbiosis and aggravation of dysbiosis (genes & overall ecosystem and functions?)
  - What are the consequences for disease progression & chronicisation?
  - Need models for data integration development (Tsunami of data)
  - Need accurate models for translation (relevance of mouse models?)
- **Challenge for the patients: Need for new nutrition-related treatment**
  - An obese person is not just fat or is not a overeating person
  - Diagnosis (progression, relapses, response to treatments)
  - Optimal treatment (lifestyle related, Functional food, efficient of prebiotics/fiber, probiotics, next probiotic generation, transfer of ecosystem (gut microbiota transfer?) **One size does not fit all++**)
  - Combination therapy (ex Fibers + probiotics+ Relevant Drugs on host) ?
- **Economic challenges**
  - Tools for Patients' stratification ( Needs for relevant Biomarkers)
  - Accurate predictors of disease progression
  - Development of Individualized intervention (Precision medicine in nutrition)
  - Challenge in educating doctors, their patients and the population

En conclusion, je voudrais remercier mon équipe et souligner le long partenariat fructueux avec Dusko EHRLICH et Joël DORÉ sur certains points que je vous ai présenté.

(Applaudissements.)

**Jean-Pierre DÉCOR** - N'y va-t-il pas une interchangeabilité fonctionnelle entre les espèces de bactéries ? Vous avez mis l'accent sur une bactérie spécifique *Akkermansia*. Mais n'y a-t-il pas pour le métabolisme une redondance ? Elle doit intervenir dans la richesse.

**Karine CLÉMENT** - Bien sûr. Il y a à la fois une redondance, mais les bactéries ont aussi des propriétés spécifiques que l'on observe avec l'étude de leur génome. Nous pouvons prendre l'exemple de la synthèse de certaines vitamines B. À travers l'étude de Metacardis, nous avons montré que plusieurs bactéries sont effectivement capables de synthétiser ces vitamines.

**Jean-Pierre DÉCOR** - Dans des classifications, on peut aller jusqu'à la souche ?

**Karine CLÉMENT** - J'aimerais poser la question à Dusko EHRLICH. J'ai compris des classifications que l'on peut avoir un certain degré de précision par les analyses mathématiques, mais qu'il subsiste encore de nombreuses inconnues et des systèmes non annotés.

**Dusko EHRLICH** - La méthodologie se place au niveau des souches. La plupart des équipes travaillent encore au niveau de l'espèce parce que c'est très informatif. Mais les outils peuvent être déployés aujourd'hui pour observer les souches assez dominantes, afin qu'elles soient bien caractérisées.

**Claude MONNERET** - Toutes vos méthodologies sont extrêmement séduisantes. Soigner, c'est bien, en tant que pharmacien, je ne vais pas dire le contraire, mais prévenir serait encore mieux.

Où l'on en est pour les sujets à risque ? Peut-on prévenir cette obésité ?

**Karine CLÉMENT** - Quand je vois des patients très obèses qui ont 75 % d'effondrement de leur microbiote, je ne suis pas certaine qu'agir sur le microbiote seul va être efficace. Nous l'avons un peu évoqué à travers la chirurgie bariatrique, il y a une restauration de la diversité, mais pas suffisante pour atteindre le niveau de ceux qui ont un microbiote riche.

Il faudrait prévenir en amont, mais la question est à quel moment de la progression de ces pathologies. Vous êtes pharmacien, vous connaissez la difficulté, à prédire le développement du diabète.

Avoir de larges cohortes pour l'étudier représente aussi des enjeux économiques. Mais vous avez raison, plus on intervient tôt dans la progression de ces maladies, plus on va décaler l'apparition des complications.

Je reprends l'exemple de la bariatrie, cas spécifique mais assez évocateur. Pendant des années, on a pensé que la chirurgie bariatrique allait guérir le diabète. On sait maintenant que l'on ne guérit pas le diabète mais que l'on décale la progression de la maladie. C'est quand même un enjeu important pour les malades.

**Jean-François BACH** - En tant qu'immunologiste, je suis perplexe devant cette montée de la littérature sur les anomalies immuno-inflammatoires dans l'obésité.

Pour quelle raison ces anomalies apparaissent et quelles sont leurs conséquences sur l'obésité ?

**Karine CLÉMENT** - C'est une question importante. Il faut distinguer les modèles animaux de la situation clinique.

Sur les modèles animaux, il a été proposé dans des études cinétiques que l'arrivée des lymphocytes, puis des macrophages, bref l'immuno-inflammation dans le tissu adipeux est un facteur précoce dans l'induction de la résistance à l'insuline.

Aujourd'hui, chez l'homme, nous n'avons pas de preuves de ces changements. Nous avons même plutôt des preuves inverses. En d'autres termes, on est capable d'induire une insulino-résistance sans changement immuno-inflammatoire dans le tissu adipeux en mettant des gens en suralimentation. En revanche, nous avons des éléments pour penser que cela contribue à la chronicité et au maintien de la pathologie d'organes au cours de la progression.

**Pierre CORVOL** - Dans les défis que vous notez, il y a le modèle de la souris. Ce n'est pas un très bon modèle, par exemple, dans le domaine cardio-vasculaire.

Dans votre recherche, que pourriez-vous imaginer ?

**Karine CLÉMENT** - Le modèle animal le plus utilisé sur l'induction de l'insulino-résistance, le C57 black 6, n'est sûrement pas le meilleur. Mais il y a une avancée majeure concernant l'influence de la température dans le domaine du

métabolisme. Nous avons étudié des souris pour le métabolisme énergétique à des températures d'animalerie de 23-24 degrés. A 30 degrés, cela change beaucoup de choses, en particulier sur les phénotypes liés à la prise de poids et à la résistance à l'insuline.

De la même façon, des études sur le transfert des microbiotes sont menées chez des animaux sans germe pour la plupart. Nous avons revu récemment la cinétique d'implantation après un transfert chez des animaux sans germe et chez des animaux après le sevrage. Les animaux sans germe ont une cinétique d'implantation extrêmement différente des animaux dits conventionnels.

On tire parfois des conclusions extrêmement rapides du transfert d'homme à souris après 2 semaines. À mon avis, il faut rester très prudent.

**Pascale COSSART** - Que sait-on du microbiote des singes ?

**Karine CLÉMENT** - Il n'y a pas de similarités très proches. Nous avons regardé différents types de singes. Les animaux ont des alimentations assez différentes de la nôtre et beaucoup des changements qui ont été observés sont liés au mode alimentaire.

**Ghenima CHOUBANE** - Quel est le rôle du stress et de l'âge ? En général, les syndromes métaboliques, les problèmes de poids surviennent avec l'âge. Modifie-t-il le microbiote ? A-t-on analysé l'impact du stress ?

**Karine CLÉMENT** - L'incidence de l'âge a été étudiée par un collègue d'Irlande. Il a étudié des personnes âgées placées dans des institutions en comparaison avec celles qui étaient restées chez elles. Il y a des modifications, en particulier sur la baisse de richesse qui est plus importante chez les gens qui vivent en institution. Il apparaît également des modifications de certaines entérobactéries.

Pour répondre de façon détournée, dans notre étude d'intervention nutritionnelle, nous étions capables, avant de démarrer, de regrouper les personnes par profil alimentaire. Il y avait des gens qui avaient plutôt un bon profil consommateurs de fruits et légumes, et les autres avec un plutôt mauvais.

Celles avec un bon profil étaient plus âgées. C'étaient des femmes d'une cinquantaine d'années. Les jeunes caractérisés par la consommation de sodas avaient un moins bon profil et une plus faible diversité. Le résultat est un peu biaisé car ces personnes sont suivies dans un centre hospitalier

L'autre point est le stress. Vous faites appel à la notion intestin-cerveau qui sera évoqué. L'intestin comporte de très nombreux neurones. On peut imaginer des relations par ce biais-là et les hormones.

Je vous ai montré sur le comportement alimentaire que certaines de ces voies sont très liées à la réponse au stress.

**Marc BONNEVILLE** - Vous évoquiez l'opportunité d'utiliser des probiotiques de troisième génération pour traiter l'obésité. Vous évoquiez également l'importance de prendre en compte le contexte, notamment la diversité du microbiote.

Comment peut-on anticiper l'efficacité d'un traitement par des probiotiques ? A-t-on des moyens de suivre l'efficacité de la colonisation du microbiote par ce probiotique et de corrélérer cette colonisation avec son efficacité ?

**Karine CLÉMENT** - Vous évoquez la troisième génération. Tout dépend de quel probiotique on parle. Une des difficultés d'*Akkermansia* est qu'il est localisé dans la partie haute de l'intestin. On peut examiner les selles, mais cela ne va pas refléter la réalité. De nouvelles technologies, par l'utilisation de capsules qui pourraient capter tout le long de l'intestin certains groupes bactériens sont en cours de mise au point.

Vous avez raison, l'enjeu de l'implantation, de la dose est clé. Si on regarde les méta-analyses sur les Lactobacille ou Bifidobacterium, les effets sont faibles, mais la combinaison marche probablement mieux qu'un probiotique tout seul.

Il existe 600 000 marques de probiotiques dans le monde. Il serait important de pouvoir suivre cette implantation et l'effet sur l'écosystème global. Certains des outils dont nous avons parlé peuvent être utilisés.

*(Applaudissements.)*



*Nadine CERF-BENSUSSAN*

*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

*Université Paris Descartes-Sorbonne*

**Jean-Pierre DÉCOR** - Madame Nadine CERF-BENSUSSAN, vous êtes Directeur de Recherches, responsable du laboratoire des interactions de l'épithélium intestinal et du système immunitaire de l'Institut des maladies génétiques IMAGINE.

Cette intervention, ainsi que la suivante de Mme BELKAID, vont nous expliciter le rôle inattendu et même l'importance du microbiote dans le fonctionnement de notre immunité en général.

De plus, l'homéostasie immunitaire intestinale est un phénomène paradoxal qui nécessite quelques explications.

**Nadine CERF-BENSUSSAN** - Je vous remercie très vivement de m'avoir invitée à participer à cette journée sur l'interaction entre l'hôte et le microbiote et plus particulièrement pour parler du système immunitaire.

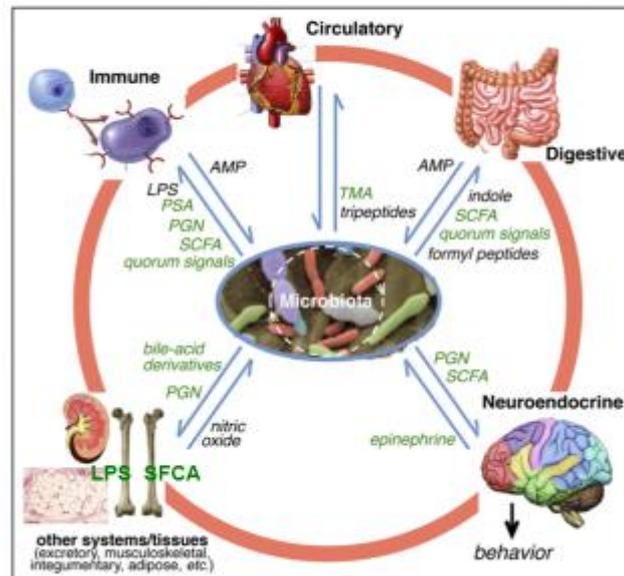
Comme nous l'a expliqué Dusko EHRLICH, la partie distale de notre intestin, souvent décrite comme le site le plus densément peuplé en bactéries sur terre, contient une énorme communauté de bactéries.

De façon frappante, ces bactéries codent collectivement pour un nombre total de gènes estimé à environ 600 000 chez chaque individu, un nombre très largement supérieur à ceux codés par notre propre génome, estimé à 22 000.

Une partie de ces gènes est certainement indispensable à l'adaptation des bactéries à la vie dans l'intestin. Il semble néanmoins plausible qu'une partie d'entre eux puisse contribuer au métabolisme et aux fonctions de l'hôte.

Cette hypothèse a conduit au concept actuellement très populaire de super organisme formé par l'hôte et son microbiote, L'intestin fournit une niche où les bactéries trouvent les métabolites nécessaires à leur développement et, réciproquement, les bactéries apportent des activités enzymatiques qui complètent l'éventail des activités métaboliques de leur hôte

## HÔTE ET MICROBIOTE : UN SUPERORGANISME ?



PNAS | February 26, 2013 | vol. 110 | no. 9 | 3229-3236

Une perspective peut-être plus raisonnable est d'imaginer qu'au cours de leur longue coévolution, hôte et microbiote ont établi un compromis fondé sur un équilibre entre les bénéfiques et les risques que chacun des partenaires tire de l'association et qui favorise leur bonne santé respective. Outre les bénéfiques métaboliques déjà évoqués, un bénéfice important résulte de l'effet barrière des bactéries contre les pathogènes. En occupant toutes les niches nutritionnelles dans l'intestin, non seulement les bactéries résidentes se protègent elles-mêmes contre l'invasion par des pathogènes mais elles protègent en même temps leur hôte contre ceux-ci.

Néanmoins, la présence d'une masse considérable de bactéries à proximité immédiate de l'hôte représente un risque très important pour celui-ci. Il est tentant d'imaginer que cette menace a constitué une contrainte évolutive majeure pour induire le développement du système immunitaire, notamment dans l'intestin.

Si cette hypothèse est difficile à démontrer, il est frappant d'observer que le dialogue engagé entre l'hôte et le microbiote à travers le système immunitaire est récapitulé à chaque naissance et maintenu tout au long de la vie, comme le montre l'étude des animaux maintenus en conditions stériles ou soumis à une antibiothérapie orale qui éradique de façon transitoire le microbiote.

Chez ces animaux, il existe une attrition profonde de l'immunité innée et adaptative, à la fois dans et hors du tractus intestinal, preuve du dialogue extrêmement dynamique existant entre l'hôte et son microbiote à travers le système immunitaire.

Au cours de mon exposé, je présenterai les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et le microbiote, essentiellement dans le tractus intestinal, à la fois pour des raisons de temps mais aussi car c'est le domaine où nous avons le plus travaillé.

Mon exposé comportera deux parties complémentaires :

## **Les mécanismes développés par l'hôte pour gérer le microbiote**

### **L'influence du microbiote intestinal sur la maturation du système immunitaire intestinal de l'hôte**

Pour traiter la première partie je m'appuierai sur l'étude des multiples modèles animaux développés ces 20 dernières années. Dans la mesure du possible, je préciserai les mécanismes vérifiés chez l'homme en utilisant des résultats générés par notre équipe.

Si je devais résumer très brièvement le rôle du système immunitaire dans l'intestin, je dirais qu'il a évolué pour former une barrière capable de circonscrire le microbiote dans la lumière intestinale, mais aussi une barrière très finement régulée pour éviter des réponses inflammatoires excessives délétères pour chacun des partenaires. Cette barrière fait intervenir :

- ✓ D'une part, des mécanismes rattachés à l'immunité innée. Celle-ci est apparue très tôt au cours de l'évolution chez les invertébrés et a la particularité d'être mobilisable rapidement, mais d'être peu spécifique et sans possibilité de mémoire ;
- ✓ D'autre part, des mécanismes rattachés à l'immunité adaptative apparue plus tardivement chez les vertébrés, et apportant spécificité et mémoire au système immunitaire.

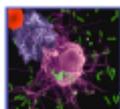
#### **Immunité innée**

Rapide mais peu spécifique  
et sans mémoire



**Epithélium**

#### **Phagocytes**



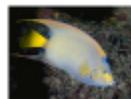
**Macrophages  
Polynucléaires**

**Cellules dendritiques**

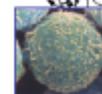
**Cellules lymphoïdes innées**

#### **Immunité adaptative**

Spécificité, mémoire, régulation



**10<sup>10?</sup> lymphocytes T et B  
/m intestin**



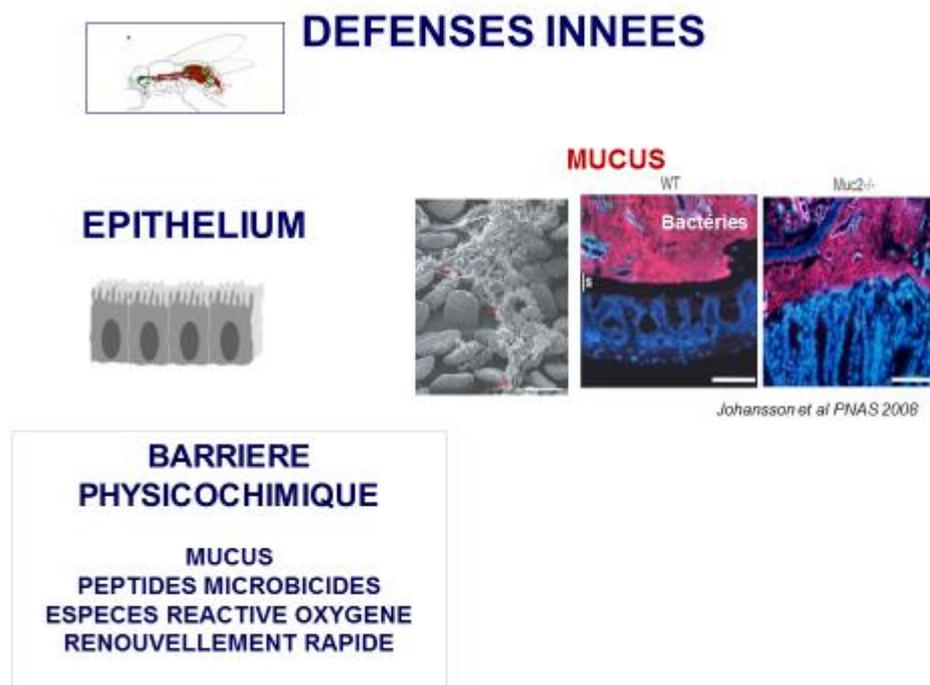
Qu'il s'agisse de mécanismes innés ou adaptatifs, ceux-ci s'organisent autour d'une cellule immunitaire particulière, probablement la première cellule immunitaire apparue au cours de l'évolution, la cellule épithéliale.

Celle-ci établit un partenariat avec les autres cellules immunitaires issues chez les vertébrés du système hématopoïétique, notamment phagocytes rattachés à l'immunité innée et lymphocytes impliqués dans l'immunité adaptative.

Le rôle de l'épithélium à l'interface entre l'hôte et le microbiote est essentiel.

C'est d'abord une barrière physique dont l'intégrité est maintenue par un renouvellement très rapide, 2 à 3 jours chez l'homme.

C'est aussi une barrière chimique, l'épithélium synthétisant un large éventail de substances qui le protègent des bactéries. Il s'agit tout d'abord du mucus, un film visqueux formé de glycoprotéines, qui enferme les bactéries dans la lumière intestinale tout en leur procurant les substrats nécessaires à leur croissance.



Au niveau du colon, où la densité bactérienne est maximale, la proportion des cellules épithéliales produisant du mucus devient très importante et le mucus s'épaissit en formant deux couches, l'une plus fluide au centre de la lumière intestinale où peuvent s'accumuler les bactéries, et la seconde si épaisse au contact de la muqueuse qu'elle devient imperméable aux bactéries, permettant leur ségrégation d'avec l'épithélium intestinal.

L'importance de cette ségrégation entre les bactéries résidentes et leur hôte est illustrée chez des souris incapables de produire la protéine principale du mucus. Les bactéries peuvent alors adhérer à l'épithélium, induisant une réaction inflammatoire visualisée ici par une hyperplasie de l'épithélium très caractéristique de l'inflammation dans le colon murin.

L'épithélium synthétise d'autres substances chimiques. Parmi celles-ci, un vaste éventail de peptides microbicides, qui agissent comme des antibiotiques et créent un gradient repoussant les bactéries dans la lumière intestinale. L'épithélium exprime en outre des enzymes capables de fabriquer, à partir de l'oxygène, des espèces réactives microbicides telles l'eau oxygénée.

L'importance de la production de radicaux oxygénés dans la fonction de barrière de l'épithélium a été d'abord mise en évidence chez la drosophile. Plus récemment, son rôle chez l'homme a été suggéré par l'étude d'enfants développant des maladies inflammatoires précoces.

Nous avons pu notamment chez un enfant de 2 ans ayant développé une colite très sévère, identifier des mutations inactivant l'enzyme (DUOX2) responsable de la production d'eau oxygénée par l'épithélium. De façon notable, l'inflammation colique a été extrêmement active entre l'âge de 2 et 4 ans. Puis, progressivement, elle a diminué, suggérant que d'autres mécanismes ont pu, chez cet enfant, prendre le relais pour rétablir l'homéostasie locale.

Une hypothèse plausible est le rôle des phagocytes, macrophages ou polynucléaires qui sont des partenaires importants de l'épithélium dans sa fonction de barrière ; ces phagocytes sont en effet eux aussi équipés d'enzymes produisant des espèces réactives de l'oxygène, les macrophages les utilisant pour éliminer des bactéries intracellulaires et les polynucléaires des bactéries extracellulaires.

L'épithélium peut recruter ces phagocytes mobiles et notamment les polynucléaires à travers des cascades de signalisation activées par les bactéries présentes dans la lumière intestinale. En effet, celles-ci libèrent diverses molécules qui se fixent sur des récepteurs présents à la surface ou dans les cellules épithéliales, induisant en aval la production de peptides microbicides (aussi appelés défensines), ou de cytokines qui stimulent le recrutement et l'activation des phagocytes.

Ce recrutement de phagocytes peut être massif en cas de colonisation de l'intestin par des pathogènes, comme ici dans une colite induite par la bactérie *Shigella*. Au cours de cette infection, les phagocytes sont en effet nécessaires pour éliminer les bactéries mais cette réaction de défense se fait au prix d'une inflammation telle que dans un nombre important de cas, elle va être létale pour l'hôte...

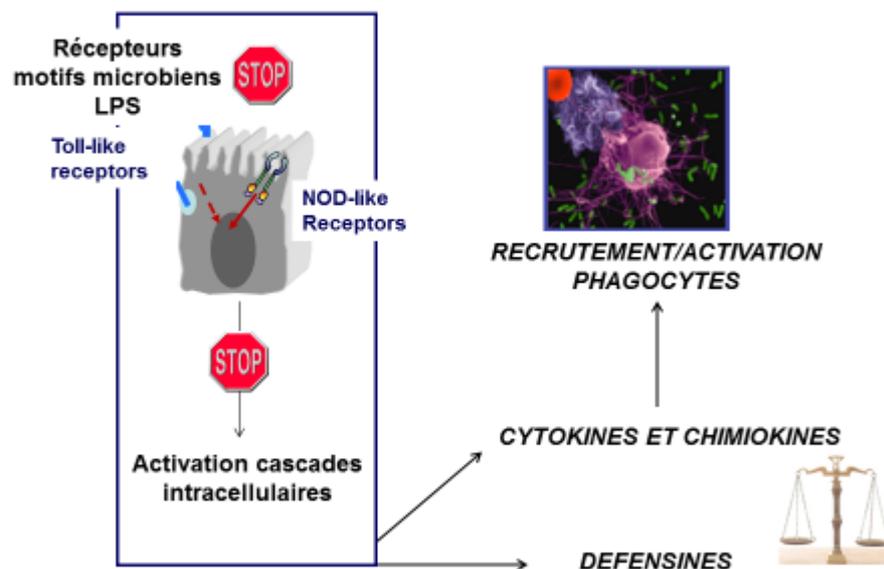
On peut bien sûr se demander le bénéfice pour un pathogène d'induire une réponse inflammatoire aussi délétère pour son hôte. De façon intéressante, une série de travaux publiés depuis 2008 montrent comment l'inflammation induite par les bactéries entéropathogènes leur permet d'entrer en compétition avec les bactéries du microbiote, et ainsi d'accéder aux niches intestinales où elles pourront proliférer.

