



HAL
open science

Le microbiote intestinal : fonctions physiologiques, interactions avec les probiotiques et nouvelles avancées thérapeutiques

Adrien Niarquin

► **To cite this version:**

Adrien Niarquin. Le microbiote intestinal : fonctions physiologiques, interactions avec les probiotiques et nouvelles avancées thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03765775

HAL Id: dumas-03765775

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03765775>

Submitted on 31 Aug 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives | 4.0 International License

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 13 JUILLET 2022

PAR

Adrien NIARQUIN

Né le 15/02/1995 à Boulogne Billancourt (92)

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**LE MICROBIOTE INTESTINAL : FONCTIONS
PHYSIOLOGIQUES, INTERACTIONS AVEC LES
PROBIOTIQUES ET NOUVELLES AVANCEES
THERAPEUTIQUES**

JURY :

Président : Madame le Docteur Muriel Masi

Membres : Madame le Docteur Claire Guelton
Madame le Docteur Alexandra Walton

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

| | |
|---|--|
| <i>Doyen :</i> | Mme Françoise DIGNAT-GEORGE |
| <i>Vice-Doyens :</i> | M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT |
| <i>Chargés de Mission :</i> | Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME |
| <i>Conseiller du Doyen :</i> | M. Patrice VANELLE |
| <i>Doyens honoraires :</i> | M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID, |
| <i>Professeurs émérites :</i> | M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS |
| <i>Professeurs honoraires :</i> | M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI |
| <i>Chef des Services Administratifs :</i> | Mme Chloé SIMON |
| <i>Chef de Cabinet :</i> | Mme Aurélie BELENGUER |
| <i>Responsable de la Scolarité :</i> | Mme Nathalie BESNARD |

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC
M. François DEVRED

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pierre REBOUILLON
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI
Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN
Mme Sandra GHAYAD

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU
Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Amandine BONIFAY

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE

Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|---|---|
| BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE | Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT |
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION | Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO |
| CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE |
| CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE | Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS |
| CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE | M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON |
| PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE | Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV |

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

| | |
|--|-----------------------------|
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | M. Cyril PUJOL |
| DROIT ET ETHIQUE | Mme Laurie PAHUS |
| GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC | Mme Félicia FERRERA |
| DISPOSITIFS MEDICAUX | Mme Valerie MINETTI-GUIDONI |

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

| | |
|----------------------------------|---|
| PHARMACIE CLINIQUE | M. Stéphane HONORÉ |
| PHARMACODYNAMIE | M. Benjamin GUILLET |
| TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE | M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI |
| TOXICOLOGIE GENERALE | Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|----------------------------------|--|
| PHARMACIE CLINIQUE | M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE |
| PHARMACODYNAMIE | M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE |
| PHYSIOLOGIE | Mme Sylviane LORTET |
| TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE | Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE |
| TOXICOLOGIE GENERALE | M. Pierre-Henri VILLARD |

A.H.U.

| | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE | Mme Anaïs MOYON M. Vincent NAIL |
|-----------------------------|------------------------------------|

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 13 décembre 2021



**LE DOYEN
F. DIGNAT-GEORGE**

REMERCIEMENTS

A Madame Muriel Masi,

Vous qui avez accepté de diriger ma thèse et de présider mon jury, c'est grâce à vous que ce travail a été rendu possible et ce, malgré la difficulté de se voir de par votre emploi du temps chargé, merci.

A Madame Claire Guelton,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de bien vouloir apprécier ce travail, c'est est un honneur pour moi.

A Madame Alexandra Walton,

Dans la précipitation, d'avoir adapté votre emploi du temps pour faire partie de mon jury, malgré le délais très court dont je vous ai fait part, et me permettre ainsi de soutenir ma thèse.

A mes parents,

J'en aurai mis du temps à finir mon cursus, mais vous ne vous êtes jamais inquiété et m'avez toujours soutenu avec beaucoup de patience et pour cela je tiens à vous remercier du fond du cœur. Un grand merci à toi maman pour toute ton aide au cours de ce travail.

A mes frères et sœurs,

César, Anaïs, et Manon et son monsieur Enio, quelle chance nous avons d'être si proches et soudés, je n'en serais sûrement pas là si vous ne m'aviez pas soutenu au cours de ces longues années d'études. Pour ce travail en particulier, je tiens à te remercier Manon pour l'aide apportée.

Plus généralement, à toute ma famille et surtout ma grand-mère,

Depuis que j'ai commencé la fac jusqu'à maintenant, des réussites aux échecs, vous m'avez toujours encouragé, voici le résultat de tant d'année de soutien, ce n'était pas vain !

Aussi j'aimerais remercier mon oncle et parrain Pierre, qui a toujours été là pour moi, et que j'appelais quand je baissais les bras pour qu'il me remonte le moral.

A ma chérie, Alexia,

Je ne t'ai pas connu tout au long de mes études, mais je te remercie de m'avoir poussé à avancer ma thèse au quotidien, sans le bonheur et la motivation que tu m'apportes je ne serais pas arrivé aussi vite à finir ce travail.

A mon coloc, mon frère, Jordy,

Tous les jours depuis que j'ai décidé de commencer cette thèse tu m'as apporté beaucoup de soutien, de bienveillance et d'aide. Je tiens à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi cette dernière année, je suis fier et heureux de t'avoir à mes côtés.

A l'équipe officinale de la pharmacie Albrand,

Merci de m'avoir permis de travailler cette thèse au quotidien pendant mon stage de 6^e année, et surtout à Edith, une personne que j'apprécie beaucoup et qui m'a énormément motivé vers la fin quand je n'arrivais plus à travailler.

A tous mes amis,

De Marseille et d'ailleurs, tous ces moments de folie avec vous pendant ces années d'études m'ont rendu très heureux et m'ont permis d'avancer, j'espère que vous pourrez voir le résultat de ce travail et assister à ma soutenance. Je sais que je pourrais toujours compter sur vous.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Introduction..... | 1 |
| I. Le Système digestif..... | 2 |
| A. Anatomie et fonctions du Système digestif..... | 2 |
| 1. Les organes du tube digestif..... | 3 |
| a. La cavité buccale..... | 3 |
| b. Le pharynx..... | 4 |
| c. L'estomac..... | 5 |
| d. L'œsophage..... | 6 |
| e. L'intestin grêle..... | 7 |
| f. Le côlon..... | 8 |
| 2. Les glandes annexes..... | 10 |
| a. Les glandes salivaires..... | 10 |
| b. Les glandes gastriques..... | 11 |
| c. Le pancréas..... | 11 |
| d. Le foie..... | 12 |
| 3. Le péritoine..... | 12 |
| B. Le système immunitaire..... | 13 |
| 1. L'immunité innée..... | 13 |
| 2. L'immunité adaptative..... | 14 |
| II. Le microbiote intestinal..... | 16 |
| A. Définition et facteurs d'établissement du microbiote..... | 16 |
| B. Méthodes d'analyses du microbiote..... | 20 |
| 1. Les modèles in vivo..... | 20 |
| 2. Les modèles d'études in vitro..... | 22 |
| a. Modèles d'études statiques..... | 23 |
| b. Modèles de digestion dynamique..... | 23 |
| 3. Le séquençage et la métagénomique..... | 28 |
| a. Le séquençage ciblé..... | 29 |
| b. La métagénomique globale..... | 29 |
| c. Le NIH Human Microbiome Project (HMP)..... | 38 |
| C. Composition du microbiote..... | 39 |

| | | |
|-------------|--|----|
| D. | Rôles..... | 41 |
| 1. | Effet de barrière contre les entéropathogènes..... | 42 |
| 2. | Interaction avec le système immunitaire..... | 43 |
| 3. | Fonctions métaboliques du microbiote..... | 44 |
| a. | Le métabolisme des glucides..... | 45 |
| b. | Le métabolisme des gaz..... | 46 |
| c. | Le métabolisme des protéines..... | 46 |
| d. | Le métabolisme des lipides..... | 47 |
| III. | Les probiotiques..... | 48 |
| A. | Histoire et définitions..... | 48 |
| 1. | Histoire..... | 48 |
| 2. | Définitions..... | 49 |
| B. | Critères de sélection..... | 51 |
| 1. | Absence de toxicité ou pathogénie..... | 51 |
| 2. | Production à grande échelle..... | 52 |
| 3. | Survie le long du tractus digestif..... | 53 |
| 4. | Adhérence au mucus ou à des cellules intestinales..... | 54 |
| 5. | Capacité à avoir des effets bénéfiques sur la santé..... | 55 |
| C. | Classification des microorganismes probiotiques..... | 57 |
| 1. | Les bactéries lactiques..... | 57 |
| a. | Les lactobacilles..... | 58 |
| b. | Les bifidobactéries..... | 59 |
| c. | Les coques..... | 60 |
| 2. | Les levures..... | 61 |
| 3. | Les bactéries non lactiques..... | 62 |
| D. | Les probiotiques sur le marché actuellement..... | 62 |
| 1. | Spécialités dotées d'une AMM..... | 62 |
| 2. | Spécialités sur le marché sans AMM..... | 64 |
| IV. | Avancées thérapeutiques ciblant le microbiote..... | 66 |
| 1. | Obésité et troubles métaboliques associés..... | 66 |
| a. | Lien entre microbiote et obésité..... | 66 |
| b. | Thérapeutique par la modulation du microbiote..... | 68 |

| | |
|---|----|
| 2. Allergies et microbiote..... | 69 |
| a. Implication du microbiote dans l'allergie..... | 69 |
| b. Modulation du microbiote et prise en charge de l'allergie.. | 71 |
| 3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)..... | 73 |
| a. Les MICI et le microbiote intestinal..... | 73 |
| b. Modulation du microbiote intestinal..... | 74 |
| 4. Syndrome de l'intestin irritable..... | 75 |
| a. SII et microbiote intestinal..... | 75 |
| b. Modulations du microbiote dans le SII..... | 76 |
| 5. Diarrhées et Microbiote intestinal..... | 77 |
| a. Diarrhées aiguës infectieuses..... | 77 |
| b. Diarrhée post antibiotique..... | 78 |
| 6. Transplantation de microbiote fécal (TMF)..... | 80 |
| a. Explication et cadre législatif de la méthode..... | 80 |
| b. Composition et Mécanisme d'action..... | 81 |
| c. Indications..... | 82 |
| Conclusion..... | 85 |

➤ **Liste des figures**

1. Le système digestif humain (p.2)
2. Le modèle continu à 3 étages (p.24)
3. Le modèle SHIME (p.26)
4. Représentation de TIM-1 (p.27)
5. Etapes de la métagénomique shotgun (p.30)
6. Le séquençage de Sanger (p.31)
7. Schéma représentatif du fonctionnement du pyroséquençage (p.34)
8. Composition et concentrations des espèces microbiennes le long du tube digestif (p.40)
9. Fermentation des sucres par le microbiote intestinal (p.46)
10. Schéma de la sonde utilisée au cours des perfusions intestinales réalisées chez l'homme (p.54)
11. Processus non exhaustif de sélection puis de fabrication des probiotiques (p.56)
12. *Lactobacillus rhamnosus* (p.58)
13. *Bifidobacterium lactis* (p.60)
14. *Streptococcus thermophilus* (p.61)
15. Principe de la TMF (p.80)

➤ **Liste des tableaux**

- Tableau 1 : Techniques analysant le microbiote intestinal (p.37)
- Tableau 2 : Récapitulatif des familles de bactéries retrouvées dans le microbiote (24) (p.41)
- Tableau 3 : Espèces et genres de Lactobacilles utilisées en probiotiques (34) (p.59)
- Tableau 4 : Médicaments probiotiques ayant une AMM sur le marché (p.63)
- Tableau 5 : Liste non exhaustive des probiotiques disponibles sur le marché sans AMM (Dispositif médicaux ou Compléments alimentaires) (p.64)
- Tableau 6 : Critères diagnostique du SII selon les critères de Rome IV (p.75)

➤ **Liste des abréviations**

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGCC : Acide gras à chaîne courte

ARN : Acide ribonucléique

ATP: Adenosine Tri Phosphate

AX : Axénique

CD : cellule dendritique

CFU: Colony Forming Units

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRP : Protéine C réactive

ESPGHAN: European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture

FOS : Fructooligosaccharide

GOS : Galactooligosaccharide

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HMP: Human Microbiome Project

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

LPS : liposaccharide

M : mètre

MC : Maladie de Crohn

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

NIH: National Institut of Health

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR: Polymerase Chain reaction

pH : Potentiel Hydrogène

PLV : Protéines du lait de vache

PPi: Pyrophosphate

RCH : Rectocolite hémorragique

SFB : Bactérie segmentée filamenteuse

SHIME: Simulator of the Human intestinal microbial ecosystem

SII : Syndrome de l'intestin irritable

TIM : TNO Intestinal Model

TLR : Récepteur Toll-like

TMF : Transplantation de microbiote fécal

Introduction

Le tractus gastro intestinal humain, représente l'une des plus grandes interfaces entre l'hôte, les facteurs environnementaux et les antigènes du corps humain (250 à 400 m²). On estime à 60 tonnes la quantité de nourriture traversant ce tractus au cours d'une vie, apportant ainsi des nutriments, mais aussi une grande abondance de micro-organismes de notre environnement qui pourraient menacer notre intégrité intestinale.

La collection de micro-organismes colonisant notre tractus gastro intestinal a été dans un premier temps appelée « flore intestinale » et enfin depuis plusieurs années « le microbiote intestinal », évoluant avec notre organisme pendant des milliers d'années et formant ainsi une relation complexe et mutuellement bénéfique.

Les connaissances sur ce sujet ne font qu'augmenter depuis une quinzaine d'années et il semblerait que son utilisation thérapeutique soit l'un des piliers fondateurs de la recherche le concernant. Nous allons donc dans cette thèse tenter de comprendre ce qu'est le microbiote intestinal, quels sont les facteurs pouvant le moduler et interagir avec celui-ci et enfin dresser un bilan des connaissances actuelles pour fixer sa place dans l'arsenal thérapeutique de certaines pathologies.

Pour se faire, dans une première partie plus bibliographique, je vais vous rappeler ce qu'est le tractus gastrointestinal ainsi que sa physiologie avant de décrire le microbiote intestinal, son histoire, les moyens développés qui ont permis son analyse et de dresser sa composition, pour finir sur ses fonctions physiologiques.

Dans un deuxième temps, nous allons développer, définir les probiotiques, éléments ingérés vivants pouvant interagir avec notre microbiote, dans le but de terminer notre étude sur les différentes pathologies où une dysbiose du microbiote serait impliquée et essayer de voir si sa modulation peut être une piste thérapeutique.

I. Le Système digestif

A. Anatomie et fonctions du Système digestif

Appelé communément tube digestif, le tractus gastro intestinal humain, est l'ensemble des organes et glandes annexes permettant l'ingestion et la digestion des aliments. Il en assure la dégradation, la transformation, l'assimilation dans le sang et sa redistribution aux différentes cellules du corps humain mais également l'élimination des résidus de l'organisme.

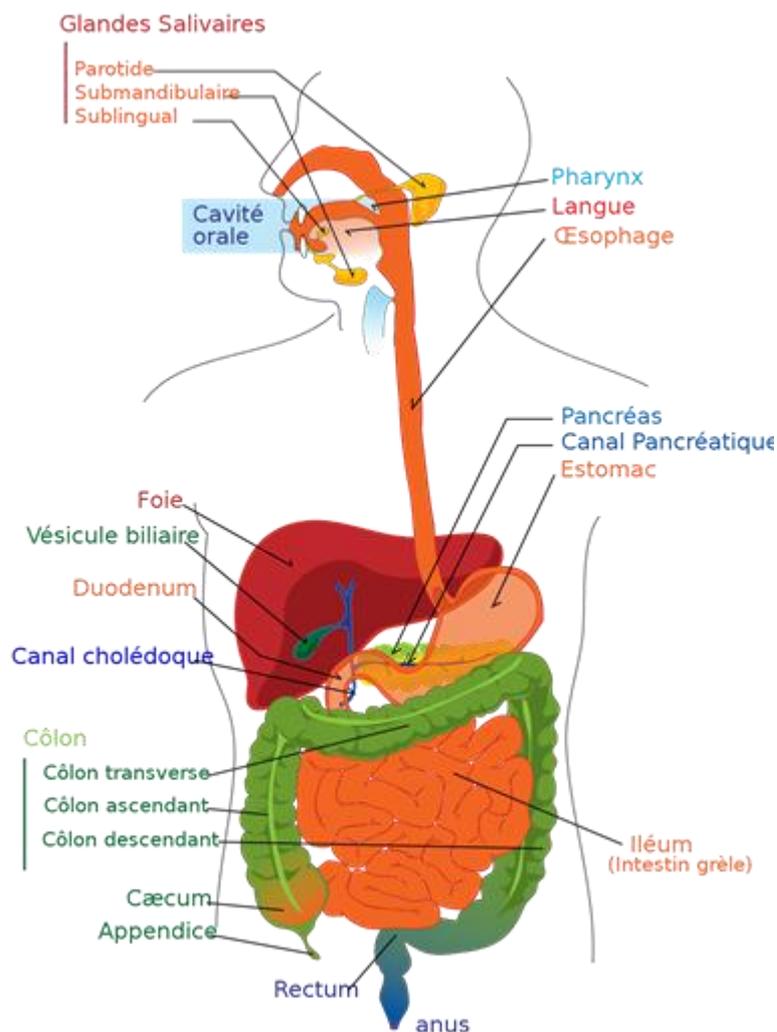


Figure 1 : Le système digestif humain

Il s'agit d'un tube creux, irrégulier allant de la cavité buccale à l'anus et composé de plusieurs segments :

- La cavité buccale,
- Le pharynx,
- L'œsophage,
- L'estomac,
- L'intestin grêle,
- Le gros intestin,

Sa longueur est d'environ 10m et il est annexé de quatre types de glandes :

- Les glandes salivaires,
- Les glandes gastriques,
- Le foie,
- Le pancréas.

1. Les organes du tube digestif

a. La cavité buccale

La digestion est amorcée dans la cavité buccale. Elle va jouer deux rôles : dans un premier temps, la mastication, qui joue un rôle mécanique permettant le broyage des aliments. Pour cela, les muscles masticateurs ainsi que les dents vont jouer un rôle prépondérant dans la préparation du bol alimentaire. Bloqués par la langue les aliments sont machés par les dents. Les muscles masticateurs permettent le déplacement de la mandibule en cycles successifs.

La dentition d'un adulte est composée de :

- 4 incisives sur chaque mâchoire située au centre permettant la coupe des aliments
- 2 canines sur la mâchoire du haut et 2 sur celle du bas situées de part et d'autre des incisives, en forme de lance, assurant la lacération
- S'en suit 4 prémolaires sur la partie supérieure et 4 sur la partie inférieure dont leurs rôles et de broyer les aliments
- Et enfin, 12 molaires, plus volumineuses, qui vont, avec les prémolaires assurer le broyage et la mastication des aliments.

Dans un second temps, la constitution du bol alimentaire, qui est le mélange de la salive avec les aliments.

Avant de commencer la mastication proprement dite, la vue et les arômes de la nourriture déclenchent une production supplémentaire de salive. Les aliments ingérés et mastiqués sont imprégnés de salive et forment une masse compacte homogène, placée sur la partie supérieure de la langue, prête à être déglutie en un seul temps.

La formation du bol alimentaire constitue le temps buccal de la digestion.

Chez l'homme, le bol alimentaire va être porté au pharynx grâce à une contraction volontaire : c'est la phase pharyngienne. La langue, muscle puissant propulse ce bol alimentaire, lors de la déglutition de la cavité buccale vers le pharynx.

La salive contient des enzymes, les amylases, qui vont commencer la digestion chimique des glucides.

b. Le pharynx

Le pharynx, plus couramment appelé gorge, est un conduit musculo-membraneux creux, vertical, mesurant environ 13 cm, d'un diamètre de 5 cm dans sa partie supérieure et de 3 cm dans sa partie inférieure.

C'est un véritable carrefour entre les voies aériennes et les voies digestives, il conduit les aliments à l'œsophage.

On peut lui distinguer trois parties distinctes :

- Le nasopharynx ou rhinopharynx, qui communique avec les cavités nasales par leurs orifices postérieurs. Il est également relié aux oreilles par la trompe d'Eustache, ou trompe auditive.
- L'oropharynx, c'est la partie centrale du pharynx situé à l'arrière de la cavité buccale et ouvert sur l'œsophage, flanqué des amygdales
- Le laryngopharynx, relie le larynx qui précède l'œsophage en ce rétrécissant sous forme d'entonnoir.

Dans la déglutition le pharynx assure le transit des aliments ou des liquides ingérés de la bouche vers l'œsophage. Afin d'empêcher leur passage dans les voies aériennes, la luette et l'épiglotte vont respectivement fermer l'accès aux fosses nasales et au larynx.

c. L'œsophage

Situé entre le pharynx et l'estomac, l'œsophage mesure 23 à 25 cm de long. Ce conduit tubulaire thoracique, de 2 à 2.5 cm de diamètre, musculéux et fermé permet le passage du bol alimentaire, par de nombreuses contractions.

À son extrémité supérieure, il est doté d'un sphincter empêchant le reflux des aliments, alors qu'il en est dépourvu à son extrémité inférieure.

Il a pour fonction de faire descendre les aliments mastiqués dans la bouche vers l'estomac, où la digestion se poursuivra. L'œsophage véhicule les aliments de manière active grâce à la contraction de ses muscles, phénomène appelé « péristaltisme ».

Il est composé de 3 parties :

- La première, cervicale, situé à la base du coup,
- La deuxième, thoracique, la plus longue, qui se termine au niveau du hiatus œsophagien (ouverture du diaphragme qui permet le passage de l'œsophage).
- Sa partie abdominale, qui commence à cet orifice œsophagien, et trouve sa fin au niveau de la cardia, lieu de communication avec l'estomac.

Dans cette partie, le tractus digestif va se composer de 4 couches concentriques qui sont de l'intérieur vers l'extérieur :

- La couche muqueuse, revêtu d'un épithélium stratifié est un tissu conjonctif lâche très richement vascularisé et comprenant de nombreuses cellules immunitaires, ainsi que des glandes à mucus. Cependant ce mucus ne permet pas de résister à l'acidité des reflux gastriques.
- La sous muqueuse est plus dense, également constituée de tissu conjonctif, où l'on trouve des vaisseaux, des nerfs et des glandes œsophagiennes
- La couche musculéuse, comme son nom l'indique va être composée de cellules musculaires striées organisées en muscles striés et de cellules musculaires lisses principalement dans le tier inférieur. Grâce à cette structure musculaire, il va y avoir une propagation d'onde de contraction, le péristaltisme et qui va permettre le mélange et l'avancée des aliments dans le tube digestif.

- L'adventice ou séreuse, c'est un tissu conjonctif lâche, dense et vascularisé, contenant des adipocytes.

Sous l'effet des ondes péristaltiques, le bol alimentaire va donc traverser l'œsophage et le cardia, pour se retrouver dans l'estomac.

d. L'estomac

Entre la partie terminale de l'œsophage et l'estomac, se trouve le cardia, l'orifice doté d'un système de muscles. Sphincter fonctionnel, il constitue une barrière au reflux, qui s'ouvre et se referme pour laisser passer le bol alimentaire mais également il protège la muqueuse de l'œsophage des éventuelles remontées de liquide gastrique.

L'estomac précède le duodénum et fait suite à l'œsophage. Segment dilaté en forme de J, ou d'une façon plus imagée en forme de cornemuse, cette poche musculaire est composée de 2 parties :

- Le corps de l'estomac, vertical dénommé dans sa partie supérieure fundus ou grosse tubérosité
- La partie pylorique, horizontale composée de l'antrum et se terminant par un orifice, le pylore. Le pylore ou valve pylorique est la jonction entre estomac et duodénum.

La paroi de l'estomac est formée de muscles qui permettent le mélange des aliments solides, leur pétrissage et leur brassage. Ils régulent également l'évacuation du contenu de l'estomac vers le duodénum.

A l'image de l'œsophage, la paroi de l'estomac est également composée de quatre couches concentriques :

- La muqueuse est constituée d'un épithélium cylindrique. La surface de la muqueuse est parcourue par des plis muqueux qui permettent les contractions de celle-ci. Ces plis sont plus profonds dans la partie centrale et moins marqués dans l'antrum.
- La sous muqueuse est la même que celle contenue dans l'œsophage, c'est une couche dense de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse. Elle comprend de gros vaisseaux sanguins et lymphatiques, des cellules nerveuses et des fibres.
- La musculature, composée de trois couches de cellules musculaires lisses, va permettre le péristaltisme et le pétrissage par malaxage du bol alimentaire.
- Et enfin, la séreuse qui entoure et protège les 3 membranes précédentes.

L'innervation de l'estomac est importante et est responsable de ses fonctions. Une innervation parasympathique provient du nerf vague droit et gauche, pour la mise en route de la digestion et une innervation des neurofibres sympathiques, permet d'arrêter les sécrétions gastriques lorsque le chyme (pâte constituée du bol alimentaire, d'eau et sucs gastriques) sera passé dans l'intestin grêle.

e. L'intestin grêle

Segment proximal de l'intestin, long (6 m) et étroit, il fait suite à l'estomac et s'abouche dans le cæcum. C'est le siège principal de la digestion et de l'absorption des aliments.

