

# UMR GenPhySE

## Équipe NED (Nutrition et Ecosystèmes Digestifs)



Orientation, contrôle et remédiation de l'écosystème digestif

# Le microbiote digestif : un acteur de la préservation de notre santé

Sylvie Combes, Laurent Cauquil



Ecole d'Ingénieurs



GenPhySE

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage

Master 2 BT, ENSAT, 15 novembre 2016



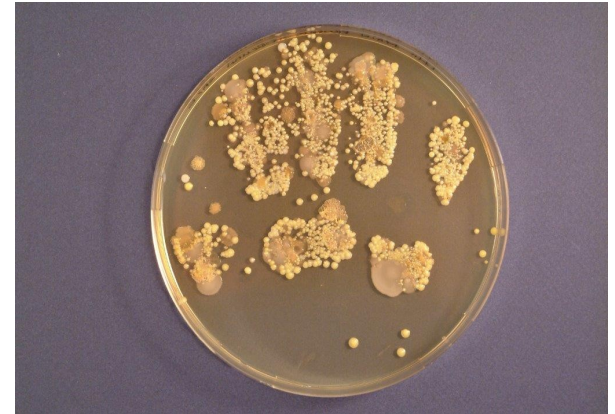
## Un microbe, c'est ...

Invisible à l'œil nu

Visible au microscope

Micro : petit / Biote : vie

Main sur une boîte de Pétri

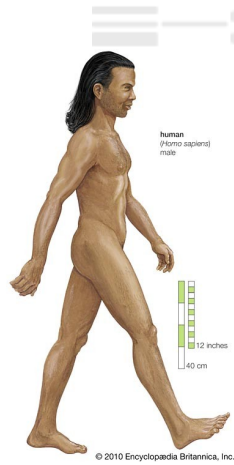


## Un microbiote, c'est ...

un ensemble de microbes différents vivants dans un écosystème  
= bactéries + virus + champignons

## Le microbiome, c'est... selon les auteurs

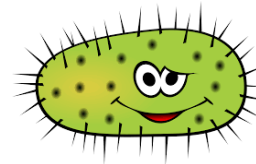
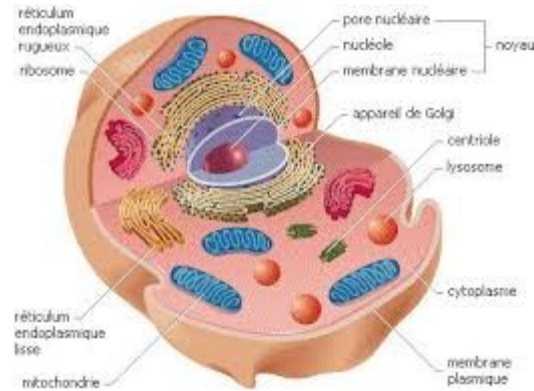
- l'ensemble des microbiotes observés
- ou
- le microbiote dans son environnement (biotope)
- ou
- l'ensemble des génomes microbiens d'un microbiote



# *Homo sapiens* :

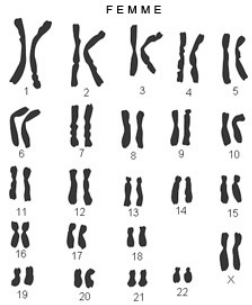
... en nombres...

ratio bactéries : cellules humaines de 1:1  
(Sender et al 2016 Cell)



~1 kilogramme de biomasse bactérienne

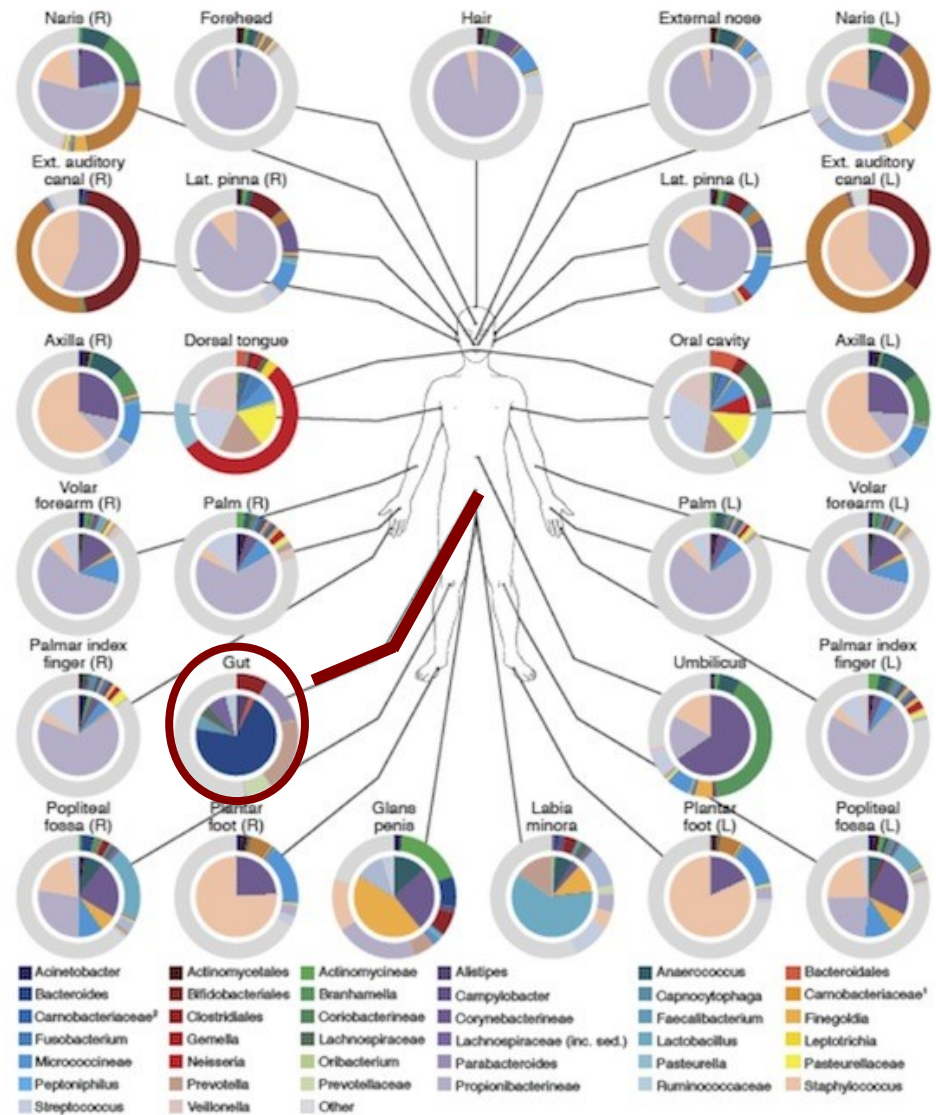
# Phénotype de l'individu



- Expression de ses gènes

- Expression des gènes des microbiotes qui le colonise

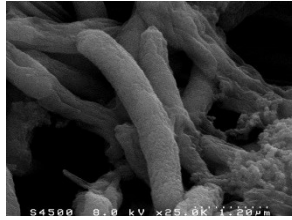
Chaque individu est un hybride hôte / microbe



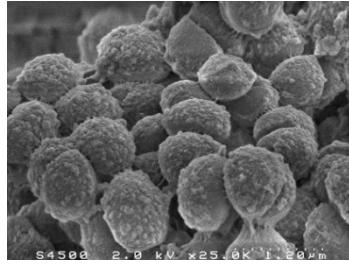
Notion d'holobionte et d'hologénome



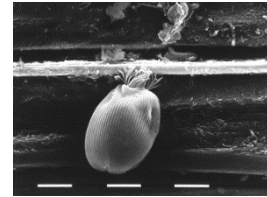
# Le microbiote intestinale : organe situé à l'interface du bol alimentaire et de la muqueuse intestinale



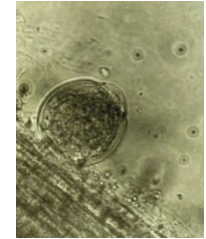
*Faecalibacterium prausnitzii*



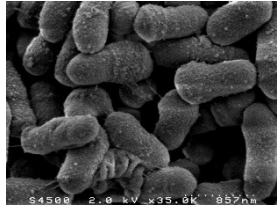
*Ruminococcus Spp*



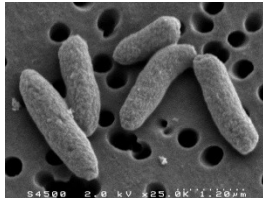
Protozoaire



Champignon



*Bacteroides dorei*



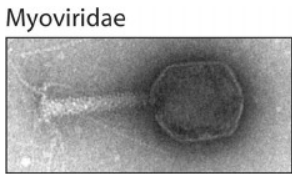
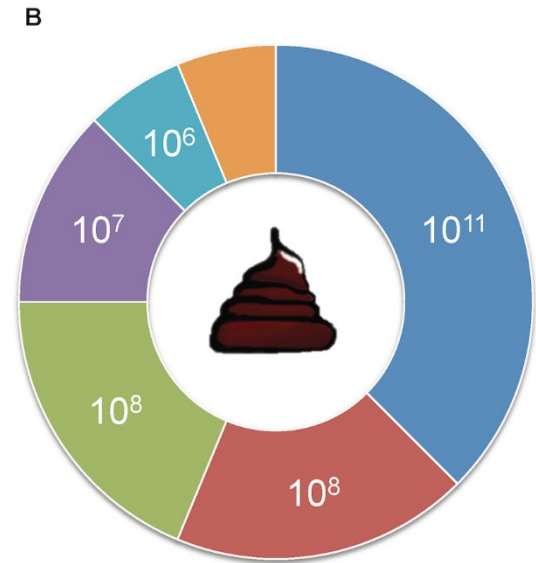
*Escherichia coli*



107 - 108 Archées

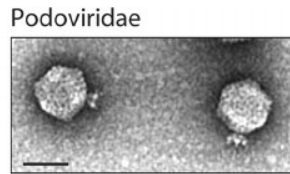
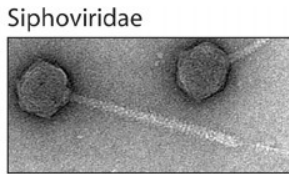
1012 Bactéries/g

Photos UEPSD



108 - 109 Virus

doi: 10.1128/MMBR.00011-11 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011

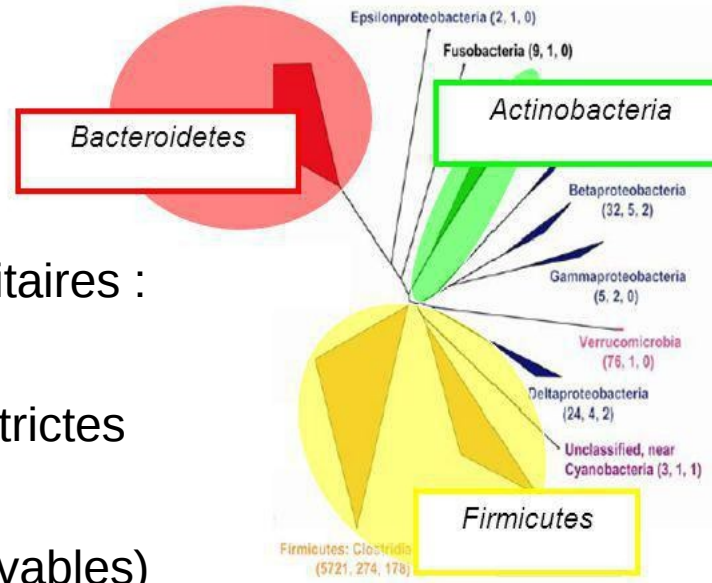


- Bacteria
- Colonocytes
- Archaea
- Fungi
- Viruses
- Metabolites, Protists, Other



# Le microbiote intestinal humain

Abondance :  $10^{14}$  bactéries / Diversité :  $\sim 1000$  espèces  
 5 phyla (divisions) majeurs



Trois phyla (division) majoritaires :

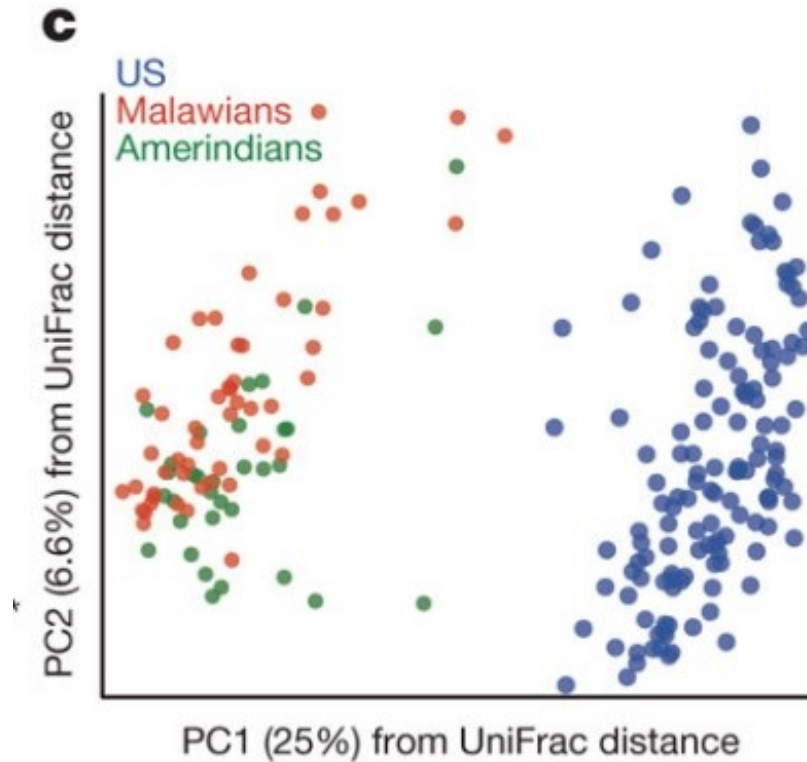
80% d'espèces anaérobies strictes

et

80-70 % inconnues (non cultivables)

Grande variabilité inter individuelle □ nature et abondances des espèces

~ 1000 espèces □ empreinte fécale  
5 millions de gènes (20 000 gènes humains)

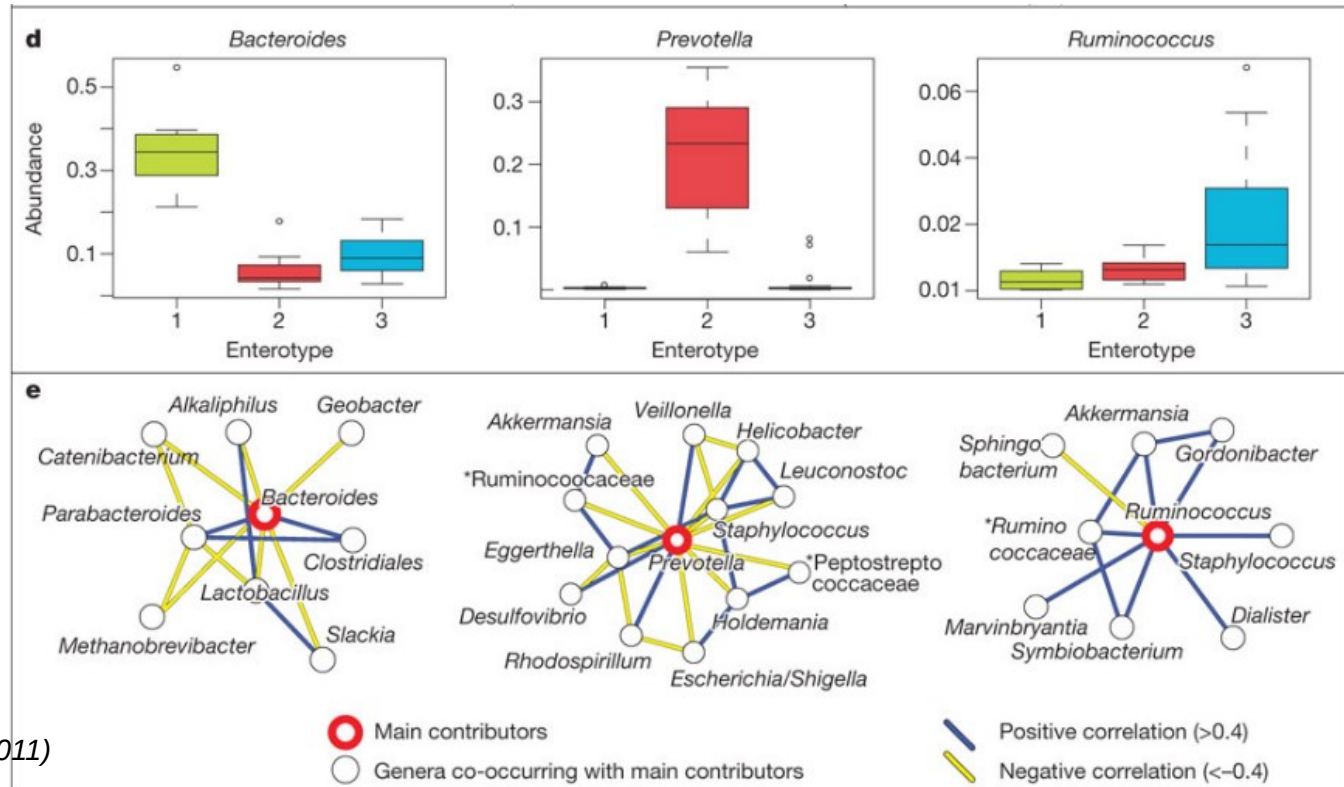


Yatsunenko et al. Nature (2012) doi:10.1038/nature11053

Grand variabilité inter individuelle □ nature et abondances des espèces

~ 1000 espèces □ empreinte fécale  
5 millions de gènes (20 000 gènes humains)

## Notion d'Enterotype



(Arumugam et al., 2011)

# Colonisation du tractus digestif du nouveau né

In utero, le TD est stérile

Les microorganismes primo-colonisateurs sont un échantillonnage d'une méta-communauté plus large incluant toutes les espèces capables de vivre et de se développer dans le tractus digestif (Curtis et Sloan, 2004)



- ✓ Mère: voie de naissance, tractus genital et digestif, peau
- ✓ Environnement : allaitement, contact, hygiène, soin, entourage

Le microbiote se stabilise en lien avec le type d'alimentation et le mode de vie

Illustration : [http://pt.slideshare.net/mikesorg/human-nutrition-gut-microbiome-and-immune-system/8?](http://pt.slideshare.net/mikesorg/human-nutrition-gut-microbiome-and-immune-system/8?smfNoRedir=1)  
smtNoRedir=1



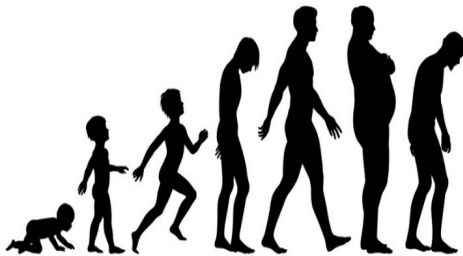
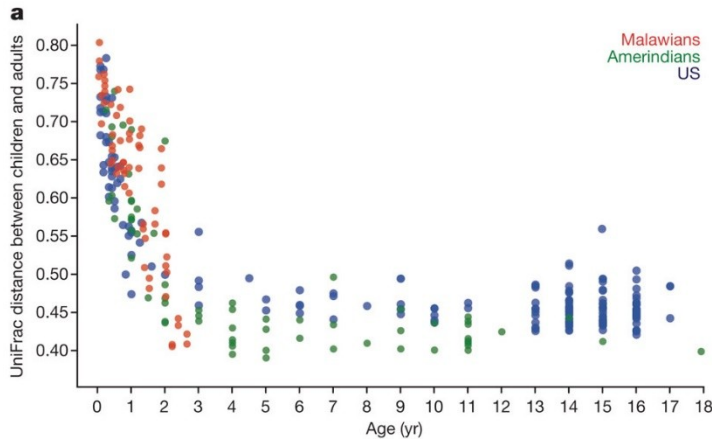
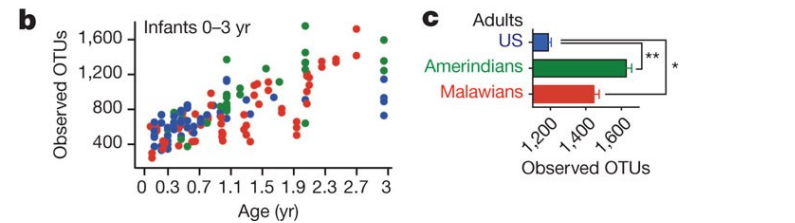
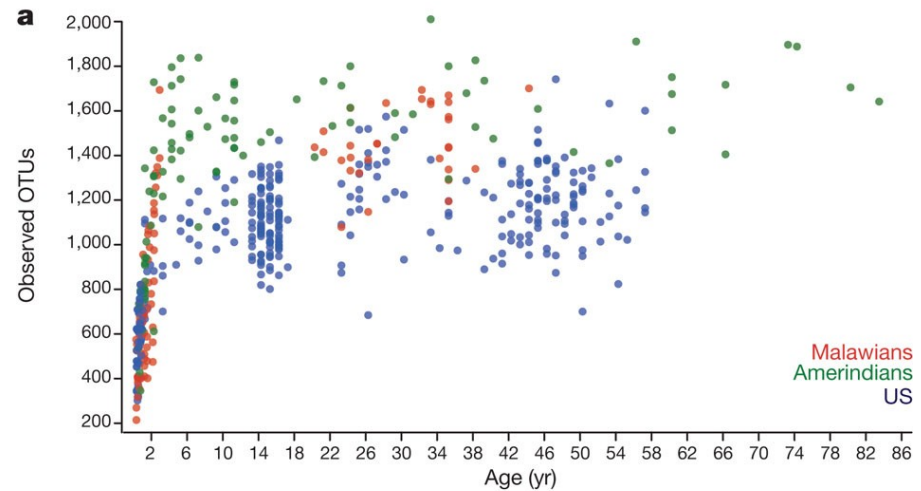
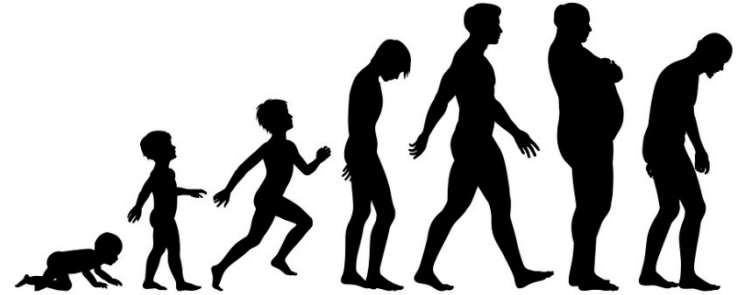
# Succession écologique des espèces

Nouveau né : **conditions oxydatives**

□ primo colonisateur bactéries anaérobies facultatives (Protobactéria)

Milieu devient plus **réducteur**

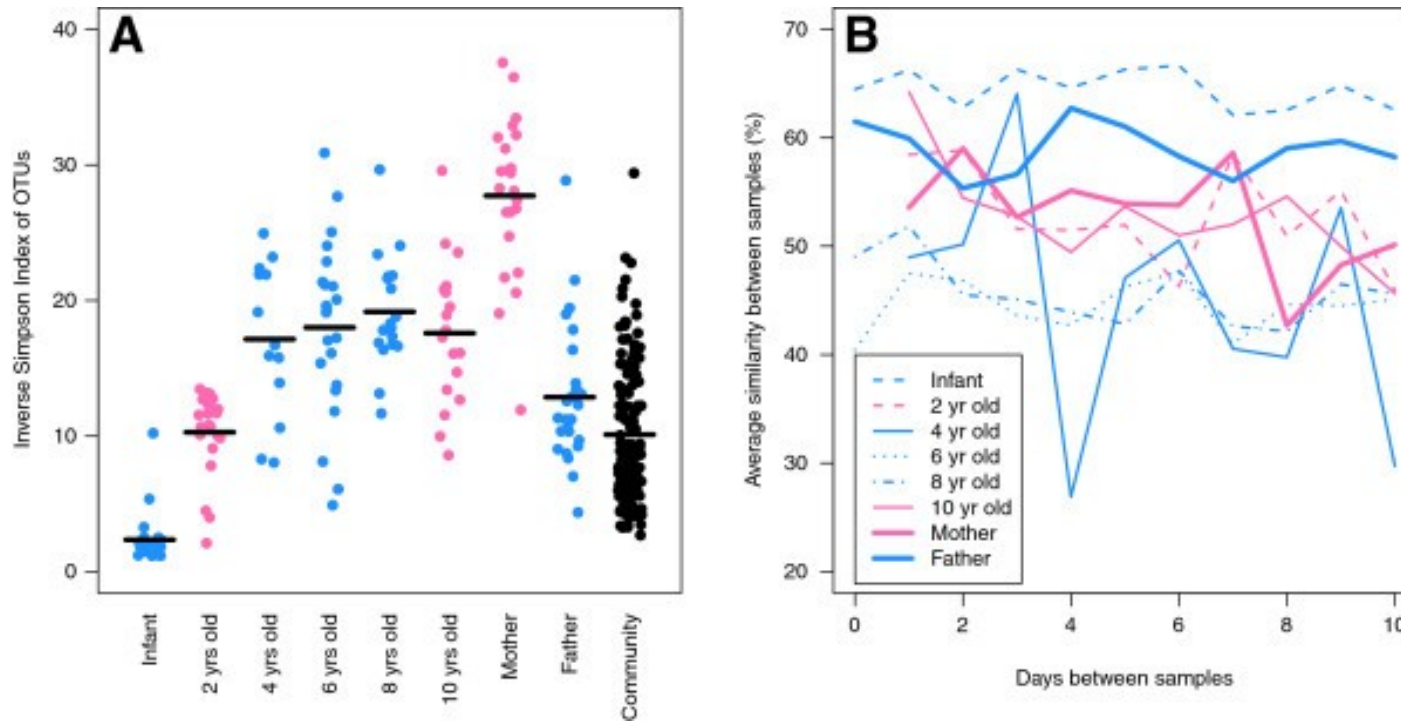
□ installation des phyla Bacteroides et Actinobacteria, et Firmicutes



Yatsunenکو *et al. Nature* (2012) doi:10.1038/nature11053

# • Dynamique d'abondance relative des espèces

Au sein des membres d'une seule famille



Une diversité qui évolue en fonction du temps

(Schloss et al 2014 Microbiome)

# La gnotobiologie, outil d'étude des rôles du microbiote intestinal



- Souris axénique :
  - Elevées dès la naissance dans un milieu stérile
  - Dépourvues de microbiote intestinal

# Rôle du microbiote digestif dans la construction de l'individu

## Nutrition

fibres -> VFA, bacterial proteins, vitamins ...