Ce phénomène, qui est tout à fait caricatural lors de la colonisation par un entéropathogène où il conduit à éliminer complètement les bactéries résidentes, s'applique à toutes les situations où apparaît une inflammation intestinale. Même très modeste, celle-ci conduit à un déséquilibre de la composition du microbiote et à l'émergence de bactéries potentiellement plus agressives qui, à leur tour, stimulent l'inflammation en créant un cercle vicieux.

Ces données soulignent l'importance d'une régulation étroite des cascades de signalisation activées dans les cellules épithéliales par les bactéries. Je citerai un check point endogène très important, l'inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, dont le déficit chez la souris que chez l'homme, conduit à des colites sévères.

Parmi les autres mécanismes régulant l'activation épithéliale, j'ai choisi d'en présenter brièvement un second, qui permet de limiter l'interaction d'un récepteur extracellulaire (le récepteur Toll like 4 ou TLR4) avec les lipopolysaccharides bactériens, dérivés de la paroi des bactéries Gram négatif.

## IMMUNITE INNEE : REGULATION



Ce mécanisme implique une enzyme synthétisée par l'épithélium intestinal, la phosphatase alcaline intestinale. Celle-ci est libérée à la surface de vésicules lipidiques dans la lumière intestinale où elle permet l'hydrolyse de l'un des deux résidus phosphate présents dans les lipopolysaccharides, réduisant ainsi par 1 000 leur capacité à activer TLR-4 et la cascade de signaux pro-inflammatoires en aval de ce récepteur.

Ce rôle anti-inflammatoire de la phosphatase alcaline a été démontré dans plusieurs modèles animaux. Le plus récent publié dans « *Science* » en décembre 2017 montre notamment que des infections infracliniques mais répétées par une bactérie pathogène peuvent inactiver la phosphatase alcaline et favoriser ainsi le développement d'une inflammation très sévère provoquée par l'activation excessive du récepteur TLR-4 par les LPS dérivés des bactéries.

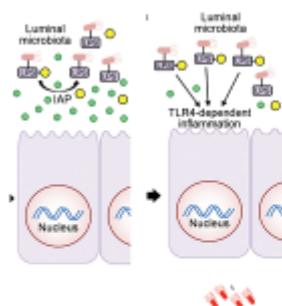
Nous pensons que ce mécanisme rend compte de l'inflammation intestinale réfractaire à tout traitement médical que nous avons observée chez 2 enfants présentant des mutations avec perte de fonction de la phosphatase alcaline. Cette observation chez l'homme suggère que la phosphatase alcaline est un mécanisme conservé et nécessaire pour limiter la réponse de l'hôte aux bactéries intestinales Gram négatif et préserver l'homéostasie locale.

## PHOSPHATASE ALCALINE INTESTINALE ET ATTENUATION DES EFFETS PROINFLAMMATOIRES DU LIPOPOLYSACCHARIDE BACTERIEN

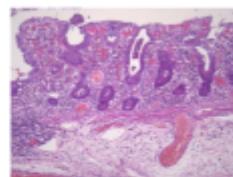
---

Recurrent infection progressively disables host protection against intestinal inflammation

Yang et al., Science 358, eaao5610 (2017)



**Inflammation intestinale réfractaire au traitement médical chez deux enfants porteurs de mutations perte de fonction de ALPI**  
*Parlato et al en révision*



En conclusion de ces premières diapositives, j'espère avoir montré que le partenariat entre épithélium et phagocytes permet la construction d'une barrière immunitaire innée bien régulée qui est indispensable pour que l'hôte puisse gérer la présence du microbiote dans la lumière intestinale.

Dans les diapositives suivantes, je voudrais illustrer le rôle clé d'une seconde ligne de défense, l'immunité adaptative. Apparue chez vertébrés, elle repose sur les lymphocytes. Elle apporte spécificité-mémoire au système immunitaire et en améliore la régulation.

On peut se poser la question des contraintes évolutives qui ont favorisé la sélection du système immunitaire adaptatif chez les vertébrés.

Une hypothèse proposée par Margaret Mc FALL-NGAI est la nécessité pour l'hôte de gérer la diversité croissante des communautés bactériennes présentes dans l'intestin. En effet, on sait que les communautés bactériennes présentes dans l'intestin des invertébrés sont très limitées, une douzaine d'espèces de bactéries tout au plus, comparées aux 1 000 à 2 000 espèces constituant le microbiote intestinal humain. Cette hypothèse reste difficile à prouver. Il n'en reste pas moins que l'immunité adaptative permet de renforcer considérablement la barrière intestinale.

Les réponses immunes adaptatives sont initiées par l'interaction entre les cellules dendritiques, des cellules qui se rapprochent des cellules phagocytaires, car elles peuvent capter microbes et les protéines. Elles sont en outre capables de les transformer sous forme de peptides et de les présenter à leur surface aux lymphocytes. Cette présentation à un lymphocyte exprimant un récepteur spécifique du peptide conduit à son activation, sa multiplication clonale puis sa différenciation en cellule effectrice et éventuellement en cellule mémoire.

Il existe 2 populations principales de lymphocytes :

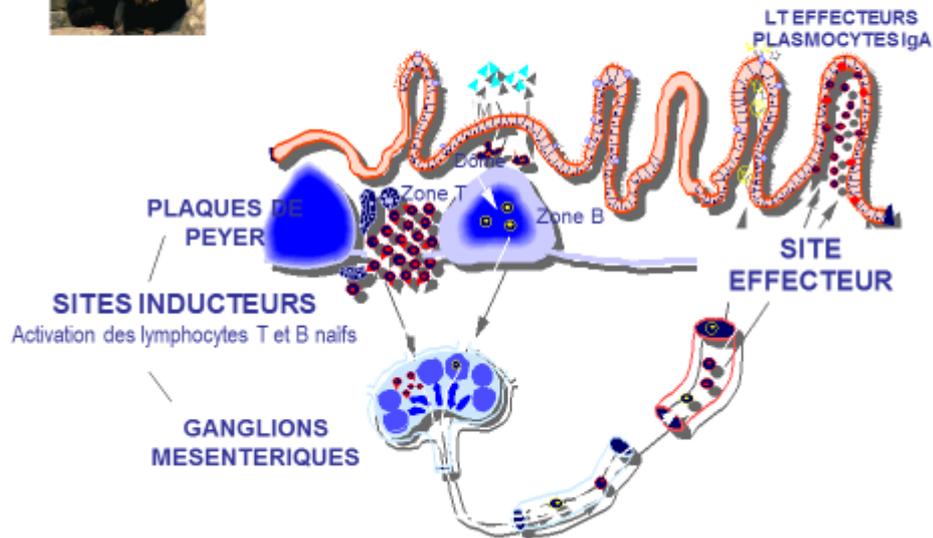
- Les lymphocytes B qui vont produire des anticorps ;
- Les lymphocytes T divisés schématiquement 2 sous-populations :
  - Des lymphocytes auxiliaires (CD4+) qui agissent à travers la production de facteurs solubles aussi appelés cytokines, en particulier pour aider les lymphocytes B à produire des anticorps mais aussi pour recruter et activer des cellules de l'immunité innée comme les phagocytes
  - Des lymphocytes cytotoxiques (CD8+) dont l'une des fonctions est par exemple d'éliminer des cellules infectées par un micro-organisme, virus notamment.

Chez les mammifères, l'initiation de ces réponses a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques.

Dans l'intestin, les organes lymphoïdes secondaires sont des ganglions lymphatiques directement inclus dans la paroi de l'intestin, appelés plaques de Peyer. Celles-ci se développent sous l'épithélium, qui se différencie à leur tour pour favoriser l'échantillonnage des bactéries et des antigènes présents dans la lumière intestinale, les amener au contact des cellules immunitaires et ainsi permettre l'activation de lymphocytes spécifiques. Une fois sensibilisés, ces lymphocytes quittent les plaques de Peyer à travers les voies lymphatiques, puis circulent dans le sang avant de migrer sur toute la hauteur de l'intestin, diffusant la réponse immune initiée en un point de l'intestin à l'ensemble du tractus digestif. Au cours de ce cycle qui prend quelques jours, les lymphocytes sensibilisés se transforment progressivement en lymphocytes T effecteurs synthétisant de grandes quantités de cytokines ou, pour les lymphocytes B en plasmocytes synthétisant de grandes quantités d'anticorps.

# IMMUNITE ADAPTATIVE ET INTESTIN

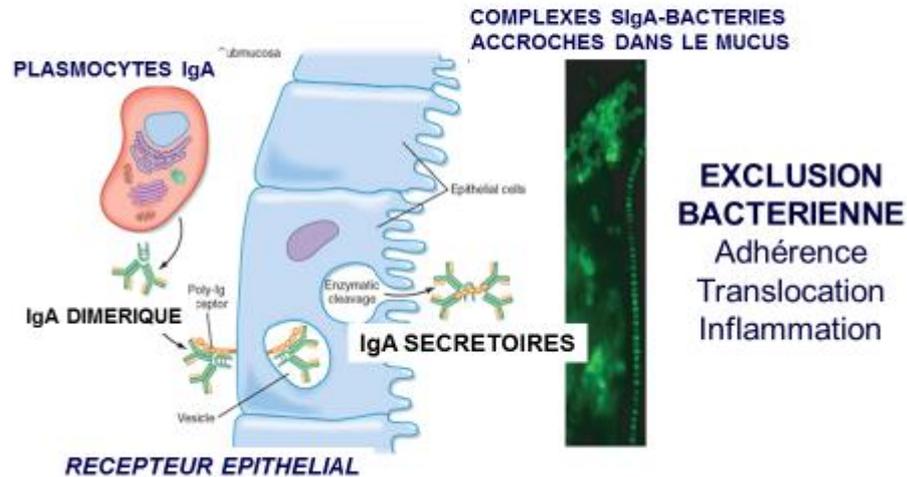
## SYSTEME LYMPHOIDE ASSOCIE A L'INTESTIN



Au terme de ce trajet, les plasmocytes se localisent dans le chorion conjonctif sous l'épithélium intestinal. Les anticorps produits en abondance par ces cellules sont alors transportés à travers l'épithélium par un récepteur dédié, autre exemple de l'interaction particulière qui lie l'épithélium et les cellules immunitaires hématopoïétiques. Ce transport permet de déverser dans la lumière les anticorps principalement de type IgA. Ceux-ci peuvent alors se fixer aux bactéries, les accrocher dans le mucus et renforcer ainsi l'exclusion des bactéries dans la lumière.

L'importance de ce mécanisme de défense est illustrée chez les patients incapables de produire des immunoglobulines. Ces patients sont en effet exposés au risque de d'infections systémiques, mais aussi au développement d'inflammation intestinale, montrant une fois de plus à quel point l'exclusion des bactéries dans la lumière est nécessaire pour préserver la symbiose entre l'hôte et son microbiote et maintenir l'homéostasie intestinale.

## ROLE BARRIERE DES ANTICORPS

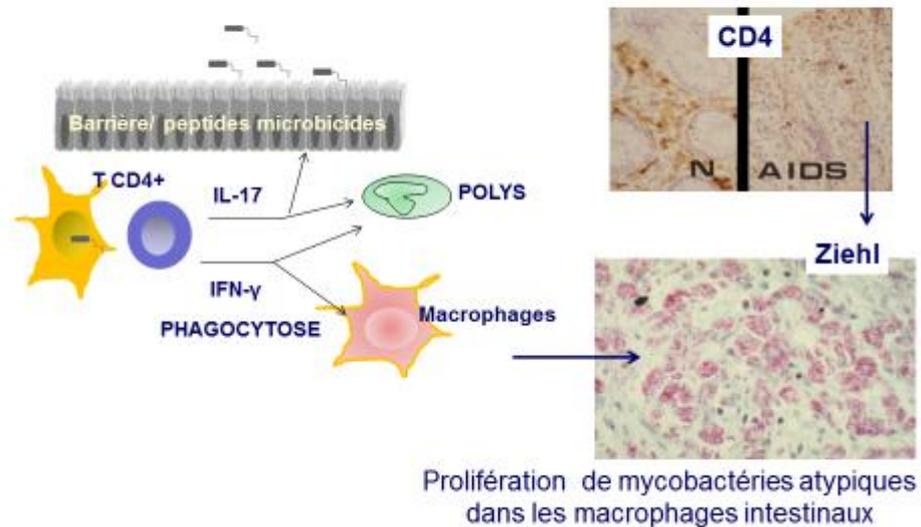


*Malamut et al Am J Gastroenterology 2010*

Enfin une dernière ligne de défense essentielle pour renforcer la barrière immunitaire intestinale est représentée par les lymphocytes T effecteurs dont il existe plusieurs sous-populations. La diapositive suivante illustre le rôle protecteur de deux d'entre elles :

- Les lymphocytes auxiliaires TH17 qui produisent la cytokine IL17, celle-ci stimulant la production de peptides microbicides par l'épithélium et favorisant le recrutement des polynucléaires.
- Les lymphocytes auxiliaires TH1 qui produisent l'interféron gamma indispensable à l'activation de la fonction de phagocytose des macrophages.

## ROLE BARRIERE DES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS



La contribution des lymphocytes T à la formation d'une barrière intestinale efficace est illustrée chez les patients qui en sont dépourvus, soit du fait de certaines maladies génétiques rares, soit du fait d'une infection par le virus du Sida qui élimine progressivement tous les lymphocytes T auxiliaires. Ces patients développent des diarrhées associées à la prolifération locale de germes et des infections systémiques graves dont le point de départ est souvent digestif. Cette diapositive illustre chez un patient avec le SIDA les conséquences locales de la disparition des lymphocytes TH1 produisant de l'interféron : les macrophages sont présents dans l'intestin mais incapables, du fait de l'absence d'interféron, de phagocyter des mycobactéries atypiques. Ces bactéries, facilement éliminées par un individu immunocompétent, s'accumulent ici dans les macrophages où elles sont révélées en rouge par la coloration de Ziehl.

Si les lymphocytes T effecteurs, notamment TH17 et TH1 sont indispensables pour renforcer la barrière intestinale, leur activation nécessite d'être étroitement régulée. Leur activation excessive peut en effet conduire, à travers le recrutement et l'activation de polynucléaires ou macrophages à des lésions inflammatoires très sévères de l'intestin.

J'ai illustré l'importance de cette régulation à travers l'étude d'une cohorte d'enfants développant une maladie inflammatoire très sévère et très précoce évocatrice d'une cause monogénique, cohorte dont nous avons donc entrepris le démantèlement génétique.

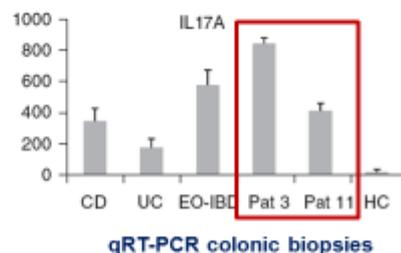
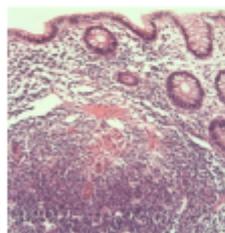
Chez une centaine de ces patients, nous avons identifié une maladie génétique connue et montré qu'une proportion importante ont des mutations affectant la différenciation ou dans l'activité des lymphocytes T régulateurs.

Je voudrais plus particulièrement insister sur le cas des patients présentant des mutations dans le récepteur pour la cytokine IL10, une cytokine qui agit sur les macrophages en inhibant leur production de molécules inflammatoires tout en préservant leur fonction de phagocytose. Ces enfants développent dès les premiers mois de vie une colite inflammatoire très sévère ainsi que des lésions périanales très délabrantes. Le cas de ces patients illustre de façon dramatique l'importance d'un rétrocontrôle très strict des réponses immunes intestinales induites par le microbiote.

## RETROCONTROLE STRICT DE LA REPOSE IMMUNE

*Glocker et al NEJM 2009  
Begue et al AJG 2011  
Pigneur et al IBD 2013*

### INFLAMMATION INTESTINALE PRECOCE ET GRAVISSME CHEZ LES ENFANTS PORTEURS DE MUTATIONS INACTIVANT LA SIGNALISATION DE LA CYTOKINE IL10



**Après avoir illustré dans la première partie de mon exposé la multiplicité des mécanismes accumulés par l'hôte au cours de l'évolution pour contrôler le microbiote, je voudrais montrer dans la seconde partie comment, à l'inverse, le microbiote influence la maturation de ces mécanismes après la naissance.**

Il est maintenant bien établi que la colonisation par le microbiote a de multiples effets sur la barrière immune intestinale. Ainsi, la colonisation augmente la production de mucus et modifie sa composition ; elle amplifie de façon considérable la production des peptides microbicides et induit les enzymes nécessaires à la production des espèces réactives de l'oxygène.

La colonisation est aussi nécessaire pour initier les réponses adaptatives dans les plaques de Peyer, production d'anticorps et réponses T pro-inflammatoires, notamment réponses TH17 mais aussi réponses régulatrices nécessaires pour contrebalancer les réponses pro-inflammatoires et maintenir l'homéostasie locale.

## La colonisation par le microbiote est indispensable à la maturation post-natale de la barrière immune intestinale



Une question à laquelle nous avons choisi de répondre il y a quelques années avec Valérie GABORIAU-ROUTHIAU, a été de définir le rôle respectif des différentes bactéries du microbiote dans la maturation de la barrière immune intestinale et notamment d'apprécier le caractère ou non redondant de ces effets.

Pour répondre à cette question, nous nous sommes appuyées sur la colonisation de souris nées et élevées en conditions stériles par des bactéries individuelles ou par des consortiums plus ou moins complexes de bactéries intestinales.

Les résultats de ce travail déjà un peu ancien peuvent se résumer en indiquant que l'impact des bactéries intestinales dépend avant tout de leur localisation dans l'intestin et plus particulièrement de leur localisation dans la lumière de l'intestin ou au contact de l'épithélium

Comme déjà largement évoqué ci-dessus, la majorité des espèces commensales vivent dans le mucus et ont un accès très limité à l'épithélium. Dans nos expériences de colonisation avec des espèces qui vivent typiquement dans le mucus, nous avons observé de façon constante l'induction de plasmocytes et la production d'anticorps de type IgA et, de façon variable, l'induction d'ARN messagers témoignant de réponses régulatrices. A l'inverse, et à notre grande surprise, nous n'avons pas observé ni réponse innée pro-inflammatoire ni réponse TH17.

Il nous a donc fallu nous rendre à l'évidence inattendue que la maturation complète de la barrière immune intestinale murine et notamment l'induction des réponses pro-inflammatoires innées et TH17 dépendaient de bactéries particulières. Les différentes (et nombreuses) colonisations effectuées nous ont finalement conduites à montrer le rôle indispensable chez la souris de la bactérie segmentée filamenteuse (SFB)

SFB a été décrite par SAVAGE dans les années 1960 dans l'intestin de nombreux mammifères. Les travaux sur SFB menés à cette époque puis dans les années 1990 avaient montré que cette bactérie colonise l'intestin des rongeurs lors du sevrage, moment où débute la maturation de la barrière immune intestinale. Ils avaient aussi montré que SFB a la particularité, contrairement à la majorité des autres bactéries du microbiote, d'adhérer à la muqueuse iléale et à la surface des plaques de Peyer, organes lymphoïdes dont nous avons vu l'importance dans l'activation des réponses immunes adaptatives de l'intestin.

### **SEGMENTED FILAMENTOUS BACTERIUM (SFB)**

1849: Leidy C. *Arthromitus arthropodes*

1972: Savage Description in rongeurs, poulet, truite, cochon, cheval, singe...



*Clostridium* / espèce sporulante  
Colonise l'intestin des rongeurs lors du sevrage

**Adhère à la muqueuse iléale  
et aux plaques de Peyer de façon hôte-spécifique**  
Sans induire de lésions

Ces travaux avaient en outre suggéré que l'adhérence de SFB à l'épithélium est hôte-spécifique. Ainsi SFB issue de l'intestin murin ne semblait se fixer qu'à l'épithélium de la souris. A l'inverse, SFB isolée d'un intestin de rat se fixait exclusivement à l'iléon du rat. On sait aujourd'hui, grâce aux travaux d'ATARASHI et collègues que l'attachement de SFB à l'épithélium joue un rôle indispensable dans ses fonctions immunostimulantes.

Nous avons nous mêmes montré que SFB peut à elle seule récapituler très largement l'effet immunostimulant d'un microbiote complexe et que sa présence dans le microbiote est indispensable pour initier la maturation complète de la barrière immune intestinale.

SFB peut notamment induire de fortes réponses immunes innées dans l'épithélium, stimuler le développement très rapide des plaques de Peyer et y induire des réponses IgA et T, en particulier TH17.

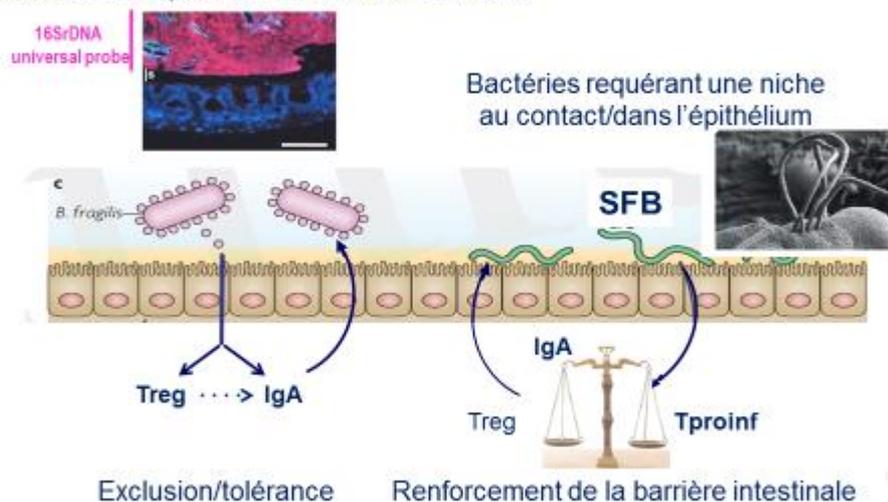
SFB induit ainsi une inflammation physiologique capable de renforcer l'effet barrière du microbiote. Plusieurs auteurs ont en effet montré que la présence de SFB dans le microbiote renforçait, voire était nécessaire à l'effet protecteur de celui contre

les pathogènes. Le rôle attribué à SFB est celui de renforcer la barrière immune de l'hôte et de le préparer ainsi à mieux faire face aux pathogènes, une explication séduisante mais qui n'est cependant pas définitivement prouvée.

En résumé de ces données, il semble possible de proposer que les bactéries du microbiote et leur hôte ont établi un compromis à géométrie variable. Les bactéries présentes en abondance dans le microbiote occupent les niches intraluminales. Elles sont capables d'induire des anticorps de type IgA qui contribuent à les accrocher dans le mucus et donc à favoriser leur exclusion dans la lumière, un mécanisme indispensable pour maintenir l'homéostasie locale

### UN COMPROMIS A GEOMETRIE VARIABLE ENTRE LES BACTERIES DU MICROBIOTE ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE L'HOTE

Bactéries occupant les niches intraluminales



Certaines de ces bactéries sont en outre capables d'induire des cellules T régulatrices, qui aident à contrebalancer les réponses inflammatoires et à préserver l'homéostasie locale. À l'inverse, d'autres bactéries beaucoup plus rares, dont le prototype est, chez la souris, SFB, requièrent une niche au contact de l'épithélium. Ce contact intime avec l'hôte induit une réponse pro-inflammatoire utile pour renforcer la barrière intestinale et la protection de l'hôte.