Il est composé de 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléum. Il présente des connexions intimes avec le pancréas et le foie.

Lorsque le chyme arrive dans l'intestin grêle, il subit l'action de nouveaux sucs digestifs. Ceux sécrétés par le pancréas neutralisent l'acidité des sucs gastriques et permettent à nouveau la décomposition de l'amidon en glucose.

Le duodénum représente la portion fixe de l'intestin grêle. Il est relié à l'estomac au niveau du pylore, c'est d'ailleurs ici le siège fréquent d'ulcères duodénaux.

Vient ensuite la partie centrale et mobile de l'intestin grêle : le jéjunum. Il commence au niveau de l'angle duodénojéjunal et se termine au niveau de l'iléon. Cette portion de l'intestin joue un rôle prépondérant dans la nutrition, dans la digestion des aliments, dans l'assimilation des vitamines, du fer et du calcium et l'absorption de l'eau et des électrolytes (sodium, potassium, etc.). Il a également des fonctions sécrétoires en produisant du mucus et des immunoglobulines.

Suspendu au mésentère ce système d'accroche garantit sa mobilité.

L'iléum est la troisième partie de l'intestin grêle. Il est précédé du jéjunum et se poursuit par le cæcum qui correspond à la première partie du côlon. Constitué de plaques de Peyer situées sous la muqueuse intestinale, l'iléum a pour fonction d'assurer l'absorption des nutriments tels que le potassium, le sodium, l'eau, les sels biliaires ou encore la vitamine B12.

La muqueuse de l'intestin grêle a une structure assez particulière, caractérisée par des valvules, des villosités et des microvillosités, permettant l'agrandissement considérable de sa surface sous forme de replis dans le but d'augmenter l'absorption.

L'épithélium de cette muqueuse est simple, mais comporte plusieurs cellules : les entérocytes, cellules prismatiques jouant un rôle dans l'absorption des nutriments, les cellules caliciformes élaborant un mucus afin de protéger la muqueuse des agressions et de favoriser la progression du chyme.

La sous muqueuse n'a pas de particularité hormis au niveau du duodénum par la présence de glandes de Brunner, sécrétrices d'un matériel muqueux alcalin afin de protéger la muqueuse duodénale de l'acidité gastrique.

L'intestin grêle a pour principale fonction, l'absorption des nutriments par sa grande surface, en effet, il va distribuer à l'organisme les sucres simples et acides aminés par voie sanguine et les lipides par voie lymphatique.

Mais il ne faut pas le limiter seulement à celle-ci :

- Il est pourvu d'une fonction motrice : il va permettre la progression du chyme par le péristaltisme intestinal (faibles contractions) ainsi que leur brassage avec les enzymes alimentaire par segmentation, ce sont des contractions localisées ne permettant pas l'avancée des aliments.
- Il possède également une fonction endocrine, par la production de mucus et d'hormones
- Enfin, il joue un grand rôle sur notre système immunitaire car c'est une véritable barrière entre sa lumière qui est remplie de bactéries et le péritoine. Il contient dans sa paroi un grand nombre de cellules immunitaires, afin de se défendre face aux nombreux antigènes provenant de la dégradation de micro-organismes ou provenant de l'alimentation.

L'intestin grêle se poursuit par le côlon.

f. Le côlon

Le côlon et le rectum forment ensemble le gros intestin, d'une longueur allant de 1m à 1m80, c'est un cadre qui entoure les replis de l'intestin grêle.

Lui-même est composé de plusieurs segments dépourvus de replis et de villosités mais possédant tous la même structure :

- Le cæcum : partie initiale débutant à la jonction avec l'iléum au niveau de la valve iléo-cæcale. L'appendice lui est attachée
- Le colon ascendant est vertical, et se termine par l'angle colique droit
- S'en suit le colon transverse, horizontal, qui se situe entre les angles coliques droit et gauche
- De l'angle colique gauche et se prolongeant jusqu'à la crête iliaque, se trouve le colon descendant également vertical
- Enfin, les colon iliaque et sigmoïde, que l'on réunit souvent sous le terme colon ilio-pelvien, se terminent par le rectum.

On retrouve ici toujours le 4 couches concentriques du tube digestif :

La muqueuse et son épithélium simple composé de cellules à mucus et de quelques entérocytes ayant pour but d'absorber l'eau et les électrolytes pour concentrer les matières fécales. En effet, plus les selles avancent dans le colon, au plus elles se solidifient. Le mucus jouera aussi un rôle protecteur de l'épithélium vis-à-vis de ces matières fécales et facilitateur de la progression de ce contenu.

La sous muqueuse composée de tissu conjonctif richement vascularisé et siège du réseau de nerf sympathique.

La musculature formée de deux couches musculaires : circulaire interne et longitudinale externe, délimitant le plexus d'Auerbach, responsable de l'innervation végétative du tube digestif.

Et enfin, la sous séreuse du colon est un tissu adipeux vascularisé.

Au niveau du rectum, il n'y a plus de séreuse mais uniquement du péritoine à proprement parler.

Le côlon possède également, à l'image de l'intestin grêle plusieurs fonctions :

- Fonction motrice, par les mouvements de contraction qui vont assurer le brassage et la propulsions des matières résiduelles et aliments non digérés vers le rectum, afin de les éliminer via le fèces.
- Fonction de résorption d'eau et d'électrolytes, environ 90% de l'eau arrivant de l'iléum sera résorbée ici.

- Fonction de sécrétion par les cellules caliciformes de mucus, protecteur de la muqueuse
- Et fonction de dégradation gérée par la flore bactérienne du côlon.

Nous avons ainsi vu les différents organes du tube digestif et leurs fonctions, nous allons donc désormais, s'intéresser aux glandes annexes qui le composent.

2. Les glandes annexes

a. Les glandes salivaires

Les glandes salivaires se divisent en glandes salivaires principales et glandes salivaires accessoires. Entre 750 à 1 000, les glandes salivaires accessoires sont de très petites tailles et jouent un rôle complémentaire des glandes salivaires principales.

Les glandes salivaires principales de tailles plus importantes produisent la plus grande quantité de la salive. Il en existe 3 types. Elles fonctionnent par paire.

- Les glandes parotides, les plus importantes en taille, situées de chaque côté du visage devant chacune des oreilles. Leurs canaux excréteurs (conduits parotidiens, ou canaux de Sténon) cheminent dans la paroi jugale pour s'ouvrir en regard des deuxième molaires supérieures.

- Les glandes sous-maxillaires, plus petites que les glandes parotides, situées derrière la mâchoire inférieure, juste sous le menton et la langue de chaque côté du visage. Leurs canaux excréteurs (conduits submandibulaires, ou canaux de Wharton) traversent le plancher buccal pour s'aboucher près du frein de la langue

- Les glandes sublinguales les plus petites des glandes salivaires principales, enfouies profondément dans le plancher de la bouche, de chaque côté de la langue et se drainent directement dans la cavité buccale par plusieurs petits canaux excréteurs et également par un canal principal s'abouchant à la portion antérieure du conduit submandibulaire.

Les canaux et éléments excréteurs de ces différentes glandes principales sont sensiblement identiques et le mélange de leur produit de sécrétion va constituer la salive.

b. Les glandes gastriques

A l'intérieur de la lamina propria de cette membrane muqueuse se trouvent différentes glandes gastriques. Ces glandes font partie des glandes digestives et sécrètent les sucs gastriques :

- Pepsinogène et acide chlorhydrique : pour la digestion des protéines.
- Facteur intrinsèque : Il est sécrété par les glandes fundiques. Ce facteur est nécessaire à l'absorption normale de la vitamine B12 ou cobalamine apportée par l'alimentation.
- Mucus et bicarbonate. Le mucus entoure les matières solides ingérées. Associés à la sécrétion de bicarbonates, ils neutralisent l'acidité stomacale en empêchant le mélange chlorhydro-peptique d'entrer en contact avec la paroi de l'estomac.

c. Le pancréas

C'est une glande allongée composée de 3 parties : la tête, le corps et, la queue.

La tête est située au contact direct avec le duodénum, qui forme le cercle duodénal tandis que la queue est située à proximité de la rate.

Les fonctions du pancréas sont dues à une particularité, c'est une glande amphicrine, c'est à dire à la fois endocrine donc sécrétrice d'hormones et à la fois exocrine, sécrétrice de substances liquides non hormonales. Cette glande est dite hétérotypique car les cellules qui supportent ces fonctions ne sont pas les mêmes.

Fonction endocrine : les ilots de Langherans, sont les cellules endocrines du pancréas. Ils produisent différentes hormones : des hormones régulatrices de la glycémie.

- Principalement de l'insuline qui diminue le taux de sucre (glucose),
- Mais aussi du glucagon qui lui augmente le taux de sucre dans le sang en stimulant le foie afin qu'il libère ses réserves
- Et la somatostatine qui empêche la libération des deux autres hormones

Fonction exocrine : va fabriquer les enzymes pancréatiques par le biais de cellules acineuses.

Ces enzymes digestives sont au nombre de 3 :

- La lipase digère les graisses,
- L'amylase digère les sucres

- La trypsine digère les protéines

Leur rôle va être d'attaquer les aliments ingérés pour les décomposer en éléments assimilables par l'organisme. Elles sont déversées dans le canal pancréatique avant qu'il rejoigne l'ampoule hépato créatique au niveau du duodénum.

d. Le foie

Faisant partie d'un des organes des plus volumineux et dernière glande annexe du tube digestif, le foie est, à l'image du pancréas, une glande amphicrine. Elle diffère cependant de ce dernier car elle est homotypique c'est à dire que ce sont les mêmes cellules qui vont supporter les fonctions endocrines et exocrines.

Le canal cholédoque relie le foie au duodénum (au niveau de l'ampoule hépato créatique également). Les sels biliaires favorisent la dissolution des graisses.

Fonction endocrine : contrôle la composition du sang qui provient du tube digestif qui va être dirigé vers la circulation générale.

Fonction exocrine, c'est la sécrétion de la bile, afin d'aider à la digestion des graisses.

Rôles métaboliques du foie :

- Libération de glucose si hypoglycémie et stockage de celui-ci si hyperglycémie avec mise en jeu des récepteurs à insuline et glucagon
- Concernant les lipides, absorption des chylomicrons (grosse particule lipidique) afin de produire de l'énergie ou des lipoprotéines capables de transporter le cholestérol
- Terminer la digestion des acides aminés et protides provenant de l'intestin.
- Détoxification et excrétion des éléments nocifs tels que résidus de médicaments et déchets de l'organisme
- Digestion : les graisses du chyme sont émulsionnées par la bile
- Synthétise : albumine, fibrinogène et facteurs de coagulation.

3. Le péritoine

Il me paraissait important, avant de commencer la partie de ce chapitre sur le système immunitaire, d'évoquer le péritoine et ses rôles.

C'est une membrane séreuse, formée de deux feuillets, qui enveloppe tous les segments du tube digestif cités plus haut. Ce péritoine permet aux organes de coulisser les uns par rapport aux autres, mais également de les soutenir et de les protéger en formant une véritable barrière entre eux. Enfin, il va permettre des échanges en eau et en électrolytes.

B. Le système immunitaire

La notion de système immunitaire est apparue dans les années 1796, grâce à l'expérience d'Edward Jenner, qui apporta la naissance de la vaccination. Au cours de ses recherches, il remarqua que les valets de ferme qui attrapent souvent la « vaccine » (cowpox en Anglais), une maladie des vaches apparentée à la variole, sont ensuite épargnés lors des épidémies varioliques. Il l'introduisit alors à un enfant de 8 ans, qui guérit assez rapidement. Quelques mois plus tard, il lui inocula la variole, humaine, qui n'aura aucun effet sur lui, après plusieurs essais similaires, il publia son résultat et fit naître la vaccination.

Ensuite, la notion de « soi » et de « non soi » se développa. Vers la fin du XIXe siècle, le monde médical considère que le système immunitaire sert uniquement de protection contre les éléments « étrangers » à l'organisme, des microbes responsables de maladies infectieuses. Cette position sera modifiée pour considérer que le système immunitaire est impliqué dans la surveillance des tumeurs et dans l'intégrité de nos cellules, tissus... Dans son fonctionnement normal, il va éliminer tout ce qui est déchet, cellules mortes et danger. Nos composants, les poussières et les bactéries commensales (bactéries sans danger pour l'hôte) ne sont pas considérées comme source de danger.

En cas d'infection, de colonisation par un virus ou une tumeur, le système immunitaire se met en action selon un procédé immuable. Il déploie ces grandes lignes d'action : réaction inflammatoire précoce, mise en place de l'immunité innée, puis immunité adaptative en vue d'annihiler le danger et enfin se termine par un retour à la normale.

1. L'immunité innée

C'est la première ligne de défense de l'organisme en cas d'agression extérieure. Nous possédons de nombreuses barrières extérieures et intérieures en étroite communication.

Des barrières physiques telles que la peau nous isolant des microbes, poussières et certains produits chimiques présents dans notre environnement. Les liquides antiseptiques forment nos premières barrière interne au niveau des muqueuses, la salive ou le mucus intestinal. De plus de nombreux germes habitent l'intestin et forment une barrière supplémentaire, le microbiote intestinal, nous protégeant d'agents pathogènes.

Si ce travail de surface ne suffit pas, on y retrouve des cellules immunitaires internes capables de repérer et phagocyter les éléments pathogènes (les ingérer afin de les détruire) et de les présenter au système immunitaire adaptatif ce sont :

- Les cellules dendritiques (CD)
- Les Macrophages

La plupart du temps ces cellules vont être activées par un amas protéique, le complément, qui va recouvrir le microbe et sécréter des messagers qui attireront les phagocytes. Pour finir, une fois phagocyté, ce complexe va se déplacer dans les ganglions pour élaborer la réponse immune adaptative.

2. L'immunité adaptative

Deuxième ligne de défense de l'organisme, c'est une réponse plus tardive, mais bien plus spécifique par sa capacité d'adaptation à la nature de l'élément pathogène. Ce système met en jeu : les lymphocytes B et T ainsi que leurs récepteurs spécifiques codés par des gènes se réarrangeant (immunoglobulines, récepteurs aux lymphocytes T, des structures particulières, les complexe majeurs d'histocompatibilité (CMH), véritable système de reconnaissance du soi exprimées par toutes les cellules.

Se déroulant dans les organes lymphoïdes, plus particulièrement la rate et les ganglions, cela va se dérouler comme ceci :

Dans un premier temps : L'antigène active les lymphocytes B, via ses récepteurs qui vont alors devenir des plasmocytes. Ces lymphocytes activés vont sécréter des anticorps responsables de la destruction de cet antigène, c'est la réponse humorale. Les principaux anticorps créés sont les IgG, dans le sang et les tissus, les IgM immédiatement disponibles, les IgA dans les sécrétions extracellulaires, les IgE intervenant dans la réaction allergique, et en petite quantité dans le sérum, les IgD.

Une fois différenciés, les plasmocytes ne se diviseront plus. En disparaissant, la quantité d'anticorps peut être mesurée, afin d'apprécier la réponse humorale. La deuxième partie de cette adaptation sera l'immunité cellulaire.

En parallèle, l'immunité cellulaire est assurée par les lymphocytes T. Elle est principalement dirigée contre les agents infectieux intracellulaires tels que les virus, tandis que la réponse humorale est plutôt dirigée contre les agents extracellulaires comme les bactéries.

Les lymphocytes TCD 4 répondent aux antigènes en association avec le CMH de classe II et vont les reconnaître via les cellules présentatrice d'antigènes tandis que les T CD8 vont répondre aux antigènes en association avec le CMH I et détruire les virus contenus dans les cellules infectées.

Lors de cette collaboration entre les deux réponses immunitaires, les cellules CD4 vont relâcher des cytokines et contrôler le développement de la réponse immune : les CD4 Th1 activent les macrophages pour détruire le matériel phagocyté et les Th2 aident les cellules B à produire des anticorps.

Le principe même de la vaccination repose sur cette immunité adaptative, plus particulièrement de sa mémoire qui permettra ensuite à l'organisme de mettre en place une réponse plus efficace et rapide lors d'une réinfection par le même microbe.

Etant la plus grande surface du corps humain exposé à l'environnement, le système immunitaire digestif va contenir 70% des cellules immunitaires de notre organisme. Afin de comprendre par quels moyens et ce qui nous compose, nous allons passer à la partie de ce travail traitant sur le microbiote intestinal.

II. Le microbiote intestinal

A. Définition et facteurs d'établissement du microbiote

Par définition, un microbiote est l'ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) vivant dans un environnement spécifique. Il existe des microbiotes associés au corps humain : un microbiote cutané, un microbiote vaginal... et le plus étudié, le microbiote intestinal.

Dans l'histoire, on classait les bactéries parmi les plantes, donc logiquement, celles découvertes dans l'intestin furent appelées « flore intestinale », possédant aujourd'hui une classification à part entière, les spécialistes ont regroupés cet organe sous le terme de microbiote intestinal. Il se compose de plus de 100 000 milliards de microorganismes.

Jusqu'aux années 1980, la caractérisation du microbiote intestinal était exclusivement réalisée à l'aide de techniques de culture, ne prenant en compte que 30% environ des micro-organismes présents. Des outils moléculaires ont depuis été développés et ont permis de montrer que la plus grande partie des espèces observées dans le microbiote fécal d'un individu lui sont propres, même si quelques dizaines d'espèces bactériennes pourraient être partagées par la plupart des individus.

C'est par l'accouchement par voie basse, les contacts et l'allaitement que sera établie notre flore (Fouhy et al 2012 (1)). Après la naissance, la composition microbienne de l'intestin, stérile in utero subit des altérations au cours des deux premières années de vie. Plus précisément, le tractus digestif change, initialement stérile, il va posséder un microbiote stable de type adulte au moment où le nourrisson atteint l'âge de 2 ans.

Divers facteurs contribuent au développement du microbiote intestinal et impactent sur la composition unique que chaque individu développe :

- Au plus jeune âge, le terme ou non de la grossesse
- Le mode d'accouchement

En effet les nourrissons vont subir une colonisation rapide lors de l'accouchement et dans les premières heures suivant la naissance. Les nourrissons nés par voie basse, sont colonisés par les microbes vaginaux et fécaux de leur mère, ce qui ne sera pas le cas des nourrissons nés par césarienne, qui seront plutôt colonisés par les microbes de l'environnement, tels que les microbes présents dans les services hospitaliers, du personnel de santé et des autres nourrissons. (Salminen S et al, en 2004)

Plusieurs études ont permis de démontrer la différence en composition des microbiotes d'enfants nés par voie basse ou par césarienne, en particulier une étude récente (2) portant sur 9 femmes et leurs 10 nourrissons, a prouvé qu'il y avait en effet une transmission des microbes vaginaux lorsque l'accouchement était réalisé par voie basse, avec un nombre important de lactobacilles présent dans les heures suivant la naissance. Tandis que pour ceux nés par césarienne, on retrouvait bien plus de staphylocoques maternels (microbes cutanés de la mère). Démontrant donc bien le lien entre microbiote maternel et celui du nourrisson.

Une autre étude (3) a cherché l'impact du mode d'accouchement sur la composition microbienne de la flore. Il a été noté une augmentation, chez les enfants nés par césarienne, de la colonisation par *Clostridium difficile*, qui est un agent pathogène responsable de diarrhées et de colites par production de toxines.

Une étude finlandaise (Huurre A et al, 2008), basée sur 168 nourrissons âgés d'un mois, montre la présence de *Clostridium*, de Bifidobactéries et de *Lactobacillus* similaires chez ceux nés par voie vaginale ou césarienne. Cependant, les concentrations de Bifidobactéries étaient 1300 fois plus importantes chez ceux nés par voie basse. Ceci est intéressant à noter pour la suite car les Bifidobactéries et lactobacilles sont les plus fréquemment utilisés dans les probiotiques.

- Le poids de la mère à la naissance

Il est en fait démontré depuis plusieurs années, que l'obésité est un cercle vicieux, une mère obèse est plus susceptible d'avoir un enfant obèse, qui à son tour a un risque accru de devenir un adulte obèse. Pour chercher l'influence de ce facteur et son lien avec le microbiote, une cohorte de sujets brésiliens datant de 2011, menée par Goldani Has et al (4), a examiné l'association entre césarienne et risque d'obésité des sujets de 23 à 25 ans. Après contrôle du sexe, poids à la naissance, activité, revenus, tabagisme et facteurs maternels (scolarisation et

tabagisme pendant la grossesse), il est ressorti une augmentation du risque d'obésité de 58% des enfants nés par césarienne en rapport à ceux nés par voie vaginale mettant ainsi en évidence les effets recherchés à long terme du microbiote intestinal et du mode d'accouchement. Il est évident que l'on ne peut pas conclure ce lien sur une seule population et en ne suivant que cette étude, mais elle montre la nécessité de se pencher sur cette théorie.

Pour appuyer le lien de ce facteur, une étude récente avec une approche alternative, consistait à chercher si le poids de la mère avant ou pendant la grossesse avait un impact sur le microbiote de son nourrisson (Collado MC et al, 2010) (5). Les résultats ont dans un premier temps, confirmé que les nourrissons de mères en surpoids avaient tendance à être en surpoids ou plus lourd à la naissance. Mais en regardant la composition de la flore bactérienne, ils ont noté une diminution des Bifidobactéries et une augmentation des niveaux de *Clostridium histolyticum*, justifiant donc d'un impact potentiel.

- L'environnement hospitalier va jouer un rôle sur la composition du microbiote
- L'utilisation d'antibiotiques à la naissance

Les antibiotiques sont les médicaments les plus prescrits dans les unités néonatales de soins intensifs (Clark RH et al, 2006). Les antibiotiques sont, par définition, des substances qui vont inhiber la croissance des bactéries ou les détruire, leur action délétère sur le microbiote est donc évidente. De nombreuses situations amènent l'équipe soignante à mettre en place un traitement antibiotique : pour les nourrissons nés prématurément, infection intra utérine, rupture prématurée des membranes et chondro-amniotite (inflammation des membranes et du chorion placentaires). Ce traitement, peut durer de 2 à 5 jours, suivant l'appréciation des cliniciens ou plus en cas de rupture prolongée des membranes ou des signes post natals tels que détresse respiratoire, intolérance alimentaire ou besoin de réanimation à l'accouchement.

Une étude coordonnée par Corryn Greenwood, MD et al publiée en 2013 (6) a cherché à déterminer l'impact de l'utilisation d'ampicilline et de gentamicine (deux antibiotiques appartenant à deux familles différentes) au cours de la première semaine de vie sur le microbiote intestinal chez des enfants prématurés. Il en est ressorti que l'administration intensive précoce d'antibiotiques aux prématurés est associée à de profondes altérations du microbiote intestinal et potentiellement à un risque accru de septicémies. De plus, une nette

diminution de la diversité microbienne a été notée quelques jours seulement après l'administration des antibiotiques. Cette étude ayant pour limite la défécation précoce peu fréquente chez les prématurés dans les premiers jours de la vie, et les quelques échantillons obtenus ne permettant pas de saisir pleinement l'effet des antibiotiques sur le microbiote, suggère la nécessité d'évaluer l'impact à long terme des antibiotiques sur le microbiote.

Au cours des 2 premières années de vie, le microbiote intestinal va se développer et la première différence qui va apparaître, sera le mode d'alimentation, à savoir l'allaitement ou le lait maternisé.

Les études de Donnet-Huges et al en 2010 (7) ont montré la présence de bactéries dans le lait maternel, influençant directement le microbiote des nourrissons allaités au sein par rapport à ceux nourris par les laits maternisés. Certaines bactéries étant capables de se fixer dans l'intestin, aidant au développement normal du microbiote après la naissance.

L'OMS recommande depuis 2001 l'allaitement maternel exclusif de tous les nourrissons jusqu'à l'âge de 6 mois et de poursuivre cet allaitement jusqu'à 2 ans, selon le souhait des mères. Cependant la réalité est très diverse, la National Immunization Survey, un organisme américain qui enquête sur la vaccination, a mené une étude de 2002 à 2014 et a rapporté un taux de nourrissons allaités exclusivement jusqu'à 3 mois de presque 50 % contre moins de 30% à 6 mois en 2014, bien que la courbe ait tendance à augmenter d'années en années. (8)

L'allaitement maternel est reconnu comme étant très bénéfique à la fois pour les mères et les nourrissons, par sa composition très nutritive pour le nouveau-né. Il varie en fonction de l'évolution des besoins nutritionnels et de l'âge du nourrisson. De plus, le lait maternel peut avoir un impact sur le microbiote intestinal car dans sa composition il contient :

- Prébiotiques (ingrédients alimentaires non digestibles qui ont un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant la croissance d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon)
- Lactoferrine (protéine alimentaire antimicrobienne)
- Le lysozyme (enzyme capable de digérer les parois cellulaires des bactéries)

L'introduction d'aliments solides, dans l'alimentation de l'enfant, modifiera la composition du microbiote. Le microbiote d'un enfant atteint sa maturité et est quasiment comparable à celui d'un adulte à l'âge de 2 ans. Bien sûr, il évolue au fil du temps. En 2011, Koenig et ses collègues, ont séquencé l'ADN fécal d'un nouveau-né sur une période de 2 ans et 6 mois. Durant cette étude, ils ont identifié des "étapes", durant lesquelles la modification du

microbiote intestinal pouvait être due à un évènement important de la vie, par exemple, lors du changement de mode d'allaitement, passant du lait maternel au lait maternisé et avec l'introduction de petits pois, on avait une augmentation significative des Bacteroidetes. Plus généralement, l'introduction de l'alimentation solide a augmenté les concentrations en Bacteroidetes et Firmicutes.