## Health

Intestinal barrier, immunity  
Detoxification

## Storage of lipids

Obesity

## Central nervous system

Autism  
Behaviour

## Feed

**Physiological state, stress** (hormons, etc..)

## Genetics

mucus, digestive secretion, peristaltism, immunity, tolerance

**Microbiota**  
**a**

**Antimicrobial Gene Reservoir**

# Symbiose et rôles physiologiques

1. **Nutrition et maladie métabolique**
2. **Developpement éducation et stimulation du système immunitaire**
3. **Notre deuxième cerveau**

## Contrôler son microbiote pour guérir ou préserver sa santé

1. **Principe écologique**
2. **Mise en place et contrôle néonatale**
3. **Outils biotiques**
4. **Outils abiotiques**

## Contrôler le microbiote des animaux d'élevage

1. **Pour qui : les stratégies digestives**
2. **Pourquoi : les services écosystémiques**
3. **Comment**

## Méthodologie d'exploration des écosystèmes digestifs

## Application statistique : un peu d'R dans l'écosystème digestif



# Symbiose et rôles physiologiques

1. **Nutrition et maladie métabolique**
  - **La chaîne alimentaire**
  - **Focus Obésité**
  - **Focus sous nutrition**
2. **Développement, éducation et stimulation du système immunitaire**
  - **Rôle barrière**
  - **Rôle trophique**
  - **Stimulation, éducation**
  - **Mécanismes impliqués dans le dialogue**
3. **Notre deuxième cerveau**

# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ la chaîne alimentaire

Polysaccharide



Hydrolytic species

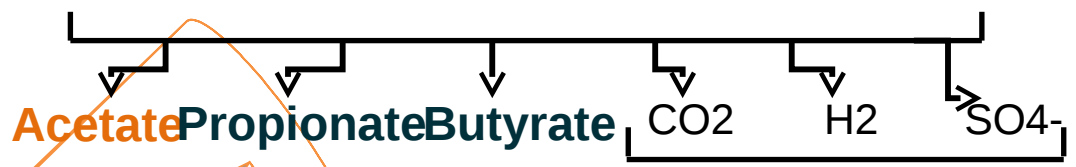
Saccharides- Oligosaccharides

Hydrolytic species



Glycolytic species

Intermediary metabolites



Hydrogenotrophic species

Methanogens

Acetogens

Sulfate-reducing

CH4

Acetate

H2S

- ✓ Nutriments :
  - Fibres
  - Proteins
  - Mucus

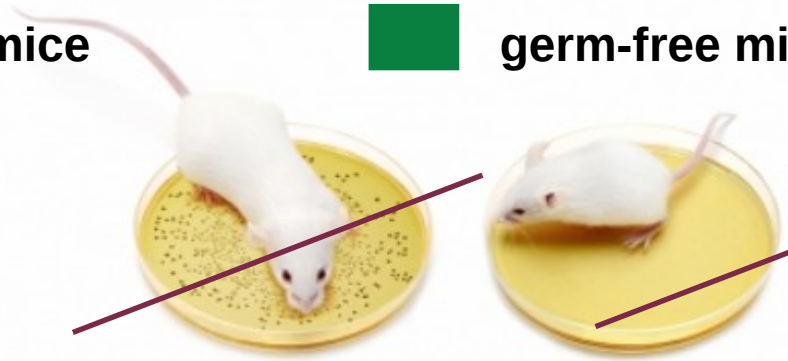
✓ Production of VFA, proteins and vitamins

✓ Host nutrition

# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition

conventional mice

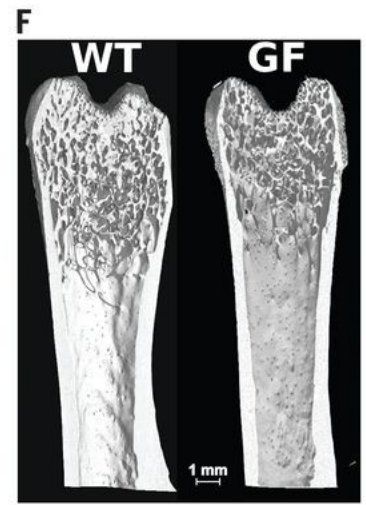
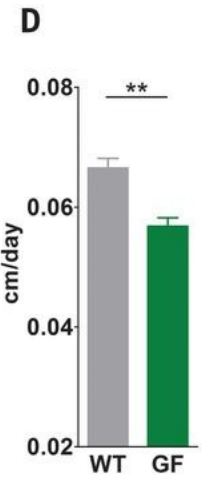
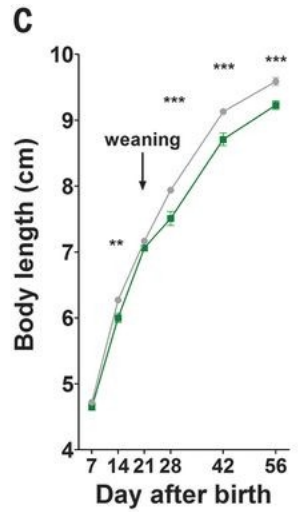
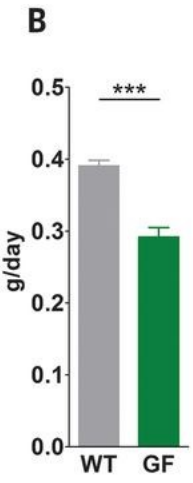
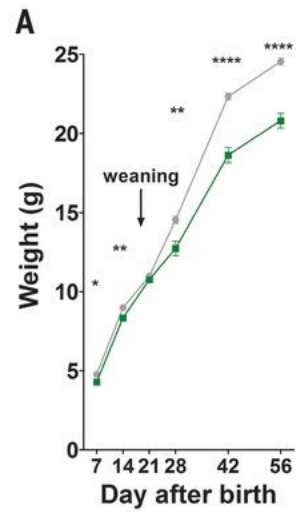
germ-free mice



© CNRS, Vincent Moncorgé  
[http://presse.inra.fr//Ressources/Communes-de-presse/microbiote\\_croissance](http://presse.inra.fr//Ressources/Communes-de-presse/microbiote_croissance)

Poids

Taille



# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition

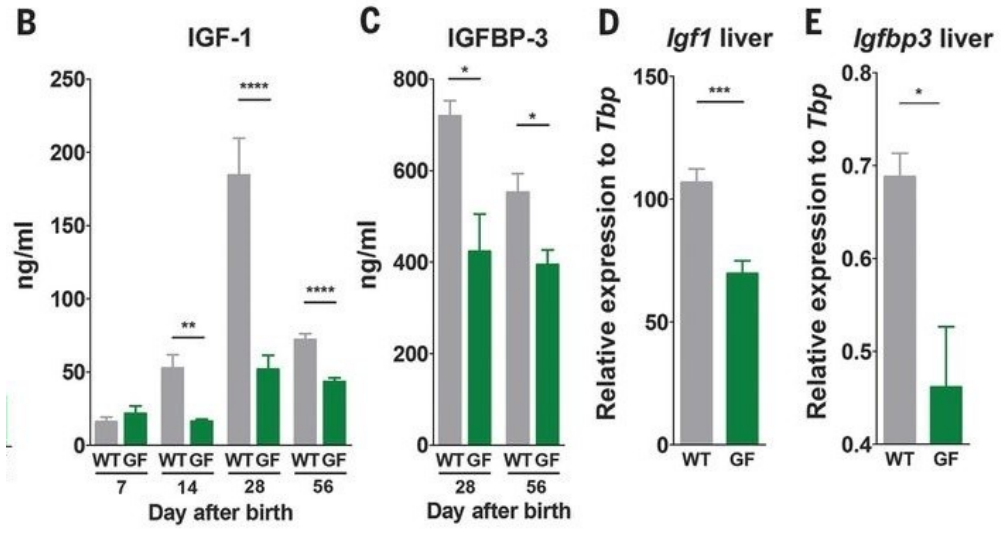
■ conventional mice

■ germ-free mice



© CNRS, Vincent Moncorgé  
[http://presse.inra.fr//Ressources/Communes-de-presse/microbiote\\_croissance](http://presse.inra.fr//Ressources/Communes-de-presse/microbiote_croissance)

Mécanisme :  
 Modulation sécrétion d'IGF-1



Schwarzer, et al Science, 19 février 2016.

# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition

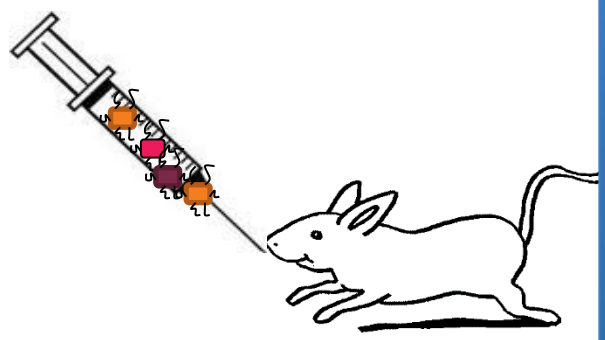
conventional mice



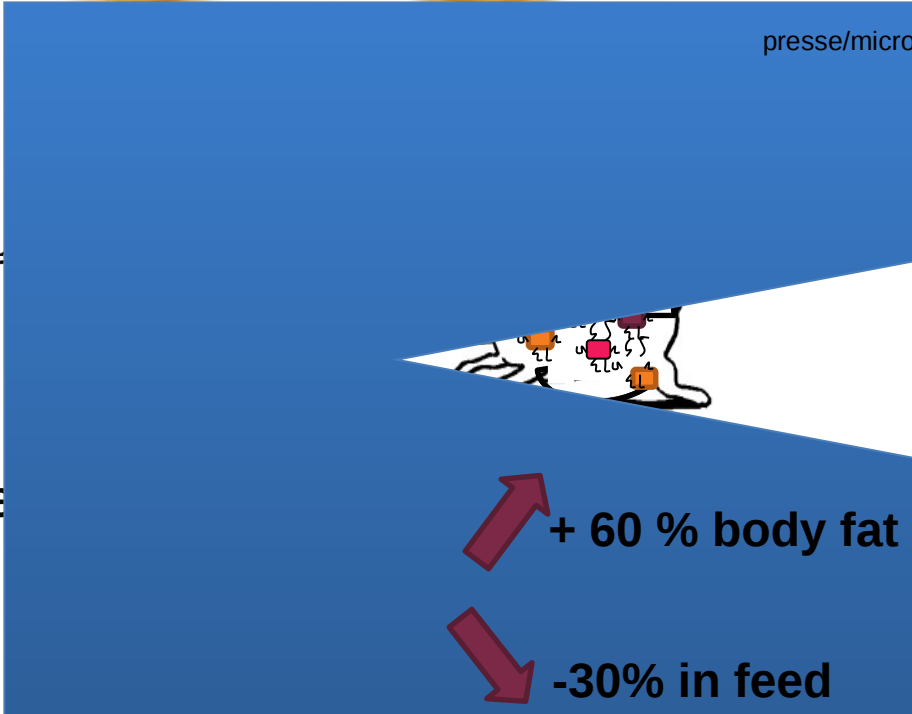
germ-free mice



© CNRS, Vincent Moncorgé  
[http://presse.inra.fr//Ressources/Communes-de-presse/microbiote\\_croissance](http://presse.inra.fr//Ressources/Communes-de-presse/microbiote_croissance)



Inoculation of germ-free mice

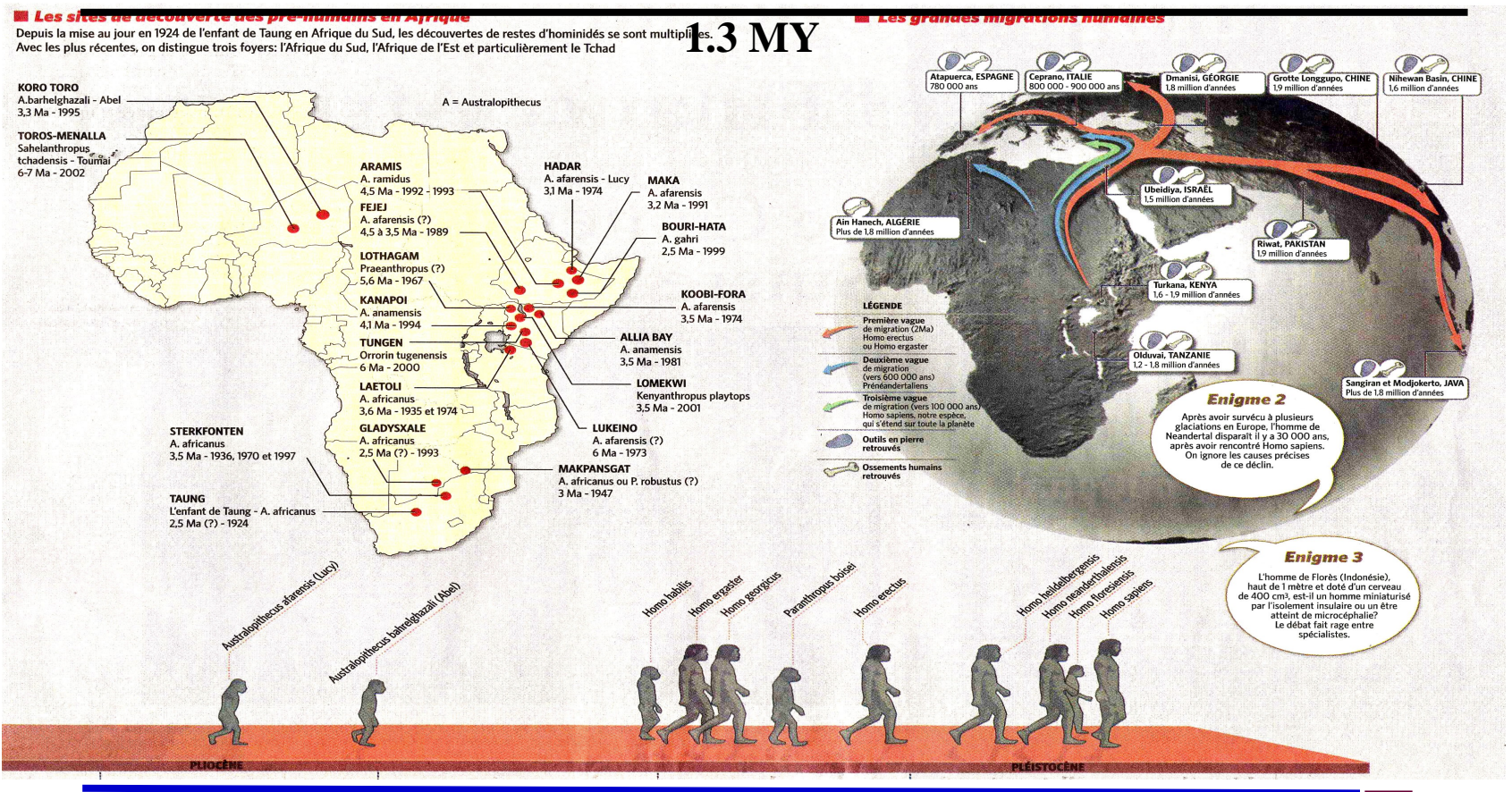


(Flemer et al., 2004)



# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ maladie métabolique

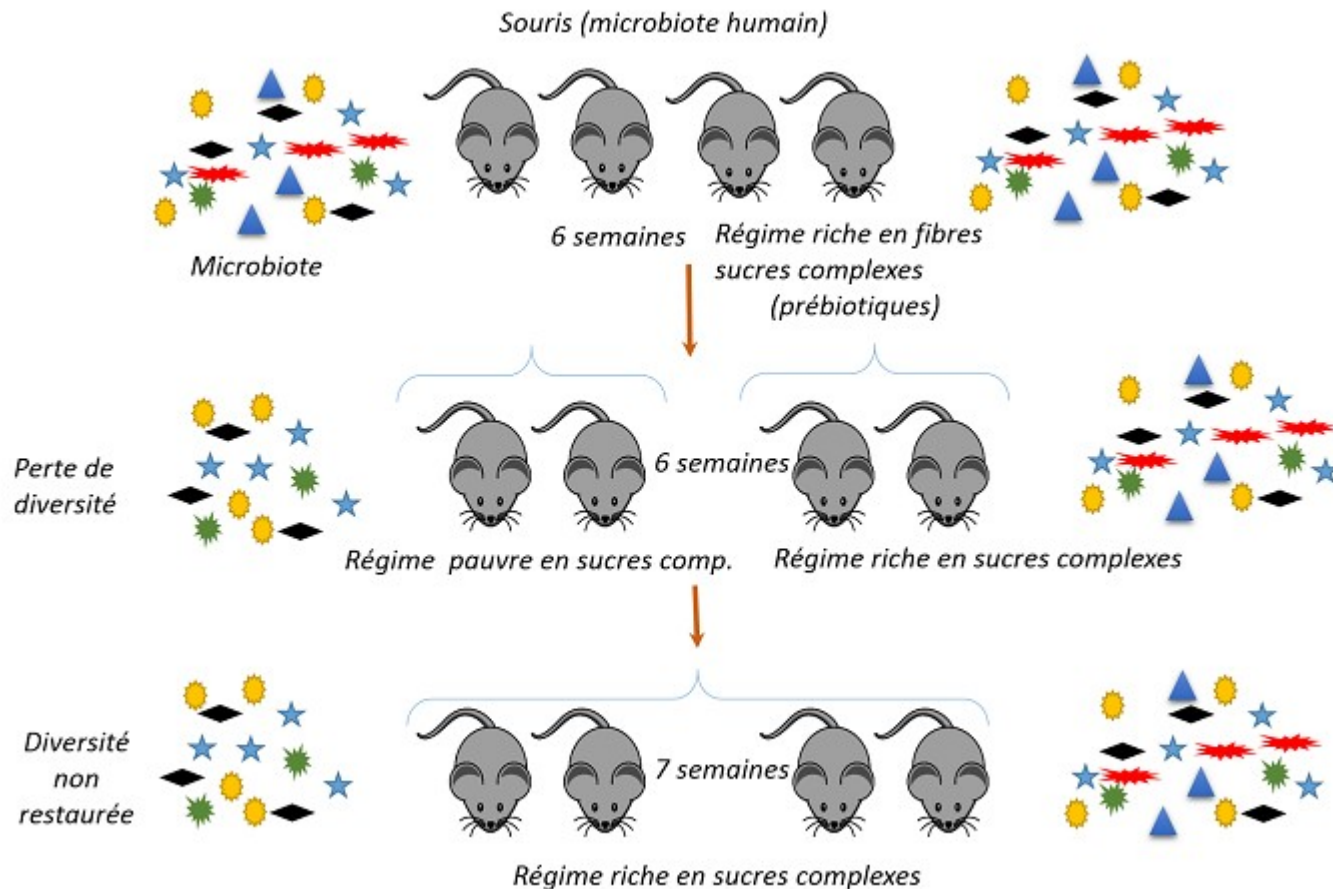
## Histoire naturelle du genre *Homo* : l'alimentation a changé avec un impact potentiellement important sur la symbiose Homme-Microbiote



100 000 à 130 000 générations avec un régime riche en fibres (>60% de l'énergie venant des fruits, légumes, racines, noix,..)

# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ maladie métabolique

- Le régime alimentaire modifie le microbiote à long terme



Sonnenburg et al., 2016 Nature 529, pp 212–215,– doi:10.1038/nature16504

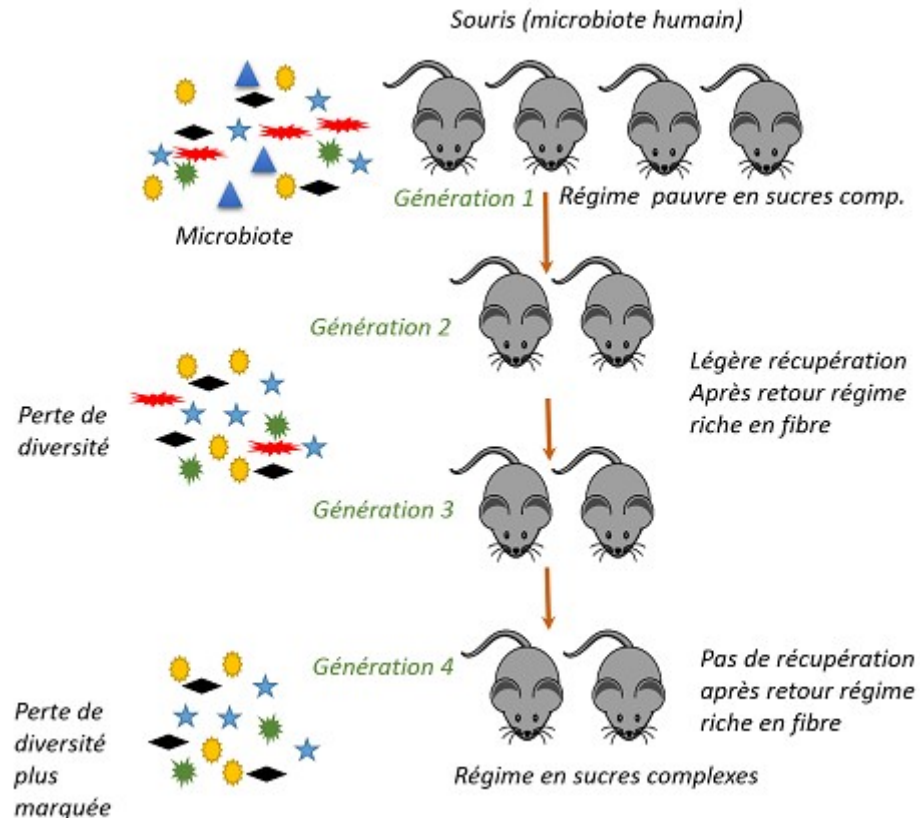
Illustration : <http://lemondeetnous.cafe-sciences.org/2016/04/fibres-et-microbiote-les-effets-sur-le-tres-long-terme/>





# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ maladie métabolique

- Le régime alimentaire modifie le microbiote à long terme

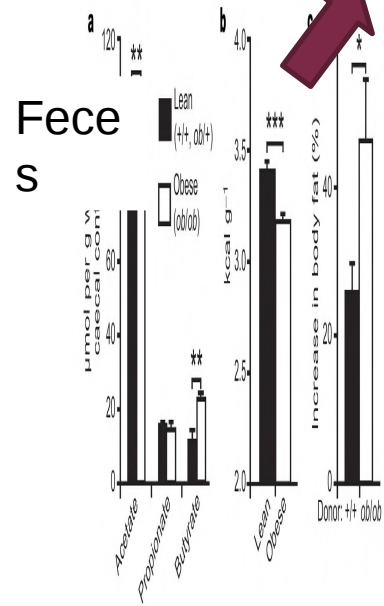
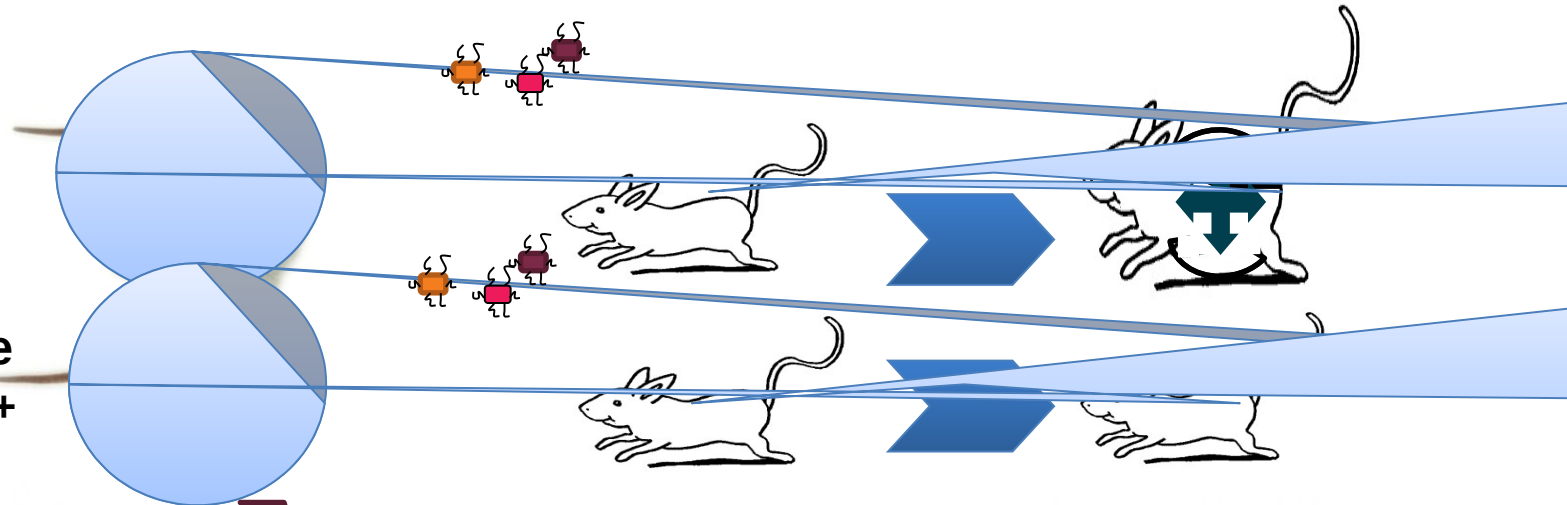


# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ obésité

## • Obésité

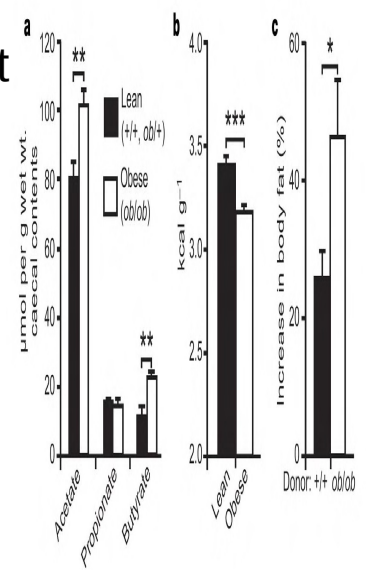
Obese mice  
*ob/ob*

Lean mice  
*+/+* ou *ob/+*



in the energy extraction from diet

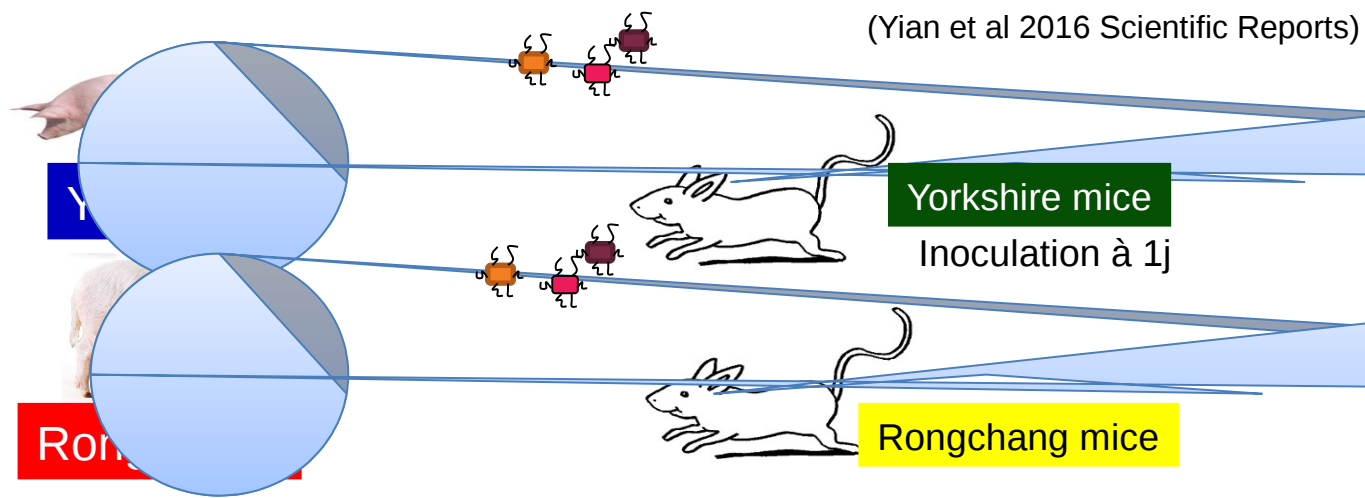
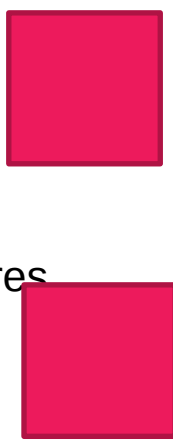
greater weight gain