Il peut sembler paradoxal pour une bactérie symbiotique d'adopter une niche au contact de l'épithélium au risque de susciter une réponse immune qui pourrait l'éliminer. En fait, SFB n'a pas le choix. C'est ce que nous avons montré avec l'aide de Pamela SCHNUPF et de Philippe SANSONETTI. Nous avons fait l'hypothèse que SFB, pour se développer avait absolument besoin des cellules épithéliales. Cela en raison de son génome réduit qui suggérait des besoins auxotrophes en acides aminés mais aussi en raison de son cycle de réplication initié par son attachement aux cellules épithéliales.

Pamela SCHNUPF a pu effectivement montrer qu'*in vitro*, SFB était cultivable à la condition indispensable de la cultiver en présence de cellules épithéliales. Son travail



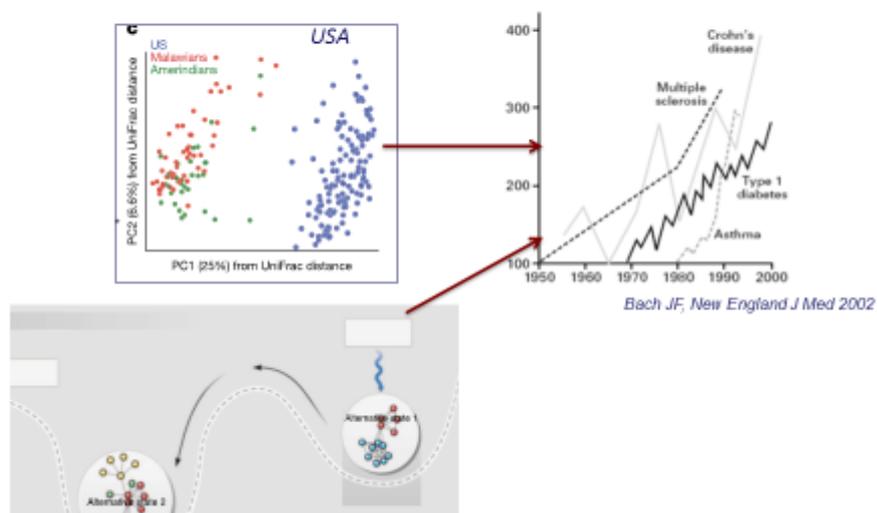
différence des autres bactéries du microbiote par son besoin d'une niche au contact de l'épithélium.

L'équilibre maintenu par le système immunitaire entre l'hôte et son microbiote dépend de multiples mécanismes acquis progressivement par l'hôte au cours de l'évolution. Comme le montre l'étude des modèles animaux mais aussi de certaines maladies génétiques rares chez l'homme, la perte de l'un de ces mécanismes peut rompre l'équilibre et conduire au déclenchement de maladies inflammatoires sévères.

Avant de terminer, il me paraît important de mentionner que la composition du microbiote humain s'est récemment modifiée sous l'influence des changements d'environnement et de style de vie associés à l'industrialisation. Ces modifications ont notamment été mises en évidence par le groupe de Jeff Gordon qui a comparé le microbiote d'Américains du Nord, population prototype des pays industrialisés et ayant adopté une alimentation enrichie en graisses et en sucres, et le microbiote de populations ayant conservé un mode de vie traditionnel et une alimentation riche en fibres, Malawites, qui vivent sur les grands plateaux africains et Amérindiens. Comme le montre la diapositive, la composition du microbiote apparaît comparable chez Malawites et Amérindiens pourtant vivant sur des continents différents alors qu'elle est clairement différente chez les Américains du Nord.

Ces modifications récentes du microbiote humain ont été théorisées dans un bel article d'écologie publié dans « *Science* » qui suggère l'évolution d'un état stable, caractérisé par une diversité bactérienne élevée et la présence de symbiotes favorisant l'homéostasie intestinale, vers un état métastable caractérisé par diversité réduite, et l'émergence de bactéries plus inflammatoires, que certains appellent des « pathobiotés ».

## MODIFICATIONS DU MICROBIOTE: ROLE DANS L'EPIDEMIE RECENTE DE MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES ?



Ces observations conduisent à évoquer la contribution des modifications du microbiote à l'épidémie de maladies inflammatoires chroniques observées dans les pays industrialisés. Cette hypothèse semble particulièrement plausible dans le cas des maladies inflammatoires intestinales dont l'incidence a explosé au cours des 50 dernières années parallèlement à l'industrialisation. Cette incidence est en train de se stabiliser dans les pays industrialisés de longue date mais elle augmente de façon importante dans les pays en voie de développement. En outre, dans les pays industrialisés, après s'être stabilisée chez l'adulte, elle augmente actuellement chez l'enfant, comme le montre une étude réalisée par EPIMAD, le registre des maladies inflammatoires du Nord de la France (qui, avec 50 000 patients, est le plus grand registre mondial). Il est tentant de postuler que les mécanismes génétiques forgés par l'hôte au cours de l'évolution pour gérer le microbiote s'avèrent aujourd'hui incomplètement adaptés pour contrôler un microbiote dont la composition a évolué sous l'influence de nouvelles pressions de sélection notamment liées aux modifications de l'alimentation humaine et à l'usage des antibiotiques.

Ces données soulignent l'importance de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent l'écosystème intestinal, travaux dont on peut souhaiter qu'ils fournissent des pistes pour restaurer un microbiote bien diversifié et riche en symbiotes favorisant une activation adaptée et contrôlée du système immunitaire. A ce propos, je voudrais indiquer que je n'ai pas évoqué dans cet exposé, le rôle du microbiote sur l'activation du système immunitaire à distance de l'intestin. Ce rôle fait aujourd'hui l'objet de nombreux travaux qui montrent que le microbiote peut amplifier et ou moduler ces réponses.

Pour conclure, je voudrais remercier les personnes dont j'ai utilisé les résultats. Pour le travail sur SFB, je voudrais remercier particulièrement Valérie GOBORIAU-ROUTHIAU et Pamela SCHNUPF et souligner les collaborations avec Philippe SANSONETTI et Gérard EBERL à l'institut Pasteur. En ce qui concerne le travail sur les maladies monogéniques intestinales, je voudrais insister sur la contribution de Fabienne CHARBIT-HENRION, une jeune pédiatre qui joue un rôle central dans la constitution de la cohorte et son exploration et celle de Marianna PARLATO, une remarquable post-doctorante avec laquelle nous étudions les conséquences fonctionnelles de nouvelles mutations identifiées. Il me faut aussi remercier toutes les plateformes de l'Institut IMAGINE qui nous apportent une aide précieuse.

*(Applaudissements)*

**Jean-François BACH** - Comment expliquer que le système immunitaire tolère les bactéries du microbiote ? Pourquoi n'y a-t-il pas de réponses immunitaires qui les élimineraient ?

**Nadine CERF-BENSUSSAN** - J'ai essayé d'expliquer l'importance des mécanismes qui excluent les bactéries dans la lumière intestinale et limitent leur pénétration dans l'organisme. Il n'y a pas de vraie tolérance vis-à-vis des bactéries. Ce

mécanisme de barrière, fondé sur la création d'une inflammation physiologique locale est clé pour permettre à l'hôte de tolérer la présence du microbiote.

Néanmoins, effectivement certaines bactéries favorisent le développement de cellules T régulatrices. Ces cellules éventuellement spécifiques des bactéries du microbiote permettent de limiter la réponse inflammatoire.

**Jean-François BACH** - Autant que je sache, lorsqu'on administre des probiotiques par voie entérale, il n'y a pas plus de barrière... Je n'ai jamais vu d'état d'immunisation contre des probiotiques administrés par cette voie.

**Nadine CERF-BENSUSSAN** - S'ils sont administrés par voie orale, grâce à tous les mécanismes que je vous ai montrés, un équilibre basé à la fois sur l'exclusion des bactéries et sur le développement de mécanismes régulateurs s'établit. Si les bactéries sont injectées par voie systémique, elles vont induire une réponse immunitaire. Il n'y a pas de tolérance aux bactéries intestinales injectées par voie systémique, comme cela a été montré notamment par A. Macpherson.

**Marc BONNEVILLE** - Vous évoquez cette hypothèse assez surprenante du rôle joué par une immunité adaptative dans la gestion de la diversité du microbiote. Y a-t-il des arguments expérimentaux plus ou moins directs qui permettraient de démontrer un impact entre la disparition de certains effecteurs de l'immunité adaptative dans des souris maintenues dans un environnement contrôlé et la diversité du microbiote ?

**Nadine CERF-BENSUSSAN** - À ma connaissance, non. Cela reste une hypothèse formulée par Margaret McFALL-NGAI. A moins que Yasmine BELKAID connaisse des données qui permettraient de la documenter.

**Yasmine BELKAID** - Quand on enlève certains types MHC dans les souris, on peut avoir un changement de la composition du microbiote. Il y a un dialogue direct entre la diversité du microbiote et le répertoire.

**Ghenima CHOUBANE** - Peut-on utiliser toutes ces connaissances pour la prévention ou du moins l'atténuation des signes cliniques ou même la guérison de certaines maladies de colites intestinales, telles que la colite hémorragique ou la maladie de Crohn ?

**Nadine CERF-BENSUSSAN** - Pour améliorer le traitement de ces maladies il apparaît de plus en plus nécessaire de bien comprendre l'écosystème intestinal. J'ai indiqué que l'inflammation favorise l'émergence de bactéries pathogènes pro-inflammatoires. Les travaux d'Andreas BÄUMLER montrent par exemple que l'inflammation dans le colon conduit à la production de nitrites qui peuvent être utilisés par les protéobactéries pour générer de l'énergie, favorisant leur expansion aux dépens des autres bactéries résidentes qui ne savent pas utiliser cette source d'énergie.

Ces données indiquent qu'éteindre la réponse inflammatoire dans l'intestin est une étape indispensable dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales. Néanmoins, se pose aujourd'hui la question de corriger la composition du microbiote enrichi par l'inflammation en espèces plus agressives, ceci afin de rétablir un écosystème favorable à une rémission prolongée. Des essais cliniques basés sur la transplantation

fécale d'un microbiote issu de personnes en bonne santé aux patients souffrant de maladies intestinales inflammatoires sont en cours. Une vraie réflexion est cependant nécessaire pour bien comprendre les mécanismes qui contrôlent les compétitions entre bactéries et choisir les conditions optimales pour réaliser cette transplantation.

**Karine CLÉMENT** - Peut-on avoir, d'après vous, le même raisonnement sur l'inflammation bas grade ?

**Nadine CERF-BENSUSSAN** Je pense que oui. Une inflammation modérée en favorisant la production de nitrites, en augmentant la pression partielle en oxygène peut sûrement conférer un avantage sélectif à certaines bactéries aux dépens d'autres, réduire la diversité et modifier la composition du microbiote. Inviter Andreas BÄUMLER pour expliquer les mécanismes contrôlant l'écosystème intestinal aurait été d'ailleurs une bonne idée.

**Pascale COSSART** - Je voudrais revenir sur l'exclusion. Vous avez dit que les bactéries se retrouvaient recouvertes d'IgA et que cela les immobilisait.

**Nadine CERF-BENSUSSAN** - Je n'ai pas dit que les IgA les immobilisaient les bactéries même si un mécanisme de ce type a été proposé récemment dans un article publié dans Nature par E. Slack, mais plutôt qu'elles aidaient à leur accrochage dans le mucus. Les travaux de SANSONETTI ont en effet montré que le composé sécrétoire associé aux IgA est très riche en sucres et favorisait l'accrochage des IgA et donc des complexes IgA-bactéries au mucus.

*(Applaudissements)*

*(La séance est suspendue à 12 h 35 et reprise à 14 heures)*



*Yasmine BELKAID*

*National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH  
Bethesda, USA*

**Dr Jean-Pierre DÉCOR** - J'ai le plaisir d'accueillir Madame Yasmine BELKAID, qui dirige le programme Microbiome du National Institute of Allergy and Infectious Diseases du NIH à Bethesda.

Elle va nous présenter ses travaux sur le rôle du microbiote dans les relations hôte- pathogène et les mécanismes d'immunité propres aux microbes commensaux

**Yasmine BELKAID** - C'est un grand plaisir et un honneur d'être ici. Je voudrais remercier la Fondation Mérieux qui a contribué à payer une partie de ma thèse. Je ne serais peut-être pas là si elle n'avait pas fait cela.

Je réside aux États-Unis depuis 21 ans. Je crois que c'est la première conférence que je fais en français depuis 20 ans. Excusez mes franglais et mes erreurs grammaticales. Je vais faire de mon mieux. Soyez indulgents.

Je travaille sur la relation entre le microbiote et le système immunitaire. Plus particulièrement, nous essayons de comprendre comment il participe à la défense contre les pathogènes et d'autre part les mécanismes d'interaction entre le microbiote et le système immunitaire.

Le microbiote contrôle tous les éléments du système immunitaire, son développement et sa maturation. Par la diffusion de produits dans le sang, il agit sur l'hématopoïèse et le milieu hématopoïétique sur le plan quantitatif et qualitatif.

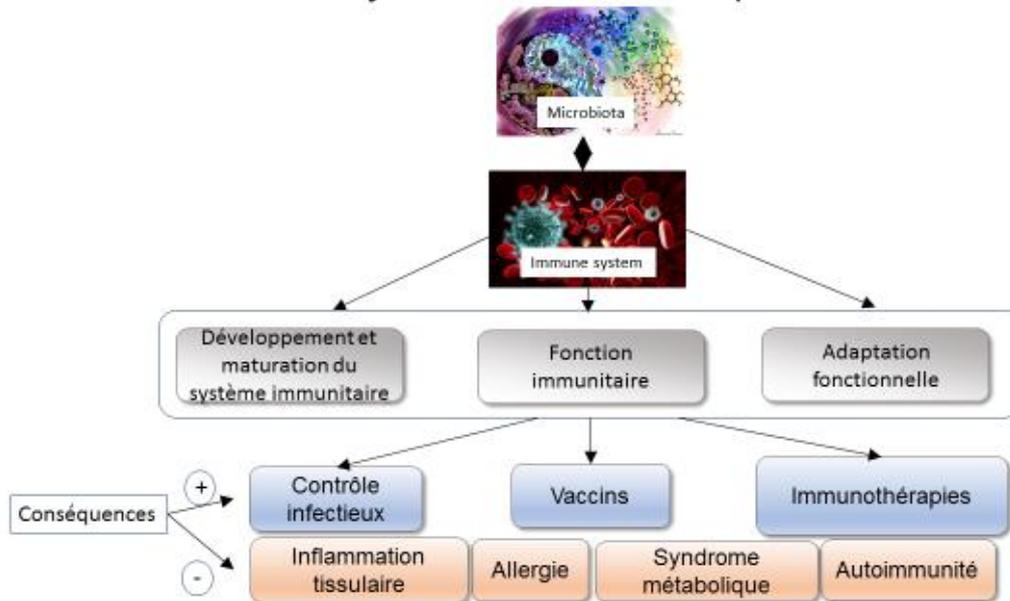
Il contrôle la capacité des lymphocytes B et T d'agir dans un contexte d'infection, mais aussi localement, sur le tissu qu'il colonise en augmentant l'inflammation tonique et en favorisant la production de cytokine

Expérimentalement, cette association a été montrée comme extrêmement importante pour le contrôle des maladies infectieuses.

Il peut agir sur les vaccins délivrés par voie orale au niveau des muqueuses. Des travaux récents montrent aussi son influence sur l'immunothérapie au niveau de traitement contre les cancers.

L'altération de cette relation peut entraîner l'inflammation tissulaire, l'émergence d'allergies, des syndromes métaboliques et aussi des maladies auto-immunes.

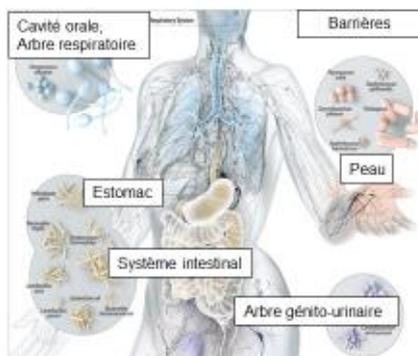
## Contrôle du système immunitaire par le microbiote



Le microbiote est un environnement très complexe, Il faut se rappeler qu'il est aussi un réservoir de pathogènes. Il y a à tout moment chez les individus des microbes qui peuvent causer des infections et des maladies. Normalement, les pathogènes sont maintenus sous contrôle directement par le microbiote mais aussi par son action sur le système immunitaire.

Les pathogènes pour être en contact avec le système immunitaire, que ce soit au niveau de la peau, de l'intestin ou des poumons, pénètrent par des milieux naturellement colonisés par des microbiotes. Cela signifie qu'il y a vraiment coexistence et interactions. Des pathogènes peuvent aussi faire partie du microbiote.

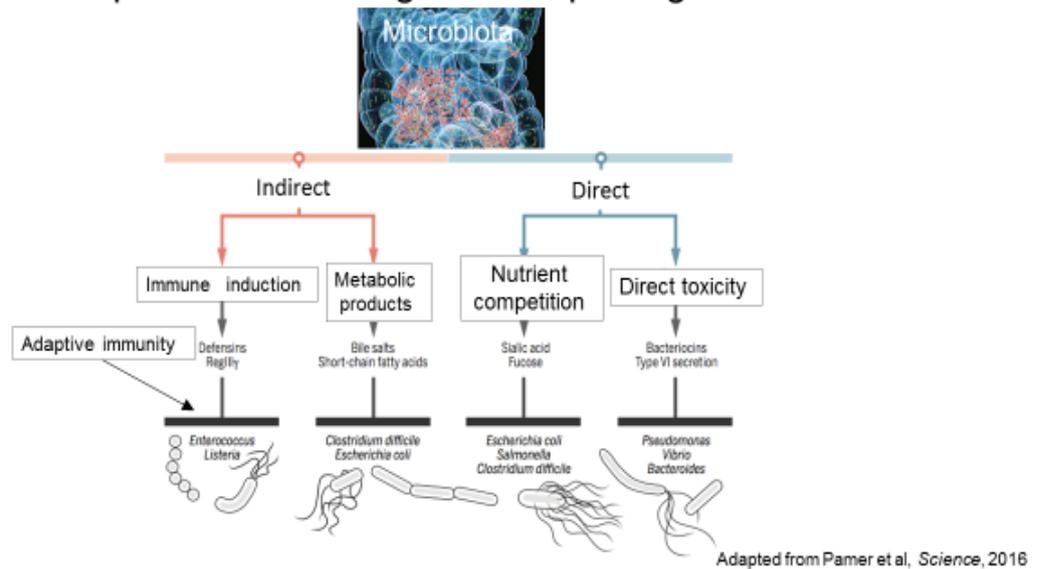
## Les tissus colonisés par le microbiote sont aussi les principales portes d'entrée des infections



Norovirus >20M  
 Rotavirus > 3M  
 Salmonella spp >1M  
 Clostridium perfringens >1M  
 Campylobacter >1.5M  
 Listeria monocytogenensis  
 E.coli (EPEC, ETEC...)  
 Giardia spp  
 Shigella spp  
 Yersinia enterocolitica  
 Candida albicans  
 RSV  
 Influenza  
 Mycoplasma pneumoniae  
 HMPV  
 Pneumocystis jirovecii  
 Streptococcus pneumoniae  
 Staphylococcus aureus  
 Klebsiella pneumoniae...

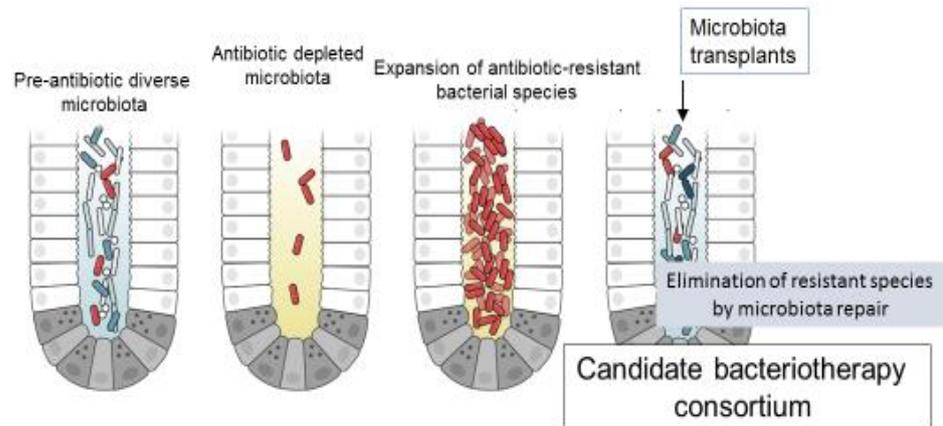
Le microbiote a un rôle important lors de la colonisation par des organismes pathogènes. Cette action peut être directe : une compétition pour l'espace et les ressources présentes ou une production de molécules toxiques contre les pathogènes. Elle peut être indirecte par induction du système immunitaire.

## Le microbiote protège de la colonisation par des micro-organismes pathogènes



Une évidence clinique montre l'importance de cette interaction : ce sont les traitements antibiotiques. Chez certains patients, ils entraînent l'émergence de pathogènes antibiotiques-résistants, qui peuvent coloniser entièrement l'intestin. C'est le cas par exemple de *Clostridium difficile*. Ils peuvent avoir des associations chroniques avec l'hôte, dans des manifestations parfois très dangereuses. C'est la compréhension de cette interaction qui a conduit aux transferts de selles pour l'élimination de ces pathogènes.

## Antibiotic treatment can lead to the expansion of pathogens



Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*

Charlie C. Barthe<sup>1,2</sup>, David Bress<sup>1,2</sup>, Michael B. Nash<sup>1,2</sup>, Peter T. McKinnon<sup>1,2</sup>, Ulana Ling<sup>1</sup>, Anu Gokhale<sup>1</sup>, Danyal Waf<sup>1</sup>, Brad Liu<sup>1</sup>, Melissa Klineberg<sup>1</sup>, Agnes Vlas<sup>1</sup>, Eric Liorans<sup>1</sup>, Stuart D. McVernon<sup>1,3,4</sup>, Robert S. Long<sup>1</sup>, Ying Tang<sup>1</sup>, Chris Sander<sup>1</sup>, Joshua B. Duer<sup>1</sup>, Nora C. Toussaint<sup>1,5</sup>, Lutz B. Kuehn<sup>1,6</sup> & Eric S. Futato<sup>1,2</sup>

Nos recherches sur cette interaction ont commencé il y a une dizaine d'années par le travail d'un étudiant, Jason HALL, dans notre laboratoire. Il a utilisé une approche très simple : traiter oralement des animaux avec des antibiotiques et examiner la qualité du système immunitaire dans l'intestin. Il a pu ainsi montrer que la présence de cytokine IL17 et d'interféron gamma, composés importants contre les infections, étaient fortement diminuée par le traitement antibiotique. Cette diminution démontrait la faible capacité de l'hôte à développer une réponse immunitaire.

Ce résultat, confirmé par de nombreux autres travaux, démontre le rôle global du microbiote sur l'intestin et son système immunitaire.