Nous allons maintenant comprendre comment nous pouvons analyser notre microbiote afin d'apprécier tous ses liens avec notre santé.

B. Méthodes d'analyses du microbiote

Dans le passé, les études sur le microbiote intestinal étaient basées sur la culture, par conséquent, les informations fournies étaient limitées par une méconnaissance des modes de culture et de croissance, rendant difficile la culture de la majorité des microbes présents dans l'intestin. Savoir quelle température utiliser, la teneur en oxygène, et le temps de croissance impactait notre capacité à générer des résultats précis basés sur la culture.

Aujourd'hui, nos connaissances plus développées des besoins de croissance des bactéries et la disponibilité des milieux de culture nous permet de cultiver un nombre plus important de microbes différents.

Dans un but de résultats et en raison des limites associées cette culture, les chercheurs ont ensuite commencé à développer et se servir des approches basées sur l'Acide désoxyribonucléique (ADN), molécule qui constitue la molécule du support de l'information génétique, afin d'obtenir des informations sur les bactéries non cultivables en laboratoire.

Concernant les modèles *in vivo*, c'est-à-dire pratiqués sur l'être vivant, les limites éthiques et de disponibilité d'échantillons limitées nous ont fait nous tourner sur la recherche animale. Nous allons développer ces différentes méthodes d'analyse et comprendre leurs avantages ou inconvénients.

1. Les modèles *in vivo*

De nombreux espèces d'animaux ont été utilisés pour étudier la diversité écologique, dynamique et diversifiée des micro-organismes qui habitent dans le tractus gastro-intestinal, afin de nous permettre de comprendre les complexités biologiques des processus qui régissent la symbiose hôte-microbiote. De plus, les modèles animaux permettent d'étudier les bactéries

commensales non cultivables, un facteur important qui n'est pas possible en utilisant les méthodes *in vitro* que nous développerons plus loin.

Ils nous fournissent un outil puissant pour étudier les micro-organismes et nous permettre d'établir un lien du rôle des principaux membres du microbiote intestinal dans le contexte de différentes perspectives de santé et de maladie (Sekirov et coll. 2010), et plus largement ils sont utilisés pour étudier divers aspects du microbiote intestinal humain, y compris la stabilisation, la colonisation et la résistance à la colonisation, ainsi que les effets de divers agents antimicrobiens (Burr et al. 1982, Gorbach et al. 1988)

Le rongeur est le cobaye le plus couramment utilisés, suivi par le chien, le cochon, le poulet, le singe et la gerbille. (Boureau et coll. 2000).

Les animaux conventionnels présentent de nombreux avantages par rapport aux systèmes de modèles intestinaux (*in vitro*) :

- Beaucoup moins de restrictions éthiques que les essais sur l'homme
- Un contrôle environnemental complet (alimentation, stress...)
- Contrôle génétique de la population sujette
- Enfin, l'accessibilité du contenu intestinal, tissus et organes à l'autopsie.

Les études sur le modèle animal consistent le plus souvent à comparer des espèces axéniques, à savoir dépourvues de germes, élevées en laboratoire dans un environnement stérile, donc dépourvu de microbiote, avec des espèces dites conventionnelles, c'est-à-dire élevées en animalerie.

Ces modèles animaux dit gnotobiotiques, c'est-à-dire obtenus dans des conditions qui permettent le contrôle parfait de leur flore microbienne offrent une approche simplifiée pour étudier les interactions hôte-microbe, en fournissant des informations utiles sur la façon dont les bactéries affectent le développement normal, l'établissement, et le maintien du système immunitaire.

Des souris nous ont par exemple, permis de démontrer que localement, dans le microbiote des rongeurs se trouve une bactérie, la bactérie segmentée filamenteuse (SFB), qui va jouer un rôle privilégié dans la maturation post-natale des réponses immunes innées et adaptatives chez son hôte. Pour cela, elle va s'ancrer sur les surfaces épithéliales de l'iléon afin d'assimiler les nutriments apportés par l'hôte pour sa croissance, ou elle jouera son rôle immunostimulateur.

Elle va engendrer la stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui vont activer des cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3), la production d'IgA et l'activation de des réponses de cellules immunitaires de type T.

Cette SFB nous montre bien chez la souris l'existence d'une communication étroite entre l'hôte et son microbiote dans le cadre d'une réponse immunitaire, néanmoins, cette bactérie reste uniquement cultivable et il reste à prouver formellement son existence chez l'être humain. (9)

Ceci nous montre bien que, même le modèle animal le plus largement utilisé (la souris) possède un microbiote qui diffère considérablement de celui des humains en termes de physiologie. Ce qui peut entraver l'interprétation des données, en particulier lors de la modélisation de maladies du tube digestif.

Par exemple, les cellules de Paneth dans l'intestin grêle de la souris produisent plus de 10 fois plus de défensines que les cellules humaines, ce qui a probablement un impact sur la colonisation et la survie microbienne (Mestas & Hugues 2004). Ainsi, il est nécessaire d'associer d'autres méthodes d'analyses.

2. Les modèles d'études in vitro

Les systèmes de modèles intestinaux in vitro fournissent un moyen rapide, facile et rentable d'étudier les microbiotes intestinaux, dans un ou plusieurs compartiments intestinaux, ou tout au long du tractus gastro-intestinal afin de répondre à des demandes scientifiques dans différents domaines.

Tous les modèles intestinaux in vitro ont leurs limites, principalement liées à leur faible pertinence physiologique. De tels systèmes ne fournissent pas toujours des modèles précis de ce qui se passe in vivo, car ils n'ont pas de muqueuse épithéliale, d'interactions immunologiques hôtes et de neuroendocrines fonctionnalité du système Ils permettent cependant de suivre les évolutions dans le microbiote, en nombre et en métabolisme, en composition sur un temps donné d'un certain système.

Ces modèles vont des cultures pures aux simples cultures discontinues en récipients, à des cultures continues plus complexes à pH régulé en une ou plusieurs étapes.

a. Modèles d'études statiques

La culture in vitro, désigne une étude expérimentale réalisée sur des microorganismes, organes ou cellules en dehors de leur contexte naturel et en conditions définies et contrôlés. Au début de la recherche sur le microbiote, ces modèles étaient principalement des modèles de culture simple et statique. Ces systèmes simples, appelés fermentation en « batch », ne seront utilisés que sur de courtes périodes, et ont été utiles pour étudier la fermentation microbienne sur différentes denrées alimentaires et ainsi donner la structure, les fonctionnalités et la capacité des bactéries composant notre flore à dégrader les substances et se nourrir de celles-ci dans le but de se développer.

Ces protocoles de fermentation ne durent qu'en moyenne 24 à 48h, limité par la courte période d'incubation est due à l'épuisement des nutriments et l'accumulation de métabolites bactériens inhibiteurs (Macfarlane et al. 1992).

Pour faire durer la fermentation plus longtemps, il faut alimenter le système par un milieu nutritif afin d'éviter l'épuisement des substrats, c'est l'exemple de modèles de fermentation continu, représentant une étude dynamique, essayant de se rapprocher le plus de la digestion.

b. Modèles de digestion dynamique

Ces modélisations du système gastro intestinal intègrent des systèmes de fermentation continus, ceci diffère de la discontinue car le processus de fermentation ne s'arrête jamais, avec une alimentation et des produits de récolte réguliers.

Ce système continu fournit un environnement qui ressemble plus étroitement aux conditions physico chimiques rencontrés dans le tractus gastro intestinal que l'on peut comparer à un apport constant de nutriments et une production régulière de déchets sur un temps de rétention défini. De plus, cette méthode présente d'autres avantages, le pH, la température et la pression atmosphériques peuvent être contrôlés.

Plusieurs groupes de scientifiques ont participé au développement de colons artificiels et systèmes digestifs entiers qui vont simuler l'intestin à deux niveaux : niveau structurel et fonctionnel.

- Le modèle continu à 3 étages

Comme le montre la figure ci-dessous, le système de modèle continu à 3 étages utilise trois cuves de fermentation connectées qui imiteront les 3 segments du côlon. La première représentant le colon ascendant, un milieu acide et riche en nutriments, résultant en un processus de fermentation bactérienne. Puis, il deviendra progressivement plus alcalin et s'appauvrira en nutriments dans la 2e cuve, assimilée au colon transversal et atteindra enfin dans la dernière cuve, un pH presque neutre, représentant le colon descendant.

Une expérience typique utilisant ce modèle consiste à inoculer chaque cuve avec du purin fécal humain (c'est un mélange de solides plus dense que l'eau) contenant toute la diversité bactérienne du côlon. Ensuite, on incubera ces cuves sous la forme d'une culture d'une nuit, dans le but d'augmenter la biomasse microbienne intestinale. Du milieu de croissance frais est pompé dans le récipient 1 (V1) via une pompe péristaltique, à une vitesse correspondant au temps de rétention souhaité, souvent 48 h. Ceci représente un temps de transit typique à travers le côlon humain. Le débordement de V1 est alors transféré vers V2 et de V2 vers V3 par écoulement gravitationnel. Le trop-plein de V3 est collecté en tant que déchet. Le système est exécuté jusqu'à ce que les communautés microbiennes atteignent un état stable (cela prend généralement 8 rotations ou 16 jours).

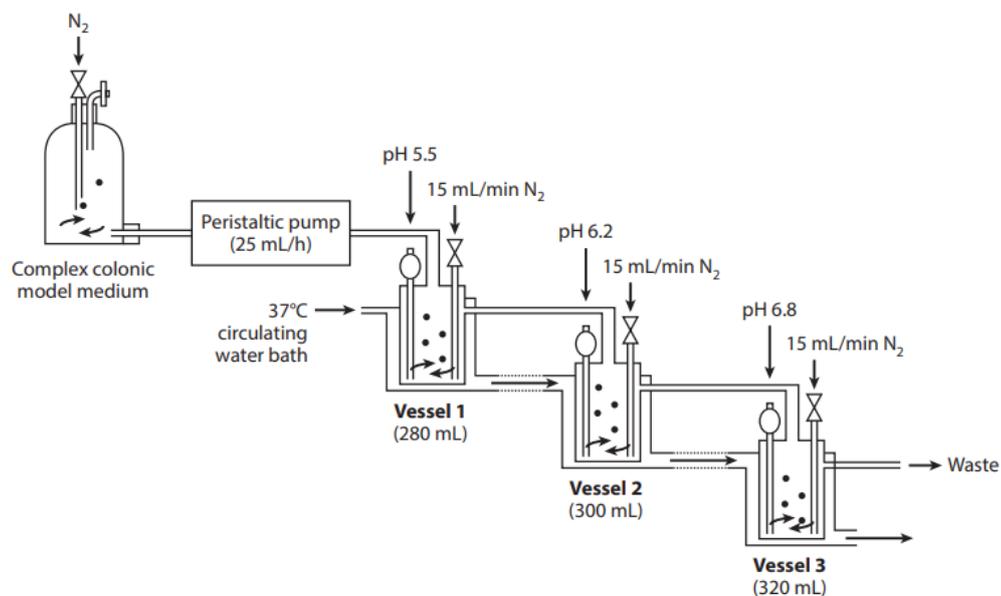


Figure 2 : le modèle continu à 3 étages

La plupart des modèles existants se basent sur le modèle conçu par Gibson et al en 1988. La figure 1 ci-dessus représente celui de Macfarlane et al en 1998 (10). Sa pertinence in vivo a été validée à la suite de prélèvements intestinaux de victimes de morts subites. On a alors remarqué que le contenu bactérien et chimique du modèle in vitro et de l'intestin humain étaient comparables.

Donc, bien que ce système n'incorpore pas de paramètres humains tels que des sécrétions intestinales, immunologique ou des facteurs d'absorption, il restait un outil de modélisation peu coûteux et fiable de l'activité microbienne du côlon.

- Le modèle SHIME: Simulator of the Human intestinal microbial ecosystem.

En tant qu'extension de la conception du modèle colique décrit précédemment, une nouvelle génération de systèmes de modèles intestinaux ont été développés pour imiter les conditions physico-chimiques trouvées le long du tractus gastro-intestinal.

De tels systèmes permettent de modéliser l'environnement dynamique de l'intestin en fournissant :

- Un afflux de suc gastrique et de suc pancréatique
- De sels biliaires
- De motilité péristaltique
- De capacité d'absorption
- De forces de cisaillement élevées (reproduisant celles permettant le broyage des aliments)
- Et des interactions hôte-microbiote

C'est dans ce sens, que Molly et al ont développé en 1993, un modèle dynamique de l'intestin humain. Comme le montre la figure 3, il est composé de cinq réacteurs simulant Respectivement l'estomac, l'intestin grêle, le côlon ascendant, côlon transverse et descendant.

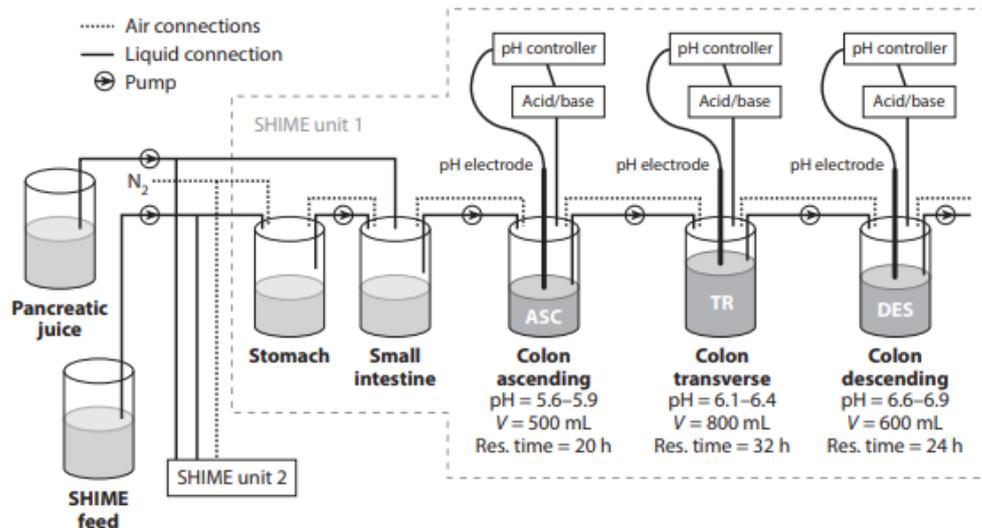


Figure 3 : Le modèle SHIME

Les deux premiers réacteurs miment l'environnement enzymatique et physico-chimique en contrôlant le pH, le temps de séjour et sont dosés en milieu de culture, y compris en enzymes et sels biliaires.

Ces deux réacteurs disposent d'un système de remplissage et de prélèvement avec un filtre de dialyse utilisé pour simuler les processus d'absorption se produisant dans l'estomac et l'intestin grêle, cependant aucune absorption n'est mimée dans les compartiments représentant le colon.

Les derniers réacteurs à trois étages, qui simulent le gros intestin, sont des récipients agités en continu inoculés avec des échantillons fécaux frais correspondant à l'in vivo en termes d'activité métabolique et de composition, basés sur le modèle décrit précédemment. La période de stabilisation de la microflore avant prélèvements est généralement de deux semaines.

Le modèle SHIME a été utilisé pour comprendre la biodisponibilité de divers composés tels que les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), l'arsenic ou l'isoxanthohumol, dans l'étude du métabolisme microbien lors de la digestion. (Van de Wiele et al. 2003, Laird et al. 2007, Possemiers et al. 2006). Il a également permis d'étudier les effets de divers probiotiques et prébiotiques sur l'écosystème microbien intestinal.

En résumé, ce modèle n'est peut-être pas le plus performant pour reproduire le système gastro-intestinal, ce dernier étant le TIM 1 qui nous aborderons dans la partie suivante, mais il est particulièrement efficace pour mesurer les interactions entre le microbiote intestinal et les composés alimentaires et produits pharmaceutiques.

- Le TNO intestinal Model (TIM)

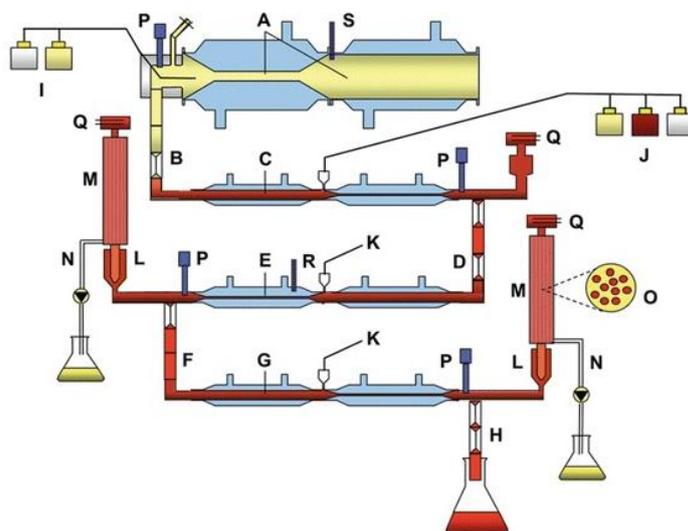
Le modèle gastro-intestinal TNO (TIM) est le plus complet existant actuellement pour mimer les conditions digestives. Il a été conçu pour simuler de manière réaliste les conditions du tractus gastro intestinal. Il est utilisé pour étudier le comportement du tractus sur des aliments et des produits pharmaceutiques. De la même façon que les précédents modèles dynamiques, des paramètres sont contrôlés, le transit gastrique et de l'intestin grêle, les débits et la composition des fluides digestifs, les différentes valeurs de pH et l'élimination de l'eau et des métabolites.

Les résultats du TIM montrent une prévisibilité élevée par rapport aux données *in vivo* (11).

Le fait que, le long du tractus digestif, la sécrétion de fluides digestifs, et l'absorption d'eau et de nutriments conditionneront les conditions changeantes qui subiront les différentes fractions du repas à travers les compartiments digestifs.

Les paramètres réglables sur le TIM sont : l'espèce, l'âge, la pathologie et les paramètres liés aux repas, obtenus à partir de données *in vivo* (Marteau et al. 1997 ; Minekus 1998 ; Havenaar et al. 2013).

Il peut prendre plusieurs conformations, et nous allons voir grâce à la figure ci-dessous la conformation la plus fréquemment utilisée, c'est le TIM-1.



Schematic presentation of TIM-1, equipped with filters to study the bio-accessibility of lipids. A. gastric compartment; B. pyloric sphincter; C. duodenal compartment; D. peristaltic valve; E. jejunal compartment; F. peristaltic valve; G. ileal compartment; H. ileal-cecal valve; I. gastric secretion; J. duodenal secretion; K. bicarbonate secretion; L. pre-filter; M. filtration system; N. filtrate with bio-accessible fraction; O. hollow fiber system (cross section); P. pH electrodes; Q. level sensors; R. temperature sensors; S. pressure sensor

Figure 4 : Représentation de TIM-1

Il comprend quatre compartiments, représentant l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Les compartiments sont reliés par des pompes à valve péristaltique (PVP) qui permettent le transfert de quantités contrôlées de chyme. Avant d'être introduit dans le compartiment gastrique (A), le repas est mastiqué à l'aide d'un robot culinaire et mélangé avec de la salive artificielle contenant l' α -amylase et des électrolytes. Les sécrétions gastriques (I) contiennent une alternative à la lipase gastrique, une lipase fongique, de la pepsine et un contrôle du pH avec de l'acide chlorhydrique. La sécrétion duodénale (J) est composée de bile, de pancréatine et d'électrolytes. Les produits de digestion sont éliminés par deux systèmes différents en fonction de leur hydrophilie ou lipophilie. (12)

Ce modèle permet donc d'offrir une alternative plus rapide et plus éthique aux études sur les animaux et les humains ; et ce malgré un débit inférieur et un coût supérieur aux modèles plus statiques.

Les systèmes de modèles intestinaux *in vitro* fournissent un moyen rapide, facile et rentable d'étudier le microbiote intestinal, dans un ou plusieurs compartiments intestinaux, ou tout au long du tractus gastro-intestinal afin de répondre à des demandes scientifiques dans différents domaines.

3. Le séquençage et la métagénomique

Le séquençage de l'acide désoxyribonucléique ADN est une technique qui a révolutionné la biologie moléculaire dans les années 1970, suivant l'établissement de la structure de l'ADN par Watson et Crick.

Ce décryptage a permis de déterminer l'ordre dans lequel se succèdent de l'extrémité 5 à 3', les quatre nucléotides abrégés par une lettre, A pour Adénine, C pour Cytosine, G pour Guanine, et T pour Thymine qui composent une molécule d'ADN.

Il existe deux stratégies en séquençage : la stratégie globale et la stratégie ciblée.

- La méthode ciblée consiste à viser un gène d'intérêt au lieu d'un génome entier. C'est plus de la métagénétique que métagénomique.

- La métagénomique globale (c'est le terme du procédé qui vise à étudier le microbiome) consiste à fragmenter tous les ADNs présent dans un échantillon en petit

fragments et les séquencer avec un séquenceur haut débit. Les séquences sont alors réassemblées grâce à un logiciel informatique dans le but de reconstruire les génomes bactériens d'origine, cette technique a pour nom le « shotgun screening ».

a. Le séquençage ciblé

Les ribosomes sont des organelles capables de traduire l'ARN en protéine et comportant deux sous unité. L'ARN 16s est un gène qui se trouvent sur la petite sous unité ribosomale chez la bactérie. Il est commun à toutes les bactéries.

Cet ARN 16s est composé de parties constantes et variables. Ces dernières n'ont pas de rôle fonctionnel très important mais vont nous permettre d'apprécier les taxons (entité conceptuelle qui regroupe tous les organismes vivants possédant en commun certains caractères taxinomiques ou diagnostiques bien définis.) bactériens au sein du microbiome. Chaque région variable particulière correspondra un taxon.

Cela permet donc de classer les différents organismes dans l'échantillon, c'est-à-dire nommer et classer les bactéries. Plus tard est apparue la métagénomique shotgun, le séquençage, qui définit plus précisément les bactéries.

En effet là où la stratégie ciblée ne peut caractériser que le niveau de genre et plus rarement de l'espèce, la stratégie globale va elle aller au niveau de l'espèce voir même de la souche.

b. La métagénomique globale

Avant de développer les différentes techniques de séquençage global, nous allons dans un premier temps décrire les différentes étapes pour séquencer l'ADN.

La première étape consiste à sélectionner les cellules qui seront destinées au séquençage. On peut, en principe, séquencer de l'ADN à partir de n'importe quelle cellule, pour les recherches cliniques et biologiques, on sélectionnera les lymphocytes du sang.

Ensuite, il faut extraire l'ADN de ces cellules qui est situé dans le nucléole de leurs noyaux. Il faut donc débarrasser la cellule de tout ce qui n'est pas de l'ADN, plusieurs machines permettent l'isolation, soit par broyage soit par centrifugation. Plus récemment ont été développés des systèmes de filtration sous pression à base de nano membranes, qui sont plus rapides. Une fois extrait, l'ADN doit être purifié par l'éthanol ou par chromatographies.

La troisième étape consiste à le découper en petit morceaux pour choisir la portion à étudier, ce sont des enzymes de restriction qui vont effectuer ce travail, véritables protéines spécialisées elles vont couper l'ADN au niveau de sites de restriction. Un inventaire de tous ces sites de restriction existe : le choix d'un site est fait, le choix des enzymes est établi puis ils seront mis ensemble dans de l'eau purifiée et pourront ainsi être amplifiés.

L'amplification consiste à la démultiplication jusqu'à un millions de fois de notre morceau d'ADN découpé précédemment pour permettre son séquençage, parmi les techniques existantes, la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) est la plus utilisée. Cette technique fonctionne par cycle, et débute par une étape de dénaturation de l'ADN pour séparer les 2 brins qui le constituent, hybridation des amorces aux extrémités de la séquence choisie et élongation des brins grâce à l'ADN polymérase, enzyme de réplication. Ce cycle sera répété un grand nombre de fois avec une augmentation exponentielle du nombre de copies (2,4,8,64...) Enfin, vient le séquençage proprement dit, les extrémités de tous les brins se trouvant dans l'échantillon vont être marquées puis triées par taille ou longueur. Et à l'aide de logiciels bio-informatiques, les reads (séquences obtenues) seront réassemblés.