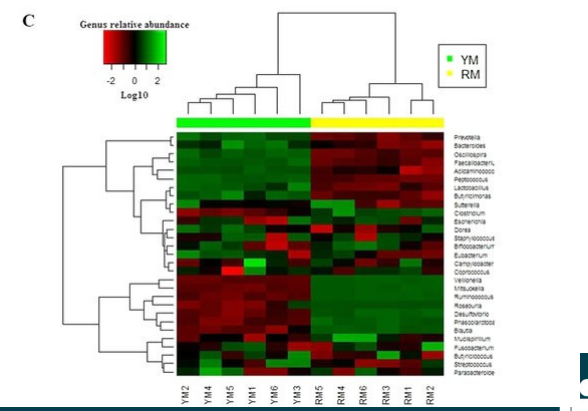
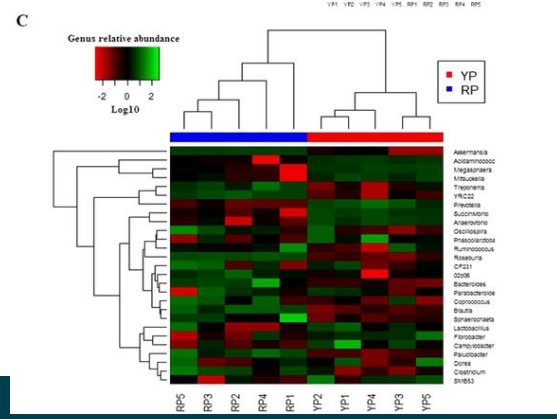
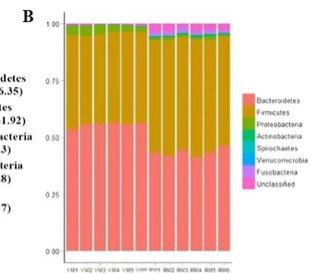
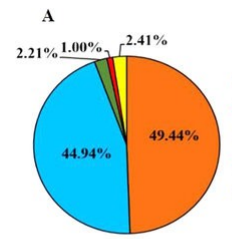
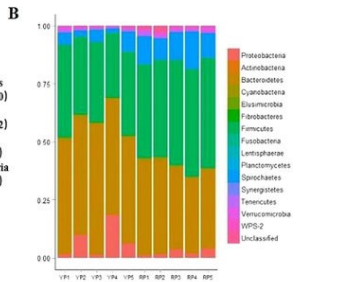
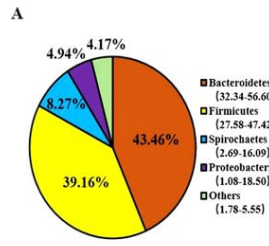
(Turnbaugh et al., 2006)

# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition obésité

Adiposité  
Lipides intramusculaires



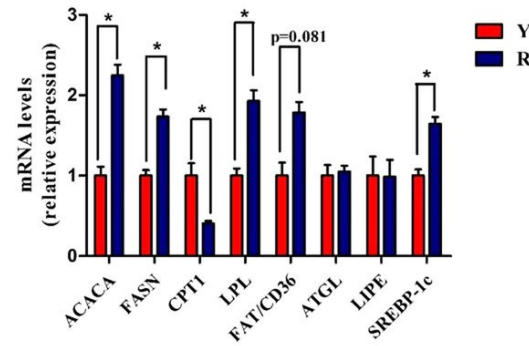
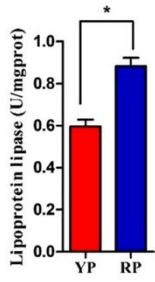
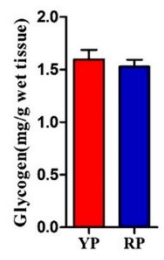
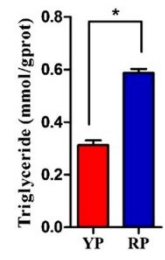
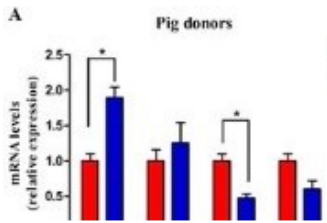
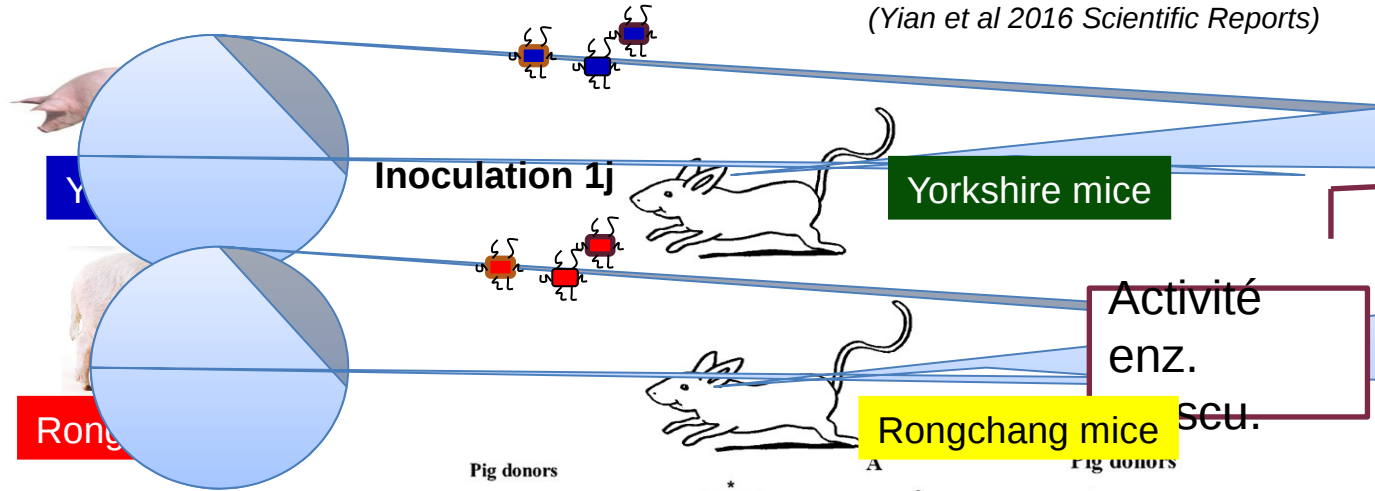
(Yian et al 2016 Scientific Reports)





# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition   métabolisme musculaire

Adiposité  
Lipides intramusculaires



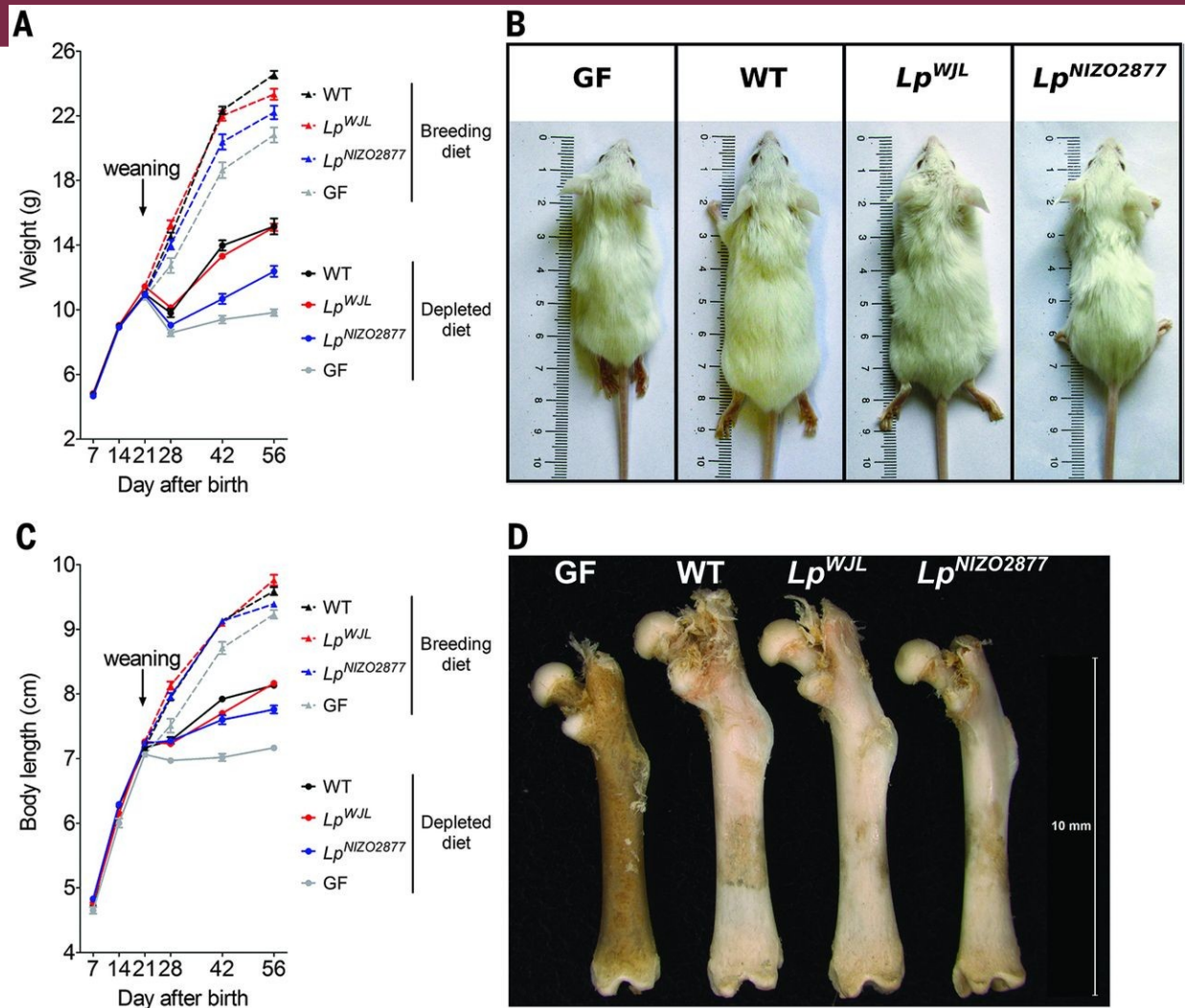
Métabolite

Proportion MHC

S musculaire

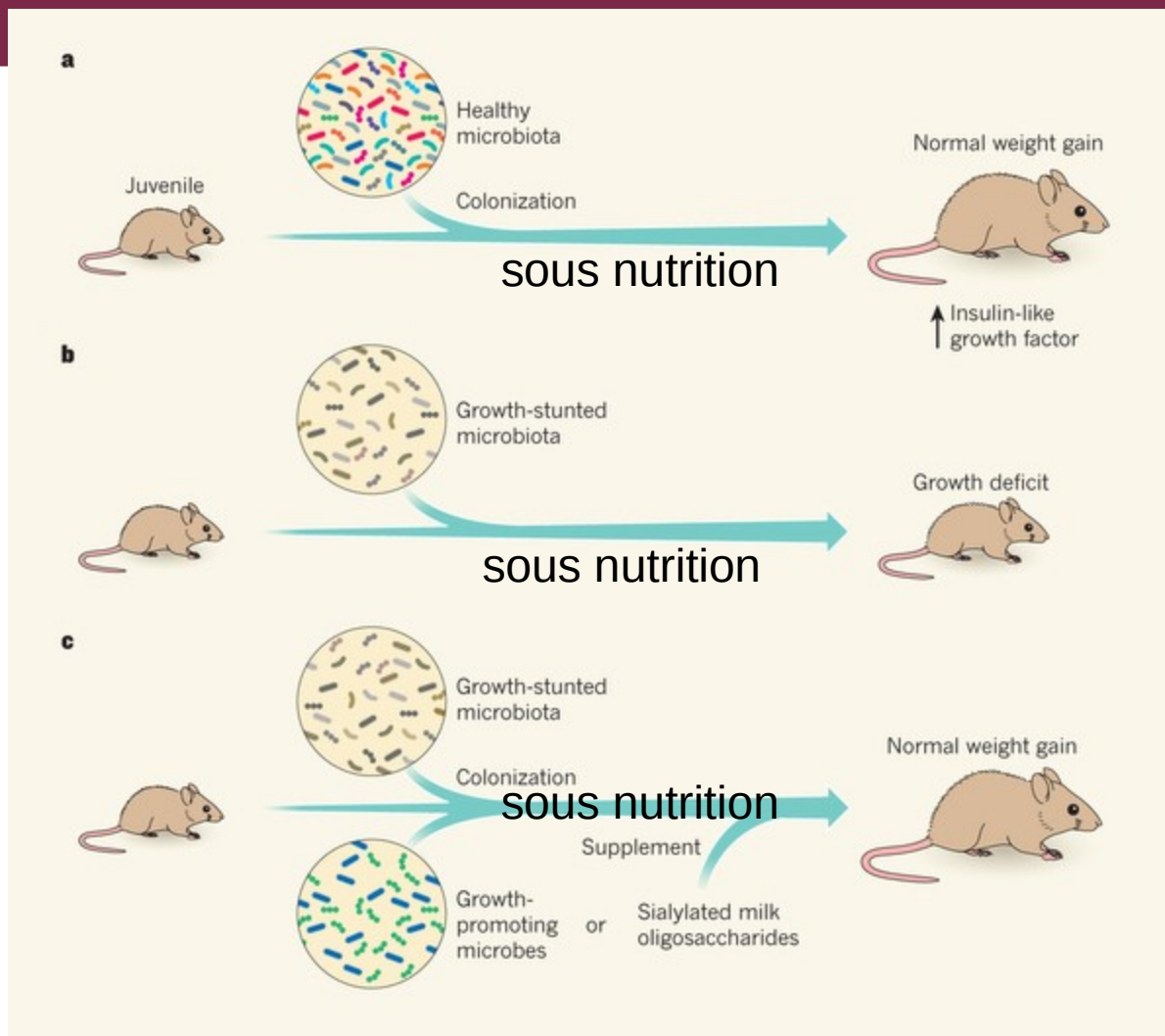
# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ sous nutrition et croissance

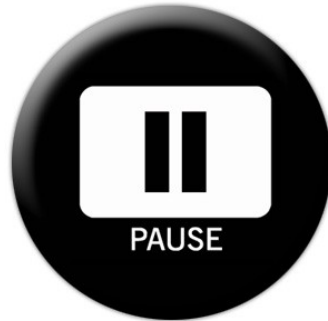
En sous-nutrition les écarts GF - conventionnel sont plus importants



Schwarzer et al. Science 2016;351:854-857

# Symbiose et rôles physiologiques : Nutrition □ sous nutrition et croissance





## Symbiose et rôles physiologiques

1. **Nutrition et maladie métabolique**
  - **La chaîne alimentaire**
  - **Focus Obésité**
  - **Focus sous nutrition**
2. **Développement, éducation et stimulation du système immunitaire**
  - **Rôle barrière**
  - **Rôle trophique**
  - **Stimulation, éducation**
  - **Mécanismes impliqués dans le dialogue**
3. **Notre deuxième cerveau**

## Le système immunitaire:

- Prévenir l'introduction et le développement de pathogènes
- Discriminer le soi du non soi



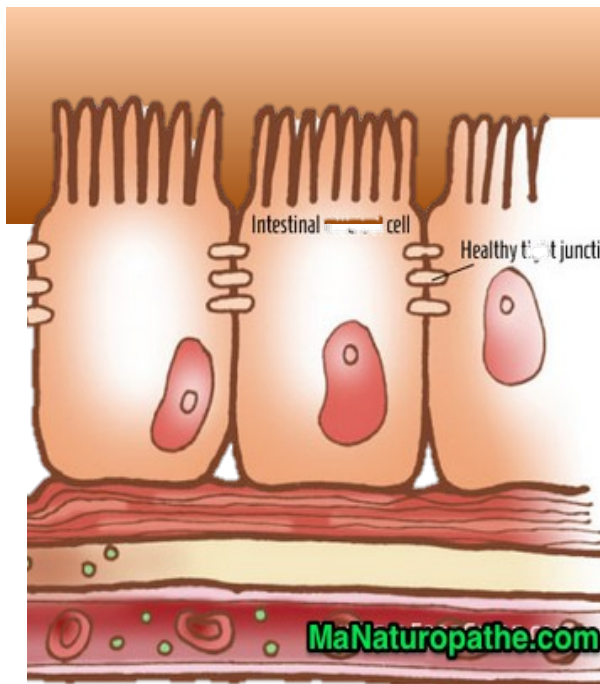
L'enjeu est de **tolérer** et **contenir** le microbiote commensale  
(e.g.  $10^{10-12}$  bactéries/g!)

- Rôle barrière
- Développement trophique
- Système inné
- Système adaptatif
- Focus sur les allergies alimentaires
- Focus maladie de Krohn, IBD
- Mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue



# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □ rôle barrière

## • Rôle barrière



## L'épithelium intestinal = une barrière physique et chimique

- Jonctions serrées
- La couche de mucus (cellule calciforme)
- Renouvellement rapide des cellules épithéliales
- Production de molécule antimicrobienne (défensine)



## Microbiote participe à l'effet de Barrière

- ✓ Compétition à l'adhésion
- ✓ Compétition à l'accès au nutriment
- ✓ Production de substances anti-microbiennes

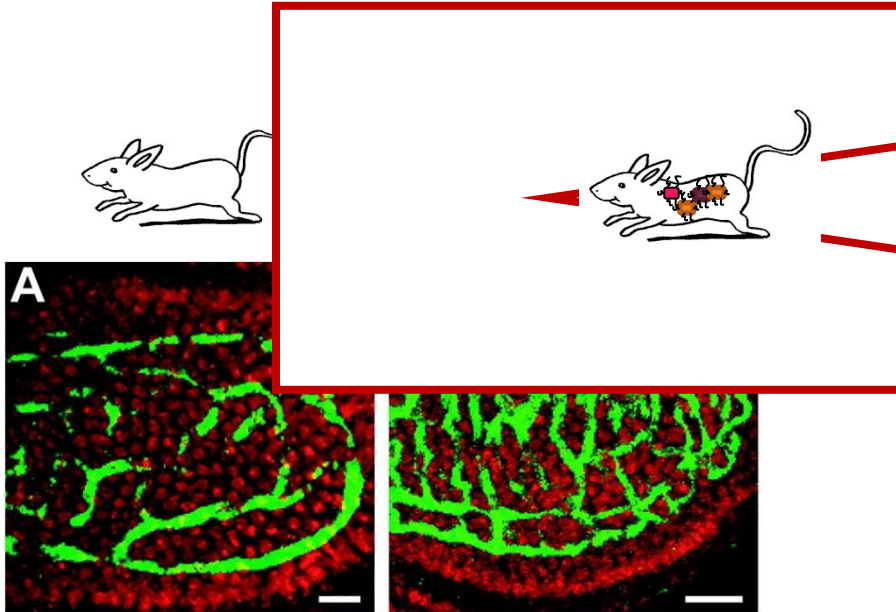


# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □

## développement

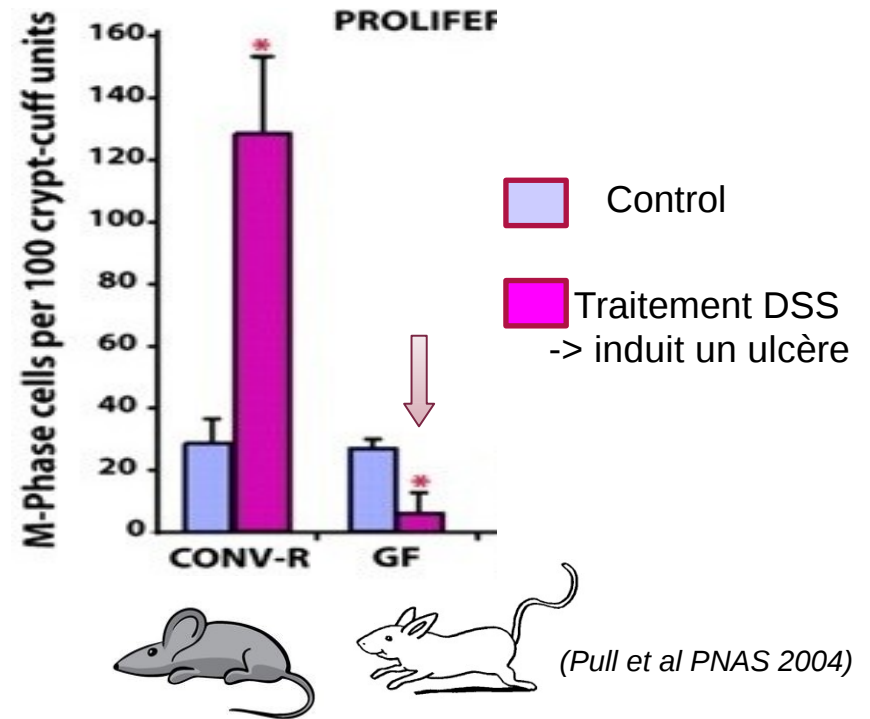
### Acteur du développement

#### ·L'angiogénèse



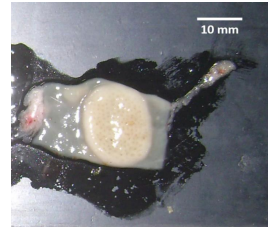
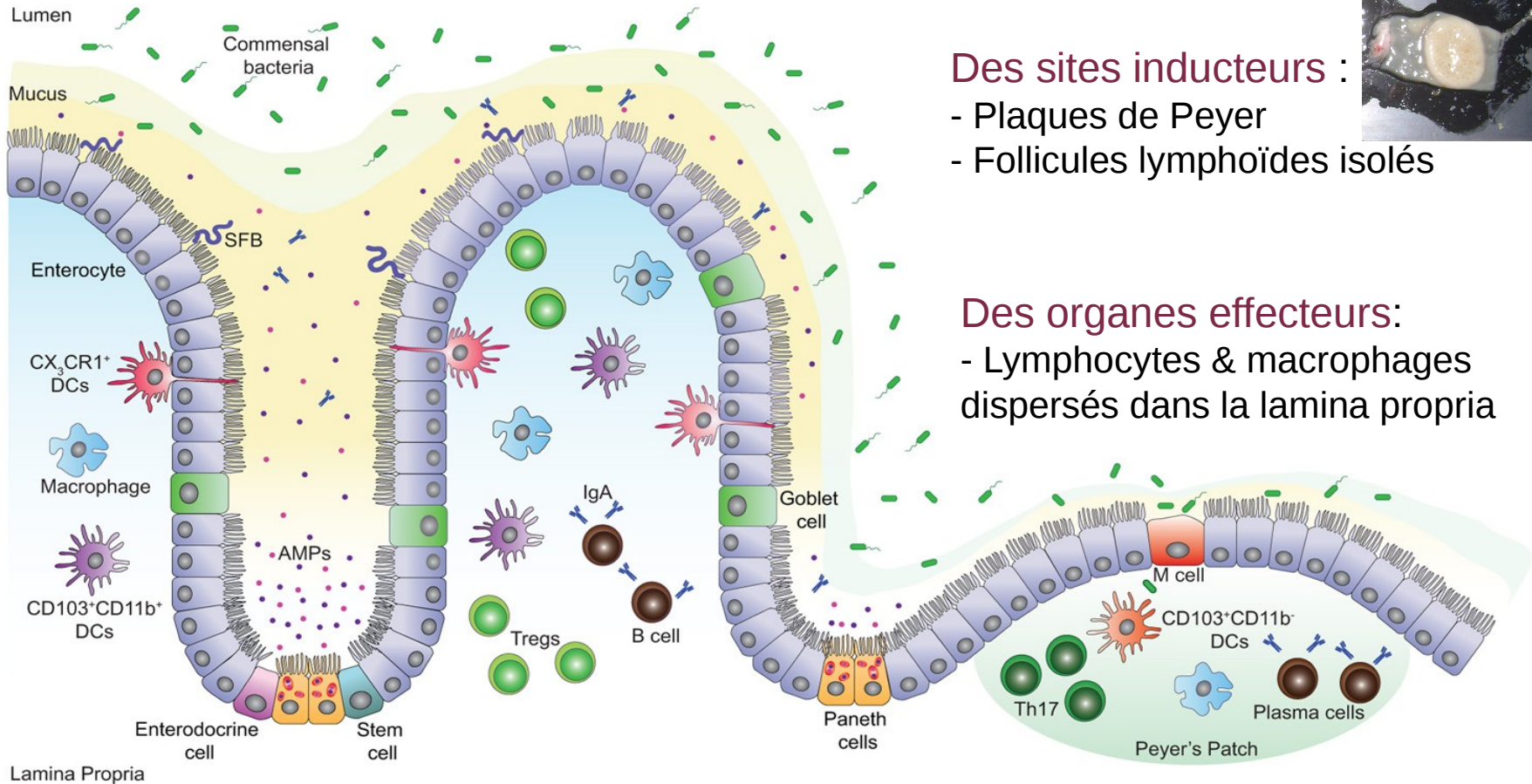
(Stappenbeck et al., 2002)

#### ·la réparation de l'épithélium intestinal



# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI $\square$ SI inné

Tissue)



Des sites inducteurs :

- Plaques de Peyer
- Follicules lymphoïdes isolés

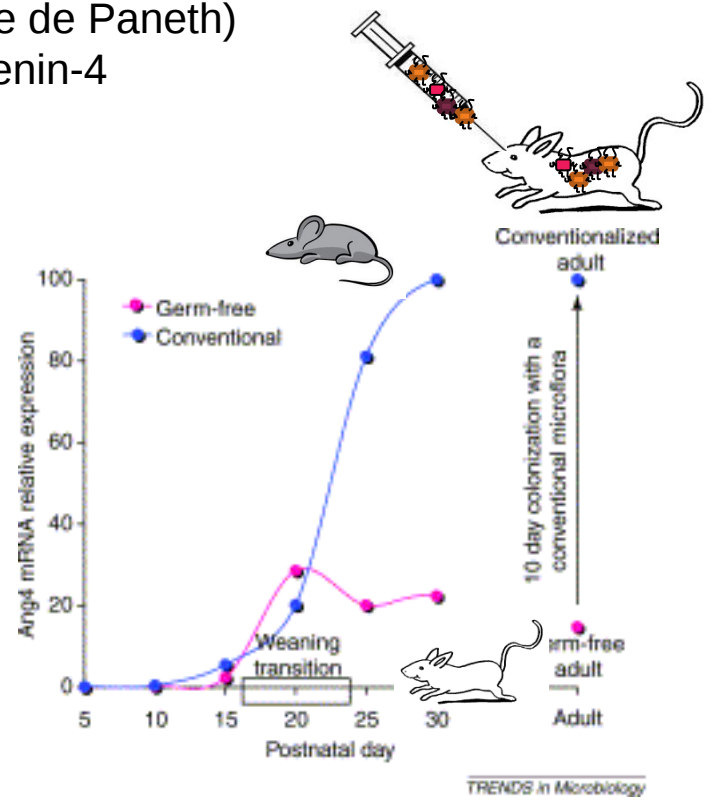
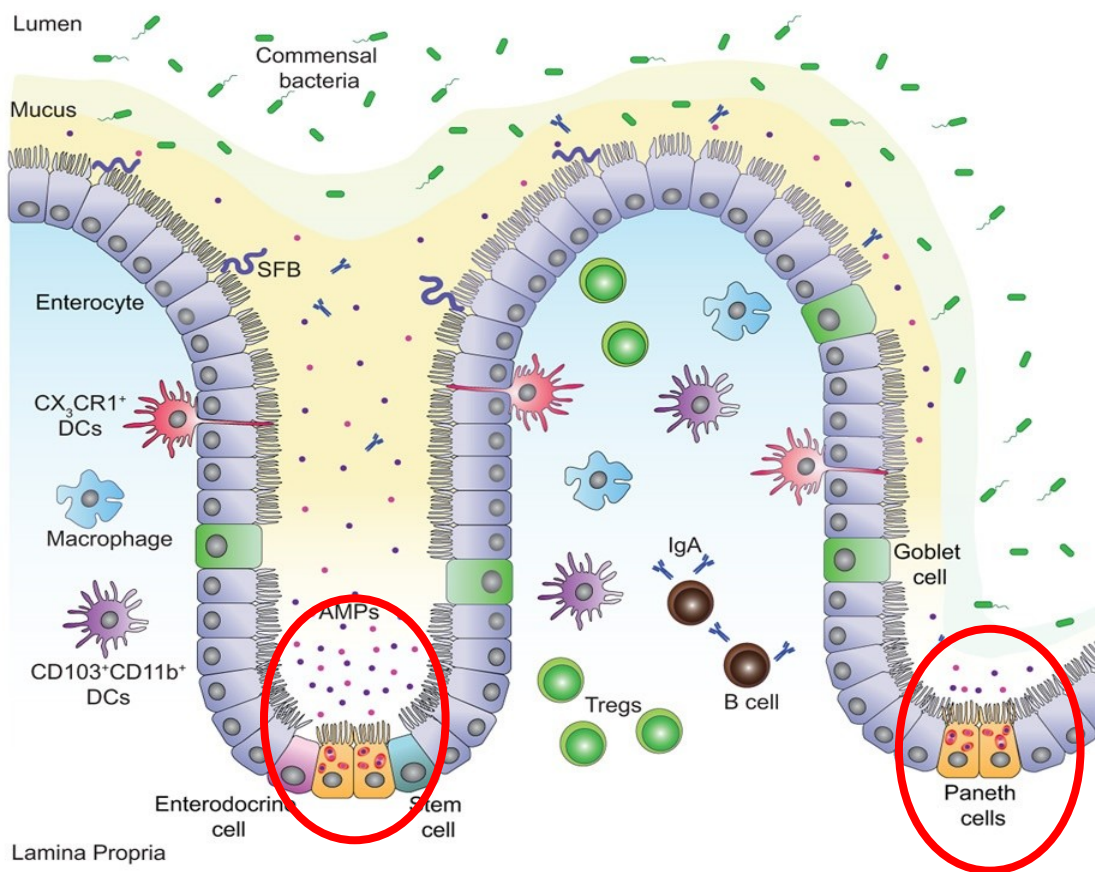
Des organes effecteurs:

- Lymphocytes & macrophages dispersés dans la lamina propria

(Muniz et al Frontiers in Immunology 2012)

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □ SI inné .