En réponse à une discussion précédente sur l'importance des bactéries par rapport à d'autres microbes, Myriam MERAD a montré que les protistes, très peu présents au niveau de l'intestin de l'homme, étaient extrêmement importants pour contrôler la réponse immunitaire. Certains types de protistes, quand ils sont présents dans l'intestin, sont suffisants pour changer de façon importante la capacité de l'hôte à répondre.

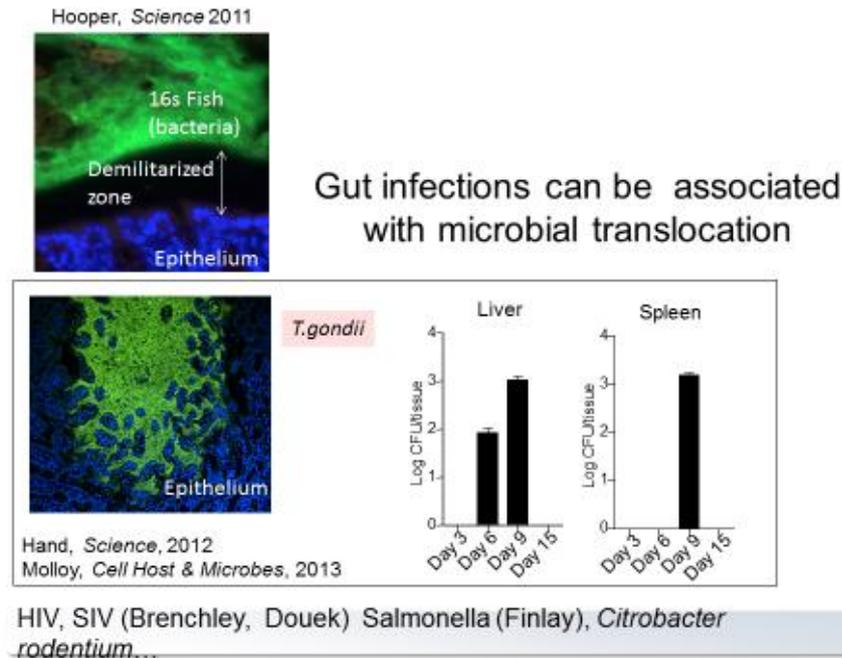
Des virus peuvent inverser la capacité des microbes à influencer le système immunitaire. Il faut comprendre le rôle des divers types de microbes. Certains seulement présents en petit nombre peuvent pousser la réponse immunitaire de façon spectaculaire.

L'association microbiote-pathogènes peut aussi être délétère ; certains pathogènes ont vraiment besoin du microbiote pour devenir infectieux. C'est le cas avec le *Réovirus* acquis par voie orale.

Des vers où les œufs de parasites peuvent avoir besoin des produits du microbiote comme le LPS, pour être capables d'éclore et de devenir infectieux

Dans certains cas, l'état de l'intestin peut contribuer à l'immuno-pathologie due à une infection. C'est la présence du mucus riche en HD et en peptides antimicrobiens, qui permet la séparation physique entre l'épithélium et les microbes.

Dans des contextes infectieux, la zone de séparation entre l'épithélium et les microbes est complètement éliminée.



En plus de ce contact, il y a aussi le passage de bactéries à travers l'épithélium qui peuvent devenir systémiques. Lors d'une infection aiguë dans l'intestin, le microbiote peut s'échapper et se retrouver dans une zone périphérique où il contribue à créer des inflammations.

Cela se vérifie dans beaucoup de processus infectieux. Le plus connu est le HIV SIV où la présence de produits microbiens est un des éléments qui contribuent à la dissémination du virus en maintenant l'inflammation périphérique. Lors de l'infection, la séparation entre le microbiote et l'hôte diminue du fait de l'inflammation. Le microbiote peut alors envahir le système périphérique.

Dans certaines infections, c'est l'expansion des microbes, comme *g-proteobacteria*, qui devient le facteur de l'inflammation. Ainsi, il y a plusieurs exemples dans lesquels la pathologie causée par l'infection n'est pas due au pathogène lui-même, mais à une croissance aberrante de certains microbes qui deviennent eux-mêmes agents de l'inflammation.

En conclusion de cette partie, il est important de se rappeler que toutes les étapes de la relation entre l'hôte et le pathogène sont contrôlées de façon directe ou indirecte par le microbiote :

- La transmission du pathogène peut être dans certains cas favorisée par sa présence

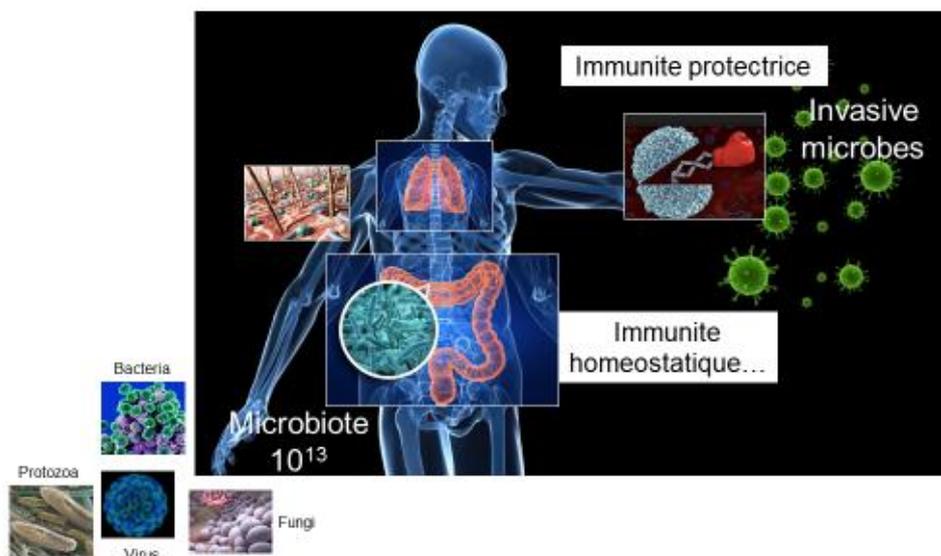
- Le contrôle de l'immunité et le développement lymphocytaire ou anticorps contre les pathogènes.
- La pathologie peut être amplifiée par la présence dans le microbiote, de certains microbes.
- Le rôle des commensaux dans la réparation tissulaire

Pour transférer ces résultats en traitement il est nécessaire de connaître des mécanismes d'interaction entre ces microbes et le système immunitaire.

Le type d'immunité développé contre ces microbes qui vivent avec nous de façon symbiotique est un élément peu compris

Nos connaissances du système immunitaire aujourd'hui proviennent essentiellement de l'immunité dans le contexte de systèmes infectieux.

## Comprendre les réponses immunitaires envers le microbiote



Des immunologistes ont dépensé énormément d'énergie pendant les 50 dernières années pour comprendre le système immunitaire dans un processus inflammatoire : comment se développe une réponse pour attaquer un pathogène ?

Cependant, la plupart des interactions développées de façon permanente entre le système immunitaire et les microbes sont celles avec les microbes qui ne sont pas invasifs, vivant en permanence sur la peau, dans l'intestin ou les poumons.

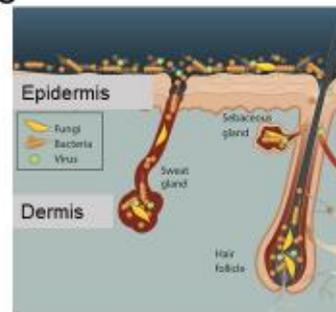
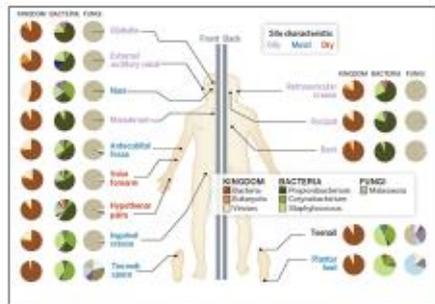
La nature de ce type d'immunité est peu connue. Nous en avons besoin pour comprendre l'inflammation tissulaire.

Pour étudier ces mécanismes nous avons décidé d'utiliser un modèle plus simple et plus accessible : le microbiote de la peau

Le travail de Julie SEGRE avait montré que la peau de l'être humain est un caléidoscope de communautés microbiennes contrôlées par la présence de substrats. Comme dans tous les autres tissus, lorsqu'il y a une inflammation, ce microbiote est changé de façon très importante.

Sur la peau, le nombre de bactéries présentes est très faible. C'est donc un environnement plus favorable pour l'étude des mécanismes d'interaction entre ces microbes et le système immunitaire.

## Le microbiote cutané contrôle l'immunité tissulaire/locale



Skin commensal niches  
Belkaid & Segre Science, 2014



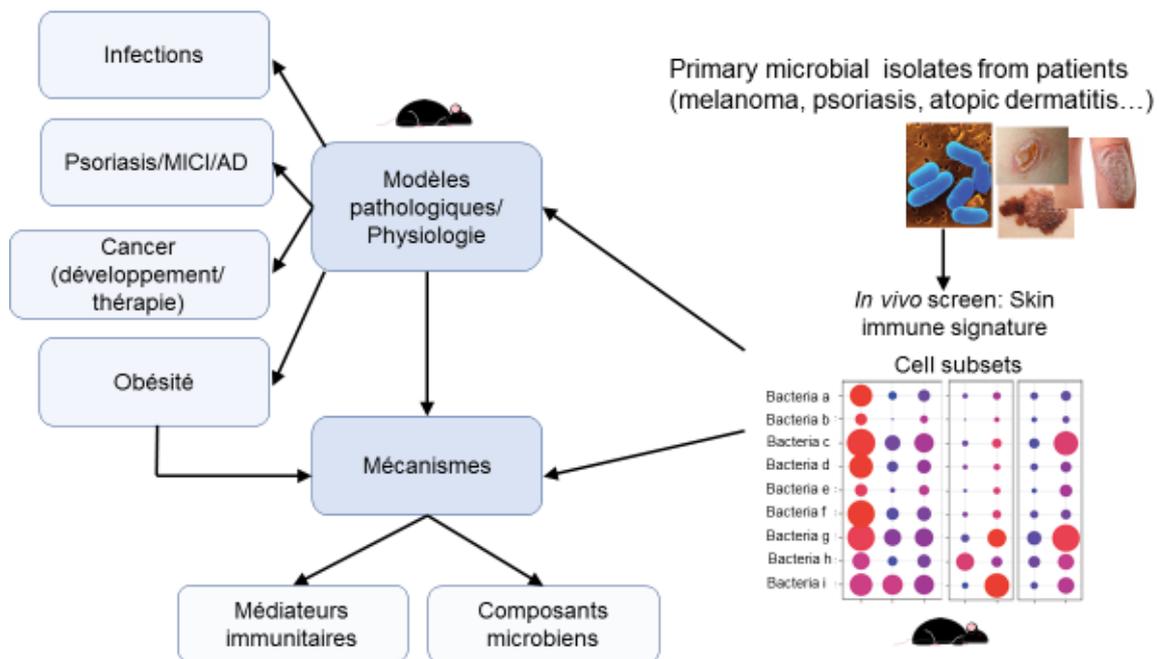
### Promote immunity to pathogens

Naik, Science, 2012

Une étudiante, Shruti NAIK, a montré que sur la peau, les microbes, lorsqu'ils étaient présents, étaient capables d'influencer la qualité et la fonction des cellules dans les tissus. Cela avait pour conséquence d'aider la peau à se protéger des infections. Ces commensaux présents à l'intérieur du tissu au niveau des follicules pileux ou des glandes sébacées, bien qu'en très petit de nombre, sont toutefois extrêmement actifs sur le système immunitaire.

Il s'agissait d'établir si des éléments de ce microbiote ont des effets dominants sur le système immunitaire cutané.

A partir d'individus soit sains soit avec des inflammations causées par des cancers (mélanomes), des psoriasis ou des infections, des microbes ont été isolés, identifiés et appliqués à la surface de la peau saine de souris, pourvues de leur microbiote. Ces animaux ne sont pas « *germ free* ». Les microbes sont appliqués à une densité comparable à celle observée chez les individus.



Cette approche a permis d'établir des signatures associant certains types de microbes à des cellules immunitaires particulières.

Nous avons pu voir que des microbes de la peau sont capables d'activer un seul type de cellules à la fois. Par exemple, *Corynebacterium* n'active que les lymphocytes gamma/delta.

Ce matin nous nous sommes questionnés sur l'interaction microbiote-pathologie en termes de causalité versus corrélation.

**Nous avons pu montrer par l'expérience suivante que le microbiote peut être la cause de pathologies.**

Allyson BYRD, étudiante en thèse avec Julie SEGRE et Heidi KONG ont fait une analyse métagénomique d'enfants détectés avec une dermatite atopique très sévère. Elles ont confirmé qu'elle s'accompagne d'une colonisation très importante de *staphylococcal virus*. L'approche métagénomique a mis en évidence que les enfants les plus sévèrement atteints étaient mono-colonisés par un seul isolat de *staphylococcal virus*.

Ils deviennent complètement couverts par cette bactérie lors de la poussée inflammatoire.

Cela a permis à Allyson BYRD de purifier ces bactéries, de les isoler, de les séquencer et puis de les utiliser dans un système expérimental pour examiner si ces bactéries avaient une façon particulière d'interagir avec le système immunitaire.

Elle a démontré qu'en appliquant les isolats de ces bactéries à la surface de la peau d'une souris parfaitement saine, ils sont suffisants pour recréer une inflammation.

Donc, dans certains cas, ce qui n'est sans doute pas la norme, des bactéries particulières sont capables de causer une poussée inflammatoire des tissus par elles-mêmes, cela même en l'absence de prédisposition génétique.

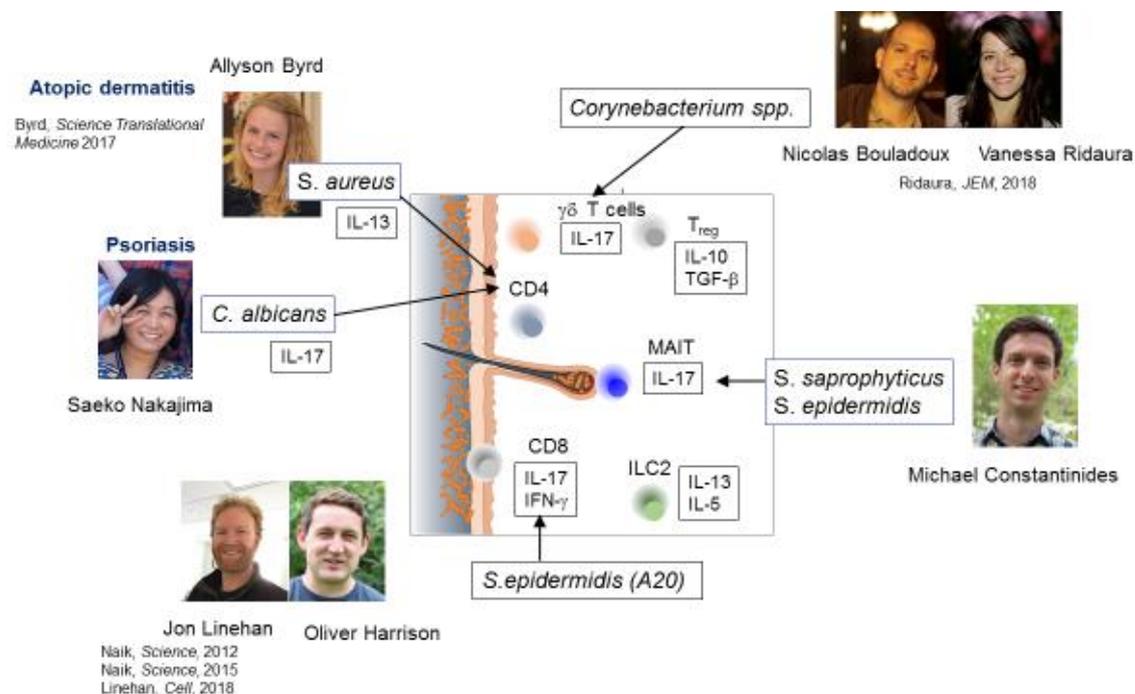
Les lymphocytes qui infiltrent la peau de ces souris sont surtout des cellules TH2 et aussi des cellules qui produisent IL17, très importantes dans la pathologie humaine.

Vanessa RIDAURA a répété ce *screening in vivo*, sur la peau de souris avec des corynebactéries qui sont très présentes au niveau de la peau humaine.

Ces bactéries sont toutes capables d'activer les lymphocytes T $\gamma$  de façon très précise et uniquement ceux-là.

Un autre type de corynébactéries, déficientes au niveau de l'enveloppe cellulaire en acide mycolique, n'était plus capable d'activer ces lymphocytes. L'acide mycolique joue donc un rôle très important pour cette communication, résultat confirmé à l'aide d'un mutant qui ne peut plus produire de l'acide mycolique.

Donc dans certains cas, avec suffisamment de bactéries pour analyser leur fonction *in vivo*; on peut identifier les molécules utilisées par ces bactéries pour communiquer avec le système immunitaire.



Dans la plupart des cas, lorsque nous associons les microbes de la peau avec des peaux saines, il n'y a pas d'inflammation, nous voyons une augmentation de ces populations IL17, mais celles-ci ne sont pas inflammatoires.

Cela peut changer en fonction du contexte de l'hôte.

Ainsi nous savons très bien que le fait d'être obèse peut avoir des conséquences néfastes sur l'inflammation de la peau. Il y a une difficulté à contrôler des lésions, les infections. C'est vrai aussi pour l'intestin.

Dans l'expérience suivante, les souris sont, soit nourries avec une diète normale, soit riche en lipides. Après quelques semaines, on associe la peau des souris avec des *Corynebacterium*. Sur les souris nourries avec une diète normale, il n'y a pas d'inflammation. Sur celles avec la diète riche en lipides, l'association avec ce microbe induit une inflammation.

Ainsi un simple changement de diète peut complètement altérer la rencontre avec un nouveau microbe. Même en réduisant cette diète à 2 semaines seulement, avant d'associer le microbe, il se produit un processus inflammatoire.

**L'interaction d'un microbiote avec un simple changement en diète, même dans un tissu comme la peau, peut avoir des conséquences néfastes sur l'inflammation.**

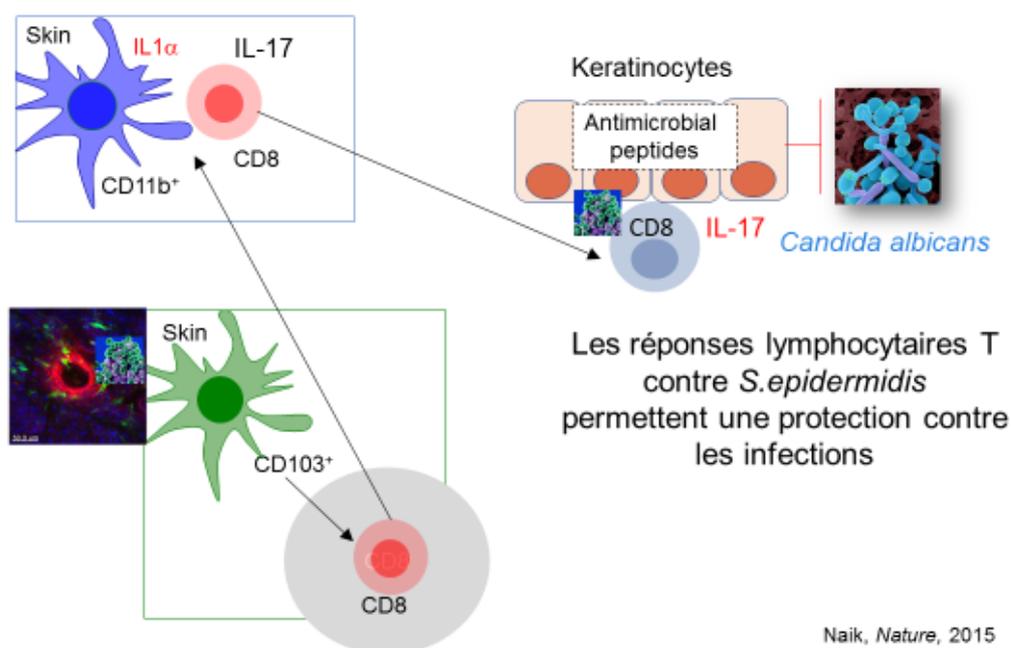
Le microbiote vit dans un continuum d'interactions et nombre de circonstances peuvent transformer des partenaires en agresseurs. Des prédispositions génétiques par exemple, mais également d'autres éléments comme l'âge, le métabolisme, la génétique et même un simple changement de diète.

Un autre exemple d'association précise entre les bactéries et le système immunitaire est avec *Staphylococcus aureus*. Une étudiante du laboratoire a montré que ces bactéries appliquées dans la peau, étaient capables d'augmenter la réponse CD8 de façon très spécifique. Ces CD8 s'accumulent au niveau de l'épiderme et produisent des cytokines IL17 et de l'interféron gamma et cela sans inflammation.

Dans ce cas précis, le système immunitaire est capable de rencontrer ce nouveau microbe, d'augmenter l'immunité tissulaire, mais sans déclencher un processus inflammatoire. C'est très différent de la rencontre classique entre un pathogène et le tissu.

La représentativité du modèle souris a été discuté dans la matinée Il peut y avoir des sceptiques dans la pièce comme je l'ai été. Peut-on avec ces microbes de l'homme sur la souris avoir des informations extrapolables ? Nous avons fait la même expérience avec des macaques. Nous avons pris de la peau et examiné le système immunitaire au préalable. Nous avons appliqué le *Staphylococcus aureus* sur la peau et 2 semaines plus tard examiné le résultat. Comme chez la souris, elle augmente la réponse IL17, CD8, mais aussi le nombre des cellules présentes.

Allison BYRD a testé beaucoup de *Staphylococcus aureus* obtenus de la collection de Julie SEGRE du NIH. Elle a montré que la capacité de *Staphylococcus Epidermidis* à engager cette réponse CD8 était restreinte à un clade de *Staphylococcus Epidermidis* très particulier, hautement représenté chez les gens qui ont une peau saine. Cela nous a permis de montrer que l'induction des CD8, est due à un prophage intégré dans la bactérie. On a pu éliminer les régions d'intégration et confirmer le mécanisme utilisé par les bactéries pour manipuler le système immunitaire.



Comment ces bactéries peuvent-elles augmenter la réponse CD8 ? En vivant dans les follicules pileux elles activent les cellules dendritiques qui se trouvent autour de ces follicules et dans le ganglion où elles engagent les réponses CD8. Ces CD8 vont dans la peau, activés par un autre type de cellules dendritiques ils produisent une cytokine appelée IL1. Ils s'infiltrent ensuite dans l'épiderme, entre les kératinocytes, produisent IL17 et sont en capacité d'augmenter la production de peptides antimicrobiens. Ces derniers permettent à l'hôte d'être mieux protégé contre une infection, comme les *Candida Albicans*.

Cela a été également montré dans une infection par staphylocoque.