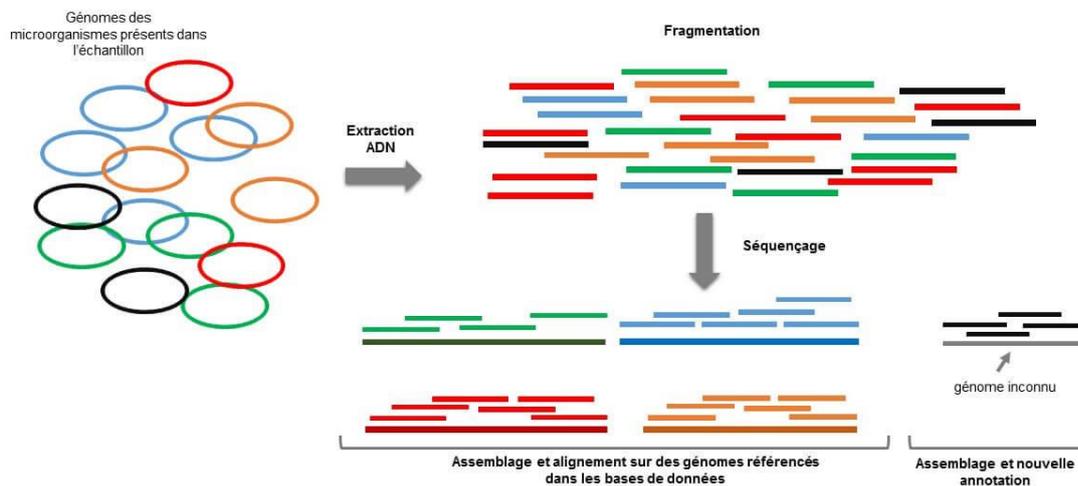


Figure 5 : étapes de la métagénomique shotgun

Ces avancées dans les techniques de séquençage ont permis l'étude d'échantillon provenant d'une communauté complexe.

Nous allons donc désormais décrire les différentes techniques utilisées pour séquencer notre flore intestinale, parmi les nombreuses méthodes, je vais en développer cinq.

- La Méthode de Sanger

Il me paraissait intéressant de commencer par cette méthode car, mise au point en 1977 par le scientifique Sanger, qui obtiendra d'ailleurs un prix Nobel en 1980 grâce à cette méthode, a été la plus répandue, et ce pendant près de 20 ans.

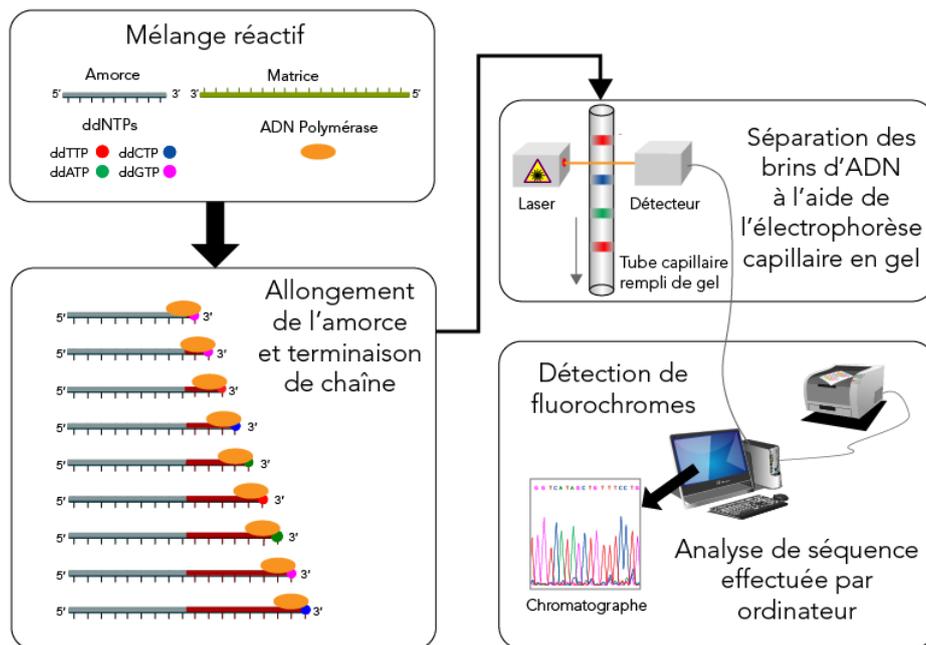


Figure 6 : Le séquençage de Sanger (Parlons Science)

Pour commencer, un fragment d'ADN va être extrait de l'échantillon puis chauffé afin qu'il se déroule. Les 2 brins de l'hélice se séparent en deux brins individuels. Ensuite, une amorce d'ADN est ajoutée, c'est une courte séquence d'ADN qui va s'attacher à un seul brin. Cette amorce indique le début du brin à séquencer

Par la suite, la température est légèrement augmentée. Puis, est ajouté des nucléotides libres et une enzyme appelée ADN polymérase. Les nucléotides libres contiennent l'une des quatre bases suivantes : cytosine, thymine, adénine ou guanine. En commençant par la séquence d'amorce, l'ADN polymérase construit un brin d'ADN complémentaire (ou inverse). Elle le fait en ajoutant un nucléotide à la fois.

L'enzyme peut arrêter la séquence en construction lorsqu'elle atteint un nucléotide de terminaison, un nucléotide dépourvu du groupement hydroxyle en position 3' (ddNTP), nécessaire à la poursuite de la polymérisation de la chaîne.

Ainsi de nombreuses séquences d'ADN vont être produites, de différentes longueurs. Pour séparer ces fragments d'ADN formés, on va utiliser l'électrophorèse en gel, avec application d'un courant électrique sur ce gel contenant les fragments, ils vont s'aligner en fonction de leur taille. Enfin à la fin de ce déplacement, on examine ce gel par radiographie ou à l'aide d'une lumière UV pour rendre visible chaque segment. En examinant la séquence des bandes foncées, on peut déterminer la séquence des nucléotides. (13)

Pour accélérer le processus, aujourd'hui, on utilise des fluorochromes (petits composés chimiques qui émettent une lumière colorée) de couleurs différentes sur chaque nucléotide, permettant d'effectuer le séquençage en un seul mélange dans un tube. Eclairé par un laser, un détecteur va inscrire un pic sur un graphique lorsque la lumière traversera une bande de couleur, ces pics représenteront les bases nucléotidiques. (14)

Cette automatisation du processus a permis une réelle augmentation du débit, cependant il restait des points clés de la méthode non automatisable, c'est pourquoi on a recherché de nouvelles pistes, de séquençage encore plus rapide, capable de produire beaucoup de données très rapidement, avec tout de même quelques biais.

- Le séquençage par terminateur réversible

La société Illumina a développé une technologie de séquençage sur biopuce (ensemble de molécules d'ADN fixées sur une petite surface solide, telle qu'une lame de verre). Le principe est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents et par lecture optique de cette fluorescence. Des technologies informatiques de pointe sont utilisées pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images obtenues. Les coûts et le temps de séquençage sont réduits de façon drastique. Cette méthode permet de séquencer en parallèle plus de 3 milliards de petits fragments d'ADN de 50 à 300 nucléotides de long.

Tout d'abord, il faut amplifier l'ADN, on va donc fragmenter l'ADN en petit bouts reliés par des adaptateurs à une lame de verre afin d'être recopiés une multitude de fois et former une colonie.

La réaction de séquençage est réalisée directement sur cette lame de verre. Elle nécessite de nombreuses copies d'ADN pour détecter un signal lumineux et est basée sur l'arrêt de la synthèse d'ADN par l'utilisation d'un nucléotide terminateur fluorescent. A l'aide d'un laser, on va ensuite détecter la fluorescence en temps réel, cycle après cycle.

L'Analyseur Génétique 1G, commercialisé par Illumina est utilisé pour les grands projets de reséquençages, étant donné qu'il a la possibilité de générer de grandes quantités de données encore plus vite et plus économiquement, grâce à la miniaturisation et le groupage des réactions.

Cependant, des études (15) ont montrées que, au plus le nombre de cycles est grand, au plus on voit apparaître des erreurs à l'extrémité 3', vers la fin de la lecture, créant ainsi un décalage et rendant erronée l'interprétation de la fluorescence.

- Le pyroséquençage

En 1988, est apparu une nouvelle technique de séquençage haut débit, le pyroséquençage, par Hyman et al. (16). Elle sera par la suite améliorée par un groupe suédois (Ronaghi, Karamohamed et al. 1996 ; Ronaghi, Pettersson et al. 1998 ; Ronaghi, Uhlen et al. 1998) par introduction de la PCR.

Cette technique est un séquençage par synthèse et se caractérise par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase.

Elle comporte 5 étapes :

- Mise en réaction dans des enzymes clefs et du substrat dans le milieu réactionnel
- Ajout des nucléotides, non pas tous ensemble, mais les uns après les autres, et incorporation dans le brin en cours de synthèse par l'ADN polymérase avec libération d'un pyrophosphate (PPi)
- L'Adénosine Tri Phosphate (ATP) sulfurylase vient alors transformer ce PPi en ATP qui est alors utilisé, couplé à une Luciférine, par une Luciférase, pour la production d'Oxyluciférine et d'un signal lumineux
- Le signal lumineux est capté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) puis reproduit sous forme d'un pic sur le Pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides

incorporés en même temps. La hauteur de ses pics va nous permettre de déduire la séquence.

L'avantage de cette technique repose sur l'absence de clonage et une lecture directe de la séquence, ce qui va permettre d'abaisser drastiquement le coût et de gagner du temps. Mais, il y a également des limites, la principale est la faible lecture de séquences, limitée à 100 paires de bases, rendant ainsi difficile cette méthode pour la lecture de génome entiers.

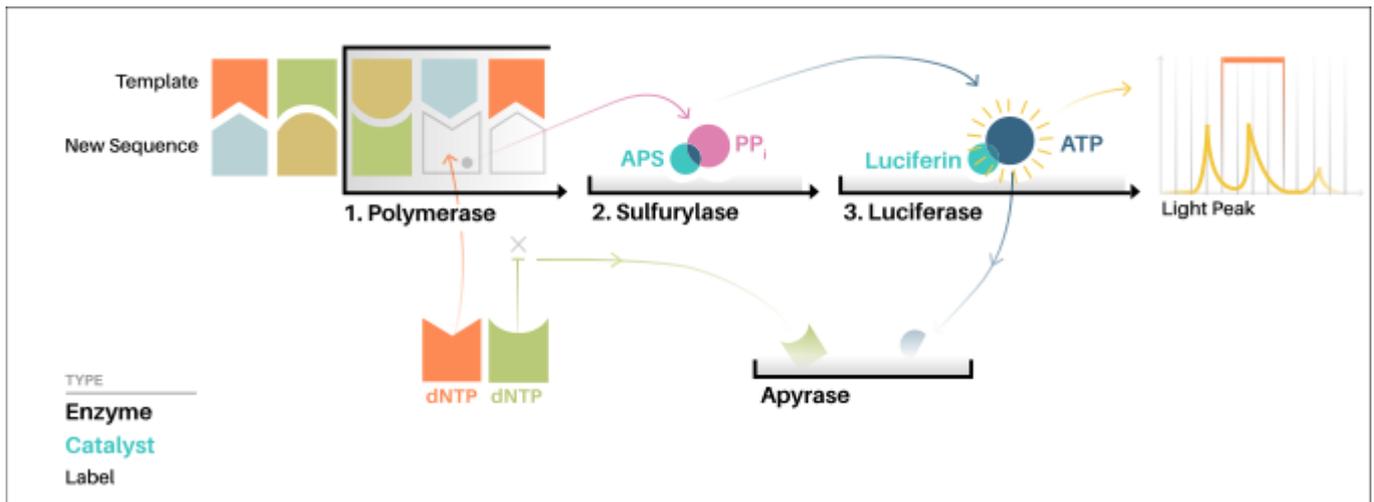


Figure 7 : Schéma représentatif du fonctionnement du pyroséquençage

- Le séquençage par semi-conducteur = Ion torrent

Pour pallier les résultats ambigus des techniques de séquençages, une nouvelle stratégie de séquençage "nouvelle génération" (NGS) a vu le jour.

Mise en place par une division de life technology, la méthode de l'ion Torrent va déterminer la séquence d'ADN en mesurant les variations de pH causées par l'incorporation d'un nucléotide sur le brin complémentaire (détection des ions H⁺ qui sont dégagés lors de la polymérisation de l'ADN).

Le principe repose dans un premier temps sur la préparation de la matrice de séquençage, étape automatisée permettant l'amplification clonale, et contribuera à atteindre un seuil de détection du signal nécessaire et suffisant au moment du séquençage.

La matrice de séquençage couplée aux amorces de séquençage et à la polymérase est chargée sur la puce Ion Torrent selon un protocole bien spécifique. Les puces se déclinent selon 3 capacités de séquençage (Chip 314 >10Mb, Chip 316 >100Mb, Chip 318 >1Gb)

A chaque polymérisation de nucléotides non modifiés, la libération d'ions H^+ entraîne une variation de pH, elle-même détectée au niveau de la couche mince (technologie des semi-conducteurs) située au fond de chaque puits. L'ensemble des données brutes générées est transcrits sous forme de ionogrammes.

A la fin de ce séquençage, un logiciel va permettre de transformer les données de l'ionogramme en lettres de séquences A, T, C, G.

L'avantage de cette technique repose essentiellement sur son faible cout et sa rapidité (2h de séquençage par run)

- Le séquençage par nanopores

Les techniques commerciales de séquençage de l'ADN citées précédemment sont fondées sur un signal obtenu lors de l'amplification ou la synthèse de molécules individuelles. Donc sur l'amplification de l'ADN par PCR pour amplifier le brin d'ADN à séquencer, sur une microbille ou une surface fonctionnalisée.

La difficulté d'obtenir des fragments séquencés de grandes longueurs, et l'intérêt d'une lecture en temps réel, a conduit ces dernières années à des recherches sur l'utilisation de nanopores biologiques, ou artificiels, comme outils de séquençage de l'ADN.

L'idée a donc été d'utiliser un nanopore pour séquencer l'ADN, c'est Kasianowicz, Branton et Deamer qui ont réalisées les premières avancées dans le domaine (17).

La détection du passage des nucléotides est réalisée par la mesure du courant ionique traversant le pore : un pore vide correspond à un courant élevé, la présence d'un nucléotide réduit le flux d'ions au travers du pore, modifie ainsi le courant électrique.

L'ADN à séquencer est capté par une enzyme (hélicase ou ADN polymérase) qui extrude l'ADN simple brin à une vitesse réduite. Le nanopore lui-même constitue une ouverture dans la membrane lipidique dans laquelle le champ électrique force le passage de l'ADN simple brin. Ce dernier est ralenti au passage par la constriction du nanopore et permet l'identification des bases individuelles par mesure de l'intensité du courant électrique traversant le pore à un instant donné.

Les avantages de cette technique sont multiples, la lecture de très longues séquences, la détection de modifications sur les bases, on n'a pas de PCR donc pas de biais d'amplification et enfin elle repose sur une simplicité d'utilisation.

Pour terminer sur les méthodes d'analyses, que ce soit global ou ciblée, chaque stratégie a son avantage. La métagénomique globale est plus précise dans le sens où elle séquence l'ensemble du génome d'une bactérie alors que la seconde ne s'intéresse qu'à un seul gène. Elle permet de décrire le fonctionnement global du microbiote en étudiant l'ensemble des gènes. Donc tous les ADN présent dans le milieu, bactériens, viraux, ou encore humains, sans discernements. La stratégie ciblée est quant à elle plus sélective. En effet, le gène de l'ARN 16S est présent uniquement chez les bactéries qui seules seront séquencées. Enfin, les algorithmes de traitements des données issues d'un séquençage ciblé sont beaucoup plus simples que les assemblages de génomes nécessaires dans le séquençage global.

Le tableau ci-dessous résume ces différentes techniques, leurs avantages et inconvénients.

| | Méthodes de Culture | Méthodes indépendantes de la culture | Séquençage haut débit |
|---|---|--|--|
| Description | Utilisation de milieux spécifiques pour mettre en culture des microorganismes | Identification des bactéries à travers l'isolation et l'amplification d'ADN bactérien, d'ARN 16s | Approche basée sur le séquençage pour identifier les bactéries en utilisant l'ADN bactérien comme matrice |
| Historique | Dans l'histoire, c'est la technique la plus fréquemment utilisée pour identifier des bactéries dans divers environnements | De plus en plus utilisée ces 20 dernières années | Devenu possible au 21 ^e siècle et de plus en plus populaire |
| Avantages | Rapide, faible coût, Pas d'équipements requis et utilisé comme première étude avant d'autres investigations. | Assez simple et peu chère, et fournit des résultats plus détaillés | Moins de biais, informations très détaillées Des bactéries dans un environnement complexe peuvent être détaillées (tel que microbiote intestinal) Assez rapide |
| Inconvénients | 90% des bactéries sont non cultivables Fournit des informations limitées | Biais de la PCR Nécessite des équipements sophistiqués et de la formation pour s'en servir | Très cher Exigences du traitement de données |
| Exemples d'études utilisant cette technique | (18) | (19) | (20) |

Tableau 1 : Techniques analysant le microbiote intestinal

c. Le NIH Human Microbiome Project (HMP)

Le NIH (National Institut of Health) Human Microbiome Project (HMP) a été mené sur dix ans et deux phases, pour fournir des informations, ressources sur le lien entre santé humaine et interaction entre les Hommes et leur microbiote. Ce projet a duré cinq ans, et fut lancé en 2008 avec un budget de 115 millions de dollars.

Les objectifs étaient multiples :

- Etablir la caractérisation et l'ensemble des séquences génomiques du microbiote humain
- Explorer la relation entre maladies et modifications de ce microbiote
- Développer de nouveaux outils pour l'analyse
- Etablir un référentiel de ressources
- Etudier les implications éthiques, juridiques et sociales de la recherche sur le microbiote

Après plus de 190 publications entre 2009 et 2012 sur le site web du projet, les données sur le génome du microbiote ont pu être extraites grâce à la technique utilisant l'ARN 16s. C'est de ce projet que nous avons pu calculer que près de 10 000 espèces occupent le microbiote et les chercheurs ont pu identifier 81 à 99% des genres concernés. (21)

C'est le 13 juin 2012, que les chercheurs ont pu passer une étape très importante du projet, les chercheurs réussirent alors à créer une base de données servant de référence et établirent alors les limites de variation du microbiote humain.

Enfin, grâce à la cartographie du génome des microorganismes du microbiote des personnes en bonne santé, on a estimé que certains gènes microbiens seraient indispensables à la survie humaine. Mais aussi que ce microbiote peut varier au cours du temps, par la prise de médicaments, ou un état pathologique chez le patient, mais ce microbiote peut toutefois revenir à l'équilibre en dépit d'un changement de sa composition.

D'autres projets virent alors le jour : le projet de 100 000 génomes asiatiques qui comporte une partie sur le microbiote. Il est très ambitieux, et vise à collecter des échantillons de communautés microbiennes autour du globe et de les analyser : c'est le Earth Microbiome Project qui possède lui aussi son site dédié : earthmicrobiome.org.

C. Composition du microbiote

Les complexités de la partie distale du microbiote de l'iléon et du colon fournissent une grande source d'organismes, de ligands et d'antigènes pouvant potentiellement nuire à l'organisme, et pouvant activer le système immunitaire inné et adaptatif, ainsi que des produits métaboliques qui affectent les fonctions épithéliales et immunitaires.

Les techniques de détection moléculaire et métagénomique ont révolutionné la compréhension de la composition et les activités métaboliques de ces organismes pour la plupart incultivables. Ces techniques ont permis d'augmenter les estimations des cultures d'époque de 200 à 300 espèces jusqu'à 1800 genres et entre 15 000 et 36 000 espèces individuelles. (22)

Pour une compréhension parfaite de ce travail, il faut comprendre comment nous dénommons les bactéries. L'espèce, composée de différentes souches est l'unité fondamentale de la classification. Cette espèce appartient elle-même à un genre.

On désigne les bactéries par deux noms latins : le nom de genre, écrit avec une majuscule, qui est suivi du nom d'espèce, écrit en minuscule.

L'ensemble du nom est écrit en italiques (Ex. : *Staphylococcus aureus*)

La charge totale microbienne de l'intestin est de 10^{13} à 10^{14} microorganismes, qui contiennent au moins 100 fois plus de gènes que contient le génome humain.

La figure 7 montre bien la répartition des bactéries le long du tractus digestif. Elle se diversifie et se concentre de plus en plus au fur et à mesure que l'on avance, on part de la population gastrique et duodénale, représentant environ 10^2 à 10^3 CFU (colony forming units) /gramme avec un pH très acide. Dans le jéjunum, le transit est plus rapide, le pH augmente et il y a présence d'acides biliaires, il y aura 10^2 à 10^3 CFU/g dans l'iléon proximal pour atteindre une composition de 10^7 à 10^8 CFU/g dans l'iléon distal avec un transit plus lent et enfin la concentration et la diversité est assez importante dans le côlon avec 10^{11} à 10^{12} CFU/g et une grande prédominance de bactéries anaérobies.

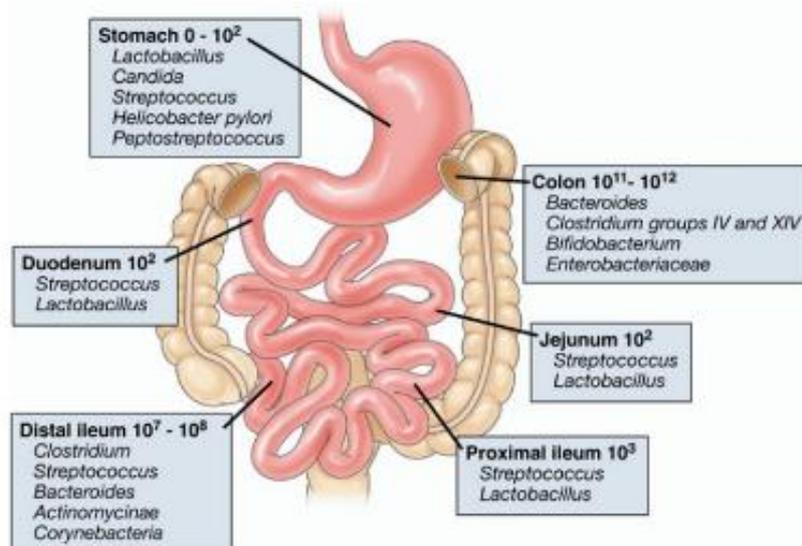


Figure 8 : composition et concentrations des espèces microbiennes le long du tube digestif

A la naissance, nous l'avons déjà souligné, notre corps est considéré comme exempt de microorganismes, c'est par les contacts avec l'environnement que la colonisation commence. Les bactéries « primo-colonisatrices », vont coloniser notre tube digestif dès la naissance. Celles-ci font partie de la famille des Lactobacilles (Enterococcus) et des Entérobactéries (E. coli) ainsi que certaines Bifidobactéries. Ces bactéries vont se servir de l'oxygène pour leur croissance et ainsi faire baisser son taux. Durant les trois premières années de vie, le microbiote intestinal se façonne à la suite de la primo-colonisation, puis au gré de l'alimentation et des bactéries rencontrées dans les aliments, l'entourage et l'environnement.

Plus de 99% du microbiote intestinal adulte est composé d'espèces appartenant à 4 divisions (phylum) :

- Firmicutes ce phylum représente l'un des plus grands phylums bactériens, et sont utilisés pour illustrer une enveloppe cellulaire gram positive (classification par colorisation des bactéries). Elles sont réparties en différentes classes :
 - Les Clostridia pour qui l'oxygène est toxique et qui sont composés des genres Clostridium et Sarcina
 - Les Mollicutes qui sont minuscules et sans paroi, composés des genres Mycoplasma et Ureaplasma
 - Les Bacilli, composés de nombreux genres tels que Bacillus, Listeria, Staphylococcus, dans l'ordre des Bacilliales et on retrouve dans cette classe également l'ordre des

Lactobacillales, qui sont des bactéries lactiques, parmi lesquelles nous retrouvons Lactobacillus, Enterococcus, Lactococcus et Streptococcus

- Bacteroidetes, ces bactéries sont largement répandues dans le sol, les sédiments, l'eau de mer et dans les selles des animaux à sang chaud, ainsi que des humains.

Ces deux phylums font partie des phyla dominants de la flore intestinale, tandis que ceux les deux autres seront minoritaires :

- Protéobactéries ce sont parmi les bactéries, celles les mieux caractérisées parmi lesquelles nous retrouvons entre autres Escherichia coli

- Actinobactéries en plus grande quantité que les protéobactéries, nous retrouverons dans cette classe le genre Bifidobacterium

Le tableau suivant dresse un état des différentes bactéries et leur famille retrouvées dans le microbiote intestinal :

| Embranchement ou Phylum | Classe | Famille | Genre | Gram | Caractéristiques | |
|-------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|------|--|--|
| Firmicutes | Bacilli | Streptococcaceae | Streptococcus | BG+ | Aérobie/anaérobie facultatif | 10 % de la flore intestinale aérobie |
| | Bacilli | Streptococcaceae | Enterococcus | BG+ | Aérobie/anaérobie facultatif | |
| | Bacilli | Staphylococcaceae | Staphylococcus | BG+ | Aérobie/anaérobie facultatif | Peu dans intestin, plutôt peau, cuir chevelu, nez, gorge |
| | Bacilli | Lactobacillaceae | Lactobacillus | BG+ | Anaérobie, supporte mal l'O ₂ | |
| Firmicutes | Clostridiales | Clostridiaceae | Clostridium | BG+ | Anaérobie strict | |
| | Clostridiales | Clostridiaceae | Segmented Filamentous Bacteria | BG+ | Anaérobie strict | Partie terminale de l'iléon au moment du sevrage |
| | Clostridiales | Clostridiaceae | Faecalibacterium | BG+ | Anaérobie strict | Seule espèce : <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> |
| Actinobacteria | Actinobacteria | Bifidobacteriaceae | Bifidobacterium | BG+ | Anaérobie strict | |
| Bacteroidetes | Bacteroidia | Bacteroidaceae | Bacteroides | BG- | Anaérobie strict | |
| Proteobacteria | Gamma proteobacteria | Enterobacteriaceae | Escherichia | BG- | Aérobie | <i>E. coli</i> 80 % de la flore intestinale aérobie |

Tableau 2 : Récapitulatif des familles de bactéries retrouvées dans le microbiote

D. Rôles

Du fait du grand nombre de microorganismes contenu dans notre intestin, il n'est pas étonnant d'avoir un grand nombre de fonctions associées à ce microbiote. Il peut même être considéré comme un véritable organe à part entière.