• Production de peptides antimicrobiens (cellule de Paneth)  
 ✓ alpha-defensin, RegIII-gamma, angiogenin-4



(Hooper 2004)

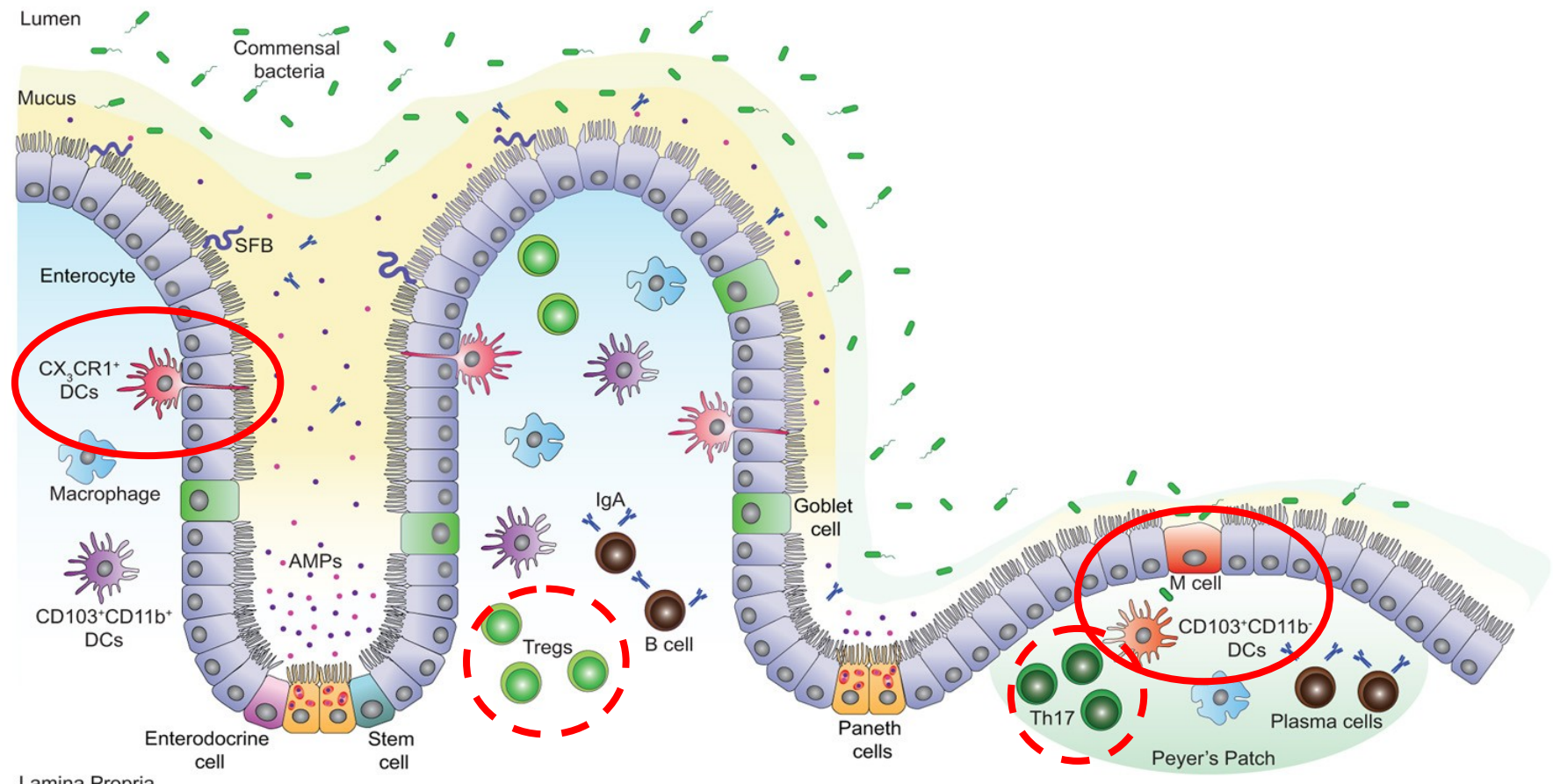
(Muniz et al Frontiers in Immunology 2012)



# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □ SI

inné

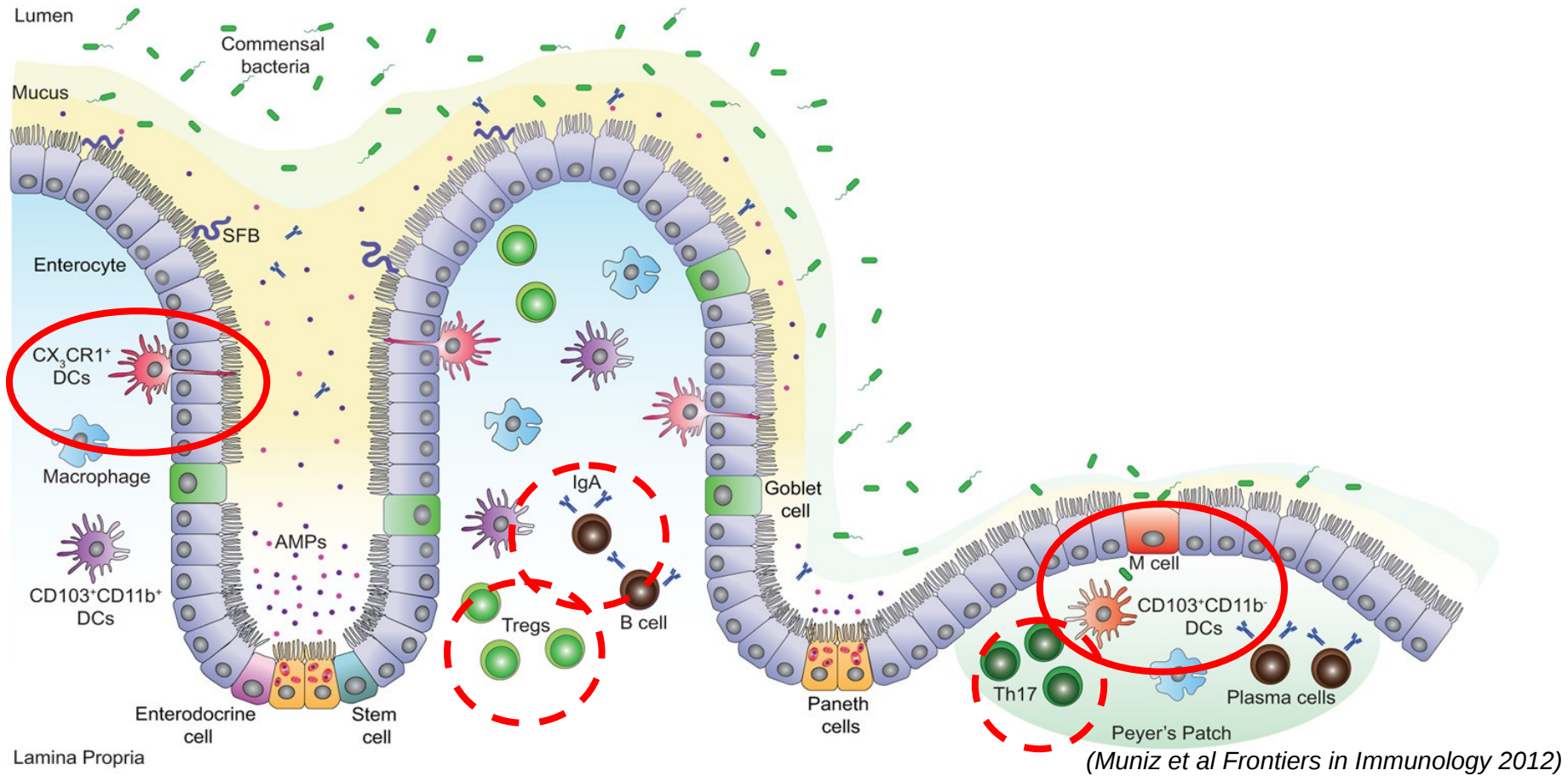
induction de la réponse innée (lymphocyte T et la production de cytokines)



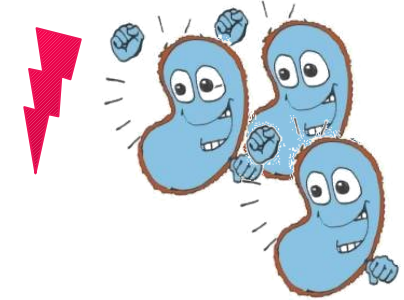
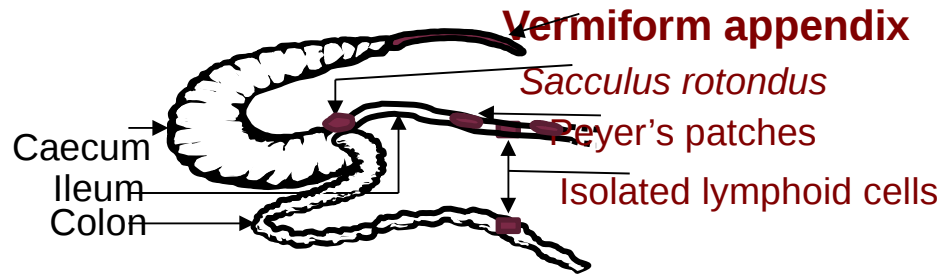
(Muniz et al *Frontiers in Immunology* 2012)

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □ SI adaptatif

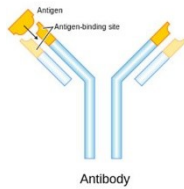
Stimulation de la réponse adaptative (secretion IgA par lymphocyte B)



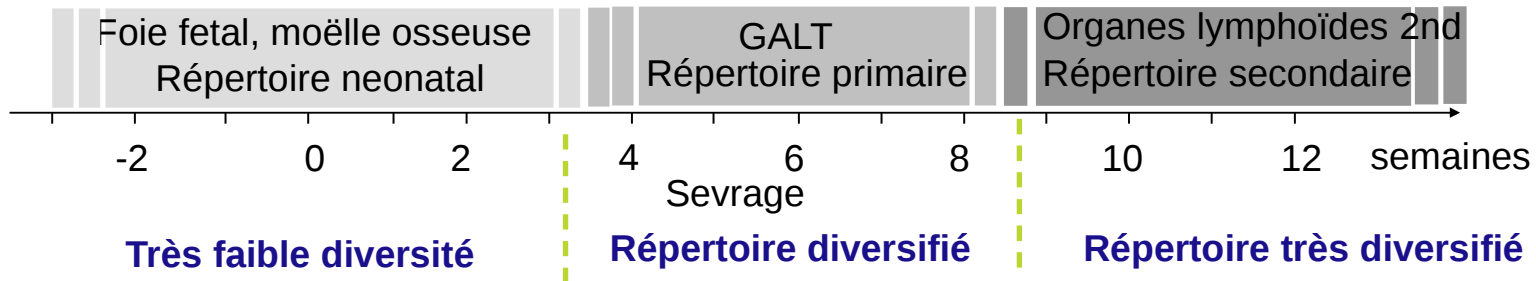
# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □ SI inné



(Rhee et al., 2004; Hanson et Lanning 2008)



Stimulation Ag exogène  
Réponse immunitaire spécifique

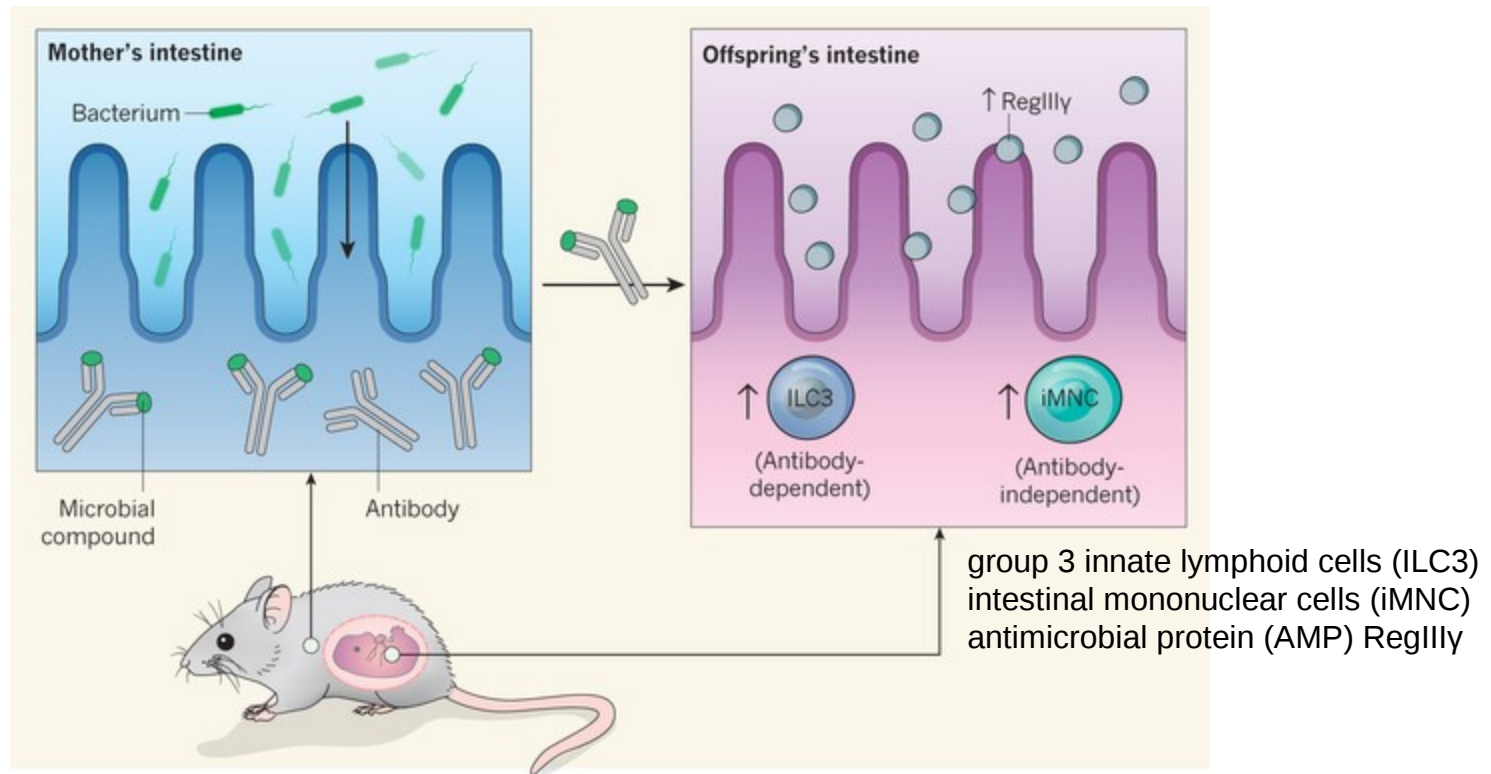


(Fortun-Lamothe et Boullier, 2007)



# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI

- **Education du SI inné in utero par le microbiote de la mère**



La colonisation transitoire de la mère par Ecoli pendant 1 semaine permet la production d'anticorps spécifiques qui vont augmenter le nombre de cellules responsables de la réponse innée non spécifique chez le nouveau né

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI

- **Education du SI et maladie auto-immune**

## « The hygiene hypothesis »

Le défaut de stimulation ou d'exposition aux agents pathogènes et aux microorganismes symbiotiques (microbiote intestinal) ou l'utilisation fréquente d'antibiotique chez le jeune enfant augmente la susceptibilité des patients à développer des troubles allergiques et des maladies auto-immunes

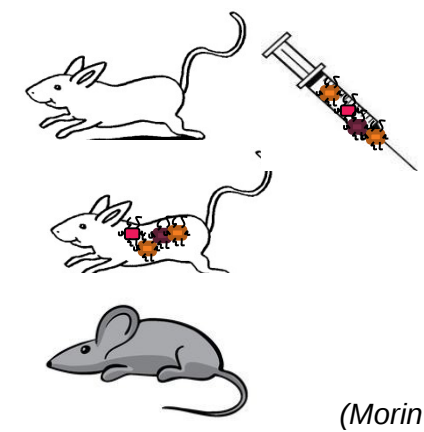
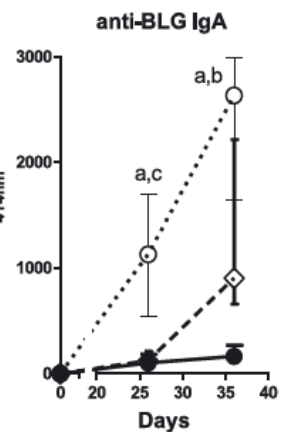
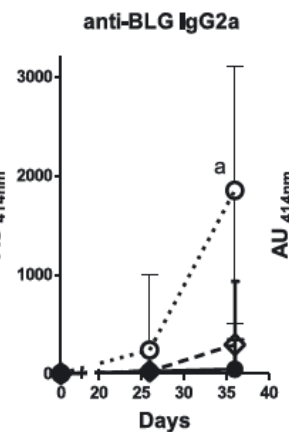
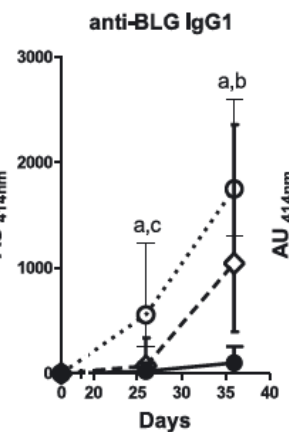
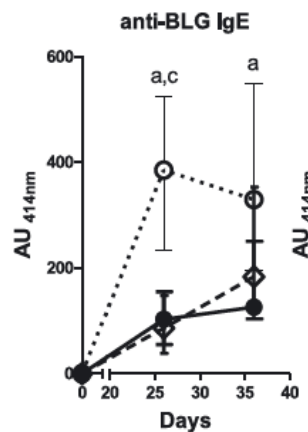
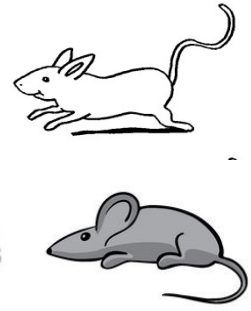
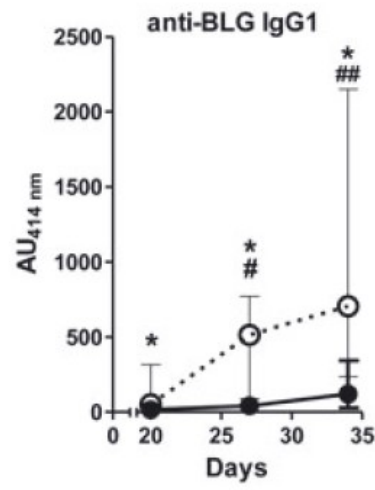
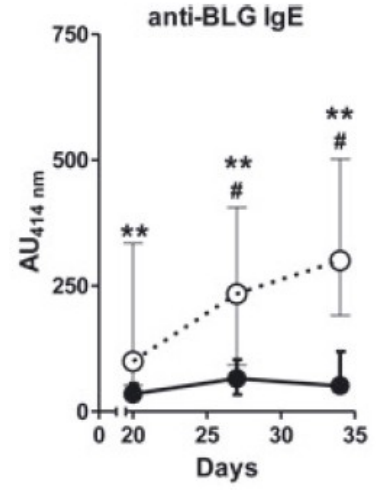


□ lié à une altération de la mise en place du système immunitaire en relation avec des modifications de la composition du microbiote (Okada *et al.*, 2010).

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □

## allergie

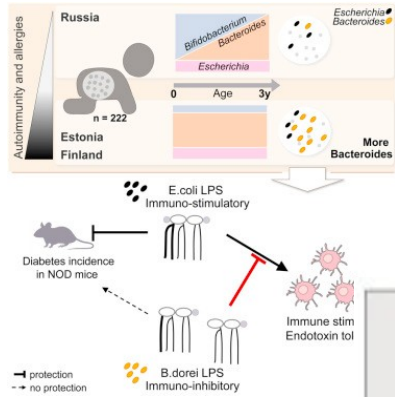
Réponse allergique de souris GF ou conventionnelles après sensibilisation à la beta-lactoglobuline



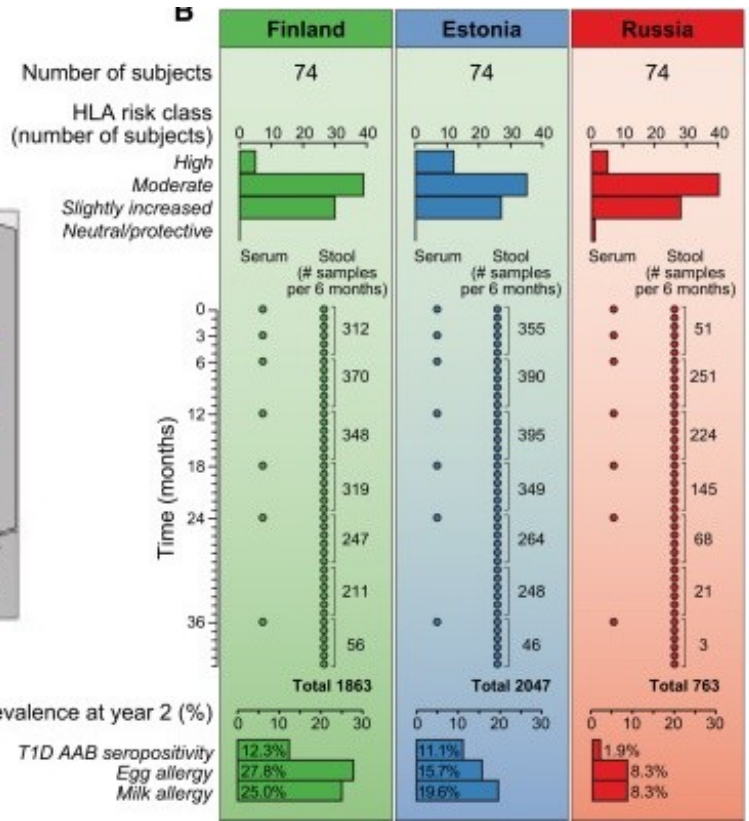
(Morin et al. 2012)

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI

## • Education du SI et maladie auto-immune : Finlande Estonie vs Russie



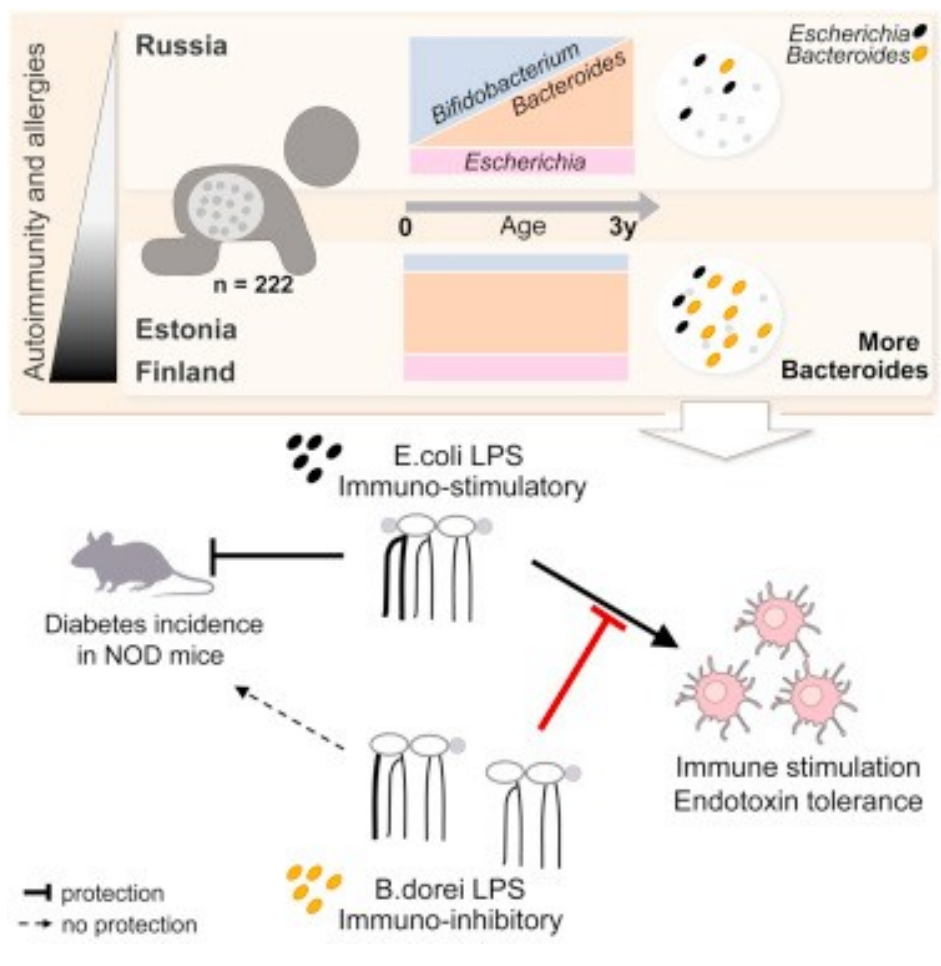
Maladie auto-immune  
 T1D : diabète de type I  
 Allergie Alimentaire



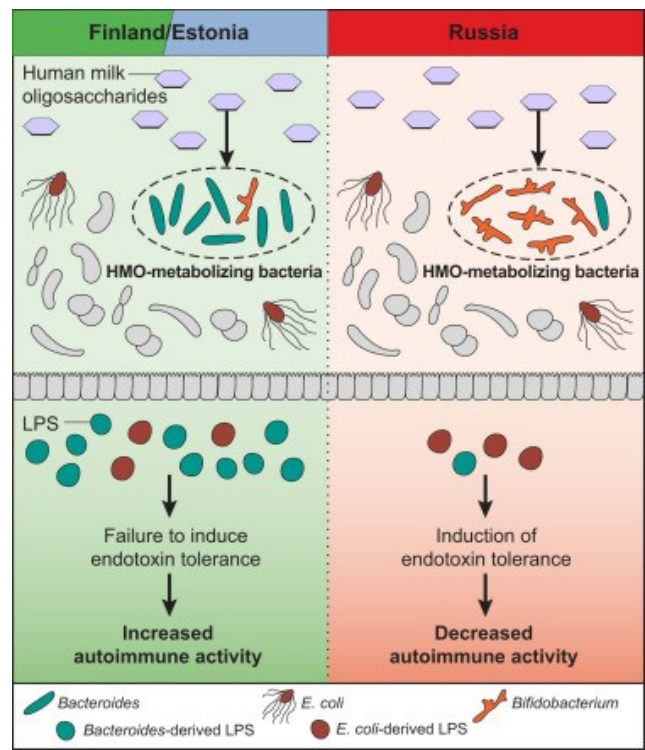


# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI

- **Education du SI et maladie auto-immune**



- Altération de la composition du microbiote (*Bacteroides*)
- La réaction pro-inflammatoire (liée au LPS E. Coli) est inhibée

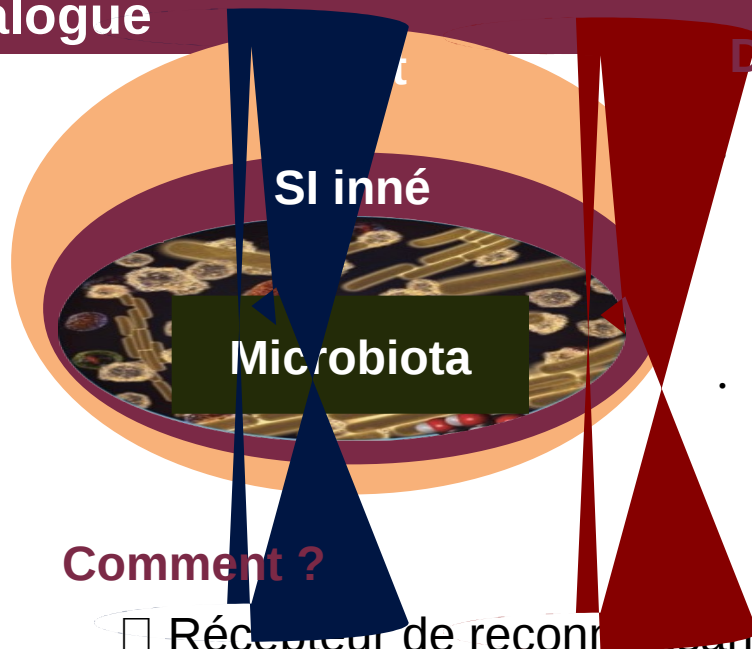




# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □

dialogue

Dialogue SImme □ □ Microbiote



Assure l'équilibre entre la tolérance des micro-organismes commensaux et l'immunité contre les pathogènes

- Intervient également comme médiateur de tous les effets physiologiques du microbiote sur l'hôte

Comment ?