**Une réponse adaptative à un microbe de la peau peut avoir pour conséquence d'augmenter la réponse innée contre d'autres pathogènes et protéger des infections.**

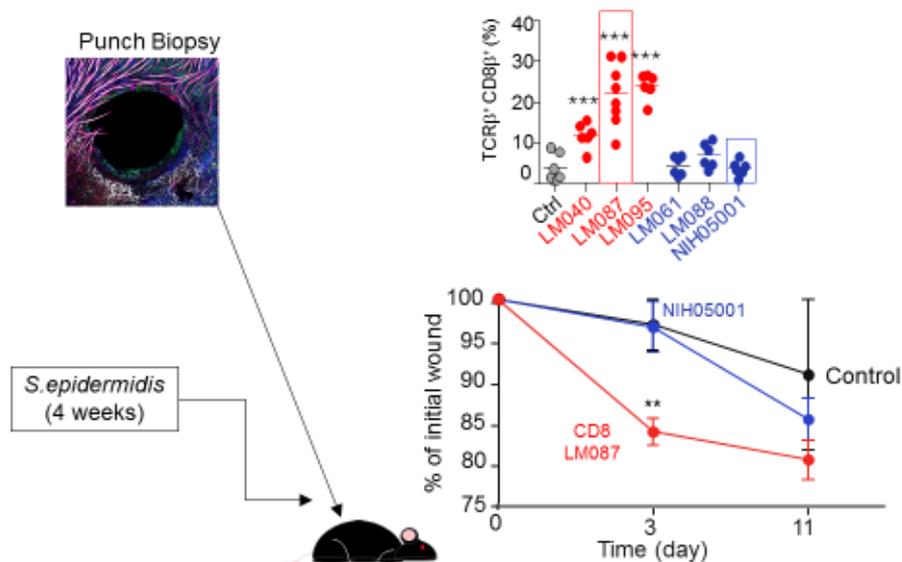
Pour comprendre ce qui différencie les réponses contre des pathogènes, de celles vis-à-vis des commensaux, l'approche utilisée a été de purifier des lymphocytes générés contre un pathogène, l'herpès présent dans l'épiderme et ceux générés contre des commensaux.

Lorsqu'on compare l'expression de gènes par ces lymphocytes générés dans ce type de conditions, ceux générés dans le contexte d'une rencontre avec des microbes commensaux expriment beaucoup de molécules associées à la réparation tissulaire. Elle est plus le fait de macrophages, de fibroblastes que des lymphocytes.

Nous avons vérifié si des lymphocytes générés contre certains microbiotes pouvaient aider la réparation tissulaire. Pour cela nous avons fait une biopsie dans la peau des souris. Elles ont été associées 4 semaines avec *Staphylococcus Epidermis*. Avec la bactérie qui peut induire des CD8, il y a une accélération de la fermeture de la

lésion. Elle n'est pas observée si les souris sont associées avec une bactérie qui ne peut pas induire de CD8.

## Rôle de l'immunité envers les commensaux dans la réparation tissulaire



Cela veut dire de façon corrélative que ces bactéries induisant des CD8 ont également la capacité d'accélérer la réparation tissulaire, processus fondamental pour la survie de l'hôte.

Si l'on regarde la prolifération des kératinocytes, les souris associées avec *Staphylococcus Epidermis* qui induit des CD8, présentent une accélération du processus avec une fermeture plus rapide de la lésion. Cela peut être quantifié

Ces conclusions sont également valables pour l'intestin.

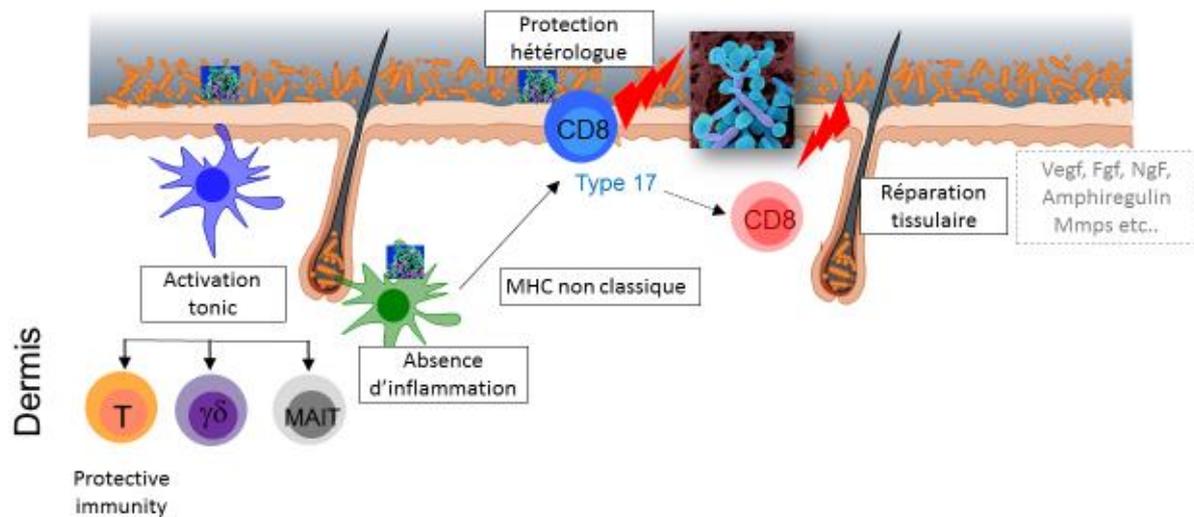
Le microbiote peut agir sur le système immunitaire au travers de nombreux mécanismes. Certains ont été illustrés dans cette présentation, mais il y en a d'autres.

On a une augmentation de l'inflammation tonique, mais ce n'est pas un vrai processus inflammatoire, il n'y a pas de recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu.

Dans certains cas, les bactéries sont détectées par le système immunitaire en utilisant des molécules MHC qui ne sont pas les mêmes que celles utilisées dans le contexte de la rencontre avec les pathogènes. Ceci montre que le langage utilisé entre le microbiote et le système immunitaire est distinct de celui utilisé avec les pathogènes.

Dans l'exemple précédent, des lymphocytes CD8 s'accumulent dans la peau, mais cela peut être aussi des CD4 induits par SFB. Ils sont capables d'augmenter la réponse tissulaire par l'accroissement de la quantité de peptides antimicrobiens par les kératinocytes. Cela a un effet positif sur l'hôte contre les infections

## Immunité homéostatique envers le microbiote



En addition de cette réponse protectrice, ces lymphocytes ont d'autres fonctions physiologiques. Ils sont capables de promouvoir des processus réparateurs. Cela montre clairement que la réponse contre les microbiotes a des particularités distinctes de la réponse contre les pathogènes. En explorant ce type de relations, on peut commencer à comprendre comment manipuler le système immunitaire de l'hôte de façon précise, physiologique. Cela peut avoir des conséquences importantes pour le développement de nouveaux adjuvants pour les vaccins, de meilleurs traitements contre les pathogènes ou pour l'amplification de réponses pour le traitement de cancer.

Les recherches sur le microbiote sont un travail d'équipe. Tous nos travaux ont été conduits avec de nombreuses collaborations, en particulier celui de Julie SEGRE de NHGRI. Je remercie Michael FISCHBACH, spécialiste de la production de *natural product*, absolument nécessaire pour la compréhension de l'interaction entre les microbiotes et l'hôte. J'ai également montré le travail de John LINEHAN et Seong-Ji HAN.

Je remercie bien sûr les personnes de mon laboratoire à l'origine de ces résultats. Certains sont partis depuis et ont créé leur propre groupe.

Je vous remercie de votre attention.

*(Applaudissements)*

**Marc BONNEVILLE** - Dans les situations où certaines bactéries ont des effets pathogènes, ces mécanismes d'activation du système immunitaire peuvent-ils être observés dans d'autres tissus ?

En d'autres termes, peut-on utiliser le microbiote cutané comme un modèle pour évaluer de façon plus simple des effets pathologiques de certaines souches ?

**Yasmine BELKAID** - L'exemple que j'ai donné est extrême et doit être relativement rare. Dans la plupart des cas, les bactéries font partie d'éléments complexes comme la prédisposition génétique, la nutrition, etc.

Mais certaines bactéries ont des propriétés extraordinaires pour engager le système inflammatoire. On peut très bien penser qu'il existe des équivalents au niveau du poumon ou de l'intestin.

Peut-on généraliser ce résultat sur la peau à l'intestin ? Peut-être...

La relation entre la peau et le microbiote est plus simple car il y a bien moins de redondances et d'inflammations. L'intestin est un système plus complexe. Il faut examiner si les principes sont généralisables et si les molécules que nous avons identifiées peuvent aussi avoir un rôle.

Les tissus communiquent pendant l'inflammation. Lorsqu'une réponse adaptative à un microbe se produit dans la peau et que ce microbe est également présent dans l'intestin, il y a communication entre les deux organes. Il est possible que lorsque des systèmes inflammatoires sont générés dans l'intestin ou la peau, ils aient des effets périphériques parce que les microbes sont partagés et les lymphocytes circulent entre les deux tissus.

**Marc BONNEVILLE** - Avec les corynébactéries qui induisent des réponses *T gamma delta*, ces réponses cutanées sont-elles retrouvées dans d'autres territoires ?

**Yasmine BELKAID** - Les *Corynebacterium* induisent des *T gamma delta* qui circulent et se retrouvent dans le poumon. Si on utilise des modèles d'asthme avec des souris qui ont été associées à des *Corynebacterium* dans leur peau, l'asthme devient plus grave.

Cela veut dire que certaines bactéries ont la capacité de forcer un dialogue entre certains tissus, avec une protection systémique dans un contexte de maladies infectieuses. Ce serait un système préemptif pour éliminer le sepsis par exemple. Mais il peut également y avoir des manifestations néfastes dans le contexte inflammatoire.

**Daniel LOUVARD** - Pour la réponse du lymphocyte lors de la réparation cellulaire ou tissulaire.

Savez-vous sur quel type cellulaire agit-on ? Est-ce sur la cellule épithéliale en induisant un EMT transitoire ou sur les myofibroblastes ?

**Yasmine BELKAID** - Oui. La cible de façon surprenante est le muscle attaché au follicule pileux. L'amphyréguline produite en partie par ces lymphocytes a la capacité de promouvoir la réparation du muscle lui-même. C'est vraiment une cible très particulière. Nous avons regardé d'autres types de cibles, nous n'avons pas vu de différence sur l'épithélium. C'est vraiment une question de contraction de la lésion.

**Daniel LOUVARD** - C'est vraiment une cellule musculaire, pas myofibroblaste ?

**Yasmine BELKAID** - Non. En tout cas, nous ne l'avons pas vu.

**Jean SALENÇON** - Vous avez mentionné à plusieurs reprises les traitements contre le cancer.

Quel est l'effet d'une radiothérapie sur un microbiote épidermique ou intestinal ?

**Yasmine BELKAID** - Un très joli travail avait été mené il y a une dizaine d'années par Nicholas RESTIFO, le premier qui a irradié de façon expérimentale les souris. Il utilisait le *cell-transferred* depuis longtemps et montrait que la translocation microbienne était énorme juste après une radiation et aidait à la protection contre les tumeurs.

Chaque fois qu'il y a une irradiation, il y a une perméabilisation des barrières et les produits microbiens sont capables de pénétrer. Ils font partie de l'environnement systémique.

Sur la base de ce genre de travail, beaucoup d'autres ont eu lieu. Laurence ZITVOGUEL en France développe ce genre de thématique, la présence du microbiote comme adjuvant endogène.

De façon expérimentale, c'est extrêmement clair. Des émergences d'associations cliniques sont en train d'être développées. Mais chaque irradiation a des effets absolument dramatiques sur le microbiote et sur sa relation avec l'hôte parce que la perméabilité des muqueuses est affectée.

**Philippe SANSONETTI** - Si on analyse expérimentalement et génomiquement le clade de *S. Epidermidis* avec cette capacité inductrice particulière, que se passe-t-il ? Se replie-t-il plus et plus profondément dans la peau ? Exprime-t-il des facteurs que l'on pourrait considérer comme des facteurs de pathogénicité, une toxine ou une hémolysine, ce qui n'est pas vraiment le cas de *S. Epidermidis* ?

A-t-on omis quelque chose dans *Epidermidis* qui se révèle dans cette situation particulière ?

**Yasmine BELKAID** - Énormément de choses sont différentes. L'un des objectifs du futur est de comprendre si les bactéries se multiplient ou si elles sont dans leur niche écologique. Nous n'avons pas vraiment de connaissance précise. Y a-t-il une différence de micro-colonisation et d'association ? Nous ne le savons pas.

Mais nous savons que lorsque nous avons ce prophage, il y a une activation du phagocyte dans l'hôte. Il y a donc une forme de reconnaissance. Est-ce une production du phage lui-même qui interfère avec le système immunitaire, qui peut même être reconnu ? Nous savons que, quand on élimine certaines régions, on élimine l'effet. Nous savons qu'une sorte de réponse antivirale se produit lorsqu'on a une réponse immunitaire contre *S. Epidermis*.

**Pascale COSSART** - Sait on si les produits de transcription de ce phage sont éventuellement relargués ?

**Yasmine BELKAID** - Nous ne le savons pas. Nous pouvons les retrouver *in vitro* mais nous ne pouvons pas le faire *in vivo*. La biomasse est tellement faible qu'il n'existe pas encore de méthode.

**Dusko EHRLICH** - Vous avez parlé de mutant de la production d'acide mycolique. Je me suis demandé si d'autres effets sur l'hôte pourraient expliquer vos observations ? L'élimination des capacités de production d'acide mycolique peut-elle impacter la biologie de la bactérie ?

**Yasmine BELKAID** - Nous avons également réussi à montrer cette activation *in vitro*. Effectivement chaque fois que l'on manipule une bactérie, surtout une bactérie du microbiote, et que l'on enlève un élément fondamental de l'enveloppe, on peut aussi altérer son comportement. Nous avons fait des essais *in vitro* qui montrent que la présence de cet acide est importante pour l'activation des T *gamma delta* indépendants.

Mais votre point est tout à fait valide. Quand on travaille avec le microbiote ; Penser à ce que l'on fait sur l'écologie et le comportement de la bactérie est très important.

**Mme CHOUBANE** - Y a-t-il un lien entre les lymphocytes T régulateurs, le microbiote et la prévention de certaines maladies auto-immunes ou des cancers ?

**Yasmine BELKAID** - Nous avons démontré, ainsi que d'autres, qu'il existe effectivement une induction de cellules régulatrices, qui se produit tout le temps. Une partie de la tolérance à ces microbes est l'induction constante d'éléments T régulateurs. Pour d'autres questions, il a pu être montré de façon expérimentale que des réponses aberrantes aux régulatrices peuvent avoir des conséquences sur les maladies inflammatoires et la réponse aux microbes.

Nous pourrions en discuter après plus longuement.

*(Applaudissements.)*



*Michel NEUNLIST*

*Institut des Maladies de l'appareil digestif*

*CHU et Université de Nantes*

**Jean-Pierre DÉCOR** - Monsieur NEUNLIST, vous dirigez l'unité de recherche en neuro-gastro-entérologie à la faculté de médecine de Nantes.

La relation double flux intestin-cerveau est une véritable autoroute à 4 voies (sanguine, immunitaire, endocrinienne et nerveuse). Elle a été médicalement bien établie.

Le fait nouveau, depuis quelques années, est que le microbiote créerait des interférences sur cette autoroute. En effet, des études rendent compte d'une relation possible entre le déséquilibre du microbiote et certaines maladies neurologiques ou neuropsychiatriques.

Qu'en est-il réellement ?

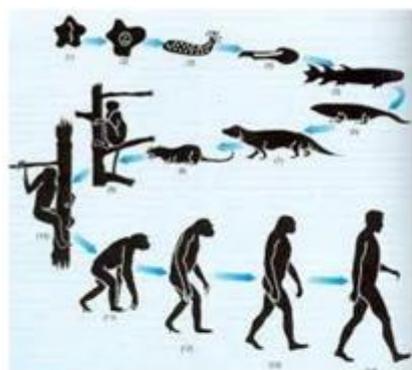
**Pr NEUNLIST** - Merci pour cette invitation. C'est pour moi un grand plaisir d'être parmi vous. Je ne suis pas microbiologiste. Ma présentation sera donc principalement centrée sur les données émergentes montrant qu'il existe une communication tripartite entre l'intestin, le cerveau et l'environnement, en particulier le microbiote. Ces interactions, à la base du développement de ces 2 organes, l'intestin et le cerveau, sont aussi des éléments contributifs au développement de certaines pathologies du cerveau neurodégénératives ou neuropsychiatriques.

Ma présentation est structurée selon 4 axes :

1. Un historique de l'axe intestin-cerveau, montrant comment ces 2 organes ont évolué de manière très étroite ;
2. L'existence d'un deuxième cerveau dans l'intestin et sa raison d'être ;
3. Les maladies du cerveau, de plus en plus reconnues comme des maladies systémiques, sont aussi des maladies digestives et en particulier du système nerveux entérique ;
4. Enfin, l'implication du microbiote intestinal dans le développement des pathologies du système nerveux central.

Le cerveau et l'intestin sont 2 organes étroitement connectés car ils ont assuré les fonctions essentielles à la survie de tous les organismes au cours de l'évolution. L'intestin fournit l'énergie indispensable et le cerveau a permis aux espèces de s'adapter aux modifications de l'environnement.

## Le cerveau et l'intestin : deux organes clefs de l'évolution et connectés....

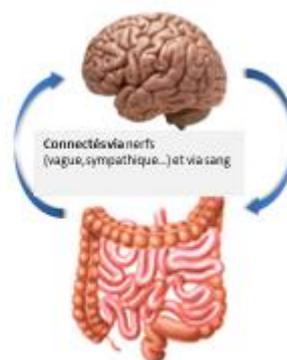


Survie (reproduction) et adaptation à l'environnement

**Hypothalamus** (prise alimentaire - satiété)

**Hippocampe** (formation de la mémoire)

**Amygdale** (agressivité - peur)



Les structures primitives du système limbique sont mises en jeu par exemple lors de la recherche de la nourriture :

- ✓ L'hypothalamus régule la prise alimentaire, la satiété ;
- ✓ L'hippocampe participe à la formation de la mémoire. En effet, il fallait se souvenir dans les temps primitifs où se trouvait la nourriture que ce soit pour la chasse ou la cueillette ;
- ✓ L'amygdale mise en jeu face aux prédateurs, car parfois la fuite était la seule issue...

Ces structures, communes à toutes les espèces, sont associées de manière extrêmement étroite à l'intestin via des voies nerveuses, humorales et sanguines. Il existe une véritable interaction entre ces 2 organismes. Avec la complexification des tâches, ces interactions entre l'intestin et le cerveau, ont perduré au cours de l'évolution.

L'intestin ou le tube digestif est l'organe central chez les organismes primitifs comme les hydres, les cnidaires ou les nématodes. Ce n'est qu'au cours de l'évolution que d'autres organes sont apparus comme le cœur et les poumons pour la diffusion de l'oxygène

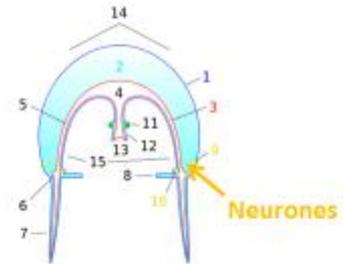
L'intestin est l'organe autour duquel s'est structuré l'ensemble de la vie.

Le tube digestif est le premier organe neurologique apparu au cours de l'évolution. L'ancêtre des cnidaires, des anémones de mer ou des méduses est un fossile trouvé en Chine de plus de 500 millions d'années. Les méduses restent des témoins de ce passé. Elles sont principalement constituées d'un tube digestif avec les premiers neurones.

## Le tube digestif : premier organe neurologique de l'évolution

### LETTER

Micofaunal deuterostomes from the basal Cambrian of Shaanxi (China)



Le tube digestif et le cerveau ont des similitudes d'un point de vue anatomique. On retrouve les mêmes constituants cellulaires, les mêmes acteurs moléculaires. Conceptuellement, on peut imaginer que les facteurs environnementaux qui vont agir sur le tube digestif pourront également moduler les fonctions du système nerveux entérique et même certaines du système nerveux central.

Pourquoi avoir besoin d'un cerveau dans l'intestin ?

Au cours de la vie, on absorbe environ 30 tonnes d'aliments, 50 tonnes de liquides divers. Cela met en jeu des processus extrêmement complexes :

- De transport vers les sites spécialisés d'absorption des différents types de nutriments ;
- Des mécanismes d'absorption de ces nutriments réalisés par la monocouche des cellules épithéliales intestinales qui composent une surface d'environ 400 m<sup>2</sup> ;
- D'autres fonctions de barrière, de réparation mises en jeu en permanence, la sécrétion de différents mucus, de peptides antimicrobiens. Les cellules immunitaires sont l'une des composantes importantes de cette barrière épithéliale intestinale.
- Le microbiote, acteur clé de l'intestin

## Pourquoi avoir un système nerveux dans l'intestin ?

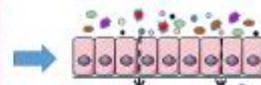
30 tonnes d'aliments  
50 tonnes de liquides



1- Transport



2- Absorption des nutriments / minéraux / électrolytes



Cellules épithéliales intestinales

3- Barrière / fonctions immunes



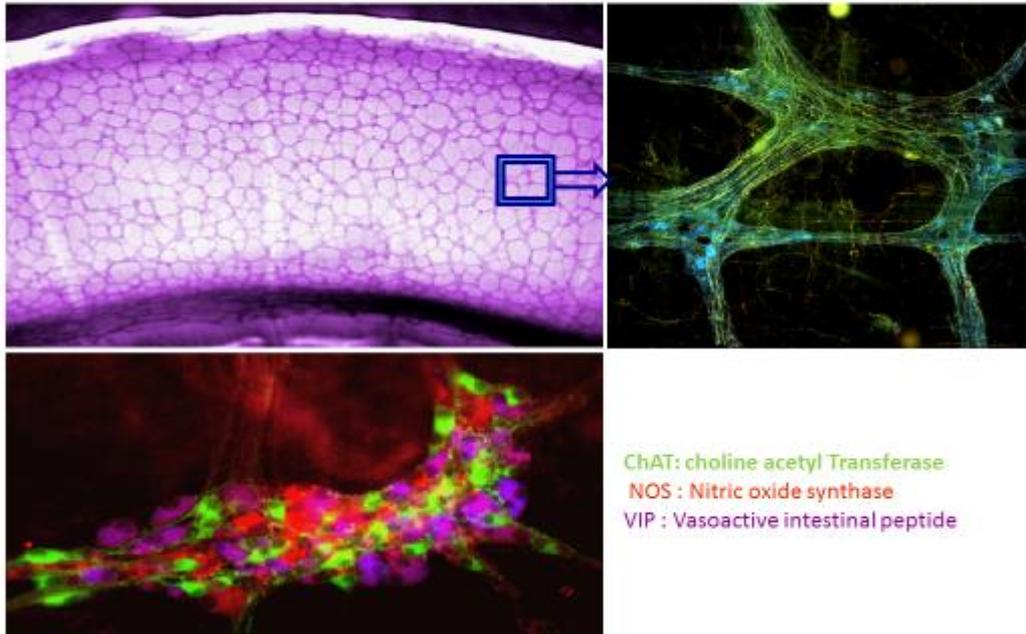
Microbiote



Pour illustrer l'autonomie du système nerveux entérique, un segment d'intestin prélevé est fonctionnel : il est capable de propulser dans le sens oro-anal l'aliment et de manière répétée en l'absence de toute connexion avec le système nerveux central. En revanche, si vous introduisez un inhibiteur d'activité neuronale tout mouvement cesse.