1. Effet de barrière contre les entéropathogènes

Notre microbiote intestinal joue un rôle de barrière contre des pathogènes ingérés. Nous avons découvert cela en 1957, des chercheurs ont comparé la mortalité induite par une bactérie pathogène, *Salmonella typhimurium* chez des souris traitées ou non par la streptomycine, un antibiotique de la classe des aminosides. La dose létale des souris non traitées par l'antibiotique était de 10⁶ salmonelles tandis que les souris ayant été traitées par la streptomycine ne nécessitait qu'une centaine de salmonelles pour décéder. Cette expérience montra alors que l'élimination du microbiote par l'antibiotique était favorable à la colonisation par les salmonelles. (23)

Chez l'Homme, on note une plus grande fréquence des infections à *Clostridium difficile* lors de la prise d'antibiotiques, confirmant cet effet barrière dû à des mécanismes très complexe, parmi lesquels :

- La compétition entre les bactéries pour les nutriments (consommation des mêmes substrats sur les différents sites d'adhésion),
- La production par les bactéries résidentes de substances de type antibiotiques telles que les bactériocines ou des acides, qui peuvent s'opposer en cas d'inflammation à la prolifération de bactéries pathogènes.
- Un autre mécanisme découvert plus récemment est la production de butyrate à partir d'hydrate de carbones alimentaire des fibres non digestives, va permettre aux bactéries symbiotiques anaérobies telles que les firmicutes et *Bacteroidetes* d'orienter le métabolisme des colonocytes (cellule épithéliale du côlon) vers la dégradation des acides gras, qui va consommer beaucoup d'oxygène. Ainsi, les bactéries anaérobies facultatives responsables d'effets pro inflammatoires ou pathogènes ne pourront pas se multiplier et ces conditions d'anaérobiose seront même propice à la croissance des bactéries symbiotiques.
- Il induit également la production des IgA sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes.

Tous ces mécanismes permettent le maintien d'un écosystème favorable au développement des bactéries symbiotiques résidentes et résistant à l'invasion de bactéries pathogènes.

En revanche, les bactéries se développant très rapidement, une petite modification du microbiote peut venir modifier ces compétitions bactériennes et favoriser la survenue

d'espèces pathogènes plus aptes à survivre et se multiplier dans ces conditions. C'est pourquoi, mieux comprendre notre flore intestinale peut nous permettre de répondre aux différents problèmes que pose certains agents pathogènes et peut être même certaines bactéries multirésistantes qui émergent avec l'utilisation massive d'antibiotiques.

2. Interaction avec le système immunitaire

Le fait que la flore intestinale soit tolérée par l'hôte et spécifique de l'hôte, nous fait dire qu'il ne faut absolument pas dissocier la présence de la flore et le fonctionnement de l'intestin, ceci est une notion encore peu reconnue aujourd'hui. En 2001 Moreau et Gaboriau-Routhiau établirent que la relation flore intestinale résidente et système immunitaire associé à l'intestin est un exemple de fonctionnement intégré.

Chez l'homme et surtout chez l'enfant, des études épidémiologiques et cliniques, utilisant principalement des probiotiques fournissent les données intéressantes sur le rôle de la flore intestinale sur les fonctions immunitaires.

La présence de la flore joue un rôle prépondérant dans l'activation du système immunitaire intestinal, comme le montre deux études, l'une de 1999 menée par Cebra et l'autre par Moreau et Gaboriau-Routhiau en 2001. Ces études comparatives se sont déroulées entre souris axéniques et conventionnelles. Chez la souris axénique, le SII est peu développé, les plaques de Peyer sont minuscules et la lamina propria n'est pas diversifiée. La colonisation chez le souriceau par la flore fécale adulte permet la maturation et le développement du SII sous 3 semaines. Chez le nouveau-né, on a une situation comparable du SII, mais une colonisation plus longue, la colonisation se terminant à 6 semaines chez le souriceau, durant jusqu'à 2 ans chez l'enfant.

Les souris AX adultes ont été colonisées par des flores digestives de souriceau âgées de 1 à 25 jours, afin de montrer que les bactéries intestinales sont l'élément majeur responsable du complet développement du SII, mis en lumière par la mesure du nombre de plasmocytes a IgA peuplant la muqueuse, mesure réalisée par Moreau et al, en 1982 :

L'analyse du rôle des types de bactéries a montré que les bactéries gram négatif telles que les bactéroïdes et Escherichia Coli jouent un rôle important dans cette réponse aux plasmocytes a IgA non spécifique, pour avoir une stimulation maximale du système immunitaire intestinal, il faut que la flore soit identique à celle de l'adulte, à savoir totalement diversifiée. Cependant,

une diversification alimentaire trop tardive ou trop précoce ou l'utilisation de traitements antibiotique au plus jeune âge peut entraîner une répercussion sur l'équilibre microbien de la flore et donc sur le développement du système immunitaire intestinal.

Enfin, une dernière étude menée in vivo, pour apprécier la modulation des réponses spécifiques a été menée. En effet, les diarrhées à rotavirus constituent une des maladies nosocomiales les plus redoutables chez l'enfant. Nous savons que les enfants allaités par leur mère auront une flore différente de ceux nourris au biberon, avec un très grand nombre de bifidobactéries et des épisodes diarrhéiques moins nombreux et moins sévères.

Afin de comprendre l'effet protecteur des bifidobactéries, des souris axéniques adultes ont été colonisées avec des souches isolées de la flore d'un enfant nourri avec au sein ou celle d'un enfant du même âge nourri au lait infantile.

Ainsi les souris "bébé sein" étaient composées de *Escherichia coli*, *Streptococcus* et de *Bifidobacterium bifidum*, tandis que les souris "bébé formule infantile" de *Escherichia coli* et *Bacteroides*. On a donc introduit le rotavirus dans ces souris, qui ne se différenciaient que par leur flore intestinale.

La réponse anti-rotavirus a été mesurée sur une période d'1 mois après l'inoculation virale, dans les fèces et lors du sacrifice, sur le nombre de plasmocytes à IgA présents dans la lamina propria de l'intestin grêle. L'apparition des anticorps était la même dans les deux groupes, seule différence notable, la quantité produite étant quatre fois plus importante. Des études complémentaires chez des souris uniquement composées de la souche bactérienne *Bifidobacterium bifidum* ou *E. Coli* ont montré qu'elles avaient des effets opposés sur la réponse anti-rotavirus : les bifides stimulaient fortement tandis que la souche *E. coli* l'inhibait.

Ces études nous montrent bien l'importance de l'équilibre de son microbiote intestinal dès la naissance, et qu'une modification de cette flore très fragile peut avoir un impact sur le fonctionnement de son Système immunitaire intestinal.

3. Fonctions métaboliques du microbiote

La nature et la quantité de substrats disponible pour la fermentation par le microbiote intestinal font partie des facteurs pouvant modifier notre écosystème microbien. Les principales sources d'énergie de ce dernier sont représentées par les glucides et les fibres alimentaires (protéines) non digérées par la partie supérieure du tractus digestif. Les processus

de dégradation et fermentation de ces composés vont donner lieu à la production d'acide gras à chaîne courte, de gaz ou d'ammoniac. Ainsi, ces produits vont permettre le maintien et la croissance des bactéries.

En parallèle de ces activités fermentaires, plusieurs études comparatives ont montré les rôles métaboliques du microbiote sur la physiologie de l'hôte. Par ailleurs, l'utilisation des animaux sans germes dans le cadre d'études combinant microbiologie, physiologie et génomique a permis de révéler son implication dans plusieurs métabolismes.

a. Le métabolisme des glucides

La quantité de glucides fermentescibles traversant le colon varie de 10 à 60g par jour suivant le régime alimentaire. Rencontrés dans les céréales, les fruits et les légumes, ils sont majoritairement représentés par l'amidon, résistant aux α -amylases de l'hôte, par les polyosides composant la paroi des végétaux (cellulose, hémicelluloses, pectines) ainsi que des glucides de réserve, des composés algaux, des oligosides ou des sucre-alcools non assimilés par l'organisme.

Tout d'abord, pour digérer les polyosides dans le colon plusieurs groupes microbiens aux activités métaboliques complémentaires assureront un processus anaérobie complexe. Pour ce faire, ces microorganismes vont interagir entre eux pour former une chaîne trophique qui va transformer les polyosides en métabolites, à savoir principalement des acides gras à chaîne courte (AGCC) et des gaz.

Les AGCC peuvent être utiles en tant que source d'énergie aux cellules présentes dans le colon. (Notamment un AGCC majoritaire, le butyrate). Il a été ensuite découvert qu'ils pouvaient jouer d'autres rôles, et surtout sur la prise alimentaire de l'hôte. Par exemple, certains AGCC bactériens peuvent stimuler la sécrétion d'hormones anorexigènes synthétisés par l'intestin (GLP-1, PYY) et le tissu adipeux (leptine). D'autre part, il est maintenant reconnu que les AGCC ont un impact sur le système immunitaire. Des recherches ont mis en lumière les effets anti-inflammatoires des AGCC, qui semblent jouer un rôle dans le déclenchement de la différenciation (autrement dit, la spécialisation) des cellules immunitaires qui contribuent à « maintenir l'ordre » : les cellules T régulatrices.

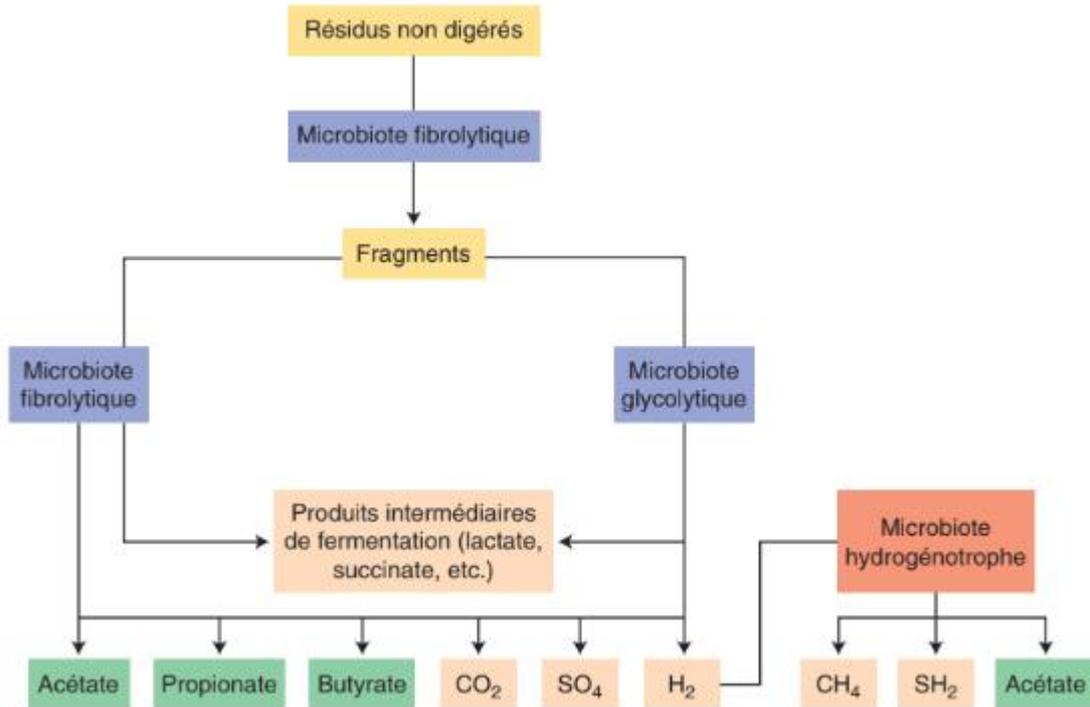


Figure 9 : Fermentation des sucres par le microbiote intestinal

b. Le métabolisme des gaz

Chaque jour, est produit du dihydrogène par la fermentation environ 300 ml/g de substrat dans le côlon. Il sera ensuite éliminé par les poumons ou l'anus mais la plus grosse quantité de H₂ est réutilisée par les organismes hydrogénéotrophe.

L'utilisation de ce H₂ par les bactéries peut prendre plusieurs voies, dont deux notamment dépendante de la production ou non de méthane, ce qui nous permettra de différencier deux types de patients : les méthano-excréteurs, qui vont transformer ce H₂ en, méthane (CH₄) et les non-méthano-excréteurs, qui vont alors produire du sulfate (SO₄). Pour ceux qui ne prennent pas la voie du méthane, une alternative a été recensée : l'acétogénèse, qui va donc produire de l'acétate à partir du H₂, les bactéries mises en évidence par cette voie sont Ruminococcus, Clostridium et Streptococcus. (24)

c. Le métabolisme des protéines

Ce métabolisme est moins important que la fermentation des glucides, à raison de 6 à 18g / jour mais va générer beaucoup plus de métabolites potentiellement toxiques que la métabolisation des glucides. Les principaux genres responsables d'une activité protéolytique

sont les espèces appartenant aux Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Streptococcus et Lactobacillus aussi aidées par des enzymes appelées protéases.

Une fois cette protéolyse terminée, on se retrouve donc avec des peptides, qui peuvent stimuler la croissance d'espèces bactériennes avec la production lors de leur métabolisme d'acides aminés, que certaines bactéries n'assimilant pas les peptides, pourront se servir pour se développer, comme source d'énergie telles que celles du genre Veillonella, Fusobacterium, Clostridium et Eubacterium. Ces réactions de désamination et décarboxylation vont amener à la production d'acides gras à chaîne courte et d'ammoniac, que les espèces pourront emprunter pour reformer des protéines bactériennes.

d. Le métabolisme des lipides

Par le métabolisme des lipides, principalement les acides gras, par les lipases bactériennes. Il touche surtout les acides gras de moins de 20 carbones, ceux composés de plus ne seraient pas métabolisés. Les produits de cette métabolisation peuvent agir comme messagers dans les voies de signalisation contrôlant l'expression des gènes (25)

Les bactéries agissent aussi sur le métabolisme du cholestérol et des stérols : il a été montré lors d'études dans les années 70 qu'environ soixante-dix pourcents des sujets étudiés métabolisaient le cholestérol contre seulement vingt pourcents qui ne le métabolisaient pas, sans décrire quelle était le mécanisme qui activait ou non cette métabolisation. Dans une étude de Viega P et al, en 2005, il a été montré que des bactéries coprostanoligènes du tube digestif devaient être présente en masse pour favoriser ce métabolisme.

Enfin, il est responsable de la production de vitamines telles que la vitamine K, vitamine clef dans le cycle de la coagulation. En effet, 75% de la vitamine K2 est produite par les bactéries issues du côlon. Il produit également certaines vitamines B.

III. Les probiotiques

A. Histoire et définitions

1. Histoire

Avant Louis Pasteur en 1857 et son mémoire sur "la fermentation appelée lactique", qui a permis d'établir l'origine microbienne de la fermentation, on retrouve des traces de probiotiques qui remontent à l'ère du néolithique au Moyen orient entre -10 000 et -5 000 avant J-C. Le soleil brulant fermentait du lait conservé dans des sacs de peaux de chèvres. Le kéfir, un lait fermenté reposant sur l'association de levures et de bactéries, remonte à - 7 000 avant J-C. Le même principe repose sur la confection du vin et de la bière.

Mais plus récemment, en 1899 par Henri Teissier et en 1900 par Ernst Moro, est apparue la première avancée dans le milieu des probiotiques, avec l'isolement des *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Puis, le premier savant à se concentrer sur les effets des bactéries lactiques sur l'Homme, fut Elie Metchnikoff, qui travaillait à l'institut Pasteur. Dès 1883, il fut considéré comme le père de l'immunité cellulaire. En 1905, il proposa une théorie, selon laquelle la population bulgare voyait son espérance de vie allongée due à la consommation de microorganismes contenus dans le yaourt fermenté. En 1908 il décrocha un prix Nobel pour les avancées qu'il proposa sur la phagocytose. A partir de ce postulat et au fil des années les chercheurs se sont intéressés aux probiotique et ont étayé nos connaissances.

En 1921, et en reprenant les travaux de Metchnikoff, le Docteur Japonais Minoru Shirota, découvrit et utilisa la souche *Lactobacillus casei* dans une boisson lactée : Yakult. Son but fut réalisé, à savoir de trouver une bactérie capable d'arriver vivante dans les intestins.

En 1953, on utilise alors pour la première fois le terme "probiotique", par l'intermédiaire du docteur allemand Werner Kollath, qui va s'en servir pour désigner des substances actives essentielles pour un développement sain.

Une autre étape clef pour l'avènement des probiotiques vis le jour, en 1954 grâce à Ferdinand Vergin, qui va comparer les effets des antibiotiques sur le microbiote intestinal avec les effets favorables des bactéries bénéfiques dans son écrit : "Anti und Probiotika".

Cependant, la définition scientifique et l'acceptation du terme probiotique va arriver en 2001 et sera acceptée par l'organisation mondiale de la santé (l'OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation (FAO) pour donner suite à la publication de nombreux résultats d'études menées depuis 1990. Cette définition est la suivante : "micro-organismes vivants qui, lorsque administrés en quantité adéquate, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte".

Depuis, l'intérêt pour les probiotiques n'a cessé de croître, et leurs effets potentiellement bénéfiques sur certaines maladies humaines ne cesse d'être étudié, en 2017 on dénombrait 2693 publications scientifiques consacrées aux probiotiques.

Leurs effets peuvent être multiples et variés, nous allons donc comprendre dans quelles mesures ils peuvent être intéressants, mais avant cela nous allons définir plusieurs termes, notamment la différenciation entre probiotiques et prébiotiques.

2. Définitions

Les probiotiques : la définition officielle est celle proposée et publiée en 2001 par la FAO :

« Un probiotique est un micro-organisme vivant (appelé aussi bactérie ou ferment) qui, ingéré en quantité suffisante, procure un bénéfice sur la santé de l'hôte, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ».

Cette définition est actuelle mais peut évoluer dans le temps en fonction des recherches et des résultats qui pourront être découverts dans le futur. Cette définition des probiotiques peut être décomposée en plusieurs parties :

- Il s'agit de microbes vivants, ce sont le plus souvent des bactéries, ils peuvent être également des levures. On peut les intégrer dans les aliments, les médicaments et dans les suppléments alimentaires. Il a été démontré que des microorganismes tués par la chaleur

avaient des effets bénéfiques sur l'organisme, mais ces effets étaient moins marqués que ceux de bactéries ou levures ingérées vivantes.

- Ils doivent être en quantité suffisante, pour être considéré comme probiotique il faut posséder à minima 2 milliards de bactéries

- Bénéfice sur l'hôte, le probiotique va renforcer la santé de différentes manières, en aidant le système immunitaire, aider à la digestion, produire des vitamines, restaurer le microbiote et ces souches doivent avoir démontré leurs bénéfices avec des études scientifiques.

Les prébiotiques, la définition officielle est la suivante : ingrédients alimentaires résistants à la digestion qui induisent des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal produisant ainsi un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

Ces ingrédients alimentaires vont nourrir les microorganismes colonisant notre intestin, ainsi la prise de probiotique n'est pas la seule solution, pour augmenter la concentration de bactéries bénéfiques dans l'estomac.

Ce sont :

- Le Fructo-oligosaccharide (FOS)
- L'inuline
- Les galacto-oligosaccharides (GOS)
- Le lactulose, que l'on connaît très bien car il est utilisé dans le traitement de la constipation.

Ils sont naturellement présents dans de nombreux aliments, notamment des végétaux, ce sont des fibres alimentaires. On s'en sert d'ailleurs beaucoup plus dans l'alimentaire, dans les biscuits, les céréales, le chocolat.

Les symbiotiques : un symbiotique allie à la fois des probiotiques et des prébiotiques afin de synergies leur action. Ainsi il va apporter des bactéries mais aussi nourrir les bactéries déjà présente dans l'intestin. Ils n'ont donc pas d'effets direct sur la santé mais leurs bienfaits sont associés au bienfaits cumulés des pré et probiotiques.

Les métabiotiques : ce sont les substances bioactives produits par les bactéries probiotiques en se multipliant expliquent leurs effets bénéfiques sur les maladies du tractus gastro-intestinal

Exemples de métabiotiques :

- Bacillus subtilis produit de l'amicoumacin A, un antibiotique qui inhibe la prolifération de Helicobacter pylori (Pinchuk et al., 2001)
- Lactobacillus acidophilus produit du surnageant qui stimule l'angiogenèse chez la souris (Halper et al., 2003)

Les postbiotiques : Enfin, les postbiotiques, ce sont des composés issus de l'activité des micro-organismes, la fermentation des probiotiques va produire des enzymes, des substrats bénéfiques pour l'organisme et des AGCC, qui peuvent améliorer la fonction immunitaire et renforcer la barrière intestinale.

B. Critères de sélection

Les probiotiques sont des microorganismes ingérés vivants par définition. Afin de s'assurer de la qualité des souches mais aussi pour rationaliser la sélection, des critères ont été proposés aux industriels pour s'assurer d'avoir des candidats ayant des propriétés probiotiques. Cependant certaines souches ne possédant pas ces critères peuvent avoir des effets probiotiques, il est important de comprendre que c'est une aide au développement et non un outil marketing. Nous allons développer certains critères.

1. Absence de toxicité ou pathogénie

Afin d'être produit à plus grande échelle et utilisé dans la population générale, un probiotique doit faire preuve d'une totale absence de pathogénie et de toxicité, c'est à dire prouver sa totale innocuité. De plus, les industriels fabriquant devront procéder à des essais dans le but d'analyser les éventuels effets indésirables tels que la production de substances toxiques, la résistance aux antibiotiques, l'absence d'activité métabolique nocive.

Le fait que les probiotiques sont utilisés depuis longtemps par l'Homme, représente une preuve de non-toxicité. C'est pourquoi des statuts ont été créés au niveau européen et américain pour dresser une liste de souche qui sont jugées comme sécuritaires du fait de leur utilisation historique : statut Qualified Preemption of Safety (QSP, en Europe) et Generally Recognized as Safe (GRAS, aux états unis). De la même approche historique, certaines souches ont été rejetées en tant que probiotique et produit de santé car pouvait présenter des résistances aux antibiotiques et associées à des maladies humaines : il s'agit de Bacillus cereus

et clausii, Bifidobacterium dentium, Enterococcus spp, Scardovia inopinata, Pediococcus acidilactici et Lactobacillus Plantarum CNCM MA40/5B-p.

Cette approche historique est utile et validée mais ne suffit pas à justifier de leur total sécurité d'utilisation. Les critères suivant pourront justifier d'une non-utilisation de la souche candidate par l'OMS ou la FAO (26) (27)

- Souches produisant des substances bactériennes potentiellement résistante aux antibiotiques
- Souches bactériennes elles-mêmes résistante aux antibiotiques, en effet certaines souches possèdent dans leur génome des gènes de résistance aux antibiotiques, pouvant être transférés à d'autres microorganismes. Ces souches-là seront rejetées en tant que candidates aux probiotiques.
- Les souches étant capables de produire des métabolites toxiques ou pouvant entraver la physiologie humaine telles que le D-lactate ou provoquer une dé conjugaison excessive des sels biliaires ne seront pas retenues comme utilisables en santé humaine.
- Enfin, hormis les souches utilisées depuis longtemps et pour lesquelles leur potentiel pathogène est démontré comme nul, devront subir des tests afin d'évaluer ce potentiel et démontrer par des études de virulence et toxicologiques.

2. Production à grande échelle

Lors de la production à grande échelle des probiotique, le circuit technologique de la souche doit être stable et le produit doit pouvoir être conservé et garder ses effets bénéfiques jusqu'à une certaine date de péremption. C'est pourquoi des études doivent être réalisées pour s'assurer la date de péremption du probiotique et ce sans diminution de l'efficacité et sans augmentation de la toxicité

Voici les étapes de la fabrication (28) :

- Mise en culture dans un milieu nutritif et stérile pour multiplier le microorganisme
- Fermentation industrielle dans des fermenteurs de plus en plus grands pour être produits industriellement. La croissance et l'absence de contamination devront être assurés
- On va séparer les bactéries de leur milieu de culture par centrifugation ou filtration

- Une fois centrifugé, on obtient une pâte qui va contenir les microorganismes qui va être ensuite congelée et déshydratée. Puis elle va être lyophilisée afin de mieux être conservée et laisser les microorganismes en vie.
- Ensuite, le résultat de la lyophilisation va être broyé en poudre fine et mélangé à des excipients, élément sans activité thérapeutique mais qui a pour fonction d'améliorer l'aspect ou le goût, d'assurer la conservation, de faciliter la mise en forme et l'administration du médicament
- Vient l'étape du conditionnement dans son format définitif (gélule ampoules...). Après ce choix de formulation, les probiotiques seront emballés dans leur boîte.
- Désormais, ils seront stockés dans des endroits ayant un environnement contrôlé (température humidité...)
- Les lots seront enfin livrés au points de vente tels que les pharmacies

3. Survie le long du tractus digestif

Afin de véhiculer les substances d'intérêts jusqu'à leur site d'action, à savoir le microbiote intestinal, les probiotiques vont devoir survivre tout le long du tractus digestif.