□ Récepteur de reconnaissance de pattern moléculaire PRRs (pattern-recognition receptor)

- TLRs (toll like receptor)
- NLRs (nucleotide-binding oligomerization like receptor) NOD1& NOD2
- RIG-I-like receptors,
- C-type lectin receptors,
- Etc...

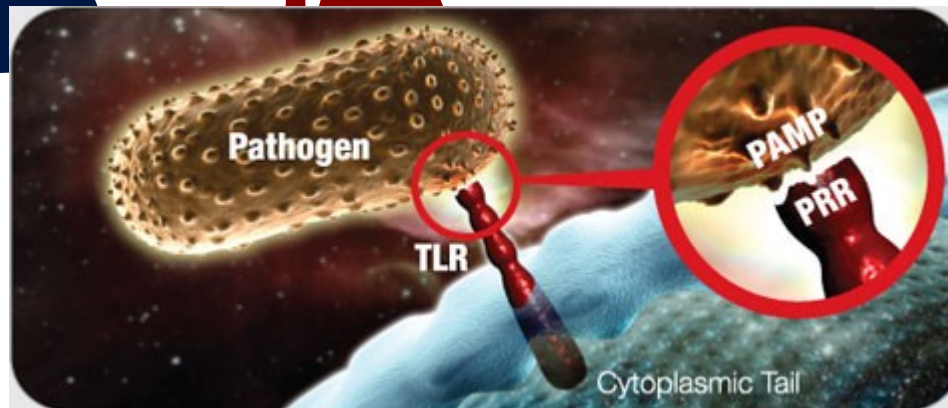
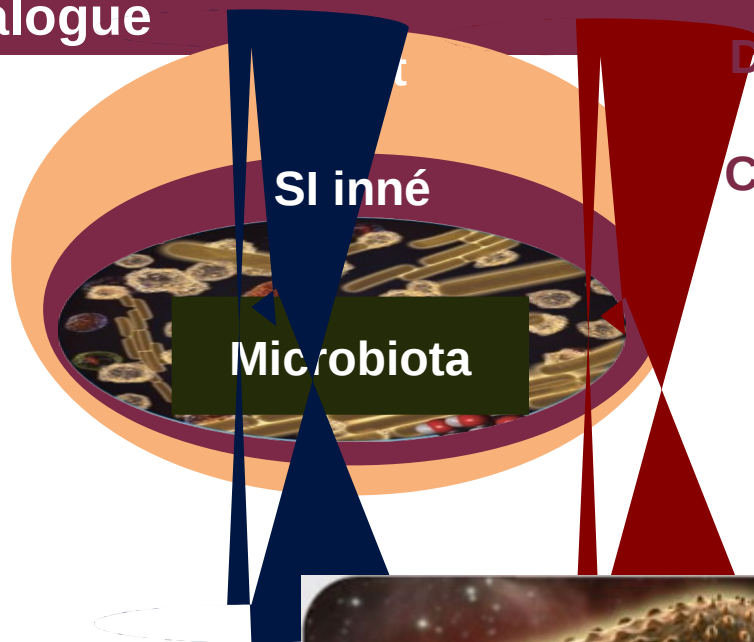
# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □

dialogue

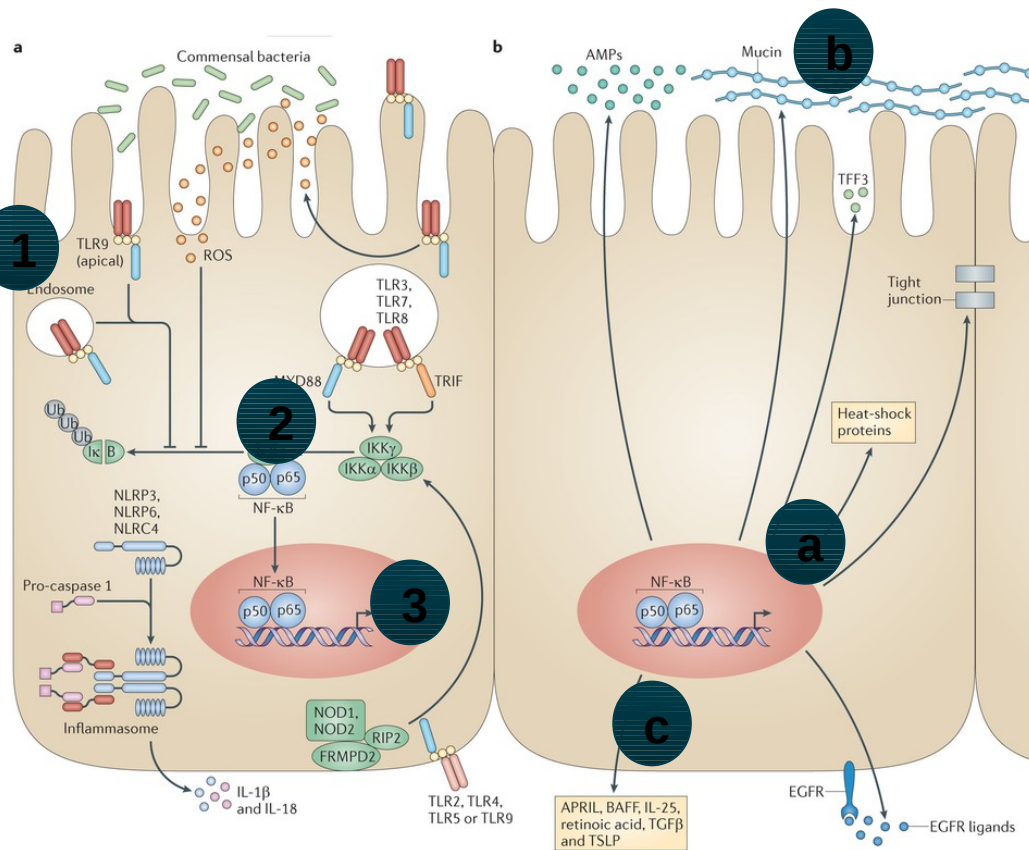
Dialogue SImme □ □ microbiote

Comment ?

- PRRs des cellules de l'hôte se lient avec des PAMPs (Pathogen associated molecular pattern)



[http://www.intestin-carrefour-de-mon-destin.fr/\\_bibli/pages\\_images/pamp\\_prr\\_tlr.jpg](http://www.intestin-carrefour-de-mon-destin.fr/_bibli/pages_images/pamp_prr_tlr.jpg)



## Dialogue SI inné □□ Microbiote

### Comment ?

1. Reconnaissance
2. Recrutement de molécules signales
3. Activation de facteur de transcription
4. Sécrétion de cytokine (IL-18 et IL-1b)

### Réponse de l'hôte ?

- a. **Stimulation des mécanismes de réparation**
- trefoil factor 3 (TFF3)
  - heat-shock proteins
  - epidermal growth factor receptor (EGFR) ligand expression

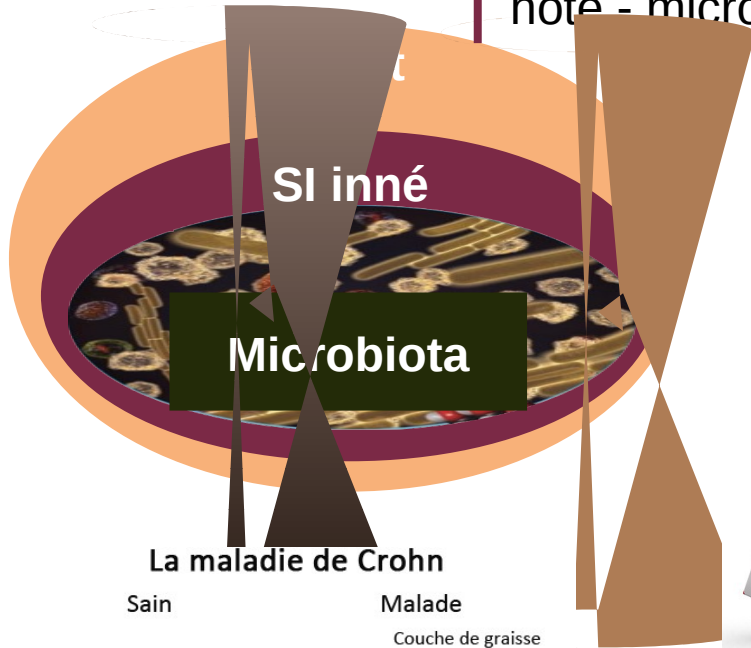
- b. **Fonction barrière**
- augmentation de la sécrétion de mucus
  - production de peptides antimicrobiens (AMP)
- c. **Réponse immunorégulatrice médiée** par
- proliferation-inducing ligand (APRIL),
  - B cell-activating factor (BAFF),
  - IL-25, retinoic acid,
  - transforming growth factor-β (TGFβ)
  - thymic stromal lymphopoietin (TSLP)

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □

## Crohn et IBD

Maladie de Crohn :

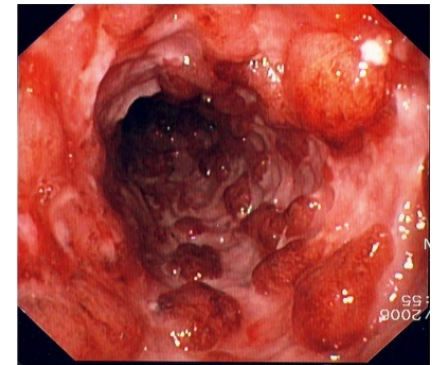
Maladie inflammatoire qui résulte d'interactions inadéquates hôte - microbiote



- Altération du microbiote □ diminution de sa diversité
- Altération du dialogue avec SI

Les moyens de lutte :

- Antibiothérapie
- Suppression de la réponse immunitaire
- Ablation



Mackenzie et al 2016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.028>

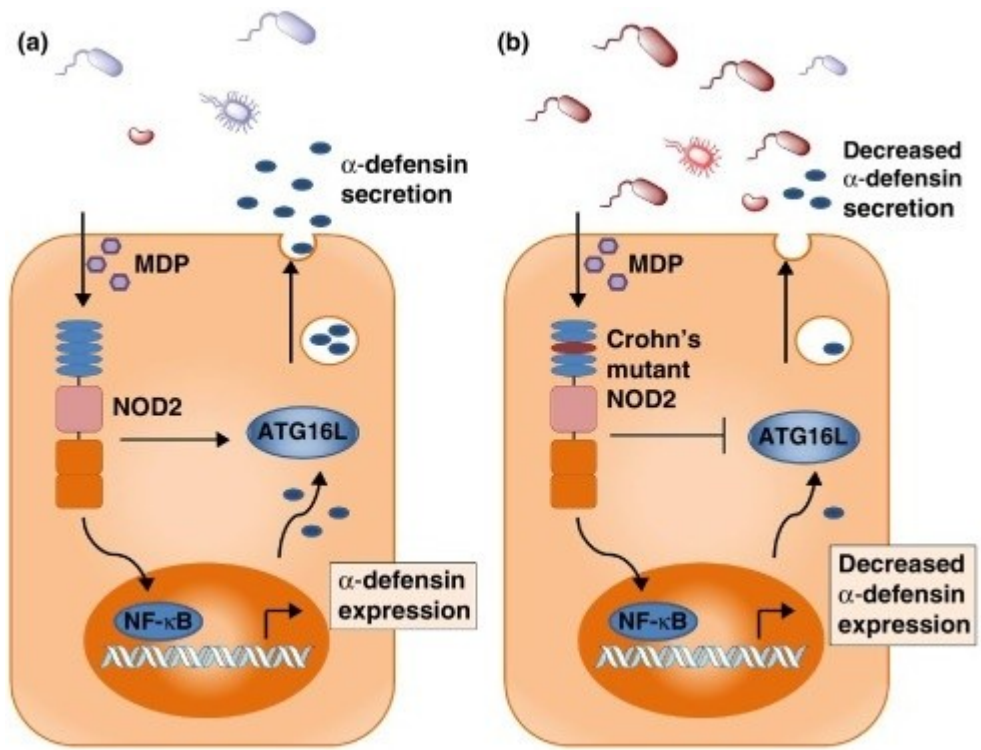
<http://www.e-semio.org/Maladie-de-Crohn>

# Symbiose et rôles physiologiques : éducation et stimulation du SI □

## Crohn et IBD

Mutation génétique : NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing 2)

- Récepteur du SI intra cellulaire des cellules épithéliales
- Liaison avec des composants du peptidoglycan des parois bactériennes □ dipeptide muramyl (MDP)



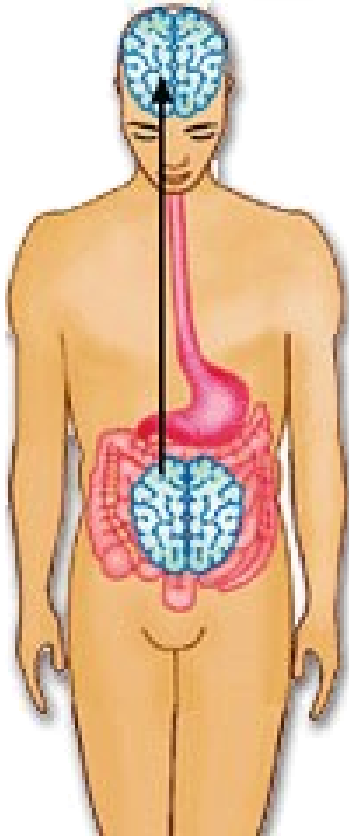
Le défaut de stabilité de NOD2 entraîne une prolifération bactérienne non souhaitée



# Symbiose et rôles physiologiques

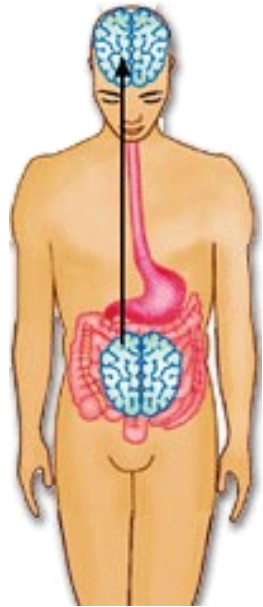
1. **Nutrition et maladie métabolique**
  - **La chaîne alimentaire**
  - **Focus Obésité**
  - **Focus sous nutrition**
2. **Développement, éducation et stimulation du système immunitaire**
  - **Rôle barrière**
  - **Rôle trophique**
  - **Stimulation, éducation**
  - **Mécanismes impliqués dans le dialogue**
3. **Notre deuxième cerveau**

## Symbiose et rôles physiologiques : 2ème cerveau



- l'autisme
- rôle les comportements et des capacités cognitives
- mécanismes et dialogue

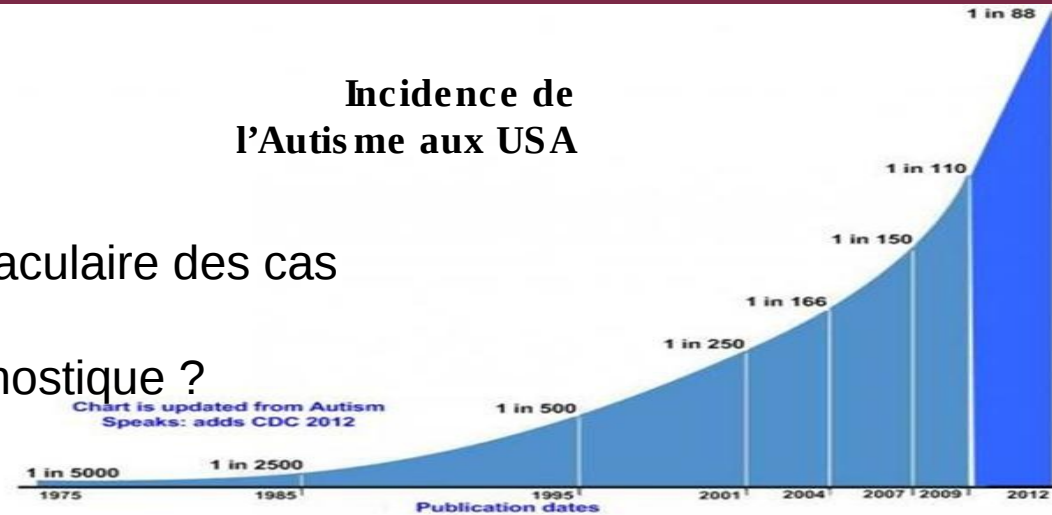
# Symbiose et rôles physiologiques : 2ème cerveau □ l'autisme



Augmentation spectaculaire des cas d'autisme

□ meilleur diagnostique ?

## Incidence de l'Autisme aux USA



**Figure 1. Increase in prevalence of ASD from 1975 to 2012.** Recent statistics indicate prevalence of 1/100 in the UK (UK census, 2010), 1/68 in USA (CDC, 2010), 1/66 in China (Fudan Univ, 2013), 1/38 in South Korea (Yale Child Study Center, 2011).

Etiologie non connue

- Piste psychique (rôle de la mère)
- Piste génétique (gènes et SNP)
- Piste environnemental (pesticide, pollution et alimentation)

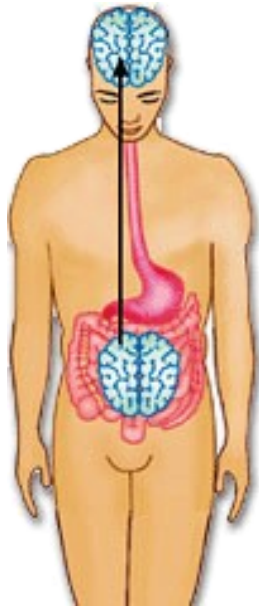
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310852/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374086/>

B. L. Williams, M. Hornig, T. Parekh, and W. I. Lipkin, mBio 3(1):e00261-11, 2012

L'énigme de l'autisme - La piste bactérienne <http://boutique.arte.tv/f7630-autisme>

# Symbiose et rôles physiologiques : 2ème cerveau □ l'autisme



D'une manière générale, les symptômes gastro-intestinaux (diarrhée, constipation, douleurs) sont présents chez 43,7% des autistes.

## Incidence de l'Autisme aux USA



**Figure 1. Increase in prevalence of ASD from 1975 to 2012.** Recent statistics indicate prevalence of 1/100 in the UK (UK census, 2010), 1/68 in USA (CDC, 2010), 1/66 in China (Fudan Univ, 2013), 1/38 in South Korea (Yale Child Study Center, 2011).

Les symptômes peuvent être contenus par la prise d'antibiotiques

- Clostridium suspectée
- Une bactérie du groupe Sutterella chez 12 autistes sur 23
- Perméabilité intestinale ?
- Propionate important ?

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310852/>

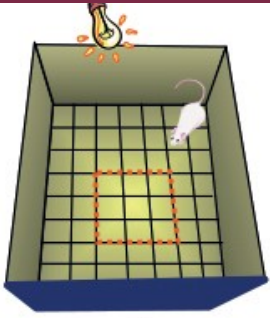
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374086/>

B. L. Williams, M. Hornig, T. Parekh, and W. I. Lipkin, mBio 3(1):e00261-11, 2012

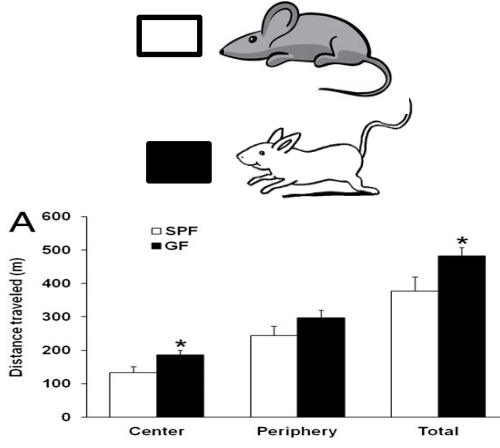
L'énigme de l'autisme - La piste bactérienne <http://boutique.arte.tv/f7630-autisme>

# Symbiose et rôles physiologiques : 2ème cerveau □ Comportement

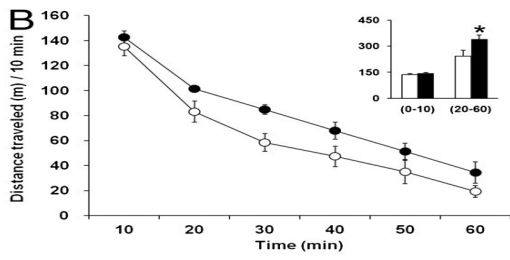
GF mice display increased spontaneous motor activity



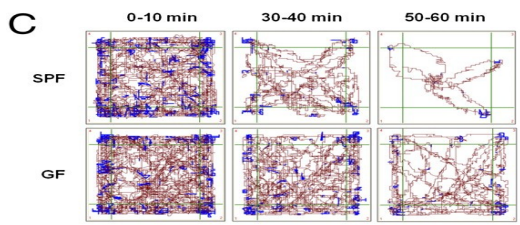
Distance cumulée parcourue



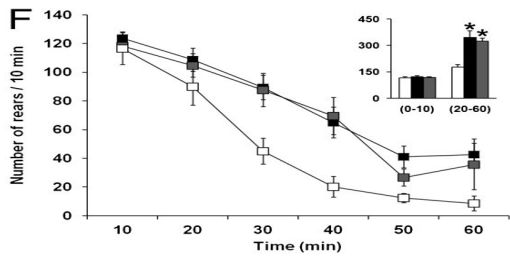
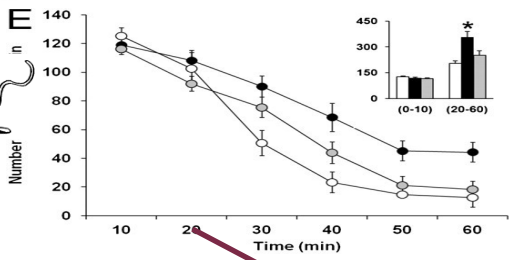
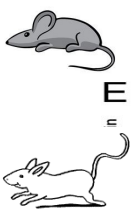
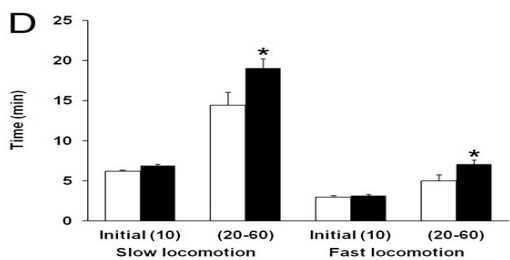
Test en open field



Déplacement



Distance moyenne parcourue

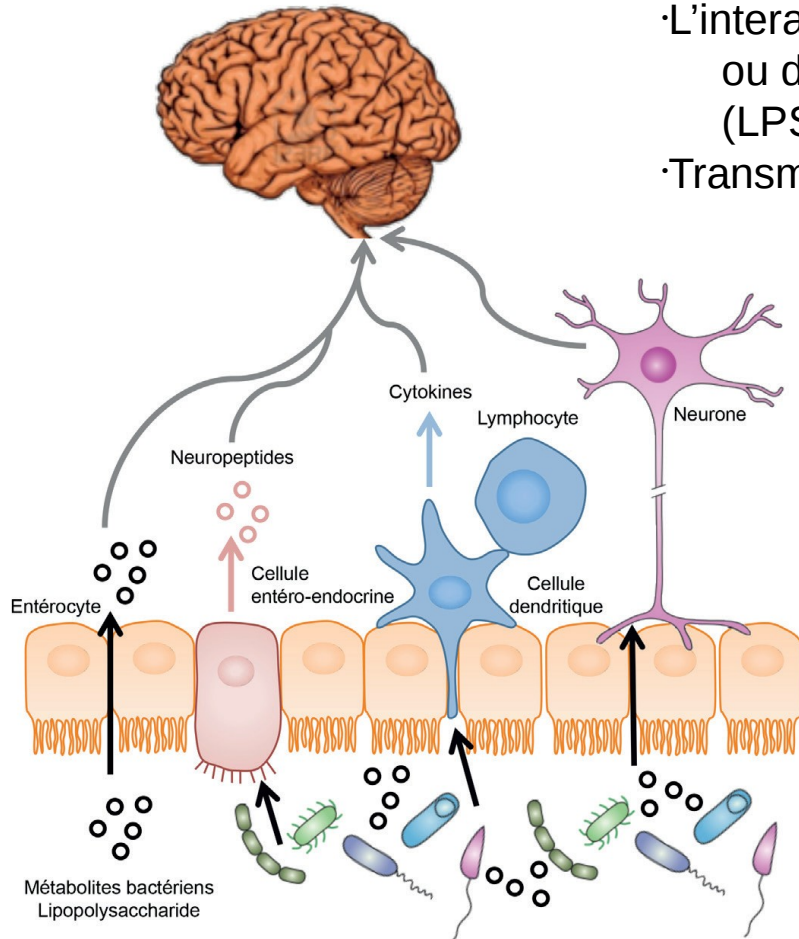


Rochellys Diaz Hejtz et al. PNAS 2011;108:3047-3052

PNAS



# Symbiose et rôles physiologiques : 2ème cerveau □ mécanisme et dialogue



·L'interaction avec les bactéries se fait via des métabolites ou des macromolécules de l'architecture cellulaire (LPS)

·Transmission via :

- Voie **métabolique** : après absorption intestinale (transcellulaire ou paracellulaire)
- Voie **endocrine** : stimulation de la sécrétion des neuropeptides par les cellules entéro-endocrines
- Voie **immune**: stimulation des cellules immunitaires intestinales et de la production de cytokines
- Voie **nerveuse**: stimulation des neurones du système nerveux entérique et de la composante parasympathique du système nerveux autonome

DOI : 10.4267/2042/57938

(Rabot, 2015)

## Symbiose et rôles physiologiques

1. **Nutrition et maladie métabolique**
  - **La chaîne alimentaire**
  - **Focus Obésité**
  - **Focus sous nutrition**
2. **Développement, éducation et stimulation du système immunitaire**
  - **Rôle barrière**
  - **Rôle trophique**
  - **Stimulation, éducation**
  - **Mécanismes impliqués dans le dialogue**
3. **Notre deuxième cerveau**
  - **Autisme et comportement**
  - **mécanismes**