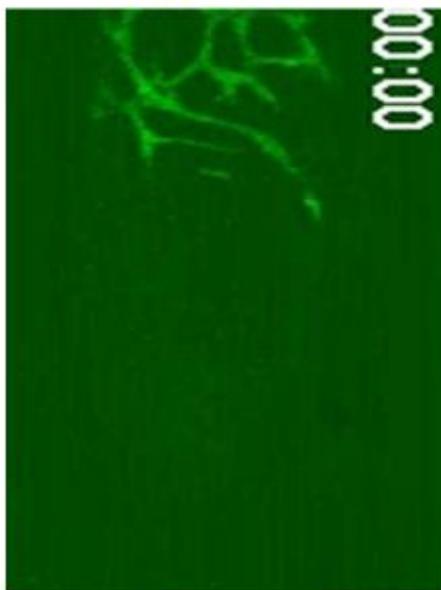
Ce résultat est lié à un système nerveux spécifique présent tout le long du tube digestif. Un marqueur de neurone fait apparaître une structure pavimenteuse tapissant l'ensemble du tube digestif. Cette structure principalement bidimensionnelle contient environ 200 millions de neurones, certes 1 000 fois moins que dans le cerveau, mais son contenu en neurotransmetteurs représente toute la diversité présente dans le cerveau.

## Le système nerveux entérique

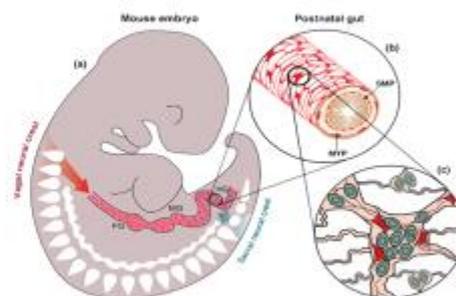


Les travaux précurseurs de Mme LE DOUARIN ont mis en évidence la genèse du système nerveux à partir de cellules de la crête neurale. En se détachant de la plaque neurale elles vont coloniser de manière très précoce l'ensemble du tube digestif. Entre 4 et 7 semaines après la conception, l'ensemble du tube digestif est colonisé. C'est un des systèmes nerveux qui mature le plus rapidement car le tube digestif doit être fonctionnel dès la naissance.

## Origine et développement du SNE.....



Nyshiyama et al., *Nat Neuroscience*, 2012



Heanue TA, Pachnis V, *Nat. Rev. Neurosci.* 2007

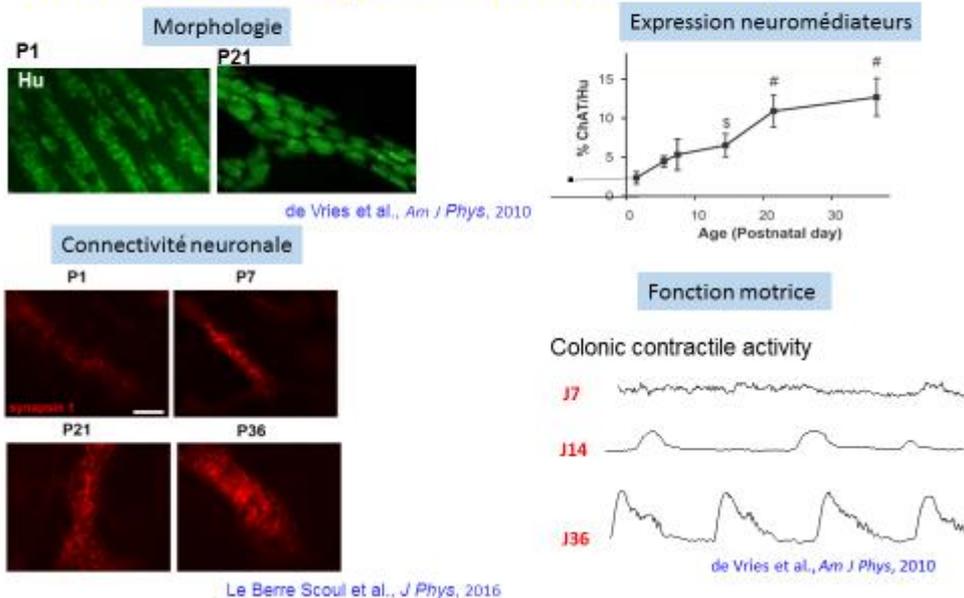
Goldstein and Burns, *Clinical Genetics*, 2012

- Colonisation de l'intestin par les cellules des crêtes neurales (E9-15 souris; W4-7 Homme)

Cette période périnatale reste importante pour la construction de ce système nerveux entérique. Le microbiote intestinal va également jouer un rôle important de modulation. C'est un système extrêmement plastique. Les neurones au sein du tube digestif évoluent à la fois en taille et fonctionnellement. L'un des aspects nécessaires à la régulation des fonctions motrices est leur capacité à synthétiser des neuromédiateurs, mais aussi à mettre en place les structures permettant leur libération, en particulier à travers les vésicules et synapses. Il se produit la mise en place d'une véritable connectivité neuronale au cours de cette période.

L'ensemble de cette maturation phénotypique et fonctionnelle conduit au développement et à la mise en place progressive des fonctions digestives.

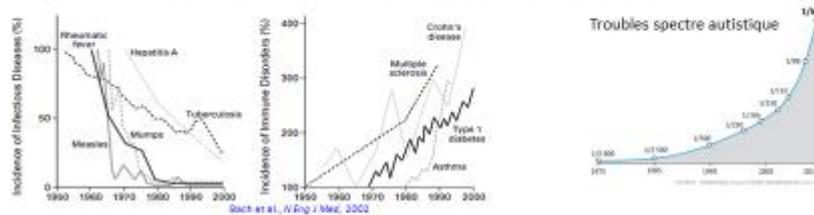
## La période périnatale : une période clef de la construction du système nerveux entérique.....



### Les maladies du cerveau sont-elles aussi des maladies de ce deuxième cerveau et du tube digestif ?

Il faut d'abord se rappeler que l'intestin est probablement au cœur de pathologies chroniques. Un schéma déjà repris par plusieurs orateurs traduit l'évolution inverse des maladies infectieuses et des pathologies chroniques au cours de ces 50 dernières années avec une augmentation exponentielle de la sclérose en plaques, de la maladie de Crohn, du diabète de type I ou de l'asthme.

## L'intestin (et la barrière intestinale) : au coeur des pathologies chroniques ?



Si l'on considère les pathologies du trouble du spectre autistique, leur fréquence est extrêmement importante atteignant actuellement une naissance sur 68. Il y a 40 ans, elle était considérée comme une maladie rare. Cette augmentation de la prévalence peut en partie s'expliquer par l'amélioration des tests diagnostiques, mais pas uniquement car ils sont utilisés depuis les années 90. Pour les maladies chroniques, il y a aussi probablement des facteurs génétiques de susceptibilité mais aussi des facteurs environnementaux lorsqu'elles ont lieu à des âges particuliers de la vie.

L'origine épigénétique des maladies peut être schématisée par l'illustration précédente : Les gènes sont représentés par une montagne et des vallées et la vie par la bille. En fonction du vent qui va souffler, la bille va suivre l'une ou l'autre des vallées symbolisant soit la longévité ou le développement d'une maladie...

Nous savons que parmi les facteurs environnementaux figurent le microbiote, les polluants, le stress, les pathogènes ou l'alimentation.

À certaines périodes de la vie, ces facteurs environnementaux sont plus à même de provoquer le développement de la maladie. C'est essentiellement chez les sujets jeunes ou, au contraire, chez les personnes plus âgées.

Ce qui place l'intestin au cœur de ces maladies chroniques est le fait qu'elles sont associées à ce que l'on appelle communément le « *leaky gut* » à des altérations du transit.

Elles s'accompagnent chez l'homme de modifications de la fonction de barrière caractérisées par la perméabilité ou des altérations des processus de réparation.

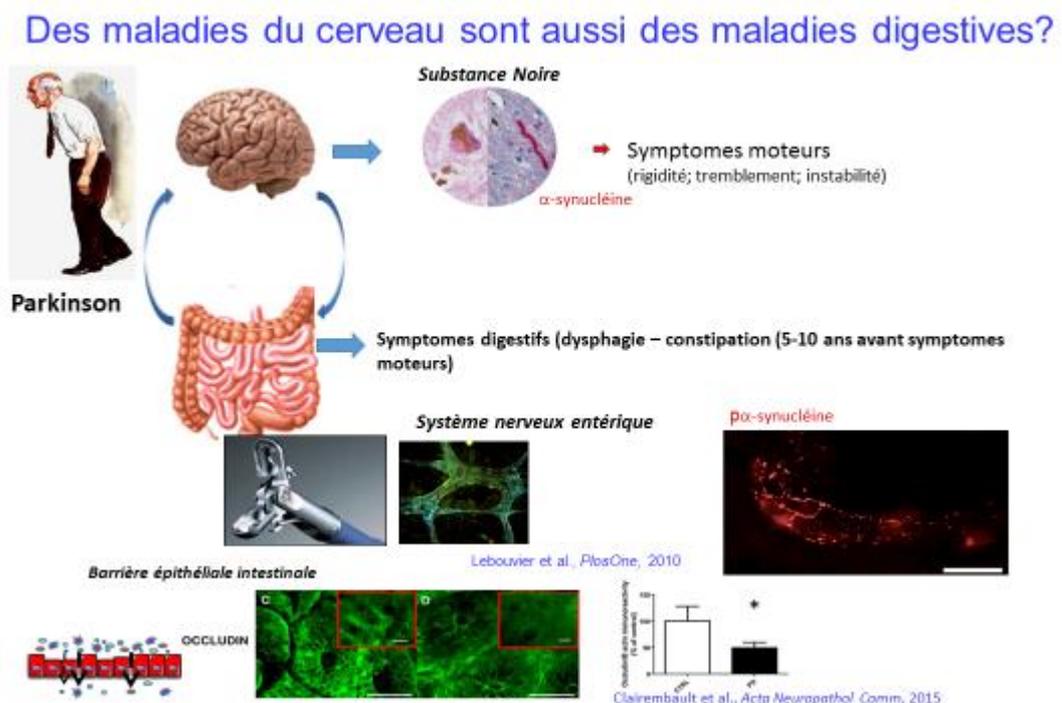
Au vu du rôle central joué par le système nerveux entérique, la question est de savoir si ces maladies chroniques ne sont pas aussi des maladies de ce système nerveux de l'intestin et **quel est le rôle joué par le microbiote**.

Je vais essayer d'illustrer ceci de manière plus spécifique à travers deux grands types de pathologies, les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et les maladies psychiatriques comme la maladie du trouble autistique.

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire, qui sont à l'origine de troubles moteurs et de problèmes de rigidité, de tremblements et de stabilité posturale. Un des marqueurs clé est la présence d'agrégats d'alpha-synucléine sous une forme phosphorylée au sein de la substance noire.

Cette maladie peut se déclarer parfois 5 à 10 ans avant l'apparition des troubles moteurs. Elle se manifeste alors par des symptômes digestifs, des problèmes de dysphagie, de constipation. Il peut y avoir aussi des troubles de l'olfaction et du sommeil.

L'idée était d'examiner si, dans ces maladies du système nerveux central, on pouvait retrouver les mêmes lésions dans le tube digestif. Par simple biopsie, Pascal DERKINDEREN de notre unité a mis en évidence au sein du tube digestif des atteintes semblables à celles présentes dans la substance noire et dont la sévérité était corrélée à celle de la maladie.

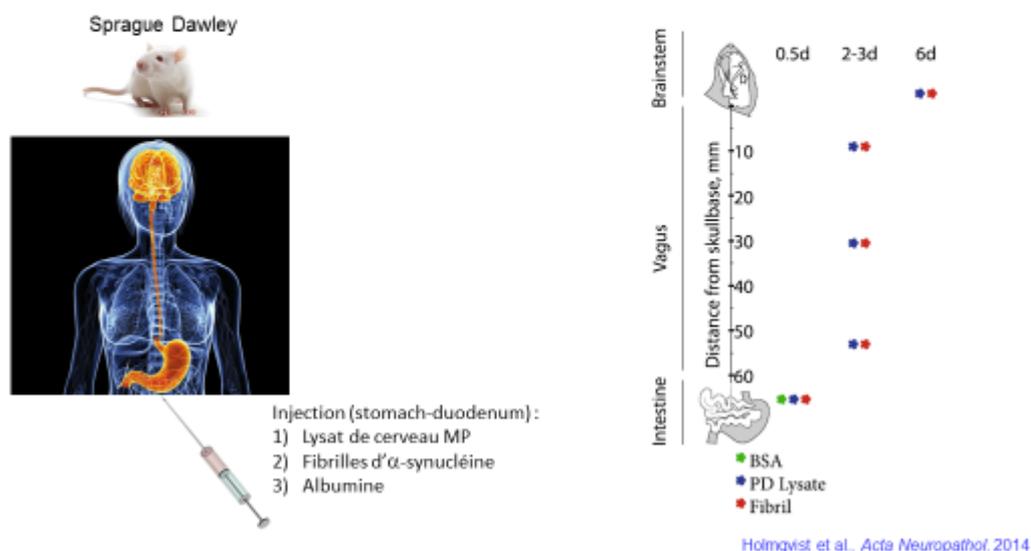


On a décelé des altérations de la barrière épithéliale intestinale caractérisées par des modifications de l'expression de protéines comme l'occludine qui régule les jonctions serrées.

Pour aller plus avant dans l'hypothèse du rôle du tube digestif dans le développement de cette maladie, nous avons examiné le rôle de l' $\alpha$ -synucléine. Son rôle physiologique normal est de participer au processus de neurotransmission. Elle fait partie des synapses. Il a été démontré que, dans certains contextes physiopathologiques, elle peut former des fibrilles, comme dans le cas du prion. Ces fibrilles sont sous-jacentes à une toxicité intrinsèque. Elles vont ensuite induire une dégénérescence neuronale et en étant libérées conduire à la dissémination de la maladie d'un neurone à l'autre.

Pour valider l'hypothèse d'une migration de la maladie de l'intestin vers le cerveau, des lysats de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson ont été injectés dans l'estomac et le duodénum de souris. L'expérience a permis d'observer la présence de ces formes pathologiques dans les structures cérébrales. Elles ont donc la capacité de se propager de l'estomac vers le cerveau.

## L' $\alpha$ -synucléine peut se propager du tube digestif vers le cerveau



Une étude, qui a eu pas mal d'écho, pour valider l'hypothèse selon laquelle la maladie de Parkinson pourrait avoir des origines digestives, a été conduite sur une cohorte de patients « vagotomisés ».

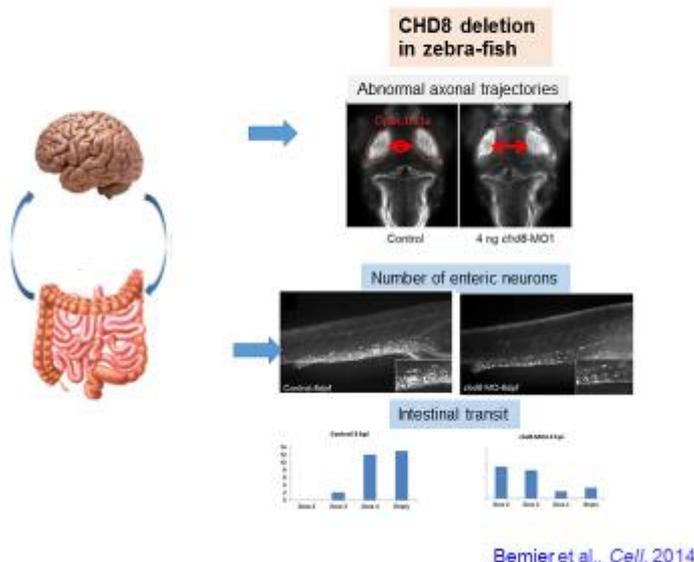
Bien qu'on ait observé une incidence plus faible de la maladie les résultats n'étaient pas significatifs.

La vagotomie ne réduit donc pas significativement le risque de développer la maladie de Parkinson.

En ce qui concerne les pathologies psychiatriques, on a également observé une véritable corrélation de sévérité des troubles digestifs et autistiques.

Les manifestations de ces derniers sont des altérations des interactions sociales caractérisées par des stéréotypies et des troubles du langage. Ces patients ont effectivement une fréquence de troubles digestifs beaucoup plus importante, caractérisés par des diarrhées, des constipations et des douleurs abdominales.

## Troubles du spectre autistique sont-ils aussi des maladies du SNE ?



Des études ont été principalement réalisées dans des modèles génétiques avec un gène participant à la régulation de la chromatine. Il a été démontré qu'au sein du tube digestif, dans ce modèle, il y a une perte de neurones entériques associée à un ralentissement du transit intestinal. Des données suggèrent qu'il pourrait y avoir des atteintes miroirs entre le système nerveux entérique et le cerveau.

## Le microbiote peut-il être impliqué dans le contrôle des deux cerveaux et de leurs maladies ?

Le terme microbiote a été inventé par le chirurgien Charles-Emmanuel SÉDILLOT quelques mois avant PASTEUR. Finalement, PASTEUR et METCHNIKOV, avaient probablement raison tous les deux : il existe, à la fois, des bons et des mauvais microbes pour parler de manière vulgaire.

Nous avons vu précédemment que la période périnatale est une période clé pour la colonisation du tube digestif par le microbiote. L'impact de la nutrition sur sa composition est important. D'un point de vue physiologique, sans microbiote, le début de la vie semble plus difficile pour l'intestin. Un grand nombre d'avancées ont été obtenues sur son rôle pour le développement du tube digestif grâce à l'utilisation de

souris axéniques comme cela a été déjà mentionné. Sans microbiote, le système immunitaire est beaucoup moins développé, ainsi d'ailleurs que le système vasculaire.

Toutefois, sans microbiote, il semblerait qu'on vive plus longtemps ; les souris « *germ free* » ont une espérance de vie allongée.

La cohabitation des souris « *germ free* » avec des souris âgées accélère leur vieillissement. Ces modifications du vieillissement par le microbiote résulteraient probablement d'une inflammation de bas grade.

Les données qui montrent que le microbiote peut moduler l'axe intestin-cerveau et réguler les fonctions du cerveau ont été principalement obtenues avec des données murines. Ainsi, chez des souris « *germ free* », l'expression de certains facteurs neurotrophiques, nécessaires au développement de la connectivité neuronale est diminuée dans le cerveau.

Il a aussi été montré que les souris « *germ free* » avaient un comportement exploratoire accru. Le microbiote ayant la capacité de fournir un substrat énergétique conséquent, les souris « *germ free* » ont donc besoin de chercher plus de nourriture que leurs congénères pour compenser.

Dans le même contexte, on s'est rendu compte que les souris « *germ free* » interagissaient moins, synonyme d'altérations du comportement, d'interactions sociales.

Au niveau de l'intestin, les souris « *germ free* » ont moins de neurones et lorsqu'on introduit un microbiote, elles peuvent restaurer un nombre de neurones normal. Il a été démontré que cet effet du microbiote sur le développement neuronal passe en partie par l'expression de récepteurs TLR-4 présents sur les neurones.

Nous avons évoqué le rôle du microbiote sur le développement de la maturation de la réponse immunitaire. Il a été démontré que ces effets étaient probablement en partie directs, mais passaient aussi par une activation du système nerveux entérique via la modulation de certains neurotransmetteurs ayant un effet immuno-modulateur.

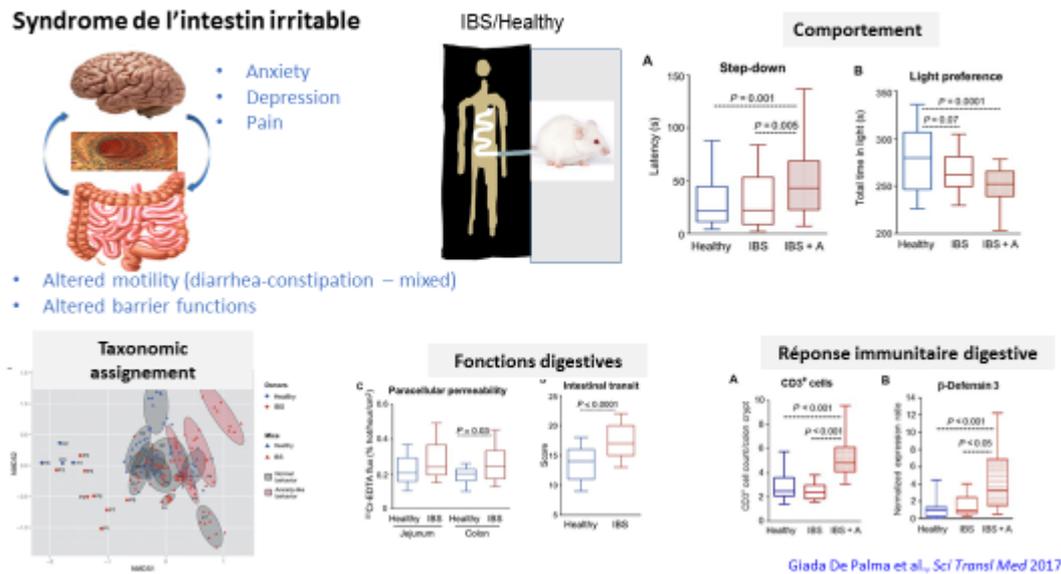
Le rôle du microbiote dans le développement des maladies de l'intestin a été démontré par sa capacité à transférer et à reproduire sur des animaux des symptômes qui existent chez les patients.

Ainsi, le syndrome de l'intestin irritable touche à peu près 15 % de la population. Il est caractérisé par des troubles de l'anxiété, de la dépression et de la douleur, mais aussi de manière concomitante, par des altérations de la motricité de la barrière. Dans une étude on a réussi à greffer le microbiote de ces patients sur des souris saines. Au bout de deux semaines, ce microbiote est établi, il a colonisé les animaux avec la signature propre à chaque patient.

Les altérations à la fois comportementales et digestives ont été transférées. On arrive ainsi à discriminer des sous-types de patients atteints du syndrome de l'intestin irritable reproduits chez les souris, c'est-à-dire ceux uniquement IBS, sans trouble de l'anxiété et ceux qui avaient des troubles du comportement. En parallèle, on retrouvait aussi les altérations des fonctions digestives présentes chez ces patients. **Ceci**

démontre la capacité du microbiote à transférer des lésions à la fois digestives et du cerveau.

## Le microbiote acteur des maladies de l'axe intestin-cerveau



Le microbiote peut-il aussi contribuer au développement de maladies du cerveau, en particulier la maladie de Parkinson.

Des résultats ont été obtenus dans des modèles transgéniques de maladie de Parkinson. Des souris développent ce syndrome parkinsonien caractérisé par la présence d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine dans le cerveau et des troubles de la motricité et la constipation.

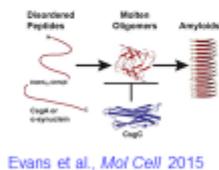
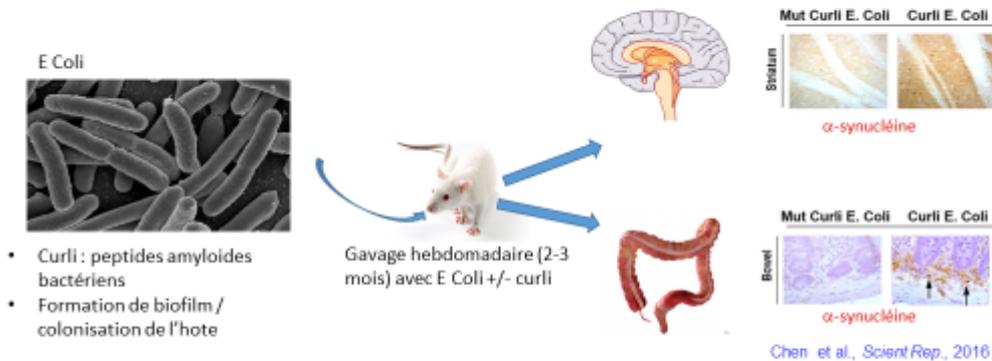
Lorsqu'on traite ces animaux « *germ free* » avec des antibiotiques on observe une réduction drastique de la présence d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine dans le cerveau. On observe aussi une absence de troubles moteurs.