Le mécanisme de défense majeur de l'organisme contre la colonisation digestive est la sécrétion d'acide, sur les bactéries qu'elles soient pathogènes ou non. La survie des bactéries contre ce tube digestif n'est pas la même en fonction des espèces et sera donc un critère de sélection pour les candidats probiotiques. S'il n'existait que ce mécanisme de défense, en cas de traitement anti sécrétoire ou d'achlorydrie, le risque d'infection intestinale devrait être plus importante, or il n'en est rien, témoignant de la présence de facteurs anti microbiens puissants dans le tube digestif :

- Les acides biliaires
- Le mucus composé de substances antimicrobiennes
- Des peptides antimicrobiens, les défensines sécrétés par les cellules de Paneth.

En plus de ces sécrétions, la motricité du transit est un autre moyen pour l'organisme de se défendre contre les bactéries, en effet dans l'intestin grêle le brassage et les contractions postprandiales rendent difficile l'adhésion et l'implantation bactérienne, tandis que dans le côlon, la motricité est plus lente constituant ainsi un milieu plus favorable à l'implantation.

Pour étudier ce phénomène on a recouru à une méthode simple c'est de mesurer la survie au niveau des selles émises.

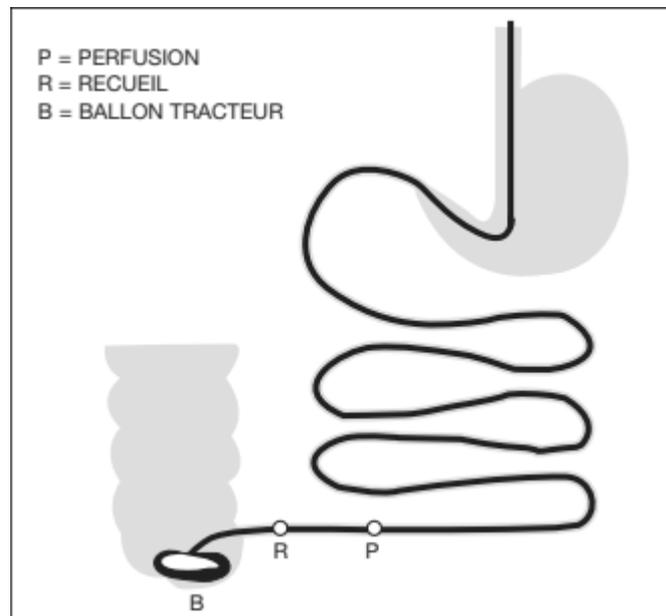


Figure 10 : Schéma de la sonde utilisée au cours des perfusions intestinales réalisées chez l'homme.

Si l'on veut savoir plus précisément la survie dans l'intestin grêle et le côlon, on va procéder en une méthode basée sur l'intubation : sur des volontaires sains on leur introduit une sonde lestée par le nez qui va descendre jusqu'au caecum. Après marquage par un marqueur inerte hydrosoluble est perfusé dans l'iléon terminal pour mesurer le début et le contenu de cet iléum. Dans le cadre de survie de bactéries, on va utiliser les spores de la souche *Bacillus stearothermophilus* car elle ne se multiplie pas et ne seront pas détruite dans ce tractus.

Ces méthodes sont assez précises mais ont pour limite la précision des techniques bactériologiques disponibles pour identifier et quantifier le probiotique étudié au sein de l'écosystème endogène.

4. Adhérence au mucus ou à des cellules intestinales

C'est l'une des étapes la plus importante pour la sélection d'un candidat probiotique. En effet sans cette adhésion il n'y aura ni colonisation ni croissance bactérienne. Elle va tout

simplement permettre la résistance aux mouvement de péristaltisme intestinaux, il est donc admis dans la littérature que plus le probiotique va séjourner dans l'intestin, au plus son effet sera important.

Pour étudier cette adhésion, le recours aux méthodes in vivo est assez difficile, car elle nécessite d'avoir des échantillons, obtenus par exemple lors de coloscopie intestinales par biopsies. Ainsi, c'est par des méthodes in vivo que nous avons pu chercher à prouver la bonne adhérence des probiotiques sur le marché.

Ce sont des tests assez simple en trois parties, la première c'est une étape d'incubation avec un substrat d'adhésion, on va les mettre en commun avec une cible et ce substrat va permettre d'adhérer à cette dernière. Ensuite la deuxième étape est simplement un lessivage, pour enlever toutes les bactéries n'ayant pas adhérees à la cible. Et enfin, la dernière étape une énumération de celles qui ont adhéré.

Soit on va se servir des mucines (composant du mucus considérées comme u des sites les plus important pour l'adhésion) soit de la culture de lignées cellulaires humaines d'origine intestinale, qui résumant parfaitement l'épithélium intestinal.

Pour le comptage des bactéries ayant adhérees et surtout sur les lignées cellulaires, on va se servir soit de la microscopie, de la fluorescence avec des fluorochromes ou encore on peut quantifier ceci par la PCR en temps réel.

Il est intéressant de noter que cette adhésion est l'un des mécanismes d'action des probiotiques, car en effet, ils peuvent occuper par compétition des sites d'adhésion de microorganismes pathogènes et représente ainsi une étape clef du développement de ces produits de santé.

5. Capacité à avoir des effets bénéfiques sur la santé

Pour produire un médicament ou un complément alimentaire, il faut s'assurer de son efficacité. Pour cela, la règle qui domine aujourd'hui est celle des évaluations basée sur les preuves, on l'appelé la médecine fondée sur les preuves ou la "evidence-based medicine".

Même si les études sur les probiotiques ce sont beaucoup développés ces 15 dernières années, leurs effets bénéfiques sont assez difficiles à mettre en lumière directement car la plupart des mécanismes ne sont pas totalement élucidés et ce malgré les progrès des études moléculaires.

De plus les études prouvant leurs effets doivent être assez longue, comme tout candidat médicament, il faut d'abord choisir des souches ayant des effets potentiels, confirmer ces résultats par des essais cliniques chez l'homme, en les comparant à un placebo et sur une certaine population et surtout sur un nombre conséquent de sujet pour que ce soit révélateur d'un réel effet.

Pour résumer :

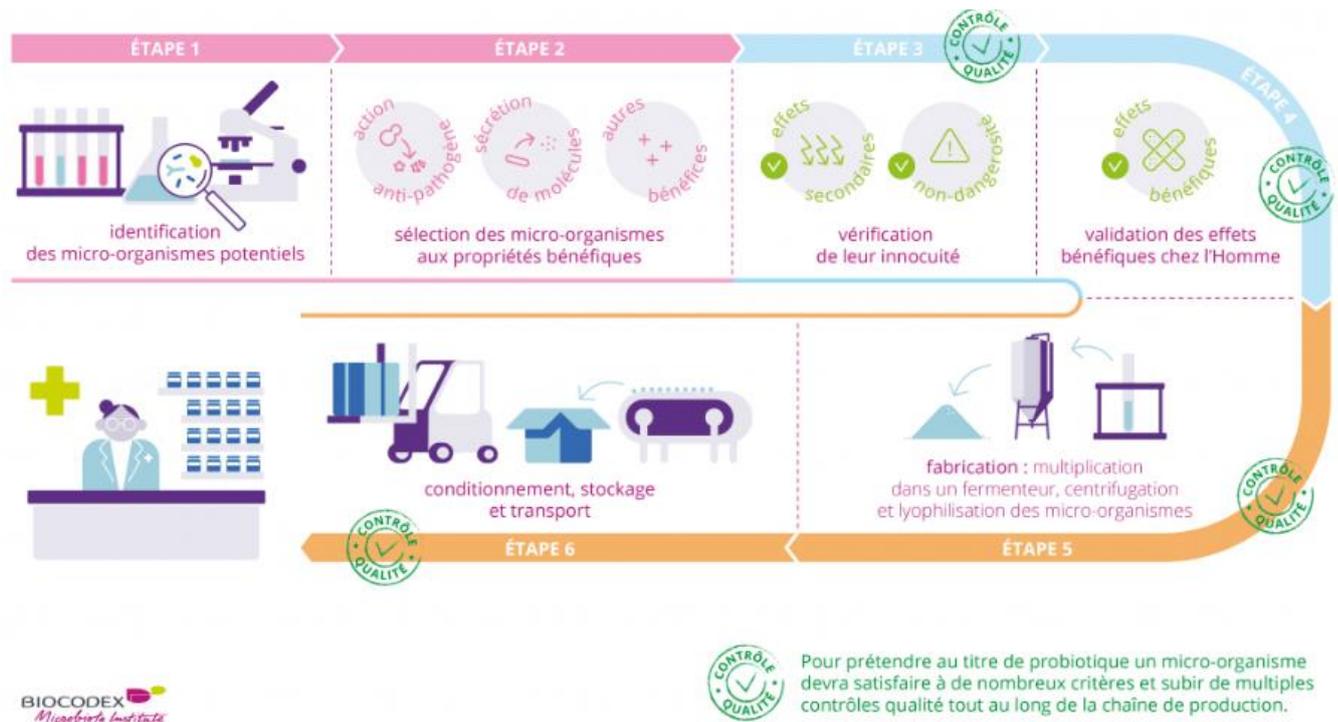


Figure 11 : processus non exhaustif de sélection puis de fabrication des probiotiques

Pour schématiser, les probiotique sont choisis en cinq étapes de la souche à la délivrance

- On attribue à la souche candidate un nom et un numéro de souche après identification en fonction de caractéristiques génomiques
- On va réduire le nombre de candidats en fonctions des propriétés bénéfiques à tester à savoir action sur les pathogènes, action sur le transit intestinal ou le cholestérol etc...
- Vérification de l'innocuité, test de résistances aux antibiotiques, de toxines, d'effets indésirables, et survie le long du tractus

- Essais cliniques chez l'Homme, afin de s'assurer d'un effet bénéfique ; ces essais sont menés par les laboratoires et coordonnés par l'autorité de santé locale ou nationale et à ce moment-là on va parler de probiotique
- Enfin, on s'assure de la stabilité du produit et du fait qu'il va rester vivant jusqu'à sa date de péremption. Ils seront ensuite déposés dans une « banque internationale de souches microbiennes »

C. Classification des microorganismes probiotiques

La plupart des probiotiques sur le marché sont des bactéries lactique et des levures utilisés comme compléments alimentaires ou produits lactés.

1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont appelées comme telles car elles peuvent produire de l'acide lactique en dégradant le glucose. Elles peuvent être divisées en deux groupes, les bactéries homolactiques et hétérolactiques : pour les premières, il n'y aura formation d'un seul métabolite lors de la fermentation obligatoire, évidemment l'acide lactique, tandis que pour le second groupe, il y aura formation de plusieurs métabolites, de l'éthanol, du CO₂ (dioxyde de carbone). Ce sont des bactéries anaérobies à gram positif et se retrouvent dans tous les types d'habitats. Les genres Streptococcus Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus et Pediococcus ont été isolés grâce à la méthode de l'ARN 16S et seront reconnaissable selon leur morphologie.

L'intérêt des bactéries lactiques est depuis longtemps montré particulièrement dans l'alimentation depuis bien longtemps en tant que conservateurs et plus précisément dans les produits laitiers. Leur utilité repose sur leur mode de fermentation, en produisant l'acide lactique, elles vont réduire la croissance d'autres microorganismes, d'où la préservation et l'effet conservateur sur la nourriture. De plus cette production de lactate va baisser le pH et ainsi donner des propriétés organoleptiques très intéressantes.

Nous allons donc décrire les trois types de bactéries lactiques au regard de leur morphologie : les Lactobacilles, les Coques et les bifidobactéries.

a. Les lactobacilles

Ce genre *Lactobacillus* est le plus large groupe de bactéries lactiques avec près de 140 espèces pour la plupart immobiles et morphologiquement reconnaissables par leur forme de bâtonnets ou de bacille qui sont souvent regroupées en chaînettes. Elles sont très utilisées en tant que probiotiques car résistent très bien à l'acidité gastrique, probablement dû à leur pH optimal bas et leur façon de réguler le pH.

Les lactobacillus les plus fréquemment utilisés dans le commerce des probiotiques sont : *Lactobacillus rhamnosus* souche GG, *Lactobacillus johnsonii* souche La1, *Lactobacillus casei* de la souche Shirota. La figure ci-dessous nous montre l'aspect de *Lactobacillus rhamnosus* et le tableau dresse un état des lieux des différents lactobacilles utilisés en probiotique ainsi que les laboratoires les ayant développés.

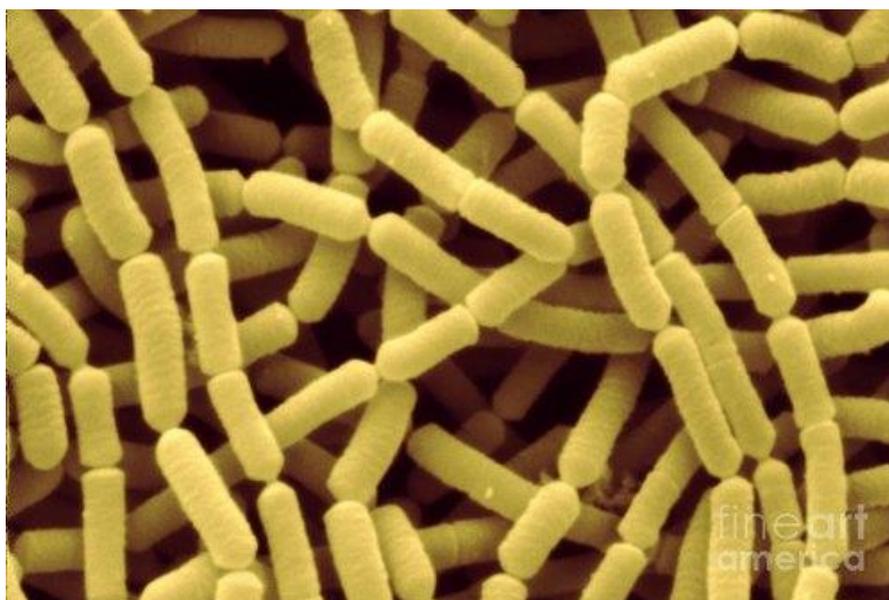


Figure 12 : Lactobacillus rhamnosus

| Species | Strains |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> | LA-1/LA-5 (Chr. Hansen) |
| <i>L. acidophilus</i> | NCFM (Rhodia) |
| <i>L. acidophilus</i> Johnsonii | La1 (Nestle) |
| <i>L. acidophilus</i> | DDS-1 (Nebraska Cultures) |
| <i>L. acidophilus</i> | SBT-2062 (Snow Brand Milk Products) |
| <i>L. bulgaricus</i> | Lb12 |
| <i>L. lactis</i> | L1A (Essum AB) |
| <i>L. casei</i> Immunitas | (Danone) |
| <i>L. plantarum</i> | 299v, Lp01 |
| <i>L. rhamnosus</i> | GG (Valio) |
| <i>L. rhamnosus</i> | GR-1 (Urex Biotech) |
| <i>L. rhamnosus</i> | LB21 (Essum AB) |
| <i>L. reuteri</i> | SD2112/MM2 (Biogaia) |
| <i>L. rhamnosus</i> | 271 (Probi AB) |
| <i>L. plantarum</i> | (Probi AB) |
| <i>L. reuteri</i> | SD2112 (also known as MM2) |
| <i>L. casei</i> | Shirota (Yakult) |
| <i>L. paracasei</i> | CRL 431 (Chr. Hansen) |
| <i>L. fermentum</i> | RC-14 (Urex Biotech) |
| <i>L. helveticus</i> | B02 |

Tableau 3 : Espèces et genres de Lactobacilles utilisées en probiotiques

b. Les bifidobactéries

Le deuxième groupe de bactéries lactiques est composé des bifidobactéries, ce sont des bactéries qui ont des formes assez variées, la plus classique est une forme de bâtonnets en Y. ce sont des bactéries à Gram positif et qui vont dégrader les sucres par un procédé hétérofermentaire résultant en la production d'acide lactique et d'acide acétique.

Dans le tractus digestif humain, on retrouve essentiellement *Bifidobacterium longum*, *adolescentis* et *dentium* tandis que des espèces telles que *Bifidobacterium boum* ou *pseudolongum* ont été retrouvées en plus grande quantité dans les selles des ruminants.

Le probiotique le plus documenté contenant des bifidobactéries est une formule infantile commercialisée par Chr Hansen aux États-Unis, contenant la souche Bb12 de *Bifidobacterium lactis* avec plusieurs effets observés chez l'humain lors de son étude (près de 400 études et de 200 publications (35)) : Stimulation de la production d'IgA, Stimulation de la croissance des bébés, modulation et la composition de la flore et prévention des diarrhées à Rotavirus.

Par leurs propriétés, plusieurs souches de bifidobactéries seront retrouvées comme probiotique chez l'homme : *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*.

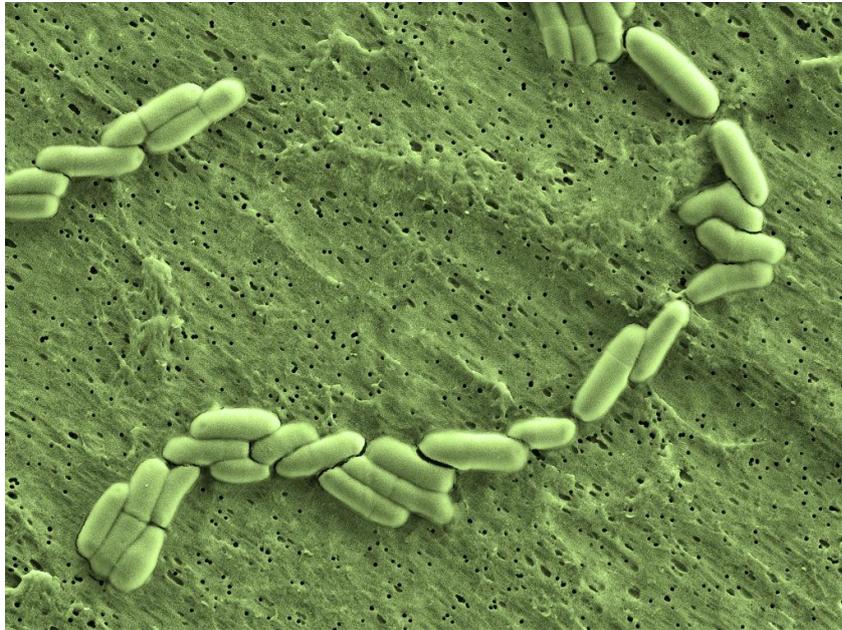


Figure 13 : Bifidobacterium lactis

c. Les coques

On désigne par ce terme toutes les bactéries lactiques composées des genres *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Pediococcus* qui fonctionnent en général par paires. Elles peuvent être également retrouvées en chaînettes ou en tétrades. Au niveau morphologique, ce sont des coques ovoïdes ou sphériques.

Sur le marché des probiotiques, il n'existe aujourd'hui que les genres *Streptococcus*, *Enterococcus* et quelques *Lactococcus*. Chez les entérocoques, deux bactéries probiotique sont intéressantes car assez résistantes à leur environnement ce sont *Enterococcus faecum* et *faecalis*. Ces bactéries sont normalement présente dans le microbiote intestinal humain.

Dans le genre des streptocoques, une espèce a été reconnue comme "Safe" et possède le label (GRAS), il s'agit de *Streptococcus thermophilus*, qui sert d'agent d'acidification et de probiotique.

Enfin, Les lactocoques ne contiennent, à la différence des deux types précédents aucune espèce à caractère pathogène. Comme leur nom l'indique elles sont retrouvées dans certains

produits laitiers et le lait mais ce sont dans les produits végétaux constitue leur réservoir naturel principal.



Figure 14 : Streptococcus thermophilus

2. Les levures

Ce sont des champignons à forme majoritairement unicellulaire, c'est à dire formé d'une seule cellule. L'humain connaît bien cette utilisation des levures car depuis longtemps on s'en sert pour faire fermenter l'alcool afin d'en faire des boissons et pour faire du pain. Un peu plus récemment, on a appris à s'en servir en tant que modulateur des performances zootechniques animales, c'est à dire appliquer la science technique et économique pour augmenter la production mais aussi pour leurs effets sur le microbiote intestinal.

Dans ce cadre, les souches *Saccharomyces cerevisiae* sont des souches fréquemment utilisées et plus particulièrement *Saccharomyces boulardii*, souche utilisée dans le médicament comportant une AMM Ultra levure®, très utilisé dans le traitement de la diarrhée aux antibiotiques et qui devrait être systématiquement conseillée.

Cette souche est connue depuis les années 1920, et le Docteur ayant cultivé cette souche pour la première fois lui a donné son nom, il s'agissait du Dr Boulard. L'histoire de cette levure est assez passionnante : en France, dans ces années-là, on utilisait le genre *Saccharomyces cerevisiae* pour fermenter la bière, et à une température de 4°C. Cette température posait des problèmes car on ne pouvait produire de bière dans les pays ayant des températures plus

hautes, il fallait alors trouver une souche qui se développerait autour des 35°C. c'est au Vietnam lors d'un voyage, que ce docteur isola la souche encore inconnue en France sur des écorces de litchi que la population utilisait en décoction dans le but de soigner les diarrhées. En revenant en France, il fit l'analyse microbienne de cette levure, qu'il breveta et donna son nom, *Saccharomyces boulardii*, et la commercialisa sous le nom commercial d'Ultra levure®. Tout d'abord en ampoules, car elle n'était pas stable, mais, en 1950 le médicament sera cédé à François Vallet et en association avec Michel Hublot, ils fondèrent le laboratoire Biocodex et produit des lyophilisats de cette levure afin d'obtenir une stabilité dans le temps et ainsi un candidat médicament. (29)

3. Les bactéries non lactiques

Trois souches bactériennes au métabolisme différent des précédents ont été observées et ont eu des preuves en tant que probiotiques, les souches *Escherichia coli* souche Nissle 1917, *Bacillus subtilis* et *Bifidobacterium cereus*.

D. Les probiotiques sur le marché actuellement

1. Spécialités dotées d'une AMM

Elles sont très peu nombreuses en comparaison aux spécialités sans AMM, et ont une indication clairement établie. Dans ce tableau nous résumons les probiotiques ayant l'AMM pour le « traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée », la seule particularité est Carbolevure® qui, associé au charbon actif possède l'AMM pour le « traitement symptomatique des manifestations fonctionnelles intestinales ».

Les autres spécialités possèdent le statut de dispositif médical ou complément alimentaire. Le statut de dispositif médical est de plus en plus contesté à tel point que l'Union Européenne a prévu de nouvelles dispositions. Le statut de dispositif médical pour les micro-organismes vivants administrés par voie vaginale a été retiré et dès septembre 2022, toutes les spécialités les composants seront retirées du marché et devront avoir le statut de médicament pour être commercialisées.

En ce qui concerne le statut de complément alimentaire, ce qui est le cas du plu grand nombre de probiotiques vendu en officine, ceux-ci sont très largement consommés. En effet, le marché des probiotiques dans le monde a été estimé à environ 40 milliards d’euros.