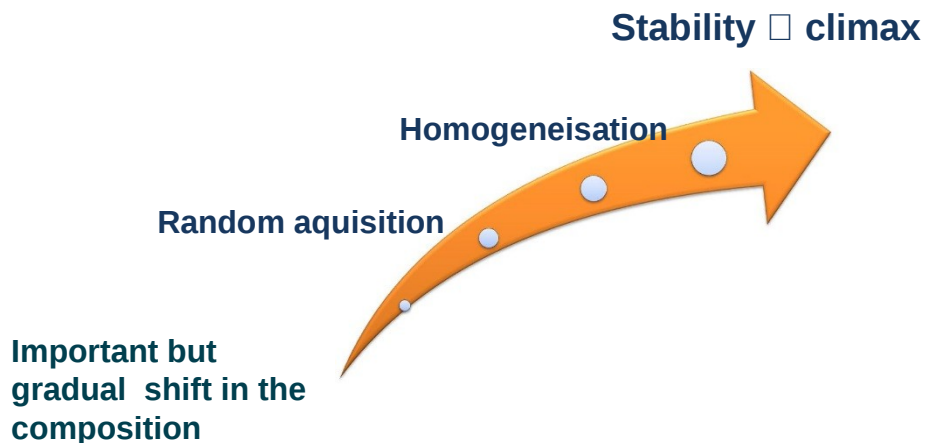




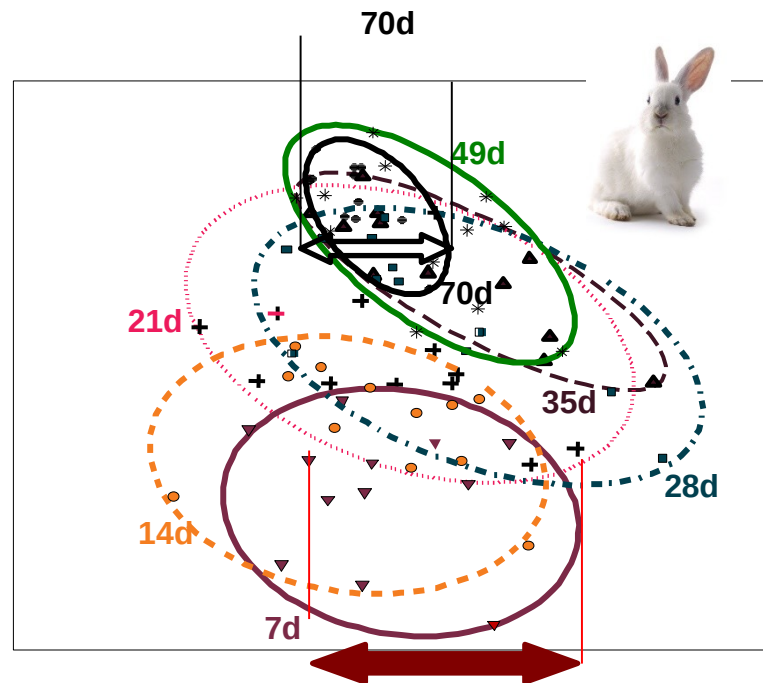
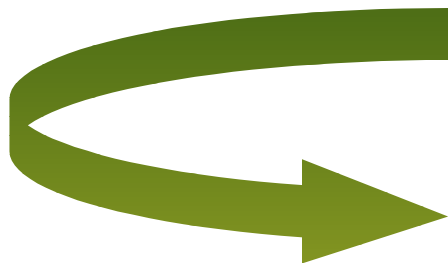
## Contrôler son microbiote pour guérir ou préserver sa santé

1. **Principe écologique**
2. **Outils**
  - **Alimentation**
  - **Prébiotiques**
  - **Probiotiques**
  - **Antibiotiques**
  - **La transplantation fécale**
  - **La phagothérapie**

# Contrôler son microbiote : principes écologiques



1. Modifier les espèces pionnières
2. Modifier la succession écologique des espèces
3. Accélérer la maturation



- Introduction d'espèces : probiotique
- Exclusion compétitive : inoculation communauté complexe
- Modification du biotope : aliments, prébiotiques



# Contrôler son microbiote : ingénierie écologique

## Les outils :



L'environnement immédiat

Nutrition

Quantity and quality of fibres, proteins ...

Prebiotics

Probiotics

Antibiothérapie

Greffe fécale

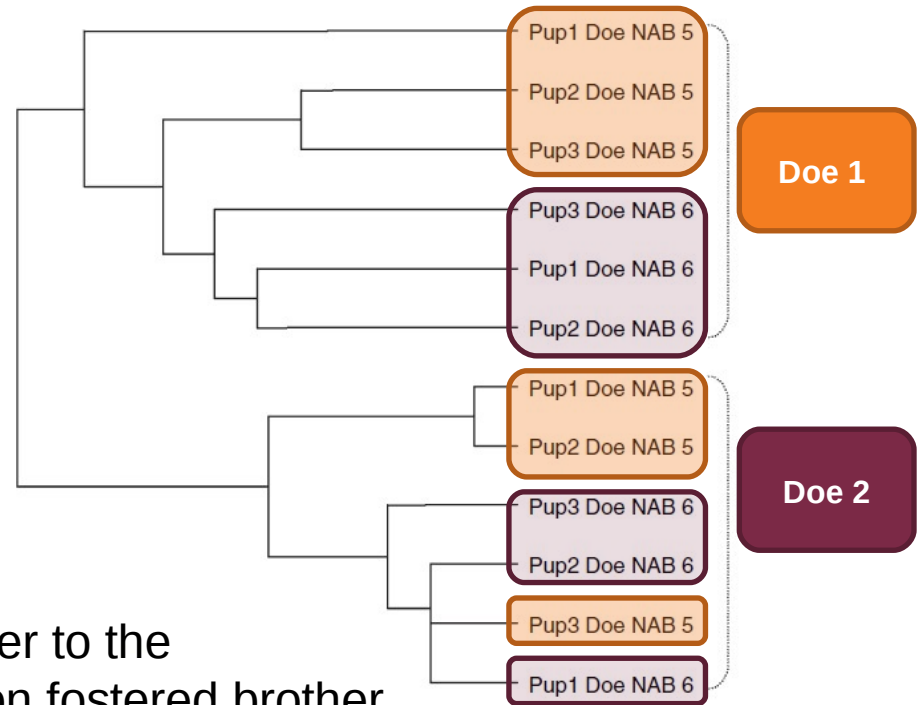
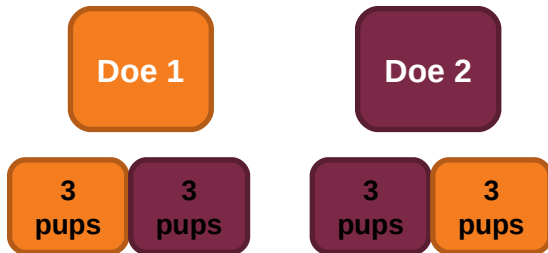
Phagothérapie





# Immediate environment: milking mother

✓ nursing mother vs the biological mother

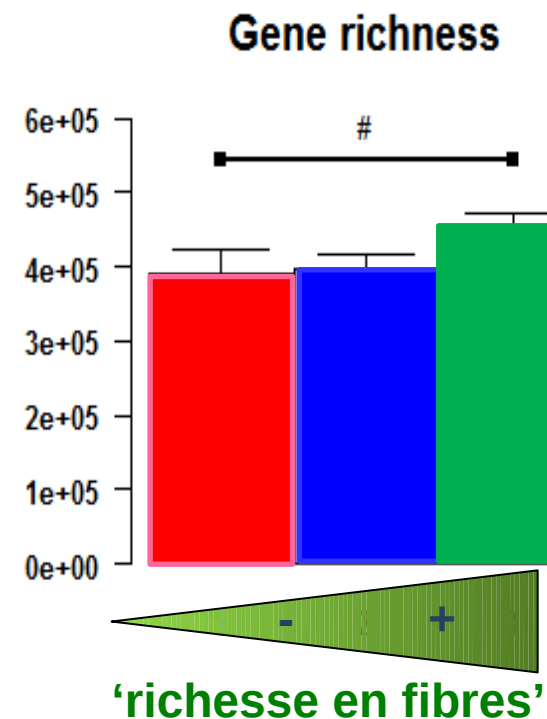
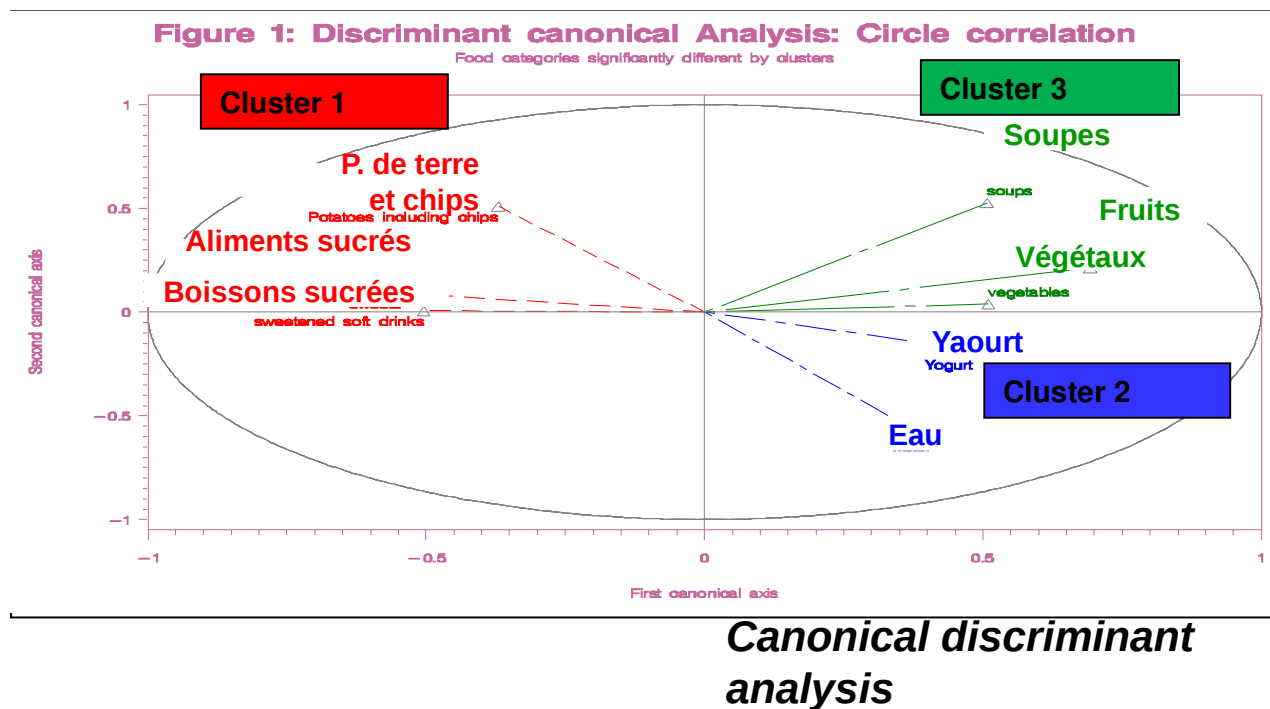


Microbiota of the fostered pups was closer to the cohabiting pups than that of their own non fostered brother

(Abecia et al. 2007)

## Contrôler son biotope

Analyse basée sur la fréquence de consommation de 26 aliments



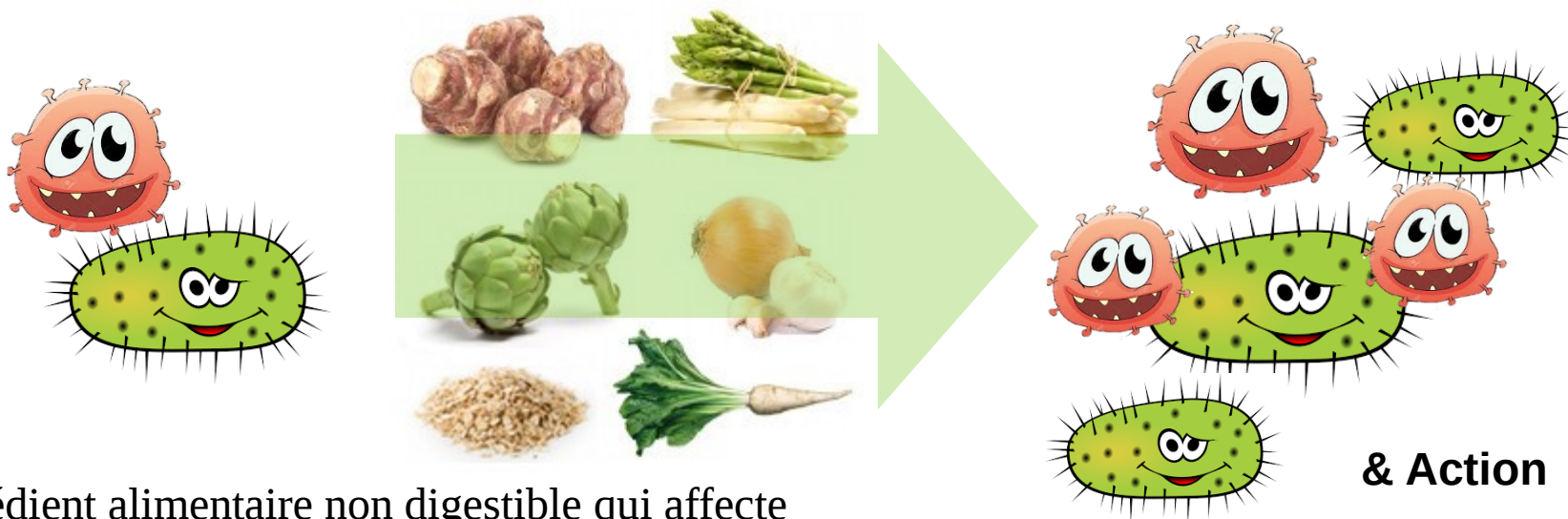
La richesse en fibres du régime favorise la richesse en gènes du microbiote !!!

## Nourrir ses bactéries préférées



### Prébiotiques

(oligosaccharides non digestible)



« ingrédient alimentaire non digestible qui affecte positivement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries intestinales » (Gibson et Roberfroid, 1995).

competition by masking the binding sites of pathogenic bacteria to the mucosa

## Nourrir ses bactéries préférées



## Prébiotiques



### Prébiotiques

### Origine

Inuline

Racines de chicorée, artichaut

FOS (fructo-oligosaccharides)

Hydrolyse de l'inuline de chicorée  
Synthèse à partir de saccharose

GOS (galacto-oligosaccharides)

Synthèse à partir du lactose

Lactulose

Isomérisation du lactose

Oligosaccharides de soja

Soja

MOS (Manannes)

Levure

Beta glucane

Levure, blé

Principaux prébiotiques commercialisés (modifié d'après Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007)

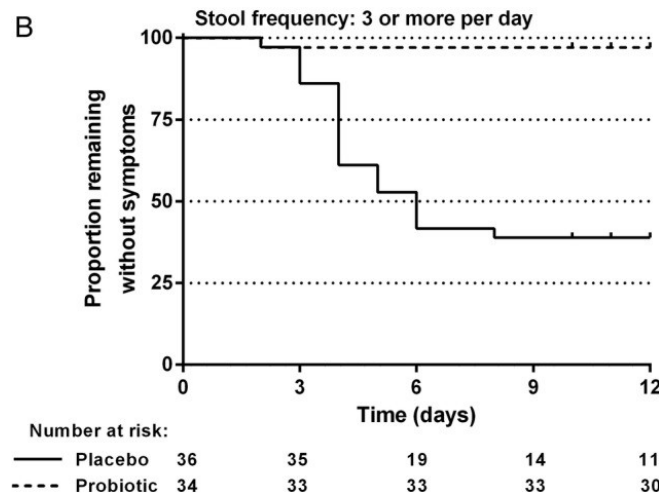
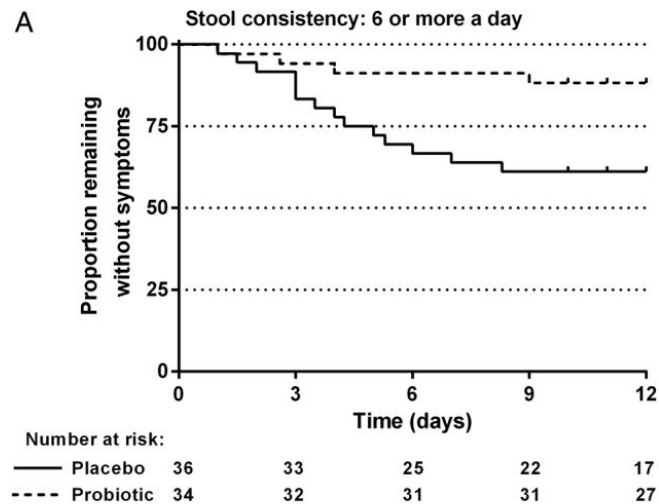


## J'invite une bactérie "amie"

 **PrObiotiques**



**Micro-organismes vivants**, utilisés comme additif alimentaire, capables de moduler les activités du microbiote digestif, dans le but d'améliorer la santé ou les performances de l'hôte. Ils sont constitués d'une ou plusieurs espèces de microorganismes vivants accompagnés ou non des résidus de culture



## J'invite une bactérie "amie"

### PrObiotiques

|                   |  |
|-------------------|--|
| Bifidobacterium   | B. longum B. breve, B.infantis, B. bifidum, B. adolescentis  |
| Lactococcus       | L. cremoris, L. lactis   |
| Streptococcus     | S. thermophilus  |
| Enterococcus      | E. faecium   |
| Lactobacillus     | L. rhamnosus, L. acidophilus, L. casei, L. bulgarus, L. gasseri, L. reuterii,<br>L. plantarum, L. srogenes |
| Pedicococcus      | P. acidilactici  |
| Bacillus          | B. cereus, B. subtilis, B. clausii, B. licheniformis, B. pumilus, B. laterosporus, B. megaterium           |
| Saccharomyce<br>S | S. cerevisiae, S. cerevisiae subp boulardii  |

Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotique (Fonty et Gouet, 1989)

## J'invite une bactérie "amie"

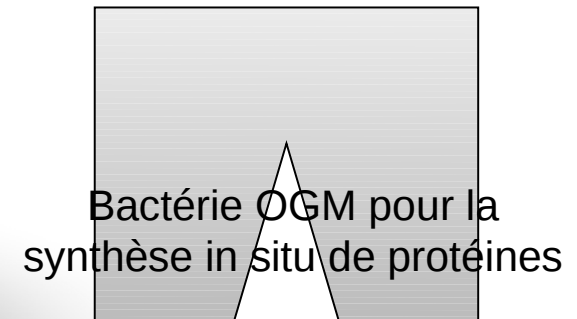
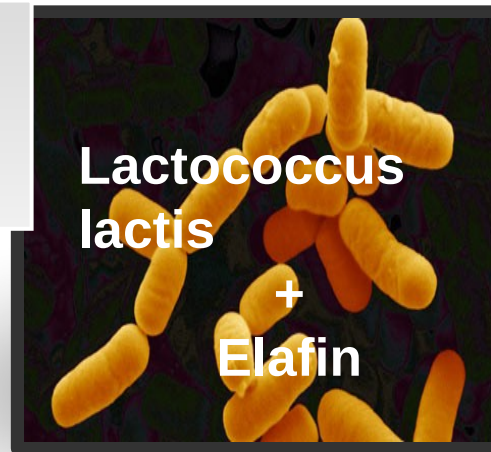


## PrObiotiques

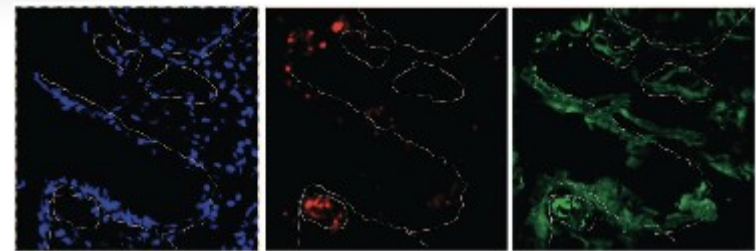
**Action:**

Production de facteurs antimicrobiens (bacteriocin), métabolites ou enzymes

Gut protection and decrease of inflammatory symptoms

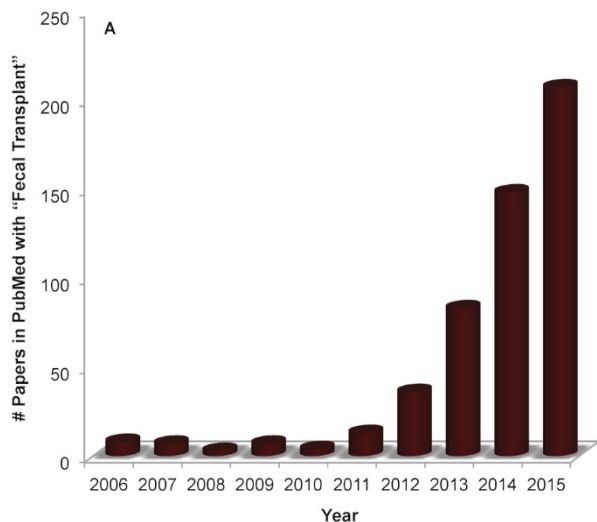


(Motta et al. 2012)



## La transplantation fécale

95% de réussite contre *Clostridium difficile*



Nombre d'articles traitant de transplantation fécale



La proximité génétique ou environnemental n'a pas d'incidence sur le succès

## La transplantation fécale



Transposition moderne d'un remède ancestral chinois :

Au IV<sup>e</sup> siècle, l'alchimiste Ge Hong administrait des suspensions fécales humaines pour traiter des diarrhées sévères.

La « soupe dorée » figure toujours dans l'arsenal thérapeutique traditionnel chinois.

En savoir plus sur [http://www.lemonde.fr/sante/article/2015/07/14/nos-bacteries-intestinales-medicaments-de-demain\\_4682189\\_1651302.html#32giWQEDdQjipmUM.99](http://www.lemonde.fr/sante/article/2015/07/14/nos-bacteries-intestinales-medicaments-de-demain_4682189_1651302.html#32giWQEDdQjipmUM.99)



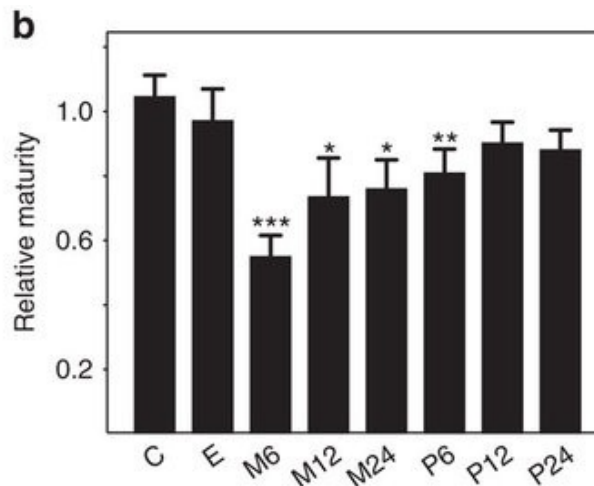
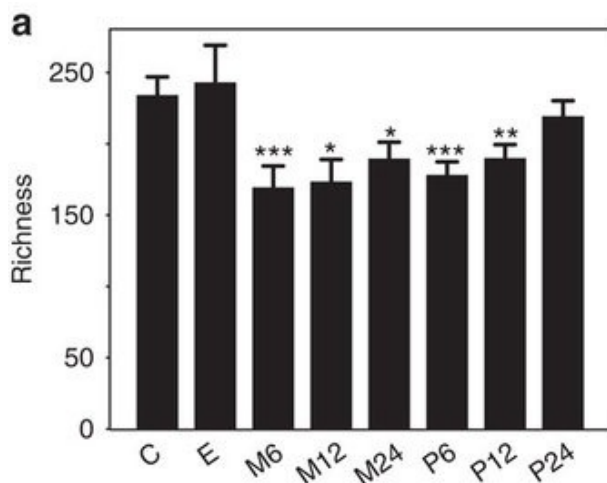
## Antibiothérapie □ peu spécifique et dégâts colatéraux



Diminue la richesse spécifique  
Modifie l'abondance relative des espèces  
Des modifications qui perdurent à long terme

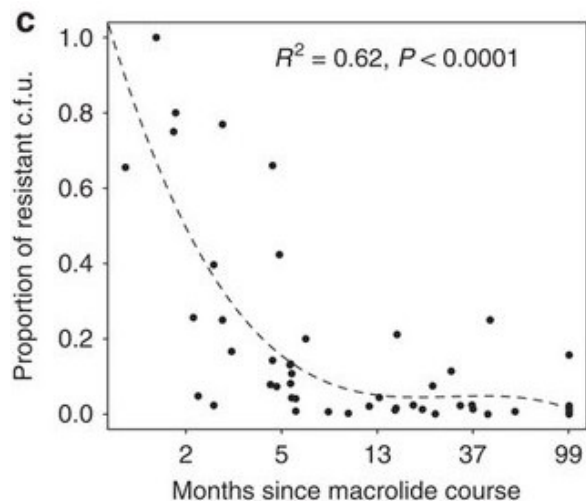


Enfant de 5 ans

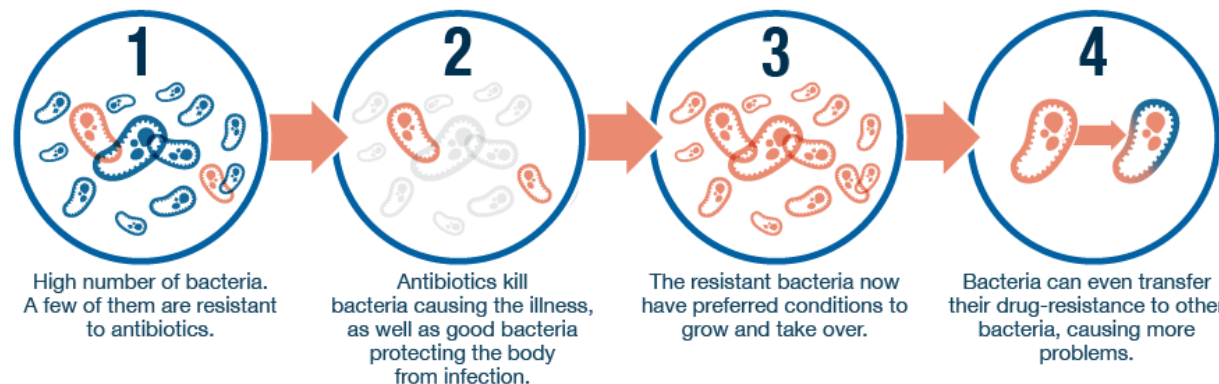


- C: control
- E: exposition précoce
- M6-12-24: macrolides 6-12-24 derniers mois
- P6-12-24: penicilline 6-12-24 derniers mois

## Antibiothérapie □ peu spécifique et dégâts colatéraux



## How does antibiotic resistance occur?



# Film sur l'antibiorésistance en 11 jours

The evolution of bacteria  
on a "mega-plate" Petri dish



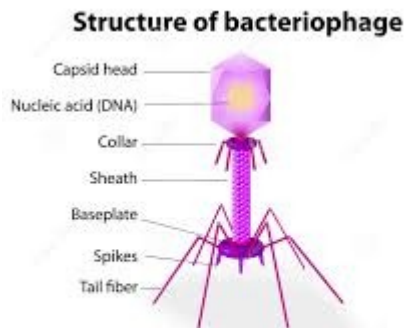
HARVARD  
MEDICAL SCHOOL

The Evolution of Bacteria on a "Mega-Plate" Petri Dish (Kish)

<http://www.biorigami.com/?p=7250>

<https://www.youtube.com/watch?v=plVk4NVIUh8>

## Les bacteriophages : Sniper et super-sniper



### Attaque ciblée des bactériophages



**Lyse**

**re-programmation  
CRISPR-Cas9  
Destruction du gene de  
résistance et  
“immunisation”  
(Bikard et al. 2014)**

Ce qu'il faut retenir....