Lorsqu'on colonise des souris « *germ free* » avec du microbiote de ces souris, on est capable de reproduire les symptômes moteurs observés chez ces animaux naïfs.

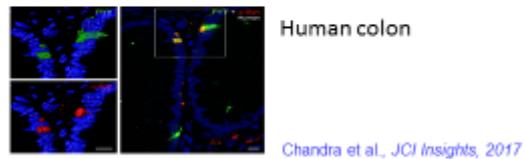
La question est de savoir quel pourrait être l'élément causal dans le microbiote : comment peut-il conduire au développement de cette maladie ?

Certains types de bactéries, comme *E coli*, ont la possibilité de synthétiser des peptides amyloïdes qui participent à la formation d'un biofilm aidant à la colonisation de l'hôte par ces bactéries. Le gavage de rats avec cette souche d'*E Coli* induit la formation d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine dans l'intestin et, en parallèle, l'apparition de forme d' $\alpha$ -synucléine dans le cerveau. Toutefois dans cette étude aucune conséquence sur les fonctions n'a été réalisée.

## Des peptides d'origine bactérienne induisent la formation d'agrégats de synucléine dans le tube digestif et le cerveau



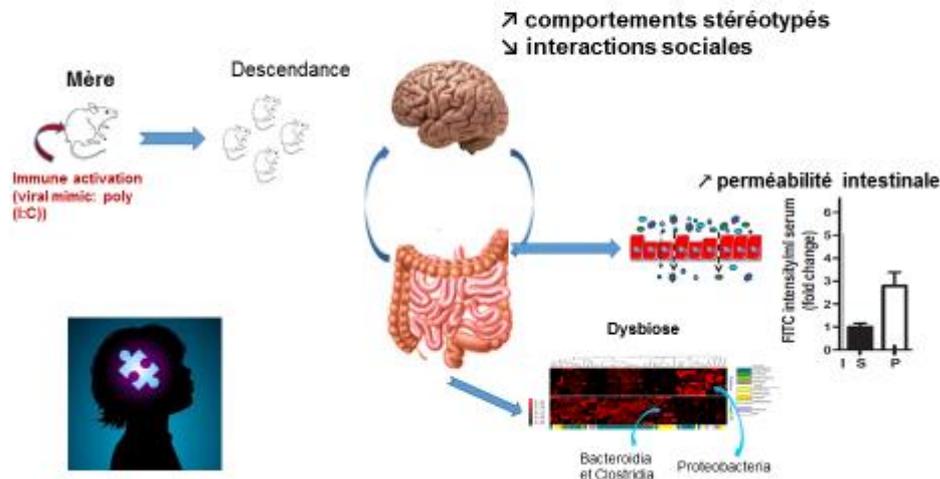
### Les cellules entéroendocrines : 'porte d'entrée' vers le cerveau?



Comment les deux systèmes peuvent-ils communiquer ? Quel peut-être le relais entre le microbiote et l'intestin ? Des études très récentes ont montré que les cellules entéroendocrines, qui sont un des sous-types constituant à peu près 1 % des cellules épithéliales intestinales du colon humain, possèdent un grand nombre des éléments neuronaux. Il est tentant de spéculer qu'on pourrait avoir une sorte de chaîne entre le microbiote et l'hôte favorisant la propagation de la maladie.

Le dernier aspect sur lequel je voudrais intervenir est la mise en évidence du rôle du microbiote dans le développement des troubles du spectre autistique. Un des éléments incriminés est une infection maternelle au cours du dernier trimestre. Dans cette étude murine, il a été montré qu'en infectant des mères, la descendance avait une augmentation des comportements stéréotypés, une évolution des interactions sociales associées à la présence d'une dysbiose intestinale avec une modification du microbiote intestinal et une augmentation de la perméabilité intestinale.

## Cibler le microbiote pour améliorer, en partie, des maladies du cerveau ? Etude dans modèle murin de TSA



Hsia et al., Cell, 2013

Il était intéressant de montrer que les métabolites bactériens étaient capables de reproduire les symptômes, suggérant que cette augmentation de la perméabilité de la barrière pouvait, sur une altération du microbiote, favoriser le passage de métabolites délétères et conduire au développement de la maladie.

L'administration d'un probiotique diminuait la perméabilité, ainsi qu'en partie, les comportements stéréotypés, mais n'avait pas d'effet sur le comportement social. Il y a probablement d'autres mécanismes responsables de ces effets.

**Ces résultats démontrent que la transplantation de microbiote peut être une perspective thérapeutique.** Dans cet objectif, une étude pilote a été réalisée sur 18 enfants : l'administration d'un microbiote d'enfant sain a permis de diminuer de manière significative les symptômes associés à l'autisme.

Ainsi, dans le futur, en ciblant notre intestin, on pourra probablement mieux prendre en charge certaines maladies du cerveau.

Je tiens à remercier les différents membres de l'unité et à vous remercier pour votre attention.

*(Applaudissements)*

**Yves AGID** - Je vous remercie. C'était d'une clarté remarquable.

Tout ce que vous avez raconté est absolument essentiel à propos des maladies neurodégénératives qui sont peu héréditaires. Pour la maladie Alzheimer, c'est moins de 2 %. Ces maladies sont sporadiques. De ce fait, il y a nécessairement un facteur pathogène qui vient de l'extérieur. Ce facteur peut arriver sur la peau, dans les poumons et évidemment par l'intestin. Le modèle du Parkinson que vous avez donné est absolument splendide. D'ailleurs, votre groupe a joué un rôle très important. C'est d'ailleurs un des premiers, sinon le premier.

Puisqu'on retrouve ces stigmates pathologiques spécifiques, l' $\alpha$ -synucléine sous forme d'agrégats dans l'intestin, en quoi le microbiote pourrait influencer ? Vous avez donné quelques exemples. Peut-on penser à une certaine spécificité ? On a parlé ce matin de communautés microbiennes. J'imagine un parasite qui arrive ou un microbe toxique. Comment peut se faire cette interaction ?

Le microbiote doit être modifié par un agent pathogène qui arrive de l'extérieur. Quel peut être le rôle du microbiote comme intermédiaire entre l'agent pathogène et le mécanisme pathologique ?

**Michel NEUNLIST** - Il y a plusieurs façons de répondre à cette question.

Il y a déjà le microbiote qui peut être pathogène en lui-même, étant capable d'induire la maladie. C'est un peu notre hypothèse avec cette souche capable de produire des peptides amyloïdes.

Le microbiote peut être aussi un amplificateur d'éléments toxiques environnementaux.

Il y a aussi d'autres agents infectieux. Il n'y a pas que les bactéries. Il y a aussi les virus. L'histoire de la grippe espagnole est là pour le rappeler.

**Yves AGID** - Vous avez parfaitement raison. J'y crois beaucoup. On avait retrouvé dans le temps avec Jean-François BACH, des séquences du virus de la grippe dans la substance noire des malades. Je pense que la voie virale est une très bonne voie de recherche.

**Maxime SCHWARTZ** - Dans le cas d'Alzheimer, trouve-t-on aussi ces agrégats dans des cellules intestinales ? Dans le cas de Creutzfeldt-Jakob, on sait que la maladie peut être transmise par voie intestinale, mais je ne sais pas si on a aussi recherché la formation des agrégats de la PRP dans des cellules intestinales. Dans toutes ces maladies dégénératives, a-t-on observé des éléments comparables à ceux de la maladie de Parkinson ?

**Michel NEUNLIST** - Autant l'argument est fort à ce stade pour une atteinte digestive dans la maladie de Parkinson, autant, ce n'est pas convaincant pour la maladie d'Alzheimer. À ce stade, il n'y a pas de données expérimentales ayant pu montrer la présence d'agrégats dans le système nerveux entérique.

En revanche, il y a des données pour le microbiote ; c'est peut-être à prendre avec précaution. Une étude montre qu'il pourrait y avoir, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, des sous-populations particulières bactériennes qui pourraient être associées à cette pathologie.

*(Applaudissements)*



*Philippe SANSONETTI*

*Membre de l'Académie des sciences, Institut Pasteur - Collège de France*

**Dr Jean-Pierre DÉCOR** - Monsieur SANSONETTI vous êtes professeur au Collège de France et à l'Institut Pasteur. C'est à vous que revient la charge de tirer les conclusions de cette journée. Certains profils de microbiote ou de dysbiose semblent se corrélérer avec des maladies métaboliques, neurologiques, voire à des cancers. Si deux événements sont corrélés ou concomitants, cela ne signifie pas que l'un est causé par l'autre. Ce n'est pas parce qu'il y a des grenouilles après la pluie qu'on a le droit de dire qu'il a plu des grenouilles !

Comment passer de corrélation à causalité dans le cadre du microbiote intestinal ?

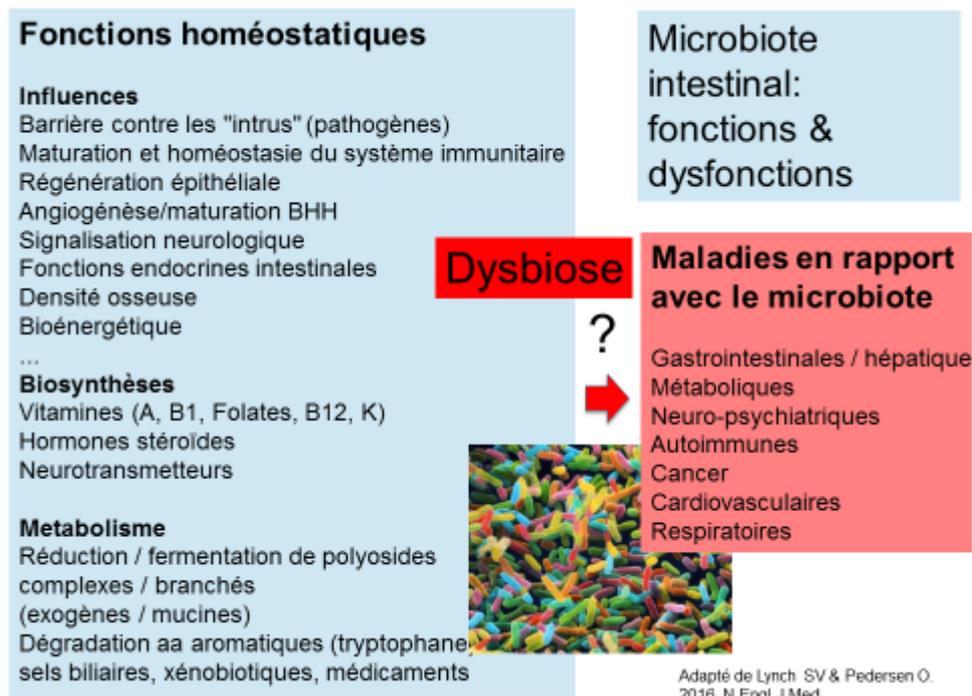
**Philippe SANSONETTI** - Vous avez fait la moitié de ma présentation !

Dans cette dernière intervention, je vais me centrer sur un élément essentiel concernant le microbiote, les dysbioses et les dysfonctions organiques associées : le passage entre la corrélation et la causalité.

La première partie sera une réflexion très ouverte. La deuxième partie présentera un travail du laboratoire qui illustre les difficultés de la mise en évidence de ce lien de causalité, d'où mes deux néologismes de la « descriptomique » à l'« expérimentomique ».

Il est clair que depuis ce matin : le microbiote est associé à des fonctions homéostatiques dans l'organisme, que ce soit avec le système immunitaire, la nutrition, le métabolisme, le système nerveux central et périphérique ou des fonctions comme l'hématopoïèse et la régénération tissulaire. La liste de situations, d'éléments physiologiques dans lesquels le microbiote joue manifestement un rôle ne cesse de s'allonger.

On souhaiterait sur cette base, associer aussi le microbiote à des pathologies, car cela ouvrirait un certain nombre de possibilités de prévention et de thérapeutiques intéressantes.



L'élément essentiel est le terme de dysbiose. Dans un premier temps, je voudrais remettre en perspective cette notion et, à partir de celle-ci, aller vers la façon d'établir des liens de causalité.

En réalité, les techniques de séquençage de nouvelle génération, les progrès de la bio-informatique, ont conduit le microbiote à un statut d'élément potentiellement important en matière de physiologie, d'homéostasie, de santé et éventuellement de pathologies.

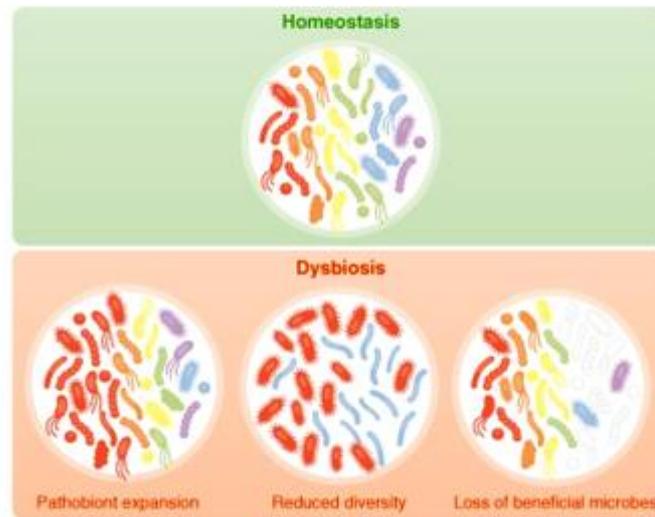
Pour nous qui avons beaucoup travaillé sur l'interaction hôte-pathogène avec un seul microbe pathogène interagissant avec une cellule, un tissu ou un organe, on se retrouve projeté par ces techniques et ce nouveau concept dans une plus grande complexité : l'interaction d'un assemblage microbien immense et extrêmement divers avec des cellules, des tissus et des organes.

Comment franchir ce niveau d'échelle tout à fait important ? Comment définir la dysbiose ? Quelles en sont les signatures éventuelles ? Comment ensuite, celles-ci étant établies, passer d'une corrélation à une causalité avec une pathologie ?

La définition de la dysbiose est la réduction de la diversité en taxa mise en évidence soit par microbiologie classique soit par la métataxonomique et/ou une réduction en diversité et richesse génique décelé par la métagénomique.

Elle peut être une perte des taxa bénéfiques à cet état d'homéostasie et de santé, ou l'expansion d'un ou plusieurs pathobiotiques, pouvant bénéficier de certains degrés de dysbiose pour se développer.

## Définition de la dysbiose



Petersen & Round, 2014, Cell Microbiol

Les approches, métataxonomique et métagénomique, restent relativement lourdes. Une complémentaire se développe. Elle consiste à identifier les signatures métabolomiques ; des effecteurs métaboliques, les molécules qui pourraient être responsables de la santé ou de la pathologie

Les dysbioses, définies précédemment, sont des équilibres différents entre microbes, ils ne sont pas nécessairement pathologiques.

Il y a une grande variation individuelle et interindividuelle. La difficulté est d'identifier un « cœur » microbien ou génique qui serait la base de cette symbiose mutualiste entre l'homme et ces microbes. Il en découle une certaine difficulté à mettre en évidence une modification dans une circonstance particulière.

Il manque aussi souvent la localisation tridimensionnelle. On travaille beaucoup sur le matériel fécal, mais rarement au niveau des muqueuses, d'accès difficile chez l'homme.

Toutefois dans la mesure où certaines espèces microbiennes résident dans la couche de mucus, proche de la surface de la muqueuse, on peut voir si certaines n'ont pas un rôle pathologique ou au contraire protecteur. Une analogie avec le staphylocoque dans la peau peut être faite au niveau du tube digestif.

Des insuffisances ou des excès expliqueraient la survenue par exemple d'un état d'inflammation. Des bactéries, comme par exemple les *fusobacteria* ou certaines protéobactéries, en se développent plus facilement que d'autres classifiées anti-inflammatoires, comme *Faecalibacterium prauznitzii* peuvent créer cet état.

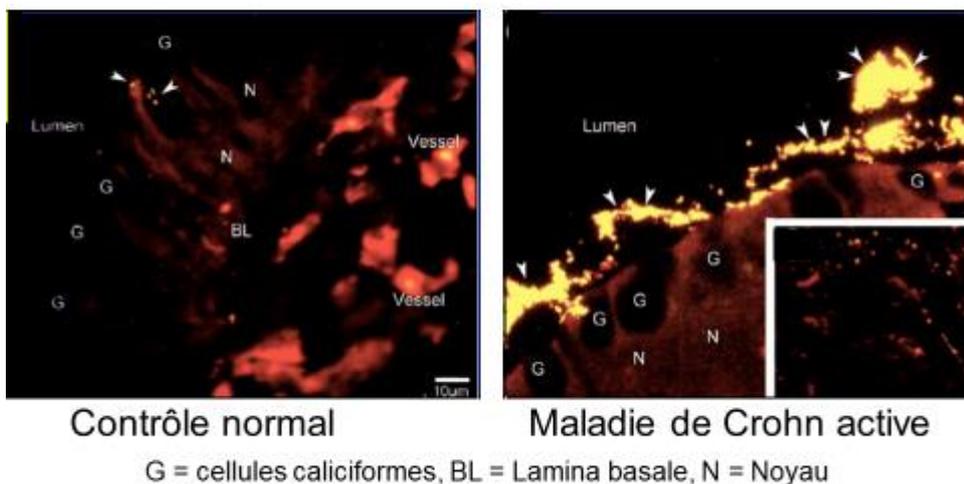
Cet état d'inflammation de bas niveau, chronique est à l'origine de certaines maladies inflammatoires de l'intestin, voire l'origine de cancers du côlon. En effet, cette

situation cause des lésions d'ADN facilitant la survenue des mutations nécessaires au développement des tumeurs coliques.

Pour aborder ces problèmes d'interface entre le microbiote et la muqueuse il faut avoir une vision en tridimensionnelle.

Un très joli travail de 2002 du groupe de SWIDSINSKI l'illustre. Par méthode FISH (hybridation des ARN avec une sonde pour les entérobactéries), on observe très peu d'entérobactéries associées à la surface muqueuse chez un individu sain. En revanche, au cours de la maladie de Crohn, on détecte sur cette surface de nombreux micro-organismes pour l'essentiel des *Escherichia coli*. Ils sont plus résistants au stress oxydatif et ont des enzymes qui leur permettent une grande versatilité. Sont-ils là de façon causale ou simplement parce qu'ils peuvent survivre dans cette situation ? On peut penser que c'est un cercle vicieux : ils profitent d'une situation et probablement l'aggravent...

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



Swidsinski et al., 2002

Pour définir cette notion de causalité on peut se référer au postulat de KOCH émis en 1884.

- 1- *Le micro-organisme doit être retrouvé en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais ne devraient pas l'être dans des organismes sains.*

Appliqué au microbiote, c'est un peu compliqué, mais cela peut se traduire en signatures particulières présentes ou absentes.

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

En ce qui concerne le microbiote, beaucoup de ces micro-organismes anaérobies sont encore, à l'heure actuelle, incultivables.

*3- Le micro-organisme cultivé d'un organisme malade devrait causer la maladie chez un organisme sain. = **lien de causalité***

On est au cœur du débat. Comment peut-on établir un lien de causalité chez l'homme (homme/homme) ou chez l'animal (homme/animal ou animal/animal) non plus vis-à-vis d'un seul microbe mais d'une communauté microbienne en perte d'équilibre.

*4- Ensuite, le micro-organisme doit être réisolé de l'hôte qui l'a reçu en culture pure et identifié comme étant identique au microorganisme initial.*

Lorsqu'on passe de l'homme à la souris, on sait très bien que le maintien stable du microbiote à signature humaine est extrêmement difficile à conserver.

Un certain nombre d'éléments seront à prendre en considération si on veut redéfinir ces postulats de KOCH pour déterminer la responsabilité des dysbioses dans les pathologies.

Pour tenter de démontrer ce lien de causalité, je vais examiner successivement trois aspects :

1) Le premier concerne les approches expérimentales dans des modèles cellulaires et animaux (plutôt la souris, parfois le porc, rarement le singe). L'objectif est d'identifier et résoudre en éléments fonctionnels le dialogue microbe-cellule/tissu/organe, mutualiste ou éventuellement pathologique.

C'est la microbiologie cellulaire qui permet de comprendre ces dialogues moléculaires, mais avec plusieurs micro-organismes et éventuellement des assemblages en dysfonction dans le cas de la dysbiose.

On peut transférer cette dysbiose, ce microbiote anormal, de l'homme dans une souris axénique par exemple. On espère que la souris développera, sinon des symptômes cliniques, au moins des traits biologiques qui vont être caractéristiques de la maladie dont on essaye d'établir le lien de causalité.

Nous pouvons reconstituer l'ensemble du dispositif à partir de microbes identifiés. C'est le cas des pathobiotés : ces microbes qui sont dans une zone grise entre pathogènes et commensaux, dont, en cas de dysbiose, nous savons qu'ils vont pouvoir éventuellement être des effecteurs de la pathologie en question. Nous pouvons essayer de les traiter dans un modèle expérimental.

2) La deuxième concerne les études cliniques interventionnelles. Nous commençons à en voir.

3) Bien entendu, l'idéal pour un médecin-chercheur est de pouvoir combiner les deux, mener à la fois une recherche fondamentale en développant un système expérimental et des études cliniques interventionnelles.

**Pour l'établissement d'un lien de causalité, à l'heure actuelle, nous disposons d'un certain nombre de résultats sur ces 3 aspects.**

Nous commençons à voir des choses tout à fait spectaculaires dans cette approche de transfert de « *free cells* » de patients dont la dysbiose a été transférée à des souris axéniques.

Ainsi pour l'obésité, les souris ne vont pas nécessairement grossir de façon spectaculaire mais présenter des symptômes relativement caractéristiques de cette situation, en particulier le transfert de la résistance à l'insuline très caractéristique des états précoces d'obésité.

L'augmentation de l'adiposité en dernière période de la grossesse est corrélée à des anomalies du microbiote. Effectivement, cette dysbiose amène également une augmentation de la masse grasseuse chez la souris axénique.

Pour la malnutrition, il a été observé des états de dénutrition graves avec des contrôles presque parfaits dans la mesure où ils ont utilisé des jumeaux homozygotes, dont l'un était complètement dénutri. C'est le travail du groupe de Jack GORDON aux États-Unis et au Bangladesh. L'apparition d'état de malnutrition a été observée chez les souris axéniques recevant ce type de flore.

Il est maintenant relativement clair que la survenue de l'asthme chez le jeune enfant est liée à une dysbiose très précoce. Son origine remontant à l'établissement de son microbiote perturbé par une césarienne ou des traitements antibiotiques de la mère dans le troisième trimestre. Les microbiotes ont permis chez des souriceaux nouveau-nés de transférer par ces dysbioses une capacité inflammatoire aggravée au niveau de l'épithélium respiratoire.

Il commence à y avoir des éléments relativement convaincants de lien de causalité dans tous ces systèmes. C'est aussi le cas dans des études cliniques interventionnelles.