De plus, le syndicat national des compléments alimentaires estime en 2020, lors de son étude Harris Interactive réalisée pour le Synadiet, que près de 40% des Français consomment des probiotiques. Des probiotiques “largement recommandés par les professionnels de santé”, note le syndicat qui déplore que “cet intérêt pour cette catégorie d’ingrédients soit cependant freiné par une méconnaissance et un manque d’informations sur les produits”, rappelant qu’à “la lecture des emballages où apparaissent uniquement le nom des souches de probiotiques utilisées, 50 % des Français ne comprend pas l’utilité du produit et moins de 30 % comprend que le produit contient des probiotiques”. (30)

| MEDICAMENTS PROBIOTIQUES AYANT UNE AMM SUR LE MARCHE | | |
|---|--|--|
| NOM | COMPOSITION ET FORME GALENIQUE | INDICATIONS |
| CARBOLEVURE ® (laboratoire Pierre Fabre) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 108 germes/gramme associé au charbon activé Gélules, boîte de 30 gélules | Chez l'adulte : Traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée en complément de la réhydratation et/ou des mesures diététiques. Traitement symptomatique des manifestations fonctionnelles intestinales, notamment avec météorisme. L'importance de la réhydratation par soluté de réhydratation orale ou par voie intraveineuse doit être adaptée en fonction de l'intensité de la diarrhée, de l'âge et des particularités du patient (maladies associées...). |
| LACTEOL ® (Adare Pharmaceutical SAS) | <i>Lactobacillus acidophilus LB (Lactobacillus fermentum et Lactobacillus delbrueckii) inactivés</i> dosés à 10 milliards de germes par gélule ou sachet Lactéo® 340 mg, gélules, boîte de 10 ou de 30 Lactéo® 340 mg, sachet-dose : boîte de 10 | Traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée en complément de la réhydratation, chez le nourrisson et l'enfant de moins de 6 ans. En complément de la réhydratation et/ou des mesures diététiques, traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée chez l'adulte et l'enfant de plus de 6 ans. L'importance de la réhydratation par soluté de réhydratation orale ou par voie intraveineuse doit être adaptée en fonction de l'intensité de la diarrhée, de l'âge et des particularités du patient (maladies associées...). |
| LENIA ® (Eurodep pharma) | Culture lyophilisée de <i>Lactobacillus casei</i> variété <i>rhamnosus</i> titrant au minimum 10 ⁸ germes par gramme Gélules : flacon de 20 gélules Poudre pour suspension buvable en sachet-dose : boîte de 10 sachets | En complément de la réhydratation, traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée. L'importance de la réhydratation par soluté de réhydratation orale ou par voie intraveineuse doit être adaptée en fonction de l'intensité de la diarrhée, de l'âge et des particularités du patient (maladies associées...). |
| ULTRA-LEVURE ® (laboratoire Biocodex) | <i>Saccharomyces boulardii</i> Gélule 50 mg : flacon de 20 et de 50 gélules Sachets 100 mg : poudre pour suspension buvable. Boîte de 20 sachets Gélule 200 mg : boîte de 10 et flacon de 30 gélules | Traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée en complément de la réhydratation. L'importance de la réhydratation par soluté de réhydratation orale ou par voie intraveineuse doit être adaptée en fonction de l'intensité de la diarrhée, de l'âge et des particularités du patient (maladies associées...). |

Tableau 4 : Médicaments probiotiques ayant une AMM sur le marché

2. Spécialités sur le marché sans AMM

| Laboratoire | Nom de la spécialité | Forme galénique | Souche probiotique | Cible d'action - indications d'après les fabricants |
|-------------|-----------------------------------|---|---|---|
| ARAGAN | Biotic P7® Adulte | Sachet (5 milliards de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium animalis ssp lactis Lafti</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> | Microbiote - Confort digestif |
| | Biotic P2® Baby | Goutte (300 millions de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> | Microbiote - Confort digestif |
| | Biotic P7® Entéro | Gélule (7 milliards de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium animalis ssp lactis Lafti</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Microbiote - Confort digestif |
| ARKOPHARMA | Arkolevure® | Gélule (250 mg de levure) boîte de 10 ou de 30 | <i>Saccharomyces boulardii</i> Inuline | Microbiote - Confort digestif - Transit |
| | Supraflor® | Gélule (11 milliards de ferments lactiques) Sachet (5,5 milliards de ferments lactiques) | <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> <i>Bifidobacterium animalis ssp lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Microbiote - Confort digestif - Transit |
| BIOCODEX | Alflorex Symbiosis | Gélules : boîte de 30 gélules | <i>Bifidobacterium longum</i> 35624 | Microbiote- Syndrome de l'intestin irritable |
| | Symbiosis Satyria | Gélules : boîte de 28 gélules ou de 60 gélules | <i>Hafnia alvei</i> HA4597 Zinc : 5 mg Chrome : 20 µg | Microbiote- Régulation du poids |
| | Ultra-baby | Sticks de poudre à diluer : boîte de 14 sticks | <i>Saccharomyces boulardii</i> | Microbiote- besoins nutritionnels des enfants dès la naissance, en cas de diarrhées aiguës, y compris lors de la prise d'antibiotiques. |
| BIONUTRICS | Ultradyn® | Poudre (10 milliards de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> | Microbiote |
| | Ultraflora 10® | Gélule (10 milliards de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> | Microbiote |
| | Ultraflora Immune® | Poudre (15 milliards de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> | Microbiote |
| | Ultraflora Infantis® | Gélule | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> | Microbiote |
| INELDA | Pediakid® Probiotiques-10M | Sachet (10 milliards de ferments lactiques) | <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> | Microbiote - Confort digestif |
| | Pediakid® Colicillus bébé | Flacon compte-goutte (1 milliard de ferments lactiques pour 5 gouttes) | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | Microbiote - Confort digestif |
| | Pediakid® ptit biotic | Pilulier de 60 oursons | <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> | Microbiote - Confort digestif |

| | | | | |
|-----------------|---|--|---|--|
| MAYOLY SPINDLER | Probiolog® | Gélule (1 milliard de bactéries) : enfant > 3 mois et adulte | <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Microbiote - Transit |
| | Probiolog® Fort | Gélule (2 milliards de bactéries) : adulte | <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Microbiote - Transit |
| | Probiolog® DIA + nourrisson-enfant | Stick (1 milliard de bactérie) : à partir de 6 mois Avec soluté de réhydratation oral | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | Microbiote - Transit |
| NUTRISANTE | Effidigest ® | Comprimé | <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Microbiote - Transit |
| PEDIACT | Biogaia ® | Gouttes tempérées dans un flacon de 5 mL Comprimés a croquer | <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Protectis DSM 17938</i> | Microbiote - colique, diarrhée et constipation |
| | Biogaia ® + vitamine D | Gouttes tempérées dans un flacon de 5 mL Comprimés a croquer | <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Protectis DSM 17938</i> Vitamine D3 | Microbiote - colique, diarrhée et constipation |
| PILEJE | Lactibiane® Référence | Gélule ou sachet (10 milliards de bactéries) | <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> | Microbiote |
| | Lactibiane® Imedia | Stick de poudre orodispersible | <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> | Microbiote |
| | Lactibiane® Tolérance | Gélule ou sachet (10 milliards de bactéries) | <i>Bifidobacterium lactis</i> LA 303 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> LA 304 | Microbiote |
| | Lactibiane® Enfant | Sachet (4 milliards de bactéries) | <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Microbiote |
| | Lactibiane® Voyage | Gélule (20 milliards de bactéries) Reste stable après 1 mois à 40°C. | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> | Microbiote |
| | Lactibiane® ATB | Gélule (6 milliards de bactéries) | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Microbiote |

Tableau 5 : Liste non exhaustive des probiotiques disponibles sur le marché sans AMM (Dispositif médicaux ou Compléments alimentaires)

IV. Avancées thérapeutiques ciblant le microbiote

1. **Obésité et troubles métaboliques associés**

L'obésité concerne 600 millions d'adulte dans le monde, surtout dans les pays industrialisés. C'est un problème de santé publique car en augmentation constante et est associée à des risque majeurs de troubles cardiovasculaires, certains cancers, des risques d'anomalies métaboliques tels que diabète de type 2, risque d'athérosclérose et enfin elle est associée à un risque accru de décès prématuré chez l'enfant et d'incapacité à l'âge adulte.

Lorsque l'on a un apport énergétique supérieur à la dépense, il y aura gain de poids. Cependant, la grande variabilité à la survenue d'une obésité a conduit les scientifiques à évoquer des anomalies biologiques, principalement génétiques. Il est admis que certains gènes sont directement impliqués dans cette pathologie, mais ne peuvent pas expliquer à eux seul l'augmentation de la prévalence.

a. Lien entre microbiote et obésité

C'est dans ce contexte que des chercheurs ont fait l'hypothèse d'une contribution du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité.

Pour commencer, c'est en 2004 que Jeffrey Gordon a constaté que les masses grasses totales des souris conventionnelles étaient de 42 à 47 % supérieures aux masses grasses des souris axénique, faisant parti du même âge et de la même souche. Il se mit alors à coloniser ces souris sans germes avec le microbiote des souris conventionnelles et observa une hausse de la masse grasse totale de 57 à 61% malgré une baisse des apports alimentaires.

Il resta alors à transposer à l'humain et prouver que le microbiote influencerait l'obésité chez l'Homme. Cette même équipe a transféré des microbiotes humains à des souris axéniques. Les microbiotes transférés appartenaient à deux sœurs jumelles de corpulence différente, une était obèse l'autre était mince. Les chercheurs ont alors observé que les souris receveuses avaient le même phénotype que leur donneuse, confirmant ainsi le caractère transmissible de l'obésité par le microbiote.

Certains troubles métaboliques étant provoqués par l'obésité, c'est logiquement que les chercheurs ont envisagé l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de ces troubles, au-delà de son action sur le poids. Plusieurs modèles murins ont confirmé le rôle du microbiote dans les troubles métaboliques, mais les données restent limitées chez l'Homme. L'existence de différences dans la composition du microbiote intestinal entre les sujets non diabétiques et diabétiques est aujourd'hui établie. La différence reposera sur une diminution des Firmicutes, bifidobactéries ou de Bactéroïdes vulgatus.

Le microbiote agirait sur l'obésité et ces troubles métaboliques par 3 mécanismes :

- Les voies dépendantes des métabolites bactériens

C'est par la présence des milliards de bactéries intestinales que les métabolites bactériens sont produits, ayant des effets sur notre santé qu'ils soient positifs ou négatifs. Nous avons vu que la fermentation des éléments non digestibles dans le côlon aboutissait à la synthèse d'AGCC et de gaz. Ce sont principalement les AGCC qui vont nous intéresser, étant source d'énergie de la muqueuse via le butyrate, ils vont également participer à la glycogénèse. Véritables molécules de stockage, de signalisation, ils vont participer à la lipogénèse et à la satiété. Ainsi il paraît donc évident de penser qu'ils peuvent jouer un rôle dans l'obésité et ses comorbidités.

- Les voies dépendantes des composants bactériens

L'inflammation de bas grade, est un état commun à l'obésité et au diabète de type 2. Plusieurs études ont cherché à comprendre cette inflammation. C'est le professeur Patrice D Cani qui a montré le rôle du lipopolysaccharide (LPS), composant de la membrane externe des bactéries Gram -, surtout son augmentation dans le sang qui induit cette inflammation.

D'autres composants ont été découverts responsables de cette induction dans les modèles animaux :

- Le récepteur transmembranaire TLR-4 et son Co récepteur CD14
- le peptidoglycane, composant de la paroi bactérienne reconnu par les récepteurs intracellulaires NOD1 et 2
- Enfin, le récepteur TLR 5 serait responsable de l'induction d'une réponse immunitaire en reconnaissant la flagelline, composant du flagelle bactérien.

- La translocation bactérienne

Nous avons déjà évoqué ce passage de bactéries à travers la barrière intestinale, soit entre les cellules entre elles soit entre les entérocytes. Le même professeur patrice D Cani a mis en lumière que la voie des jonctions serrées serait responsable de la translocation bactérienne et a été établie chez les diabétiques.

Toutes ces études montrent bien l'implication du microbiote intestinal dans la survenue de l'obésité et des troubles métabolique, mais l'absence claire de lien de causalité établi nous fait rester prudent et considérer que le microbiote ferait parti d'un des facteurs de risque de ces pathologies. Cependant, tout ceci a amené les chercheurs à réfléchir a des thérapeutiques pour moduler le microbiote afin d'avoir une action préventive ou thérapeutique sur les sujets obèses ou souffrant de troubles métaboliques.

b. Thérapeutique par la modulation du microbiote

- Les prébiotiques

Les recherches ont bien évolué sur ce sujet, et grâce au séquençage, on a pu montrer que certains prébiotiques modifiaient très fortement le microbiote en faveur ou en défaveur de certaines bactéries et notamment l'inuline et les Oligo fructoses (31). L'administration de ces derniers chez la souris a permis une amélioration de l'homéostasie intestinale avec une réduction des troubles métaboliques associés ainsi que de l'inflammation. Chez l'Homme, les effets bénéfiques des prébiotiques sur la sensation de satiété, la glycémie et l'insulinémie sont bien établis, en revanche il n'en est rien de leurs effets sur le poids corporel, l'inflammation de bas grade et sur les lipides.

- Les probiotiques

Plusieurs études ont suggéré une possible amélioration de l'obésité et des comorbidités métaboliques sous probiotique. Chez les modèles murins de nombreuses études ont pu montrer des effets bénéfiques sur les taux de cholestérol, de glucose et de triglycérides. Chez l'Homme, plusieurs études japonaises ont suggéré une efficacité de *L. gasseri* sur le poids et

l'adiposité abdominal, ainsi que sur le métabolisme lipidique de patients en surpoids. Cependant, il manque d'étude chez l'homme pour conclure un réel effet probiotique et on peut dire qu'à l'avenir, une meilleure connaissance des probiotiques et de notre écosystème intestinal pourra permettre une prise en charge curative et préventive de l'obésité.

2. Allergies et microbiote

a. Implication du microbiote dans l'allergie

Pour quantifier et argumenter sur l'implication du microbiote dans le développement des maladies allergiques, des études épidémiologiques ont été réalisées et on a pu constater une variation des microbiotes selon plusieurs paramètres, à savoir le mode de vie, l'utilisation d'antibiotiques et l'exposition aux allergènes ou aux micro-organismes. Des études animales aux études sur l'homme le lien entre la réponse immunitaire notamment allergique et le microbiote a clairement pu être établie. Nous y verrons même une voie d'ouverture aux probiotiques car certaines souches seraient même potentiellement protectrices.

- **Modèles animaux**

La première étude que nous allons citer sur les modèles animaux, est apparue après la découverte du lien entre immunité innée et adaptative. Dans l'étude en question, on a sensibilisé à l'arachide des souris conventionnelles et des souris axéniques (32). Le résultat a prouvé qu'une anomalie du microbiote amenait à l'allergie. En effet, le microbiote conventionnel pourvu de bactéries du genre *Clostridium* a réduit la sensibilité à l'arachide. L'hypothèse a été que l'induction de cellules immunitaires Treg ayant la capacité de bloquer la sensibilisation et l'activation de cellules lymphoïdes innées permettrait de réduire le passage de certains allergènes alimentaires dans la circulation sanguine et ainsi limiter le risque de sensibilisation ultérieure.

Selon une autre approche, une équipe de scientifiques a cherché l'existence d'une intervention dans le but de chercher une protection anti allergique par le microbiote intestinal. Ainsi, ils ont traité des souris conventionnelles par antibiothérapie juste après le sevrage, et notèrent une augmentation significative des IgE (qui sont les principaux anticorps responsables des réactions d'hypersensibilité immédiate). Cette augmentation disparaissait après la 5e semaine de vie. Chez les souris axéniques, les IgE augmentaient progressivement de la 8e à la 12e

semaine. Chez ses dernières, l'implantation du microbiote d'un enfant de bonne santé à la 4e semaine montra une réduction significative des IgE (33). Ce travail confirme l'importance du microbiote intestinal dans l'allergie. Premièrement, il démontre le rôle de régulation que peut jouer le microbiote sur, notamment, la production d'IgE et deuxièmement, il indique l'existence d'une fenêtre précise d'intervention correspondant à la période néonatale précoce. Ces travaux ont depuis été confirmés par d'autres équipes (34), ce qui conforte l'idée que la prévention primaire de l'allergie puisse passer par une intervention précoce sur le microbiote intestinal, et cela, dès la période néonatale.

- Etudes humaines

Depuis ces études animales, des études de cohorte ont été menées chez l'humain. Elles se sont particulièrement intéressées aux anomalies des microbiotes de patients allergiques souffrant d'asthme ou de dermatite atopique. Dans un travail prospectif, une équipe a étudié le microbiote intestinal d'une cinquantaine d'enfants à 1 semaine, 1 mois et 12 mois de vie. Les auteurs ont démontré l'existence d'anomalies de sa composition dès la première semaine de vie chez les enfants qui développaient une allergie à 5 ans.

Une étude prospective hollandaise menée sur plus de 400 nouveau-nés a également observé un risque accru d'allergies lorsque la composition du microbiote intestinal était plus pauvre à 1 et 12 mois de vie. Ils ont remarqué également des sensibilisations accrues aux Aero allergènes et un plus grand nombre de rhinites allergiques à 6 ans cependant aucune différence de microbiote n'a été trouvée chez les enfants asthmatiques ou présentant une dermatite atopique.

Plus récemment, le groupe de Hua et al ont confirmé aux États-Unis que chez des adultes allergiques, il existait bien une dysbiose. En effet, en comparant la composition des microbiotes intestinaux (séquençage ARNr 16S) de 1879 patients présentant ou non une allergie, ils ont remarqué une baisse de la richesse du microbiote des patients allergiques, et ce à la fois chez les patients atteints d'allergie saisonnière et ceux allergiques à l'arachide. Cependant, aucune relation de cause à effet n'a pu être démontrée. Il est donc important de souligner qu'à ce jour, aucune démonstration claire et formelle met en relation de cause à effet les anomalies des microbiotes et les maladies allergiques.

b. Modulation du microbiote et prise en charge de l'allergie

Ces relations allergies microbiote nous aident à comprendre comment fonctionne l'allergie mais constituent-elles des options thérapeutiques ?

Comme nous l'avons vu, il semble que c'est dès les premiers mois de vie que le dialogue entre système immunitaire et microbiote est important. C'est donc assez tôt dans l'enfance que les tests sur les traitement modulateurs de notre microbiote ont été réalisés dans le cadre de la prévention de l'allergie. Quatre pistes ont été explorées : prévention de l'allergie par les prébiotiques, prévention de l'allergie par les probiotiques, prévention de l'allergie par les laits fermentés et le traitement de l'allergie par les probiotiques.

- Prévention de l'allergie par les prébiotiques

A ce jour, les études menées en réponse à une supplémentation en oligosaccharides, ont montré des augmentations significatives de bifidobactéries et de lactobacilles au niveau fécal.

L'effet des prébiotiques en prévention de l'allergie a été synthétisée dans la revue Cochrane (35), au niveau de la prévention de l'asthme infantile, une méta analyse de deux études sur 226 nourrissons n'a permis de montrer aucune différence significative. Sur l'eczéma ensuite, quatre études retenues regroupant 1 218 nourrissons ont en revanche montré une différence significative avec une réduction de la pathologie sous traitement et principalement lors d'une association synergique de galacto-oligosaccharides et de fructo-oligosaccharides. La question que se posent les chercheurs est de savoir s'il faut utiliser ces prébiotiques seulement chez les nourrissons à haut risque d'allergie ou élargir cette indication.

- Prévention de l'allergie par les probiotiques

Pour apprécier la prévention de l'allergie par les probiotiques, deux méta-analyses ont été menées en reprenant les études de prévention de l'atopie chez l'enfant par les probiotiques. La première, regroupant 29 études (36), a montré que ceux-ci avaient un effet réducteur de l'eczéma s'ils étaient administrés à 3 moments de la vie : pendant le dernier trimestre de grossesse, pendant l'allaitement et administrés aux nourrissons. La deuxième méta analyse regroupant 17 études et 4 755 enfants a également montré les vertus bénéfiques des probiotiques sur l'eczéma lorsque les nourrissons en recevaient et particulièrement lors de

mélange de souches. Cependant, dans ces deux méta analyses il n'a été montré aucun effet préventif sur l'asthme.

- Prévention de l'allergie par les laits fermentés

Ce sont des laits qui vont être fermentés par des bactéries pendant la production, ces bactéries vont produire de l'acide lactique. Des études animales ont montré un impact de ces produits de fermentation sur la composition du microbiote intestinal. Mais chez l'homme, seulement cinq essais randomisés contrôlés ont été recensés et ont comparé l'utilisation d'un lait fermenté contre un lait standard et seulement un seul a essayé de chercher le devenir allergique. Dans celui-ci, aucune différence pour l'incidence de l'allergie au lait de vache n'a été rapportée mais chez les nourrissons se servant d'un lait fermenté, une réduction des manifestations respiratoires potentiellement allergique était notée mais aucune réduction sur les manifestations cutanées.

- Traitement de l'allergie par les probiotiques

Enfin, le traitement par les probiotiques. Chez les nourrissons, l'allergie alimentaire la plus fréquemment observée est celle aux protéines de lait de vache (PLV). La plupart des nourrissons vont guérir avant l'âge de 3 ans, cependant, dans les formes dépendantes aux IgE on note une persistance à l'âge scolaire avec un impact négatif sur la qualité de vie. Dans le but de réduire cet impact et pour changer des méthodes classiques d'induction d'une tolérance par exposition répétée à de faibles quantités de PLV, une modulation du microbiote par les probiotiques pour améliorer la tolérance a été recherchée. Une étude utilisant une association de souches de *Lactobacillus casei* CRL431 et de *Bifidobacterium lactis* Bb-12, n'a montré aucune guérison plus rapide dans le groupe sain par rapport au groupe probiotique (37). En revanche, un groupe de chercheurs italien a ajouté une souche de *Lactobacillus* GG à un hydrolysate de PLV et a remarqué que ce cocktail modifiait positivement le microbiote intestinal des nourrissons et ceux-ci acquéraient plus rapidement une tolérance.

Chez l'adulte maintenant, on a cherché à tester l'utilisation de probiotiques sur la rhinite allergique. Une méta analyse regroupant 23 études et 1919 patients, n'a montré aucun effet sur les symptômes ou sur le niveau d'IgE totales, mais une amélioration du score de qualité de vie chez les patients probiotiques contre placebo. (38)

En conclusion, ces données existantes ne montrent pas encore une nette amélioration dans la prise en charge de l'allergie de pré ou probiotiques chez l'enfant, cependant, les choses évoluent.

En 2011, la société européenne de gastroentérologie pédiatrique ne recommandait pas l'utilisation de probiotiques dans cette pathologie, cependant, aujourd'hui, la société internationale d'allergologie la recommande dans la prévention de l'eczéma de l'enfant dans les situations de risque atopique chez les femmes enceintes ou allaitantes et chez les nourrissons, ainsi que l'utilisation de prébiotiques chez les nourrissons à risque atopique allaités non exclusivement au sein. Il est donc nécessaire de se servir de la modulation du microbiote intestinal à l'avenir, pour prévenir ou traiter l'allergie, en recherchant la parfaite association de souches probiotiques.

3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

a. Les MICI et le microbiote intestinal

Les MICI, c'est à dire les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, regroupent deux maladies, la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ce sont deux pathologies possédant une prédisposition génétique, et chez lesquelles on observera une activation inappropriée du système immunitaire muqueux intestinal, entraînant une inflammation chronique d'une portion de l'intestin.

On diagnostique cette maladie facilement à l'aide de l'endoscopie, lorsqu'il y a suspicion et signes inflammatoires tels que l'élévation de la protéine C réactive (CRP).

Afin d'apprécier les dysbioses intestinales et leur lien avec le microbiote, des études ont été menées sur le microbiote fécal et muqueux, en particulier à l'aide de la métagénomique. Il en est ressorti des anomalies communes à toutes les MICI telles que l'instabilité et la diminution de la richesse microbienne, ainsi qu'une restriction du groupe des Firmicutes. D'autres anomalies sont plus spécifiques de certaines MICI. Enfin pour appuyer le rôle potentiel du microbiote, il existera des gènes impliqués dans les MICI et sont tous liés aux interactions entre le système immunitaire et les bactéries commensales : les gènes NOD2, IL-23R, ATG16L1 et enfin IRGM. (39)

Et de plus, le fait qu'un manque de défensines intervenait dans la survenue de la maladie de Crohn est venu renforcer le lien entre microbiote intestinal et MICI. En effet ces défensines sont des peptides antibactériens produits dans l'intestin.

Cependant, aucune étude claire n'a permis d'établir de lien entre le microbiote sain et la réponse immunitaire exagérée ou si c'est une réponse immunitaire normale associée à un microbiote anormal (Shanahan et Quigley, 2014).

b. Modulation du microbiote intestinal

Nous avons tout de même recherché à moduler notre microbiote intestinal pour améliorer la qualité de vie des patients atteints de MICI et leur prise en charge.

Tout d'abord, par les prébiotiques, dans ce cadre, aucun essai randomisé contrôlé n'a permis de démontrer une efficacité dans ces pathologies et n'ont donc reçu aucune recommandation de la part d'autorités sanitaires. Cependant, l'espoir reste permis, dans ces maladies les patients atteints ne mangent que très peu de fibre (Principi M, et al 2018). Or nous savons qu'un régime pauvre en fibres constitue une déplétion de la richesse microbienne de la flore, surtout en Firmicutes. Des essais thérapeutiques ont testé la complémentation en FOS chez ces sujets, mais les effets sur le microbiote n'avaient aucun effet sur l'inflammation, seule la qualité de vie se trouvait légèrement augmentée. (40)

Puis des probiotiques ont été testés, nous n'avons pas beaucoup d'utilisations dans la littérature, probablement dû à l'absence de place de ceux-ci dans la prise en charge de ces pathologies, mais il est ressorti tout de même quelques résultats positifs. Notamment une, que les recommandations européennes mentionnent, concernant un cocktail de 8 souches probiotiques (Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BL03 x, Bifidobacterium animalis subsp. Lactis BI04 y, Lactobacillus acidophilus BA05, Lactobacillus plantarum BP06, Lactobacillus paracasei BP07, Lactobacillus helveticus BD08 z), dénommée VSL#3. Pour citer les recommandations ce cocktail « a une efficacité pour maintenir la rémission induite par antibiotique et une efficacité pour prévenir la rechute ». Dans le traitement des poussées de RCH non sévères « il semble (niveau de preuve limité) que certains probiotiques, notamment ce cocktail, aient un bénéfice thérapeutique quand on les ajoute au traitement usuel ». A noter tout de même que VSL#3 n'a aucune efficacité démontrée dans la maladie de

Crohn. Du fait de l'importante consommation des probiotiques des patients, leurs utilisation fait l'objet d'importantes recherches in vitro et in vivo.