## Contrôler son microbiote pour guérir ou préserver sa santé

1. **Principe écologique**
2. **Outils**
  - **Alimentation**
  - **Prébiotiques**
  - **Probiotiques**
  - **Antibiotiques**
  - **La transplantation fécale**
  - **La phagothérapie**



# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage

## 1. Pour qui :

- Stratégies digestives et les fermenteurs
- Caecotrophie, coprophagie illustration lapin

## 2. Pourquoi ?

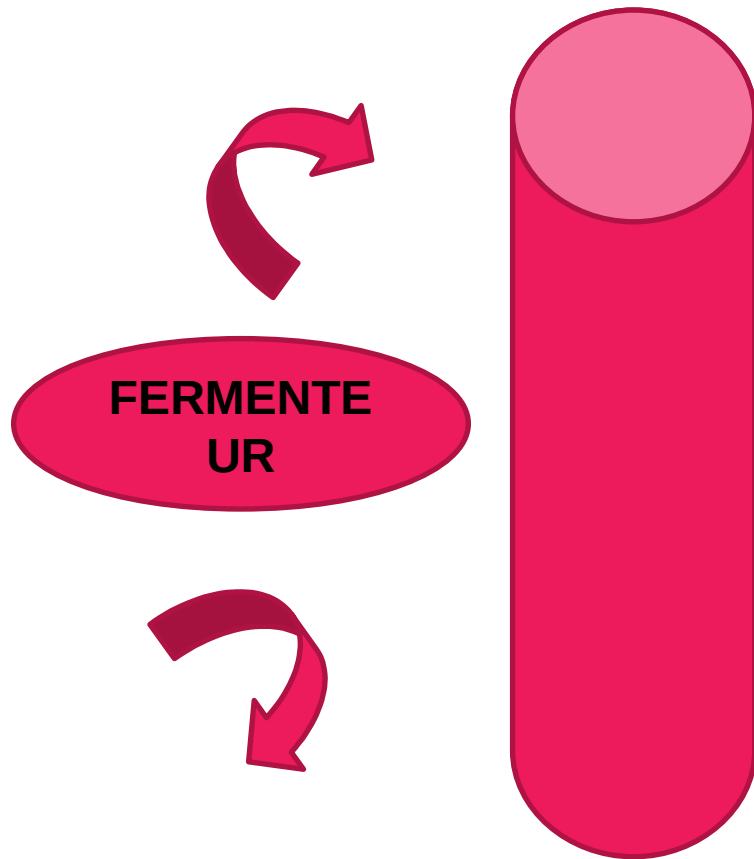
- Efficacité digestive
- Production de méthane
- Gavage
- Robustesse au sevrage
- Fibre et truie en gestation
- Résistance à la colonisation exemple salmonella

## 3. Comment

- Nutrition : fibres, prébiotiques
- Broilac
- Transmission mère jeune

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pour qui ?

- Stratégies digestives et fermenteurs



Bouch  
e

Oesophag  
e

Estoma  
c

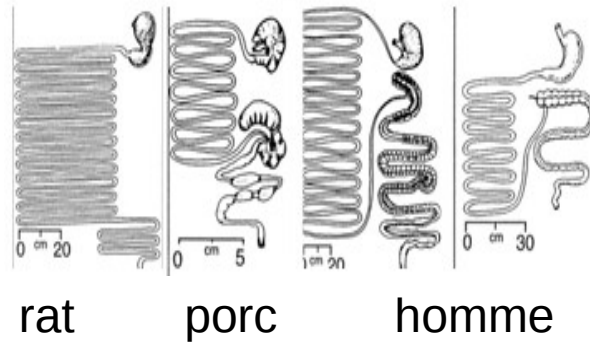
Intesti  
n

Anus

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pour qui ?

- Stratégies digestives et fermenteurs

Omnivores



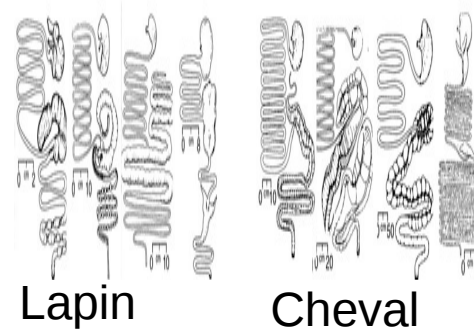
Position des fermenteurs

postérieure

Caractéristique symbiotique

Modèle  
compétition –  
coopération

Herbivores

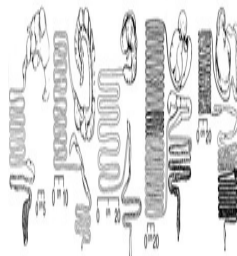


Lapin

Cheval

postérieure

Modèle  
compétition –  
coopération



Ruminant

antérieure

coopération

## Stratégie digestive herbivore



- Rétention de particules dans le rumen
- Fermentation
- Evacuation de particules de faibles tailles vers les segments postérieurs

- Digestion enzymatique



- Digestion enzymatique des aliments segments proximaux

- Fermentation dans le caecum et le colon
- Rétention des particules fines
- Rejet rapide des particules grossières (crottes dures)



**consomme une grande variété d'aliments (graine, aux plantes herbacées voire ligneuses)**

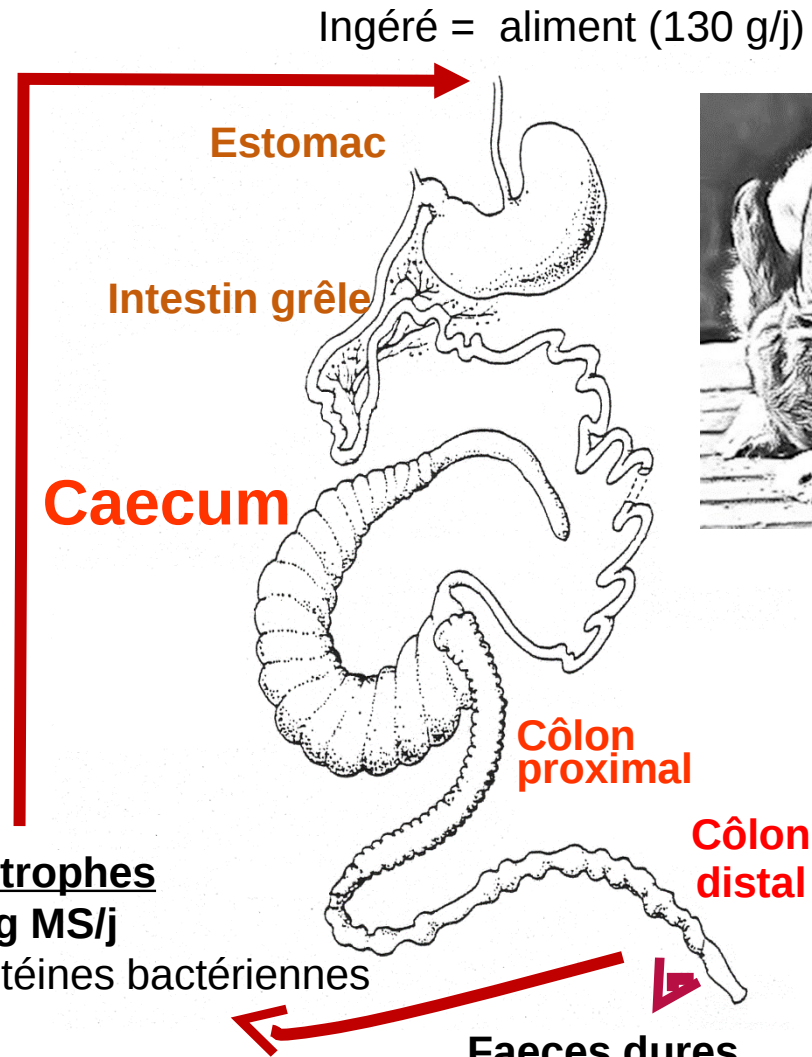
## Caecotrophie

caecotrophes

Caecotrophes riches en vitamines, à gauche et excréments normaux en forme de billes, à droite.



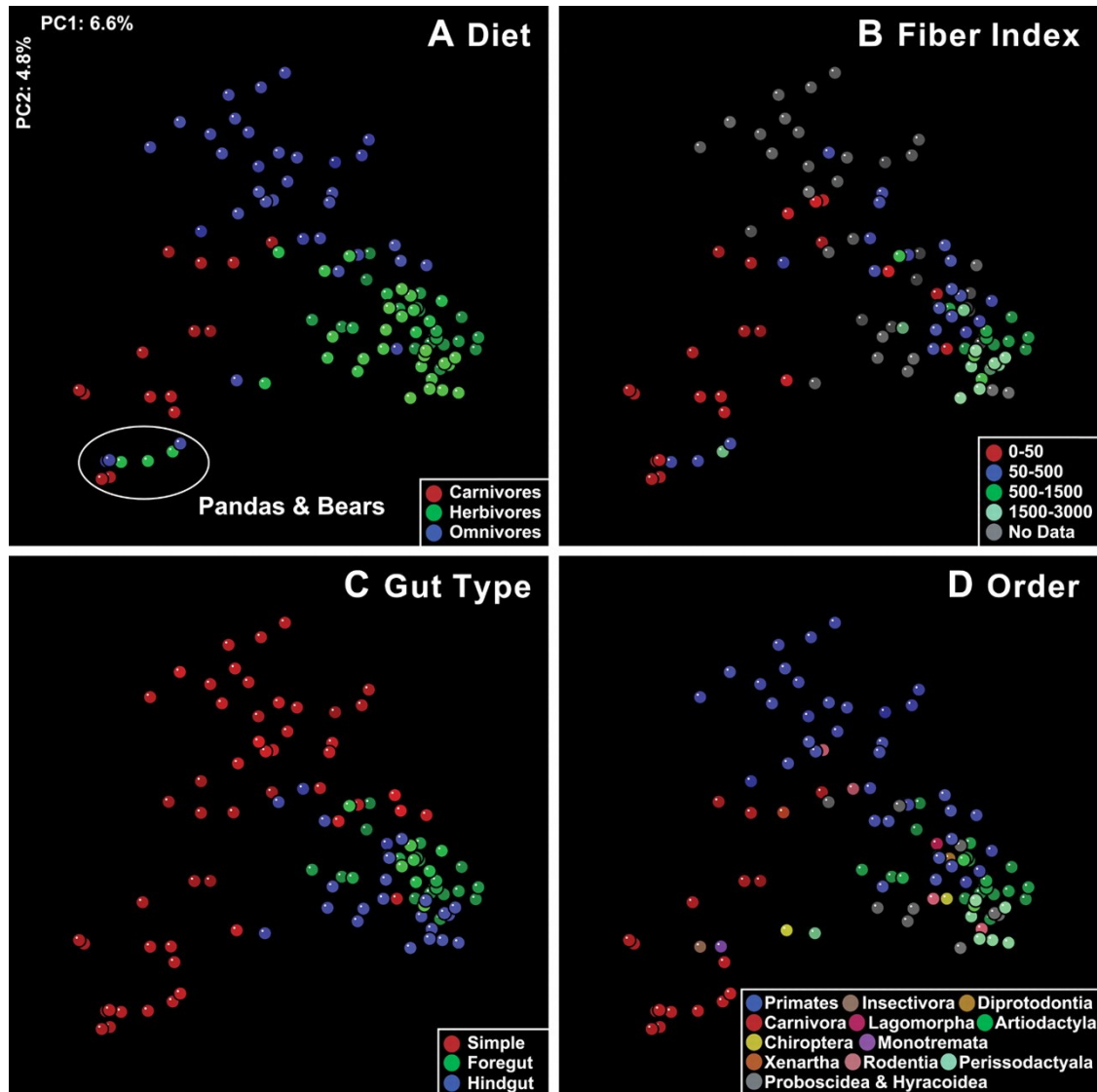
crottes



→ Pas besoin d'apports de vit B et C

**Faeces dures**  
rejet de ± 40 g MS/j

Fig. 2. Mammalian fecal bacterial communities clustered using principal coordinates analysis (PCoA) of the UniFrac metric matrix.



Ruth E. Ley et al. Science  
 2008;320:1647-1651



# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage

## 1. Pour qui :

- Stratégies digestives et les fermenteurs
- Caecotrophie, coprophagie illustration lapin

## 2. Pourquoi ?

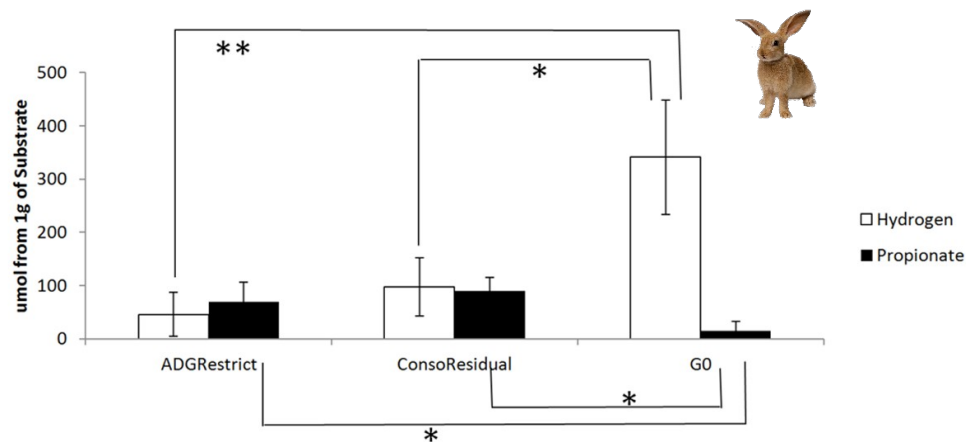
- Efficacité digestive
- Production de méthane
- Gavage
- Robustesse au sevrage
- Fibre et truie en gestation
- Résistance à la colonisation exemple salmonella
- Qualité des produits (lait, viande)

## 3. Comment ?

- Nutrition : fibres, prébiotique
- Broilac
- Transmission mère jeune

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Améliorer l'efficacité digestive et la croissance



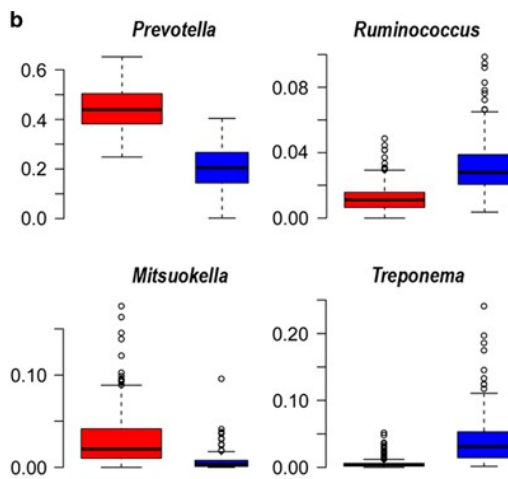
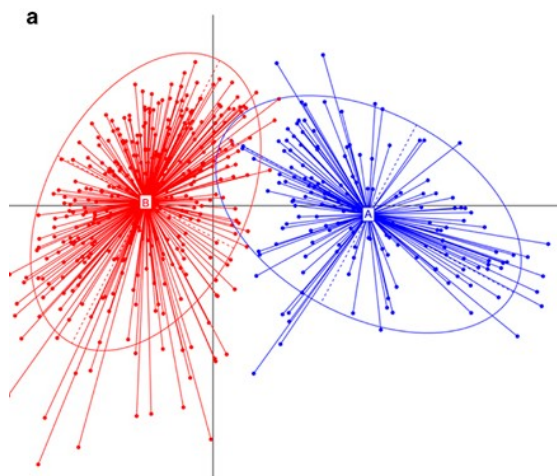
*Drouilhet 2015 Journal of Animal Science*

La sélection sur l'efficacité digestive et la croissance modifie:

- composition
- capacité métabolique du microbiote

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Améliorer la croissance

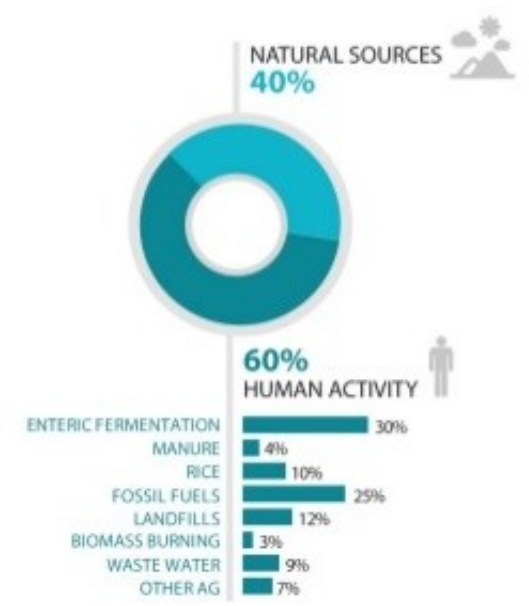


| Enterotypes             | ADG (g/day) |
|-------------------------|-------------|
| Ruminococcus, Treponema | 438.3 ± 6.7 |
| Prevotella, Mitsuokella | 456.3 ± 4.4 |

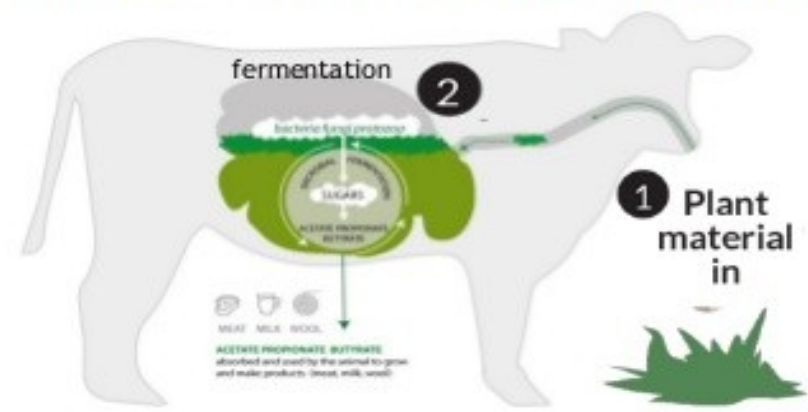
(Ramayo-Caldas et al., 2016)

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pour

- Diminuer la production de CH<sub>4</sub>

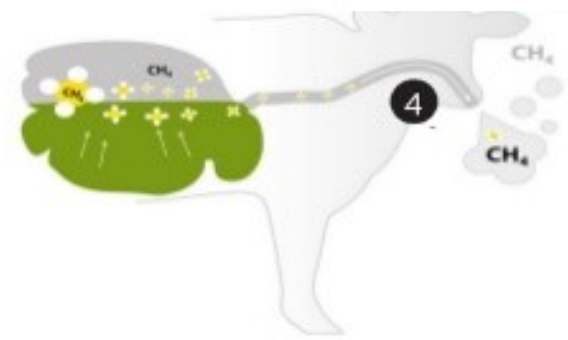


## THE RUMEN: MICROBIAL FERMENTATION



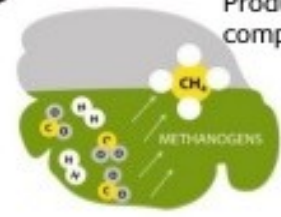
### Rumen microorganisms and their roles

- **Bacteria:** ferment fiber, starch, sugar in feed to VFA, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>
- **Protozoa:** consume and ferment bacteria to VFA and NH<sub>3</sub>, ferment starch, recycle N
- **Funghi:** assist in fibre digestion



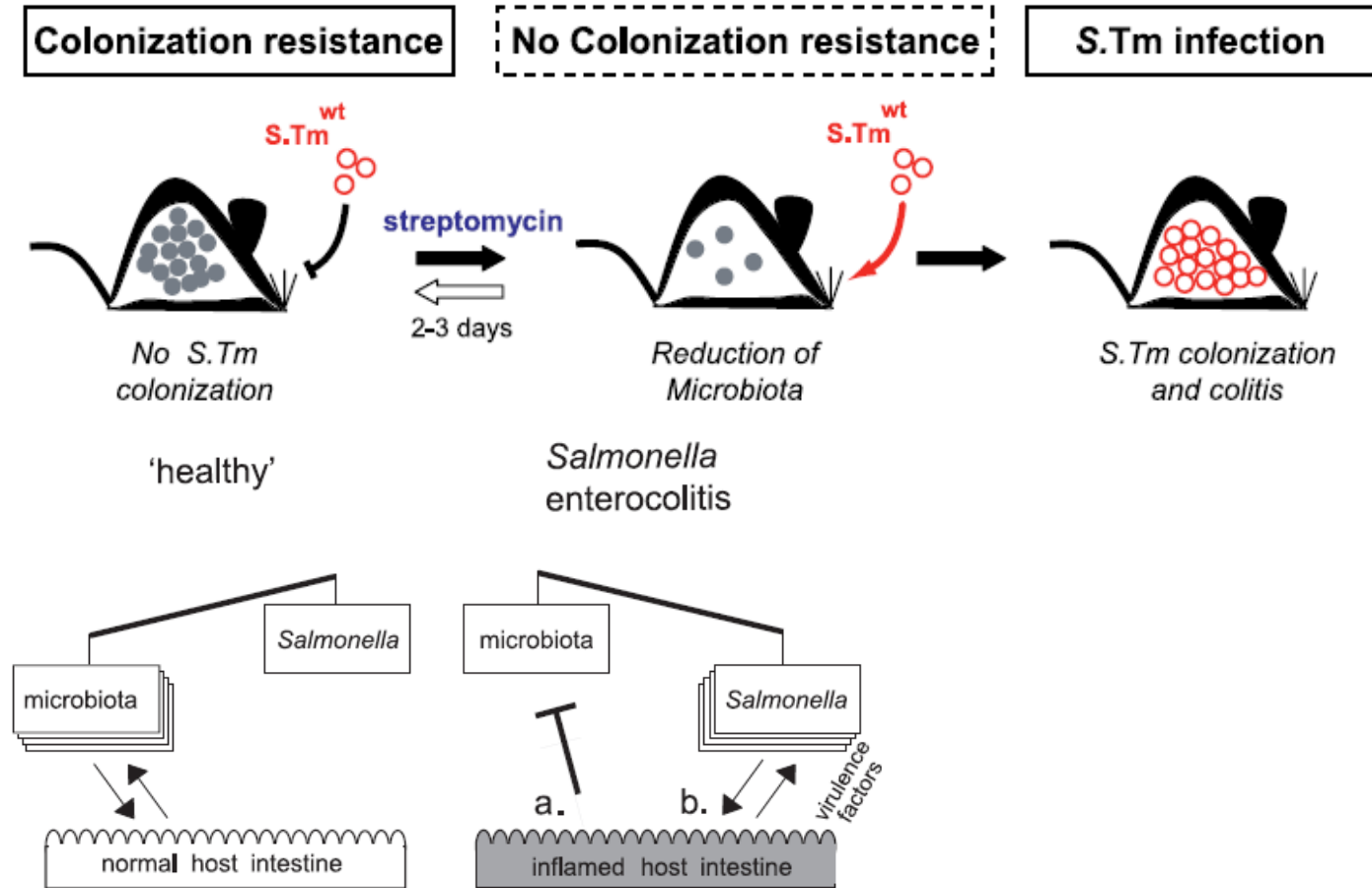
### 3 Methanogens

Produce CH<sub>4</sub>, but allows for more complete feed utilization



# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Résistance à la colonisation de pathogènes (*Salmonella*)



Stecher 2007 Plos Biology

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Résistance à la colonisation de pathogènes (*Salmonella*)

## Prevention of *Salmonella typhimurium* Colonization of Broilers with D-Mannose<sup>1</sup>

B. A. OYOFO, J. R. DeLOACH,<sup>2</sup> D. E. CORRIER, J. O. NORMAN, R. L. ZIPRIN, and H. H. MOLLENHAUER



TABLE 2. Effect of D-mannose treatment on *Salmonella typhimurium* colonization of the caecum of broiler chickens

| Group | Treatment            | Number of chickens colonized/group <sup>1</sup> |             |                 |             |                 |             |
|-------|----------------------|---|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
|       |                      | 1st Replication                                 |             | 2nd Replication |             | 3rd Replication |             |
|       |                      | n   | % Colonized | n               | % Colonized | n               | % Colonized |
| 1     | Control (water)      | 0   | ...         | 0               | ...         | 0               | ...         |
| 2     | Control (mannose)    | 0   | ...         | 0               | ...         | 0               | ...         |
| 3     | Salmonella (water)   | 22/28   | 78          | 23/28           | 82          | 26/28           | 93          |
| 4     | Salmonella (mannose) | 8/29  | 28***       | 6/28            | 21***       | 12/28           | 43***       |





# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- **Gavage**

Optimisation du microbiote



Améliorer le stockage des lipides dans le foie



Piste pour une alternative au gavage



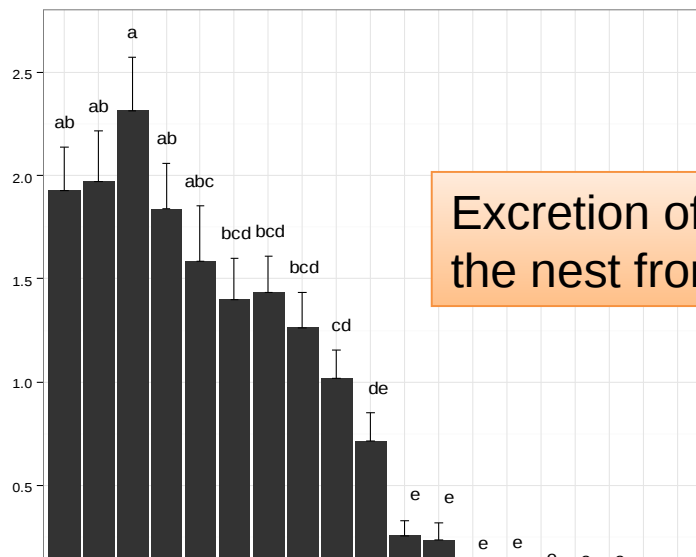
# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Robustesse au sevrage



## Coprophagie

✓ during nursing, the doe leaves some faecal pellets in the nest that are eaten by the pups (*Moncomble et al., 2004; Kovacs et al .2006*)



Excretion of fecal pellet in the nest from d1 to d12



(*Combes et al., 2014*).

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Robustesse au sevrage



## Coprophagie

|                            | Control | No Feces | Feces supply |
|----------------------------|---------|----------|--------------|
| # feces intake             | 10 c    | -        | 36 a         |
| Live weight at 35 days (g) | 858 ab  | 837 b    | 891 a        |
| Mortality 2-70 days (%)    | 15.5 ab | 22.8 a   | 9.3 b        |



(Combes et al., 2014)

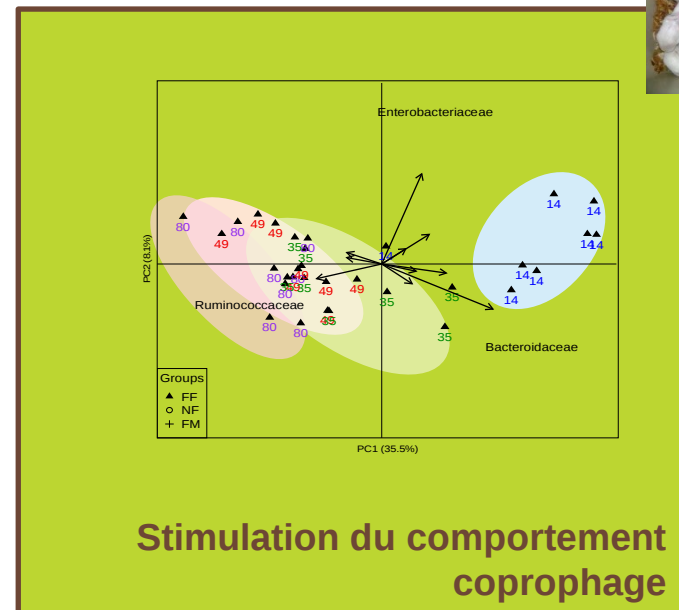
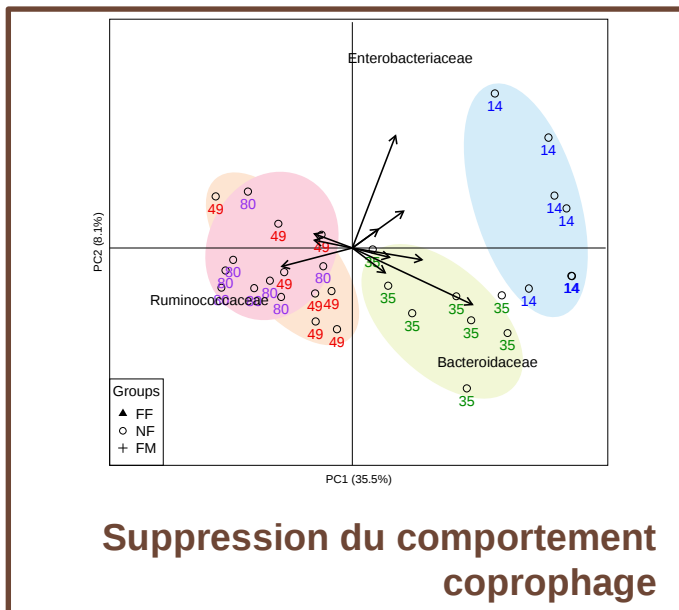
# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

- Robustesse au sevrage



## Immediate environment: coprophagia

- Does this behaviour contribute to mother microbiota transmission ?