Ainsi, le traitement des rechutes de *Clostridium difficile*, colite grave chez les personnes âgées, montre 95 % de guérison après plusieurs transferts fécaux.

Nous voudrions bien réaliser le même genre d'exploit dans l'obésité, dans la malnutrition, dans l'asthme. Beaucoup d'études cliniques sont en cours. Un certain nombre commence à montrer, sinon des évidences d'efficacité clinique, au moins des modifications biologiques qui vont éventuellement dans la bonne direction, mais beaucoup restent encore à faire.

Nous avons récemment publié une revue avec deux post-doctorants du laboratoire Pascal VONÄSCH et Marc ANDERSON pour proposer un nouveau modèle, une réévaluation des postulats de KOCH à l'échelle du microbiote et de la dysbiose, que nous avons appelé : les postulats écologiques de KOCH, avec beaucoup de modestie. Cela amène à réfléchir véritablement à ce que doivent être ces liens de causalité.

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

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

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

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

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

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

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

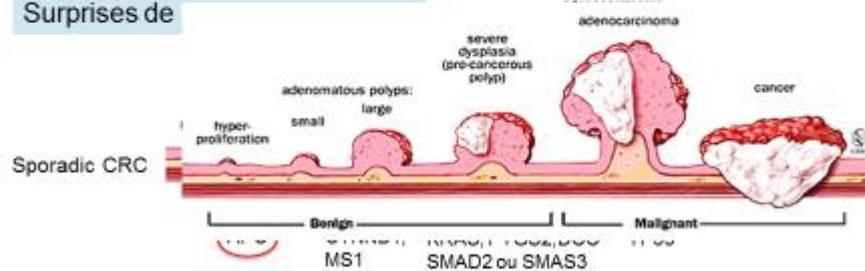
Voilà comment on pourrait synthétiser la situation du microbiote par rapport à celle plus simple du pathogène unique définie par KOCH.

La deuxième partie de ma présentation est une tentative en laboratoire d'établir un lien de causalité dans le cancer du côlon.

Ce cancer fait partie des pathologies post-modernes en croissance. Il est caractérisé dans sa forme sporadique par la survenue successive d'un certain nombre de mutations. Elles vont conduire, depuis la formation initiale de polypes traduisant une hyperprolifération épithéliale colique, à une transformation en tumeur, éventuellement invasive et métastatique. À chaque étape, si on veut caricaturer la situation, des mutations font progresser la pathologie vers l'aspect final, par exemple la mutation d'un gène P53 pour les formes invasives et métastatiques.

## Cancer colorectal sporadique (CRC)

### Surprises de



**Dysbiose globale dans CRC** (Zeller G et al. 2014. Mol Syst Biol)  
Perte d'équilibre global = expression collective potentiel oncogène ?  
Inflammation chronique de bas niveau ? Perte détoxification xénobiotiques ?

**Bactéries (pathobiotés) enrichis dans CRC** (Viljoen KS, 2015, PloS One)  
- *Fusobacterium nucleatum* (Kostic AD et al. 2012. Genome Res)  
- Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (Boleij A et al. 2014. Clin Infect Dis)  
- Cyclomodulin +, genotoxin + *Escherichia coli* (Cougnoux A et al. 2014. Gut)  
- *Streptococcus gallolyticus* (Abdulmir AS et al. 2010. Mol Cancer)

L'un des éléments initiaux est une mutation du gène APC avec une hyperprolifération et la survenue de polypes.

Une dysbiose globale a été mise en évidence dans les cancers du côlon, par le travail d'Iradj SOBHANI, un des pionniers dans ce domaine.

Nombre d'hypothèses peuvent être faites.

Est-on dans cet état d'inflammation chronique de bas niveau avec un excès de micro-organismes pro-inflammatoires et un défaut de micro-organismes anti-inflammatoires ? Ou est-on en présence d'une perte de micro-organismes qui assureraient une biodégradation efficace des xénobiotiques ou des systèmes oncogènes endogènes comme par exemple les produits de dégradation du tryptophane ?

Le cancer du côlon est surtout caractérisé par la présence de pathobiotés dominants, tels que :

- *Fusobacterium*,
- *Bacteroides Fragilis* producteurs de toxines ;
- *Escherichia coli* producteurs de cyclomodulines, molécules qui lient les brins d'ADN et facilitent la survenue de cassures, donc des mutations ;
- *Streptococcus Gallolyticus*, sur lequel nous avons travaillé dans le laboratoire, qui est en fait un *Streptococcus bovis* classifié *Streptococcus Gallolyticus Gallolyticus* (SGG).

Commensal intestinal du bétail, son portage est rare chez l'homme. Chez les personnes d'un certain âge, il peut causer des translocations, bactériémies, septicémies méningites ou surtout une endocardite. C'est une cause fréquente après 65 ans et 70 % des cas d'endocardite s'accompagnant d'un cancer du côlon.

On ne peut donc essayer d'établir, au-delà de la corrélation, un lien éventuel de causalité entre ce micro-organisme et la survenue d'un cancer du côlon.

C'est ce que nous avons essayé de faire avec une post-doctorante du laboratoire, Laëticia EYMERIC, une collègue de l'Institut Pasteur, Shaynoor DRAMSI, ancienne étudiante de Pascale COSSART, Sylvie ROBINE de l'institut Curie et mon collaborateur à l'hôpital Henri Mondor, Iradj SOBHANI.

Pour établir un lien de causalité avec cette pathologie longue à survenir dans la mesure où elle serait liée à un agent infectieux, un pathobionte, comme *Streptococcus gallolyticus*, il faut si possible faciliter l'action du micro-organisme.

Pour cela nous avons utilisé des souris APC hétérozygotes. En effet la mutation APC active le cycle cellulaire et la voie Wnt qui est un élément important de la prolifération.

En deux mois, ces animaux ont pu développer des polypes mais situés essentiellement dans l'intestin grêle

Nous voulions les avoir aussi dans le côlon ; pour cela Sylvie ROBINE nous a fourni des souris avec un double élément, APC-Notch

L'activation Notch est sous le contrôle d'un promoteur induit par le Tamoxifène. Le résultat a été un développement plus rapide de polypes au niveau de l'intestin grêle et du côlon.

La colonisation par *Streptococcus gallolyticus gallolyticus* n'a entraîné aucune accélération ni augmentation du nombre de tumeurs chez les animaux Notch mutants APC. C'était un espoir et en tout cas un lien de causalité qui disparaissait. Les animaux meurent assez tôt d'occlusion intestinale par toutes ces tumeurs polypoïdes, il n'y a pas eu développement de cancer.

La bactérie SGG n'accélère pas la survenue de polypes.

Mais inversement, nous avons observé que la présence de ces polypes, de la mutation APC, était nécessaire pour la colonisation par *Streptococcus gallolyticus* du tube digestif. Avec les souris Notch comme contrôle, il y a une très faible colonisation de l'intestin par SGG. En présence de l'expression de Notch induite par le Tamoxifène et cette mutation APC, on a 3 ou 4 logarithmes d'augmentation de la capacité de colonisation.

Un contexte génétique particulier est donc nécessaire pour assurer la multiplication des microorganismes SGG

Par ailleurs, dans ces conditions, la bactérie passe dans la circulation. Cette translocation, chez les personnes âgées, étant nécessaire pour une fixation sur les valves cardiaques et causer une endocardite. Nous l'avons observée non seulement par comptage, mais aussi par coloration.

Il faut noter qu'il n'y avait pas véritablement d'enrichissement des microbes au niveau des tumeurs

Si le microbiote est absent, dans le cas de souris axéniques, la colonisation par *streptococcus gallolyticus gallolyticus*, est maximale. Manifestement sa présence est importante pour ralentir la progression de SGG.

Avec des milieux permettant de différencier *streptococcus gallolyticus* et les entérocoques, on a pu observer qu'au fur et à mesure que *streptococcus gallolyticus* se développait les entérocoques diminuaient, quasiment à part égale. Nous avons l'impression d'une substitution écologique de *streptococcus gallolyticus* versus les entérocoques de la flore intestinale. La métataxonomique nous a montré que d'autres *taxa* disparaissaient aussi, mais très peu, en particulier des lactobacilles et des leuconostokes.

Sur la base d'analyses génomiques on a identifié chez *streptococcus gallolyticus gallolyticus* deux gènes codants pour des colicines type II créant un dimère responsable de pores dans les membranes bactériennes. Ces deux gènes sont caractéristiques de *streptococcus gallolyticus gallolyticus* et ne sont présents dans aucune autre famille de *bovis*, y compris dans les *gallolyticus* standards.

Il s'agit d'une signature pathogène dans la compétition entre bactéries. En effet, si dans un puits de gélose on met *streptococcus gallolyticus gallolyticus*, il entraîne un halo de destruction de l'entérocoque qui flotte à la surface de la boîte de Petri. A l'inverse *S macedonicus*, un des éléments de la même famille qui n'a pas ces colicines, n'est pas capable de faire cette bactériolyse des entérocoques.

## Un facteur produit par SGG inhibe *in vitro* croissance entérocoques

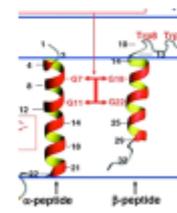
3 gènes de bactériocines annotés: gallo\_2020, gallo\_2021, gallo\_2203

*gallo2020* and *gallo2021*: spécifiques de *S. gallolyticus*, class II bactériocines  
*gallo2203* = *S. gallolyticus*, *S. macedonicus* and *S. pasteurianus*



### ClassII - bactériocines

- Peptide leader/ GG = motif clivage
- Dipeptide
- GXXXG motif /  $\alpha$ -hélice permettent interactions intermoléculaires
- Structure active = nécessité micelles**



Nissen Meyer J Probiotics Antimicrob Proteins. 2010

Nous avons « mutagénisé » les deux gènes codants pour ces bactériocines, présents sur le même opéron. Les mutants obtenus n'étaient plus capables d'assurer ce halo de destruction d'entérocoques. Nous avons pu voir *a posteriori* que ce mutant delta

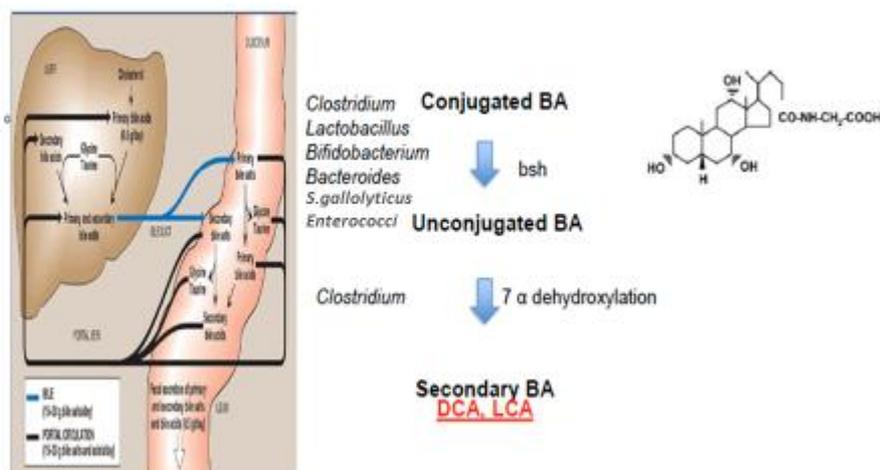
2020-2021 a aussi plus de mal pour se développer dans le tube digestif avec une différence de 2 à 3 logarithmes par rapport à la souche sauvage.

Il fallait essayer de comprendre le mécanisme de cette substitution écologique des entérocoques par *Streptococcus gallolyticus gallolyticus* dans les souris APC formant des polypes.

On s'est aperçu que si on prenait le surnageant de ces *Streptococcus gallolyticus gallolyticus*, il n'était plus capable de créer ces halos de lyse. Cela voulait dire que les colicines avaient besoin d'aide pour être bactériolytiques. C'est connu dans la littérature. Pour que ces colicines de type II fonctionnent de façon optimale, il faut ajouter du Tween, un détergent, créer une situation qui va altérer les membranes microbiennes. Effectivement à partir du même surnageant, en présence de faible quantité de Tween, on obtient cette bactériolyse.

L'équivalent du Tween dans le tube digestif, ce sont les acides biliaires. Synthétisés dans le foie, ils sont sécrétés sous une forme conjuguée par les voies biliaires au moment du passage du bol intestinal. Un certain nombre de micro-organismes du tube digestif les déconjuguent et éventuellement les déshydroxylent en acides biliaires secondaires plus agressifs, pro-inflammatoires ; c'est le cas par exemple du désoxycholate. Leur fonction détergente est encore plus puissante que celle des acides biliaires primaires.

## Métabolisme/recyclage acides biliaires

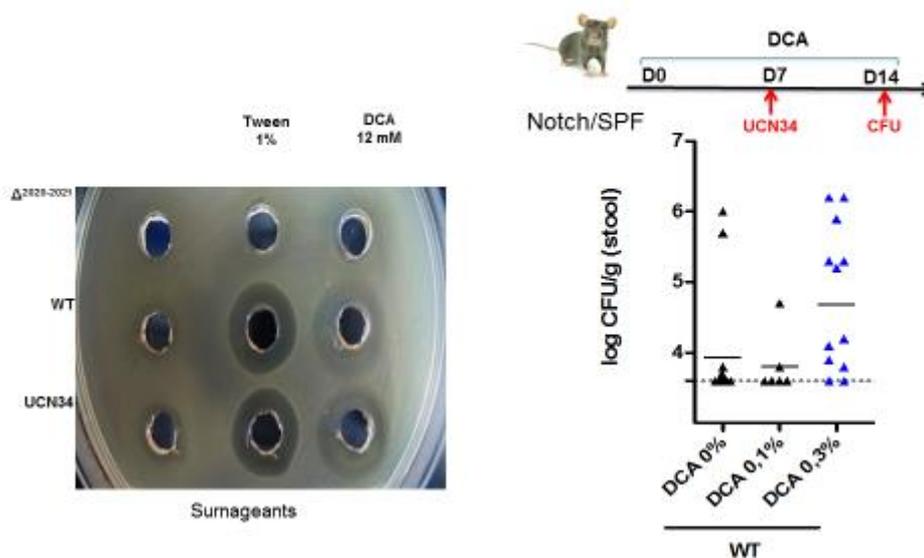


Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les acides biliaires seraient susceptibles d'activer cette colicine et permettre cette substitution écologique, nous avons remplacé le Tween par du désoxycholate et obtenu effectivement, via le surnageant, cette bactériolyse des entérocoques.

Dans une souris SPF, standard, avec une flore microbienne sans pathogène avec SGG, si on lui administre des quantités croissantes de désoxycholate, on observe,

à une certaine concentration de 0,3 %, la croissance de *streptococcus gallolyticus* décoller et coloniser l'animal.

### Acides biliaires secondaires activent colicines *in vitro* et *in vivo*



Cette substitution écologique par destruction de l'entérocoque fait partie de ces compétitions intra-microbiote qui sont extrêmement importantes dans l'équilibre de ces populations complexes, tel que l'a mentionné Yasmine BELKAID dans sa présentation.

Nous avons pu montrer que l'intestin de ces souris mutantes APC présente des concentrations nettement plus élevées de DCA par rapport aux souris Notch ou type sauvage. Manifestement, nous sommes dans une situation où le terrain pro-tumoral est associé à une augmentation de ces acides biliaires secondaires à la fois toxiques et activateurs des colicines de micro-organismes, comme le *streptococcus gallolyticus*.

Nous avons examiné l'expression de tous les gènes en rapport avec le cycle entéro-hépatique des acides biliaires : leur synthèse, conjugaison, sécrétion, réabsorption pour retour dans le foie. Sous l'effet de la mutation APC, un transporteur des acides biliaires de l'épithélium intestinal était non exprimé ou à très faible niveau. Son absence expliquerait donc l'augmentation de ces acides biliaires, en particulier du DCA.

Le lien de causalité est inverse ! Ce n'est pas la bactérie qui cause la tumeur. Sa survenue avec les acides biliaires va activer le système de prédation par les colicines de cette souche de *streptococcus gallolyticus*.

En conclusion, cela fait de cette souche de *streptococcus gallolyticus* au mieux un biomarqueur du cancer du côlon, mais nous apprend que l'hypersécrétion ou la non-réabsorption des acides biliaires sont des situations très précoces dans le cancer du côlon.

Un autre lien de causalité est à établir avec cette hyper-présence des DCA dans le côlon des individus ayant ce type de mutation pouvant causer la survenue de la tumeur.

Nous pensions que *streptococcus gallolyticus* allait éventuellement stimuler la formation des adénomes. Ce n'est pas le cas. Peut-être, une fois la colonisation établie, il se produit des altérations géniques au niveau des cellules souches intestinales. C'est ce que nous sommes en train d'examiner.

En résumé nous avons montré que l'excès d'acides biliaires secondaires, facilitait considérablement la croissance de ce micro-organisme responsable d'un déséquilibre dans la flore par destruction des souches taxonomiques relativement proches comme les entérocoques.

Dans beaucoup de ces situations où nous sommes en face de pathobiotés surreprésentés, nous revenons dans un cas proche des postulats de KOCH initiaux.

Nous sommes presque dans un contexte de pathogénicité à la fois vis-à-vis de la flore elle-même en interne et éventuellement vis-à-vis de l'hôte. Cela complique encore plus l'établissement de ce lien. J'espère que, dans les années à venir, nous pourrons clarifier un peu les choses.

Je vous remercie de votre attention.

*(Applaudissements)*

**Pierre CORVOL** - Vous avez démontré que le lien de causalité est parfois difficile à établir. Je ne suis pas très au courant sur les anomalies héréditaires dans le métabolisme. Y a-t-il des liens épidémiologiques entre ces affections et l'incidence du cancer du tube digestif, sans faire intervenir le microbiote ?

**Philippe SANSONETTI** - Cela va être difficile de ne pas faire intervenir le microbiote. Une partie importante de la maturation dans le tube digestif vers ces formes « déconjuguées », sont dues au microbiote. C'est quasiment impossible de séparer les deux. C'est une vraie symbiose.

**Iradj SOBHANI** - Sur le rôle des acides biliaires, il y a des données sporadiques. Dans les modèles animaux, si on enlève le microbiote, ces acides biliaires ne sont pas « déconjugués ». S'il n'y a pas d'acides biliaires, il n'y a pas de relation épidémiologique avec la survenue du cancer.

**Yasmine BELKAID** - Est-il possible que ce streptocoque change le milieu de la tumeur, ce qui favoriserait ensuite les *fusobacteria* ?

**Philippe SANSONETTI** - Nous avons examiné à la fois la lumière et la muqueuse de l'intestin. Nous n'avons pas vu les *fusobacteria*. C'est chez la souris. Je pense qu'il faudrait revoir tout le processus et le reconstruire en l'inoculant avec le *fusobacterium*. C'est une très bonne suggestion mais nous ne l'avons pas fait.

**Jean-François BACH** - Merci pour ce bel exposé.

Je voudrais revenir à la première partie concernant les transferts. Vous avez évoqué les expériences assez convaincantes sur les transferts. Il y a une littérature qui m'embarrasse un peu, car elle n'est pas souvent de très bonne qualité, mais elle existe.

Elle indique que des transferts de bactéries commensales de l'intestin, des probiotiques, préviennent la survenue de diverses maladies. Je connais surtout celles dans mon domaine : les maladies auto-immunes et allergiques. Cela non seulement dans des modèles de souris « *germ free* » mais même dans des modèles de souris qui ne le sont pas, avec une dysbiose, chez lesquelles l'administration de ces probiotiques a un effet de prévention.

Des études chez l'homme ont été faites, mais cela reste à confirmer, comme il est dit poliment. Néanmoins, je voudrais savoir si des probiotiques, donc des bactéries sélectionnées pour leur intérêt potentiel, ne pourraient pas être utilisées à la place des transplantations fécales un peu laborieuses.

**Philippe SANSONETTI** - Cela me paraît essentiel de réfléchir à cet aspect des choses. Maintenant, l'avantage de la transposition fécale est qu'elle transfère un microbiote complet alors que, si nous voulons commencer à reconstruire un microbiote un peu artificiel, nous faisons un peu les apprentis-sorciers, car nous ne connaissons pas encore suffisamment les éléments importants nécessaires à l'équilibre homéostatique et nous risquons de faire des erreurs. Les probiotiques classiques peuvent-ils jouer ce rôle ? C'est possible, mais c'est loin d'être prouvé.

Les probiotiques de troisième ou quatrième génération peuvent d'ailleurs jouer des rôles, même si cliniquement ce n'est clairement pas démontré. Nous en voyons qui sont anti-inflammatoires, un élément important dans la régulation de production de mucus. Nous entrons dans une période où il faut accumuler de la connaissance.

**Iradj SOBHANI** - Sur le risque élevé du cancer, il y a un modèle humain que nous connaissons très bien : c'est le syndrome de Lynch. Pour le cancer du côlon et le microbiote, vraisemblablement les bactéries dites « starters » ne sont pas des bactéries d'accompagnement. Selon le modèle de Lynch, lorsque nous prenons au sein de la même famille des individus qui ont une mutation constitutionnelle, donc un très haut risque pour le cancer du côlon dès l'âge de 30/40 ans, l'initiation est déjà là. La jeunesse du cancer est un cumul de mutations sur plusieurs gènes. Grâce à ce modèle, il est possible de définir la communauté de bactéries dites d'accompagnement. Par ce biais, nous approchons les mécanismes. Le travail qui vient d'être présenté illustre un des mécanismes qui peut expliquer la cancérogénèse sporadique.

**Pierre CORVOL** - Merci de cette précision.

Il y a quelques arguments dans la littérature pour dire que l'Aspirine à petites doses, en chronique, peut avoir un effet sur l'incidence du cancer du côlon. L'Aspirine peut-il jouer un rôle sur la composition du microbiote ?

**Philippe SANSONETTI** - Cela n'a pas été regardé. Ces résultats sont attribués généralement à la diminution de l'inflammation faisant du cancer du côlon, comme l'obésité, le vieillissement, une maladie inflammatoire chronique de bas niveau. Est-ce que l'Aspirine peut jouer sur le microbiote ? Les doses utilisées ne sont pas très élevées...

**Iradj SOBHANI** - Je peux vous apporter des éléments de réponse. Pour faire des études interventionnelles chez l'homme, il faut attendre longtemps : 15/20 ans. C'est pour cette raison que nous avons pris le modèle du syndrome de Lynch. Un projet de recherche clinique est déjà démarré depuis l'an dernier, financé par l'Institut du Cancer. Il propose à des individus à très haut risque de cancer, après randomisation, de recevoir des petites doses d'ASPEGIC sur 3 ans avec deux coloscopies. J'espère que, d'ici cinq ans, nous allons pouvoir communiquer les résultats. Nous étudions également le microbiote périodiquement au temps T = 0, à un an et à 3 ans.

\* \*

\*

**Pierre CORVOL** - Je voudrais remercier à nouveau la Fondation Mérieux de nous avoir permis de nous éclairer sur ce dont nous discutons souvent et dont nous parlons sans savoir très précisément de quoi il s'agit. Vous nous avez ouvert une voie extrêmement importante en tant que biologistes, médecins, curieux des sciences d'une manière générale. Nous avons beaucoup appris au cours de cette journée.

Je voudrais remercier Jean-Pierre DECOR, tous les orateurs et vous dire tout le plaisir que nous avons à ces réunions annuelles qui, nous l'espérons, continueront. Merci beaucoup.

***La séance est levée à 16 h 25.***