80 j

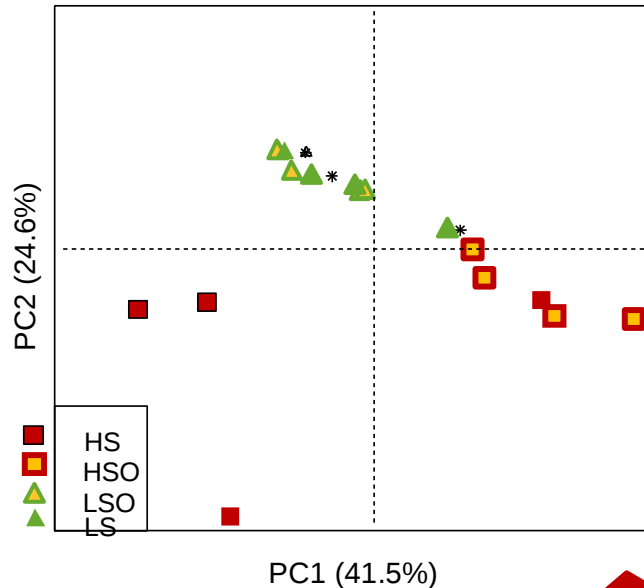
49 j

35 j

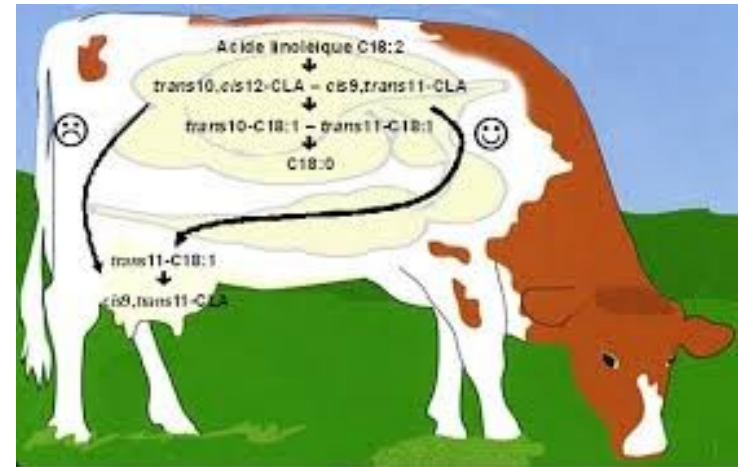
14 j

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ pourquoi ?

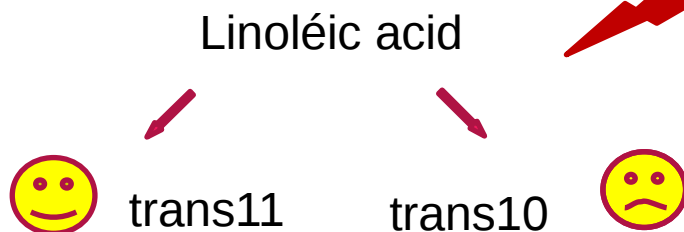
## Qualité des lipides du lait



## Ruminal biohydrogenation and lipid supplementation



## Feed manipulation



We demonstrate that alteration of ecosystem functioning was related to a modification of the composition of microbiota

(Zened et al., 2013 FEMS., 2011 JDS).

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage

## 1. Pour qui :

- Stratégies digestives et les fermenteurs
- Caecotrophie, coprophagie illustration lapin

## 2. Pourquoi ?

- Efficacité digestive
- Production de méthane
- Gavage
- Robustesse au sevrage
- Résistance à la colonisation exemple salmonella
- Qualité des produits

## 3. Comment ?

- Nutrition : fibres, (lipides, prébiotique, probiotique)
- Vaccination
- Broilact
- Transmission mère jeune



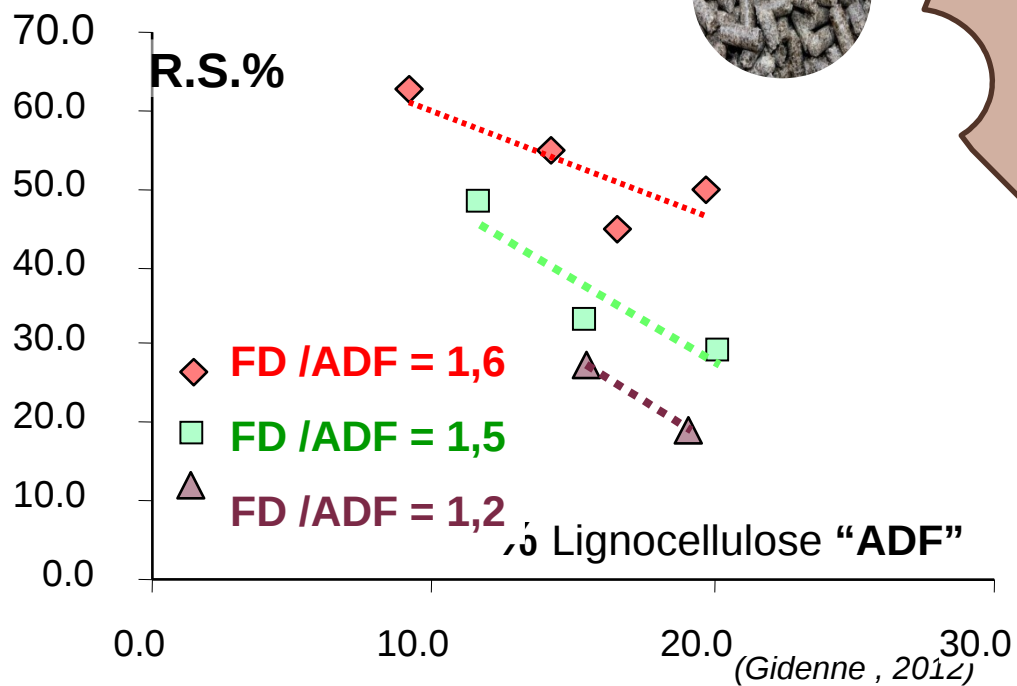
# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage

- Nutrition

  - ✓ Fibres: quantité et qualité



Microbiot  
a



FD : Fibres digestibles  
Hémicelluloses + Pectines

# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ Comment ?

- Vaccination anti-archée méthanogène



| Method                  | How it works   | Advantages   |  |
|-------------------------|--|--|--|
| Nitrate additive        | Promotes formation of ammonia instead of methane         | Highly effective in some experiments                                 |  |
| Plant extract additive  | Alters the chemistry of the rumen                        | Natural  | Cost concerns; may affect taste of feed                                |
| Increasing concentrates | Substitutes feed that relies less on fermentation        | Increases milk production in dairy cows; already available           | Can be expensive; environmental cost if transportation needed          |
| Synthetic additive      | Blocks enzyme that drives last step of methane formation | In one experiment, methane dropped 30 percent and cows gained weight | Rumen may adapt, reducing effectiveness over time                      |
| Vaccine                 | Antibodies to methanogens                                | Easy to use  | Potential for cows to accumulate hydrogen; effectiveness unknown       |
| Selective breeding      | Cows require less feed for same growth                   | Cumulative and permanent   | Changes are slow; may affect other traits, such as health or fertility |



# Contrôler le microbiote des animaux d'élevage □ Comment ?

- **Broilact**

## Competitive exclusion

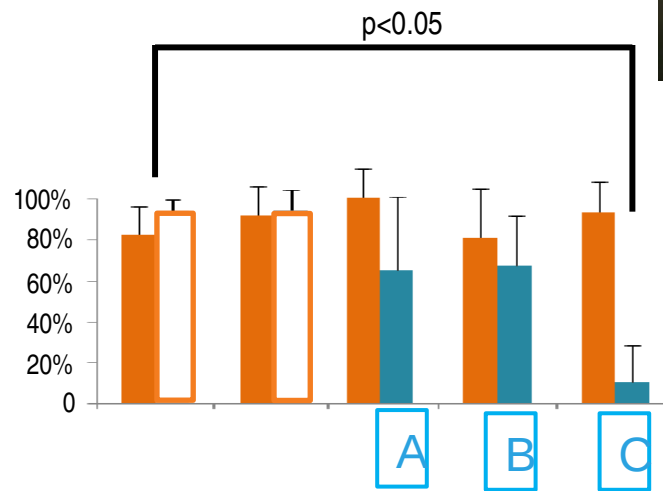
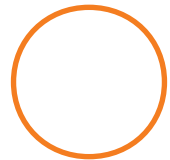
Broilact is a selected competitive-exclusion microflora for poultry. Given once, to day-old chicks, Broilact bacteria colonize the gut permanently and make a lasting contribution to gut health.

Its efficacy has been confirmed in 19 studies published in peer-reviewed journals including Poultry Science, Preventive Veterinary Medicine and Avian Diseases.

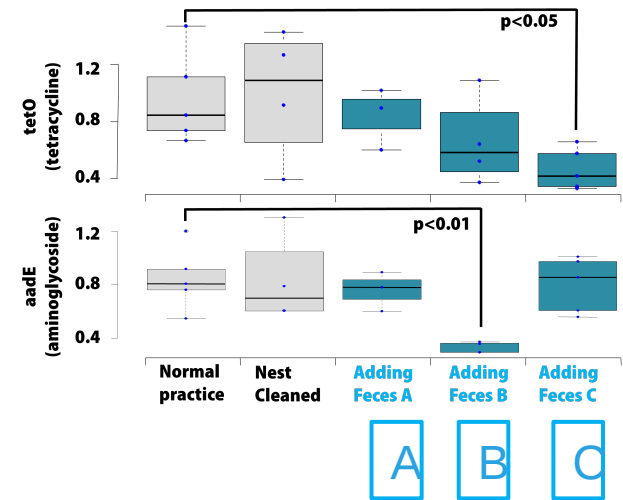
[Please contact us](#) for more information about Broilact



## Exclusion compétitive



Tetracycline resistant *Enterobacteria*



(Achard et al., 2016)

## Contrôler le microbiote des animaux d'élevage

### 1. Pour qui :

- Stratégies digestives et les fermenteurs
- Caecotrophie, coprophagie illustration lapin

### 2. Pourquoi ?

- Efficacité digestive
- Production de méthane
- Gavage
- Robustesse au sevrage
- Résistance à la colonisation exemple salmonella
- Qualité des produits

### 3. Comment ?

- Nutrition : fibres, (lipides, prébiotique, probiotique)
- Vaccination
- Broilact
- Transmission mère jeune







## Méthodologie d'exploration des écosystèmes digestifs

Culture

Amplicon

Métagénomique

Transcriptomique

Protéomique

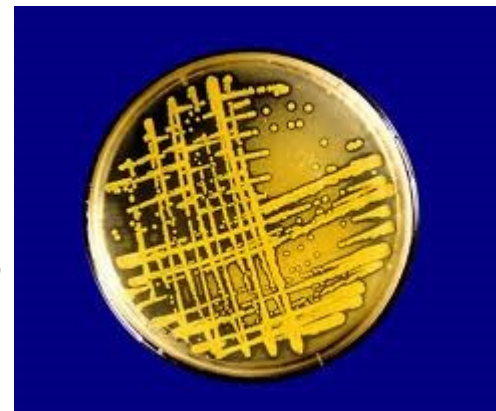
Métabolomique

Place de la bioinformatique et de la biostatistique

## Microbiote dominant

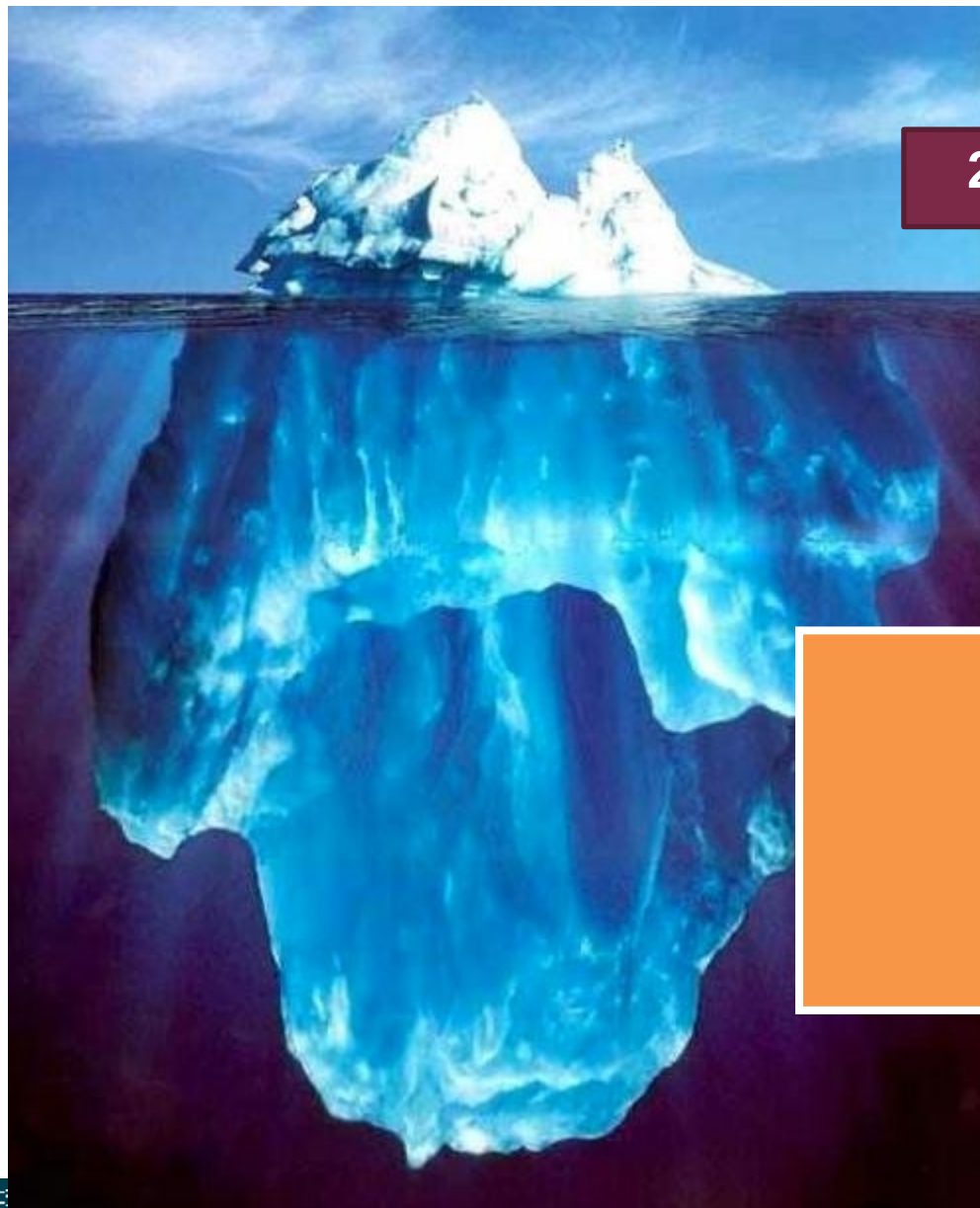


20 to 30%



*(Suau et al., 1999)*

# Microbiote dominant



20 to 40%



Re-évaluation par  
approches moléculaires  
indépendantes de la culture

16S

Light  
subunit

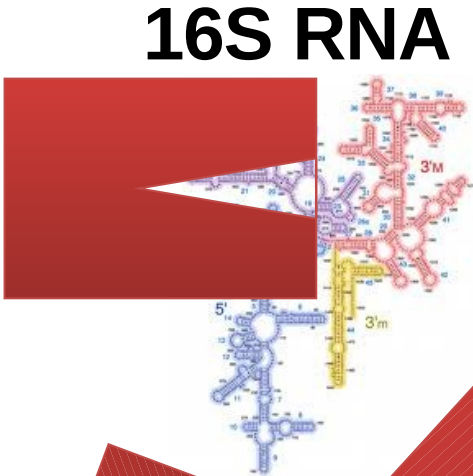
Heavy  
subunit



# Méthodologie d'exploration des écosystèmes digestifs

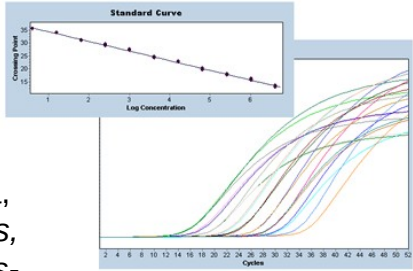
Contenu digestif

extraction



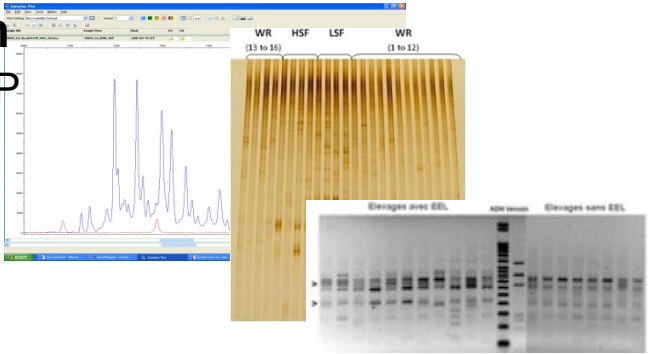
## qPCR

Bacteria, Archaea,  
*Firmicutes*,  
*Bacteroides*-  
*Prevotella*



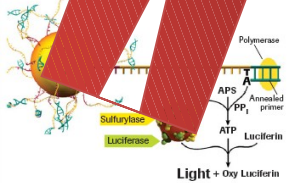
## Fingerprint

- CE-SSCP
- DGGE
- RFLP

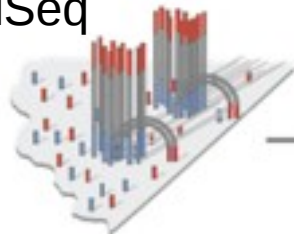


## Pyrosequencing

454 GS FLX



## MiSeq



## Sanger clone-based seq

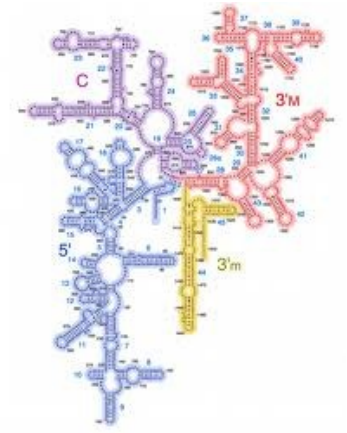




DNA extract from digestive content or feces



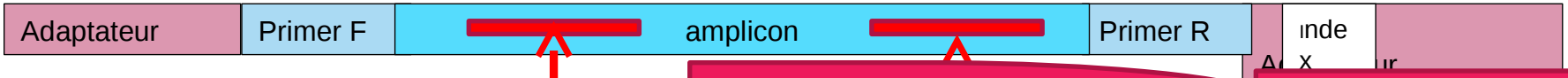
paire-end 2x250nt sequencing  
V3-V4 rDNA 16S (440 - 460 pb)



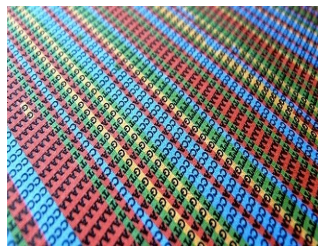
R1 = 250pb



V4



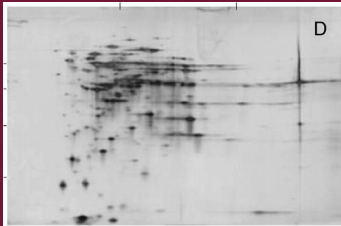
Hypervariable area



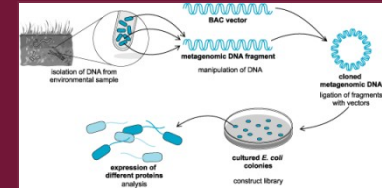


# Méthodologie d'exploration des écosystèmes digestifs

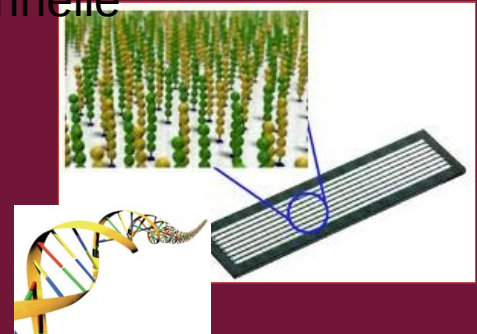
Méta-protéomique



Méta-génomique

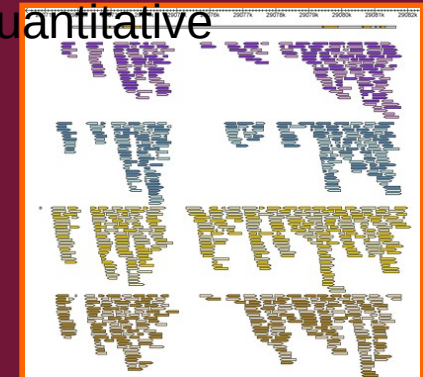


Métagénomique fonctionnelle

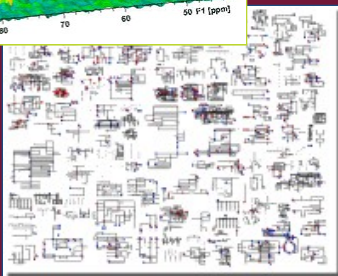


Digestiv  
e  
conten

Métagénomique quantitative



Méta-bolomique

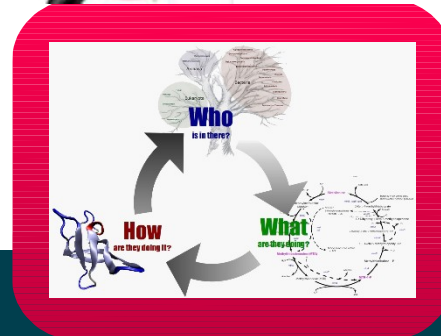
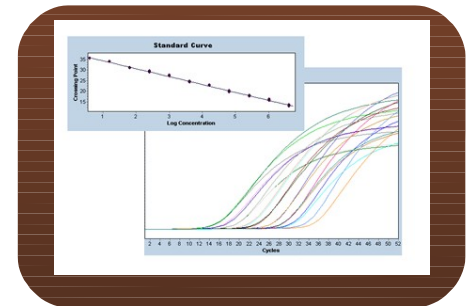
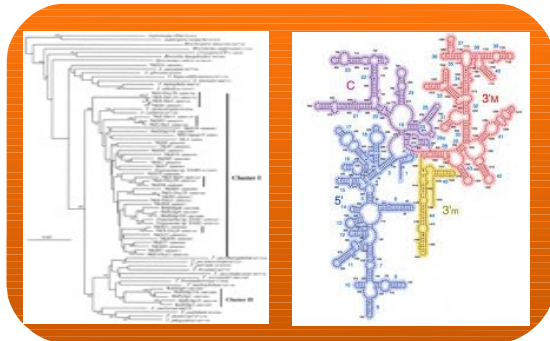


Méta-transcriptomic



# 4 questions....

|



# Digestive ecosystem

# Host

Culture and microfluidic



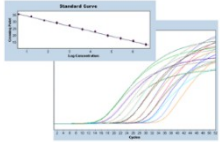
Fermentative profile  
CH<sub>4</sub>, pH, DM, Ammoniac  
FVA

Biohydrogenation C18:2

*trans10-C18 :1*  
*trans11-C18 :1*

Long fatty acid profile  
CPG Spectro de masse

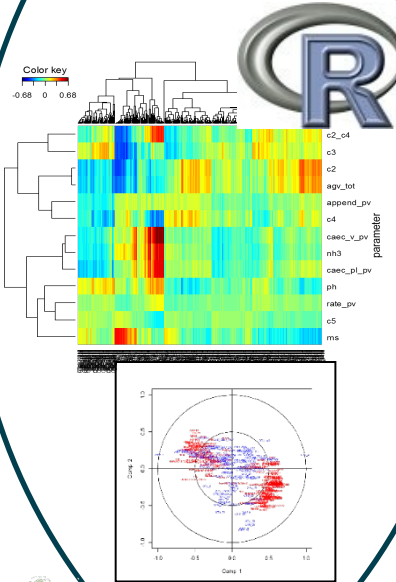
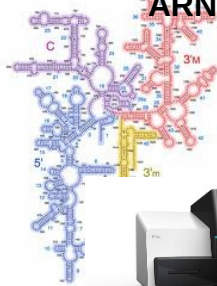
DNA and RNA extraction



qPCR ARG,  
bacteria and  
archae  
Fluidigm

High throughput sequencing

ARN16S metagenomic



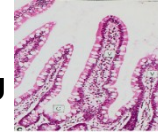
Zootechnical performance and digestibility  
feed composition



Inoculation



Spectro absorption  
atomique ZN, CU



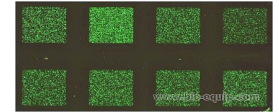
Physiological and histological measurements

RNA extraction

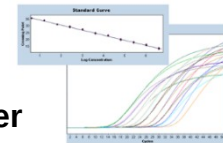
Microarray 8x40K – V2 Agilent

RNAseq

Illumina Hiseq



RTqPCR,  
Fluidigm  
cytokins,  
nutrient  
transporter

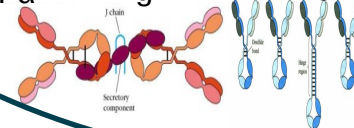


ELISA

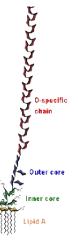
TNF $\alpha$

IgA

IgG



LPS stimulation  
OVA vaccination



Ce qu'il faut retenir....



## Méthodologie d'exploration des écosystèmes digestifs

Culture

Amplicon

Métagénomique

Transcriptomique

Protéomique

Métabolomique

Place de la bioinformatique et de la biostatistique



## Applications statistiques : un peu d'R dans l'écosystème digestif

1. **A quoi ressemble une tables d'abondance :**
  - Les variables
  - Les informations
2. **Les indices de diversité**
  - Formules
  - ANOVA
3. **Analyse taxonomique**
4. **Analyses multivariées**



$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

$H'$  : indice de biodiversité de Shannon

$i$  : une espèce du milieu d'étude

Proportion d'une espèce  $i$  par rapport au nombre total d'espèces ( $S$ ) dans le milieu d'étude

$$p(i) = n_i / N$$

- $n_i$  est le nombre d'individus pour l'espèce  $i$
- $N$  est l'effectif total (les individus de toutes les espèces).

$$\lambda = \sum_{i=1}^R p_i^2$$

# Merci de votre attention