4. Syndrome de l'intestin irritable

a. SII et microbiote intestinal

Le syndrome de l'intestin irritable est un trouble digestif fonctionnel que l'on peut caractériser par des troubles du transit avec douleurs abdominales. Ce trouble est beaucoup mieux décrit depuis la réactualisation de 2016, qui a vu l'émergence des critères de Rome IV, qui a divisé le SII en 3 sous types, selon le trouble dominant.

Douleurs abdominales récurrentes, survenant en moyenne une fois par semaine, dans les trois derniers mois, associées avec au moins deux des critères suivants :

- en lien avec les exonérations de selles,
- associées à une modification de la fréquence des selles,
- associées à une modification de la consistance (apparence) des selles.

Ces critères doivent être présents sur les 3 derniers mois et avoir débuté depuis au moins 6 mois.

Le SII est classé selon le trouble prédominant :

- SII-C avec constipation prédominante.
- SII-D avec diarrhée prédominante.
- SII-M de type mixte (ou indéterminé ou douloureux uniquement).

Tableau 6 : Critères diagnostique du SII selon les critères de Rome IV

Il n'est plus considéré comme exclusivement colique, mais c'est bien une pathologie multifonctionnelle, complexe. Une hypersensibilité viscérale, une micro-implication tissulaire, et une implication de l'axe cerveau intestin à récemment été mises en avant. Un seul acteur majeur est susceptible d'interagir avec tous ces points, le microbiote intestinal.

C'est par les observations cliniques que l'implication du microbiote intestinal dans les douleurs liées au SII a été suggérée. Tout d'abord, l'apparition d'un syndrome de l'intestin irritable ou de symptômes compatibles a été établi après un épisode de gastro-entérite aigue.

La comparaison de composition des microbiotes de patients atteints d'un SII et de patients sains ont montré des différences de profils : moins de population bactérienne et une instabilité du microbiote fécal dominant. De plus, le rapport *Firmicutes/bactéroïdes* a été rapporté augmenter en rapport avec les sujets asymptomatiques et une diminution de densité de certains groupes bactériens a aussi été remarquée (*Bifidobacterium*, *Prevotella* et *faecalibacterium*). Plusieurs grands mécanismes sont impliqués dans les interactions entre le microbiote intestinal et la physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable : l'activité fermentaire des bactéries du microbiote et la dysfonction de la barrière intestinale, entraînant une activation d'immunitaire de la muqueuse.

En ce qui concerne l'activité fermentaire, nous avons précédemment précisé les rôles du microbiote intestinal dans la digestion, par production après fermentation de gaz et de ballonnements, mais aussi d'acides gras à chaîne courte. Ces derniers vont moduler la relaxation de l'estomac, la motricité et donc influencer la vidange gastrique. Ainsi une modification dans la composition peut traduire des effets cliniques tels que syndromes dyspeptiques ou reflux gastro œsophagien deux troubles retrouvés dans le SII. Il est essentiel également de prendre en compte le temps de transit, un temps de transit court sera associé à une flore possédant des bactéries à croissance rapide, et qui produiront des métabolites différents. C'est pourquoi dans le cadre de cette pathologie, il faut contrôler le temps de transit, qui va modifier la composition de la flore intestinale et non pas seulement décrire une richesse du microbiote associé à un écosystème sain.

b. Modulations du microbiote dans le SII

C'est majoritairement par les probiotiques que la modulation du microbiote intestinale est étudiée de nos jours, en plus d'un régime alimentaire plus adapté et de la mise en place d'une activité physique régulière.

Dans la prise en charge du syndrome de l'intestin et du côlon irritable, certains probiotiques ont montré de bons résultats en modulant de manière positive l'apparition des symptômes chez les patients.

Dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo, l'administration pendant 4 semaines d'un mélange probiotique a ainsi entraîné une diminution significativement plus importante de la douleur abdominale entre la première et la dernière semaine de traitement,

une diminution du score de douleur abdominale chez les patients avec alternance diarrhée-constipation et une augmentation de la fréquence des selles chez les patients souffrant de SII avec constipation prédominante dès la première semaine de traitement. Dans certaines de ces études, l'amélioration symptomatique était associée à une amélioration du rapport entre les cytokines anti-inflammatoires et pro inflammatoires [IL-10/IL-12], suggérant bien un effet immunomodulateur du probiotique (41)

D'autres études portées sur la souche autrefois appelée *Bifidobacterium infantis* ou Bifantis, aujourd'hui connue sous le nom *Bifidobacterium longum* 35624 est utilisée dans plusieurs produits pharmaceutiques dans le traitement symptomatique de cette pathologie ont montré des gains thérapeutiques significatifs. (42) De plus, *Lactobacillus reuteri* pourrait également améliorer certains symptômes, il serait intéressant de mesurer l'association de ces 2 souches dans le cadre de cette pathologie.

Nous pouvons donc dire que ces études suggèrent que certaines souches ou mélange de souches devraient être bénéfique pour traiter de manière symptomatique le syndrome de l'intestin irritable et devraient avoir une place dans l'arsenal thérapeutique. Cependant, les preuves concernant leurs effets réels étant insuffisante, elles ne peuvent pas être prescrites systématiquement mais reste à l'appréciation du médecin prescripteur, du pharmacien et du patient lui-même. Il est évident cependant de la nécessité de continuer et d'approfondir les recherches dans cette pathologie, pour un jour peut être avoir un réel arbre décisionnel basé sur les probiotiques.

5. Diarrhées et Microbiote intestinal

a. Diarrhées aiguës infectieuses

Lors d'un épisode de diarrhée aiguë infectieuse, un examen des selles peut mettre en évidence un agent pathologique. Le plus souvent, c'est le symptôme d'une infection gastro-intestinale due à des virus, parasites ou bactéries.

Il n'existe pas d'études des ARN ribosomiaux 16S chez l'homme au vu des difficultés du dénombrement bactérien lors d'épisodes de diarrhée.

Cependant, les travaux anciens ayant étudiés ces épisodes dans des pays en voie de développement montraient une augmentation des bactéries aérobies et une nette diminution des anaérobies. Ce taux se retrouve dans le côlon droit, une hypothèse estimerait que l'afflux

d'eau et d'électrolytes déplacerait une partie du microbiote du colon droit au niveau du colon gauche et des selles.

C'est pourquoi, aujourd'hui, l'ESPGHAN, la société européenne de gastroentérologie, d'hépatologie et de nutrition pédiatriques préconise et recommande l'utilisation de probiotiques, c'est à dire l'utilisation de bactéries vivantes pour traiter la diarrhée en plus des mesures hygiéno-diététiques afin de restaurer la flore intestinale. Le *Lactobacillus GG* et *Saccharomyces boulardii* sont recommandées en complément de la réhydratation orale s'il y eu déshydratation dans le traitement de la diarrhée aigue de l'enfant.

b. Diarrhée post antibiotique

Elle est définie par l'émission d'au moins trois selles très molles à liquides inexplicées, par 24 heures, pendant au moins 24 heures, survenant pendant un traitement antibiotique, ou dans les deux mois suivant son arrêt.

Trois situations sont alors possibles :

- Diarrhée simples,
- Colites hémorragiques, le plus souvent dues à *Klebsiella oxytoca*, souche toxigène
- Colite pseudomembraneuse, on va avoir ici une rupture de la barrière intestinale et émergence de *Clostridium difficile*.

Barc MC et al, en 2004 (43) ont publié une étude sur les effets de l'amoxicilline et de l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique sur des microbiotes de souris. Il en est ressorti une perte de l'effet protecteur du microbiote intestinal avec un retour à la normale peu de temps après l'arrêt du médicament. On peut donc penser que les antibiotiques inhibent la croissance des bactéries, mais n'éradiquent pas de manière irréversible la flore intestinale.

La diarrhée simple peut apparaitre après l'instauration de l'antibiothérapie, quelques jours seulement après et rester jusqu'à 6 semaines après l'arrêt du traitement. Elle n'est pas accompagnée de fièvre, ni de douleurs abdominales. Si on arrête la cause de cette diarrhée, à savoir les antibiotiques, alors elle va régresser voire disparaître et ce, seulement quelques heures voire jour après son arrêt.

Une méta analyse a étudié l'effet et affirmé le rôle des probiotiques dans ce cadre. Dans cette étude, les odd ratio (mesure statistique, qui lorsqu'elle s'éloigne de 1 correspond à un effet important de la variable étudié, ici les probiotiques) de lactobacillus spp était de 0.34 avec un intervalle de confiance de 95% et pour Saccharomyces boulardii de 0.39 avec un intervalle de confiance à 95 %. Permettant ainsi de placer le microbiote au centre de cette pathologie et montrant l'importance d'un complément alimentaire à base de probiotiques pour favoriser sa restauration et ainsi diminuer l'apparition des symptômes.

Pour la colite pseudomembraneuse, c'est une inflammation sévère du côlon, caractérisée par des diarrhées sévères et abondantes dues à la présence de fausses membranes sur la paroi du côlon. Ces infections sont dues à Clostridium difficile, survenant après la prise d'antibiotiques. Il va y avoir rupture de la barrière naturelle créée par le microbiote intestinal. Une fois dans le côlon, les spores de C. difficile se transforment en entérotoxines, créant alors une inflammation et une diarrhée.

Il existe un paradoxe dans cette maladie, car elle va être traitée par des antibiotiques, qui à leur tour vont altérer le microbiote et donc provoquer une récurrence à C. difficile dans 20 à 30 % des cas. Le chirurgien américain Eisenmann en 1958 a proposé une alternative, la transplantation de microbiote fécal. Plusieurs publications ont alors émergé sur l'intérêt de cette technique, nous allons donc développer cette technique par la suite.

En conclusion, dans le cadre de diarrhées et de diarrhées post antibiotiques, c'est bien notre microbiote intestinal qui sera agressé et verra sa composition modifiée. Sa restauration par les probiotiques est bien documentée et validée par de nombreuses études, et devrait être systématiquement conseillée à l'officine en plus des mesures de réhydratation orale s'il y a déshydratation et des mesures complémentaires telles que les règles hygiéno-diététiques. Ils permettent de restaurer notre flore commensale attaquée par la prise d'antibiotiques, sans avoir de contre-indications et très peu d'effets indésirables. Il est nécessaire de sensibiliser les patients sous ces traitements et ce même si les probiotiques ne sont pas remboursés ou prescrits par le médecin.

6. Transplantation de microbiote fécal (TMF)

a. Explication et cadre législatif de la méthode

C'est une méthode très ancienne, en remontant au IV^e siècle, c'est Zhou Hou Bei Ji Hang, dans son livre sur la médecine chinoise qui la recommandait en cas d'intoxication alimentaire ou de diarrhée sévère et qualifiait son efficacité de miraculeuse.

Selon l'ANSM, la TMF « consiste en l'introduction des selles d'un donneur sain dans le tube digestif d'un patient receveur afin de rééquilibrer la flore intestinale altérée de l'hôte » (44). A la différence du don du sang, l'unicité du donneur n'est pas obligatoire, car il n'a pas été démontré que la sélection d'un seul donneur était bénéfique en comparaison à celle de plusieurs donneurs. De plus, actuellement il n'y a pas de contre-indications à la TMF, mais nous n'avons pas assez de recul pour la recommander dans beaucoup de pratique. L'ANSM estime qu'elle doit « être réservée aux situations graves ou rares, en échec de traitement conventionnel et en l'absence d'alternative thérapeutique disponible et appropriée ». Tout en alertant sur les effets à court terme (infectieux allergiques etc....) ou à long terme, surtout chez les immunodéprimés.

Cette méthode ne bénéficie pas de cadre universel, en France, aux Etats unis elle est définie comme un médicament, au Royaume-Uni, le Danemark ou aux Pays-Bas, non. En France, elle relève des cadres législatif et réglementaire applicables aux préparations magistrales et hospitalières ou aux médicaments expérimentaux destinés à un essai clinique (articles L. 5121-1 et L. 5121-1-1 du Code de la Santé publique).

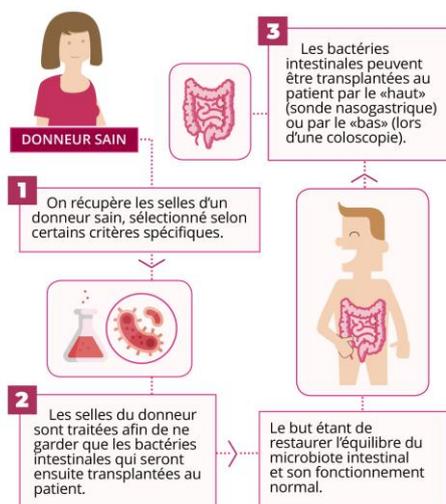


Figure 15 : Principe de la TMF

b. Composition et Mécanisme d'action

Ce n'est pas un probiotique, en effet les probiotiques sont composés de souches bactériennes sélectionnées rigoureusement. Tandis que les selles sont complexes, composées de nombreux composants (bactéries, archées, virus, cellules épithéliales, champignons et levures...). Elle nécessite d'être bien étudiée pour comprendre les mécanisme de chacun sur l'hôte et éviter les risques infectieux, métaboliques ou cancérigènes que pourraient faire courir au receveur la transplantation d'un contenu bactérien non caractérisés. C'est dans ce but, qu'une suspension de selles rendues stériles par ultrafiltration a été suggérée, surtout dans le cadre d'un patient immunodéprimé. (45)

Pour comprendre le mécanisme d'action, c'est dans l'infection à Clostridioides difficile (renommée en 2016 Clostridium difficile) que quatre hypothèses ont été émises.

1. Compétition pour les ressources nutritives, les nutriments dont se sert la bactérie pour vivre, étant accessible par les antibiotiques par destruction de la flore redeviendrais de nouveau consommés par des bactéries introduites par la Transplantation de microbiote fécal
2. La réintroduction de bactérie permettrait la restauration de la production de bactériocines et donc d'activité bactéricide ou bactériostatique.
3. La troisième sur l'inhibition de la germination des spores médiée par les acides biliaires : si les acides biliaires primaires stimulent la germination des spores de C. difficile, les secondaires l'inhibent. En rétablissant rapidement le métabolisme secondaire des acides biliaires par l'apport de nouvelles bactéries, la TMF permettrait de rééquilibrer la concentration combinée des acides biliaires présents dans la lumière intestinale et ainsi de freiner la croissance de C. difficile
4. Et enfin la résistance a la colonisation via le système immunitaire apporté par les éléments permettant de restaurer la barrière épithéliale et la production de mucine et de peptides anti microbiens

En clair c'est tous les mécanismes du microbiote intestinal qui serait réactivés par la transplantation.

c. Indications

La seule indication validée est la colite à *C. difficile* récidivante. C'est une bactérie qui va libérer des spores toxinogènes lors de son métabolisme anaérobie. Elle est responsable de 20 à 25% des diarrhées associées aux antibiotiques et des colites pseudo membraneuses.

D'autres indications sont en train d'être étudiées, car le déséquilibre du microbiote étant un facteur, la rééquilibration pourrait avoir de l'intérêt :

- Les MICI

Nous avons déjà cité les dysbioses possible du microbiote et son lien dans ces pathologies. Dans ce cadre, des essais de TMF chez des patients souffrants de MICI ont été réalisés et ont suggéré une efficacité. Dans la rectocolite hémorragique, trois essais randomisés contre placebo ont essayé des TMF de manière répétées pour guérir cette pathologie avec 30% de taux de rémission (45). Dans ce cadre ci et au vu des doses répétées, il faudrait cependant changer le conditionnement afin d'alléger la prise du traitement et favoriser l'observance, par exemple sous forme de gélules.

Cependant, dans le cadre de la maladie de Crohn et dans les pochites, aucune étude récente n'a été recensée, c'est pourquoi en 2017 une méta analyse a rappelé la nécessité de confirmer les TMF dans ces indications. (46)

- Les troubles fonctionnels intestinaux

Il est normal après avoir étudié la prise en charge des MICI de chercher à étendre l'indication de la TMF dans les pathologies de l'intestin. En premier lieu, on a cherché à améliorer la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable modéré à sévère avec diarrhées ou diarrhées Et constipation. Sur 90 patients traités, 60 ont reçu une TMF et 30 ont eu un placebo c'est à dire qu'on leur a transplanté leur propre microbiote. Sur une période de 3 mois, une amélioration des symptômes a été recensé chez 65% des patients sous TMF contre 43% chez le groupe placebo (47). A noter que 12 mois après le début de cette étude aucune différence notable n'a été reportée. L'étude ne portant que sur 90 patients, elle avait la nécessité d'être reproduite pour avoir une réelle signification. Cependant, une étude danoise a reproduit le même principe et a noté deux choses, une modification du microbiote du groupe TMF contre

placebo mais aussi une amélioration des symptômes chez le groupe placebo à 3 mois, ne faisant donc pas écho à l'étude précédente (48). Tout ceci montre bien qu'il est nécessaire de compléter la littérature par d'autres études avant de pouvoir conclure sur le rôle de la TMF dans les troubles fonctionnels intestinaux.

- Pathologies neuro psychiatriques

Nous avons vu tout à l'heure qu'il existe un axe cerveau intestin, et c'est devant cette hypothèse que plusieurs chercheurs se sont mis à rechercher et restaurer la richesse du microbiote intestinal dans la survenue de certaines pathologies neurologiques ou psychiatriques. Des cas de TMF ont été rapportés dans la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques (SEP) ou l'épilepsie. En 2017, un essai thérapeutique en ouvert a évalué cette pratique chez des enfants atteints d'autisme (49). Pour moduler le microbiote, un traitement antibiotique a été instauré et une préparation colique réalisée. Ensuite, les 18 enfants ont été traités par une forte dose de microbiote fécal administré par voie haute ou basse puis, pendant 7 à 8 semaines, en entretien, par des gélules moins dosées associées à des antiacides. Les résultats montrèrent alors une amélioration des symptômes, rien n'a permis de dire que c'était exclusivement dû à la TMF et non à d'autres éléments inclus dans le protocole. Cependant ces résultats prometteurs sont intéressants et ont amené la recherche de nouvelles études dans cette indication et dans la SEP.

- Dans le cadre des bactéries multi résistantes

Une Bactérie Multirésistante aux antibiotiques (BMR) est une bactérie qui n'est plus sensible qu'à un très petit nombre d'antibiotiques. Toutes les bactéries peuvent développer une multirésistance, qu'elles soient impliquées dans les infections communautaires ou dans les infections nosocomiales. C'est un problème avec un enjeu majeur au vu du nombre d'antibiotiques consommés chaque année et du nombre de pathologies nécessitant ce traitement.

Dans ce cadre, et pour éradiquer définitivement ces bactéries, la TMF est une piste très sérieuse. Une étude pilote multicentrique réalisée en France chez des sujets porteurs d'entérobactéries résistantes au carbapénème (n=8) et d'entérocoques résistants à la vancomycine (n=8), deux antibiotiques, a ainsi montré l'efficacité de cette technique pour 11 de ces patients (4 et 7 respectivement) (50). De plus, une autre étude polonaise cette fois-ci a

montré chez des patients colonisés par des souches de BMR une éradication complète de ces dernières sans aucun évènement grave.

En conclusion, il ressort de toutes ces études de résultats potentiellement intéressants dans des pathologies très diverses et pour lesquelles la prise en charge pourrait se retrouver grandement améliorée avec seulement une modulation du microbiote et l'essor de la TMF, tout cela sans aucun évènement indésirable grave apparu. La formulation sera également une étape déterminante, en effet si on arrive à trouver une galénique intéressante telle que des gélules, l'observance ne sera que meilleure. Cependant, il ne faut pas oublier la possible transmission d'agent pathogène, et quelles seraient les conséquences d'une transmission pathogène chez des patients ayant des terrains sensibles tel que le patient immunodéprimé. Il est donc dans un premier temps nécessaire de standardiser la transplantation de microbiote fécal au niveau international et définir des conditions de sécurité pour les donneurs et les receveurs dans le but de continuer à mener des études et des essais cliniques pour des pathologies chroniques incurables telles que l'obésité ou encore les MICI. Les prochaines années devraient donc être décisives afin de prouver ou non la place de la transplantation de microbiote dans cet arsenal thérapeutique limité

Conclusion

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui, dans un état sain, fournit des fonctions majeures à l'hôte en influençant le métabolisme, en modulant le système immunitaire et en protégeant contre les agents pathogènes. Depuis de longues années, nous cherchons à explorer notre microbiote pour tenter de comprendre ces relations avec le corps humain, en passant par une définition précise de sa structure et des grands groupes bactériens le composant et apprécier sa diversité.

Nous avons tout d'abord reproduit des modèles de digestions statiques puis dynamiques, mais, 90 % des espèces du microbiote intestinal n'étant pas cultivables en laboratoire, l'avènement du séquençage de l'ADN et de la métagénomique a aidé à comprendre précisément sa structure et a ainsi permis aux chercheurs de se pencher sur l'étude de ses fonctions voire de sa modulation pour lui trouver un intérêt thérapeutique.

C'est ainsi que nous avons découvert son implication dans de nombreuses pathologies digestives et métaboliques.

Au vu de toutes les études citées dans ce travail, il semblerait que certaines pathologies aient un lien clairement établi avec notre microbiote tandis que pour d'autres, ce lien est moins clair. Il se pourrait que ce ne soit qu'un facteur de plus dans la survenue de ces maladies humaines.

Ce rôle est donc clairement établi dans certaines diarrhées et notamment celles associées aux antibiotiques, dans l'obésité et certains troubles métaboliques associés, ainsi que le syndrome de l'intestin irritable. Cependant, malgré les nombreuses études prometteuses, il reste à prouver dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et de certaines allergies, pour lesquelles, les prochaines années devraient être décisives au vu du grand nombre de recherches engagées.

Pour ces pathologies avec un lien confirmé, il apparaît bien que le microbiote intestinal soit une cible prometteuse pour un traitement préventif et thérapeutique et dans un avenir proche. Les prébiotiques et probiotiques sont des médicaments très intéressants car ils n'ont que très peu d'effets indésirables et pratiquement aucune contre-indication.

Il faut tout de même rester prudent au vu du grand nombre de produits existants et de la grande variété d'indications que les différents laboratoires préconisent.

De plus, le microbiote intestinal peut être principalement modulé par l'alimentation et c'est là que joue une grande variabilité inter individuelle et ainsi une réponse différente aux traitements pouvant exister.

C'est pourquoi dans ce travail, vis-à-vis de l'étude de la littérature et des études scientifiques, je conclurai uniquement sur l'utilité d'une modulation du microbiote dans le cadre d'études validées par les autorités sanitaires. Ils sont déjà recommandés et validés par les autorités nationales dans le cadre de la diarrhée chez l'enfant, la diarrhée associée aux antibiotiques et pour le SII.

J'espère que dans les années à venir nous pourrons lui trouver un effet préventif sur l'obésité, les maladies métaboliques telles que le diabète de type II et l'allergie.

Enfin, il y a également deux pistes très intéressantes à développer dans le futur : la possibilité de séquencer son propre génome microbien intestinal par des laboratoires privés dans le but de connaître exactement notre composition, et nos besoins bactériens. Ainsi que l'avènement de la transplantation de microbiote fécal, réelle thérapie prometteuse, qui nécessite une harmonisation dans le droit international et dans les méthodes, mais qui pourrait à terme nous permettre de prévenir de certaines pathologies psychiatriques, de MICI et surtout de répondre au problème des bactéries multirésistantes émergentes.

➤ Références

- (1) Composition of the early intestinal microbiota,
- (2) Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010
- (3) Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev* 2010
- (4) Goldani HAS, Bettiol H, Barbieri MA, Silva AAM, Agranonik M, Morais MB, et al. Cesarean delivery is associated with an increased risk of obesity in adulthood in a Brazilian birth cohort study. 2011
- (5) Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2010
- (6) Corryn Greenwood, Ardythe L. Morrow, Anne J. Lagomarcino, Mekibib Altaye, Diana H. Taft, Zhuoteng Yu, David S. Newburg, Doyle V. Ward, Kurt R. Schibler, 2004 Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of Enterobacter
- (7) Anne Donnet-Hughes et al, Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education, 2010
- (8) [Http://medbox.iiab.me/modules/encdc/www.cdc.gov/breastfeeding/data/nis_data/index.htm](http://medbox.iiab.me/modules/encdc/www.cdc.gov/breastfeeding/data/nis_data/index.htm)
- (9) Gaboriau-Routhiau, Valérie ; Cerf-Bensussan, Nadine (2016). Microbiote intestinale et développement du système immunitaire. *Médecine/sciences*, 32(11), 961–967
- (10) Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microb Ecol*. 1998
- (11) Marteau et al., *J Dairy Science* 80 :1031–1037, 1997 ; Verwei et al., *J Nutri* 136 :3074–2078, 2006/9-
- (12) Minekus M. The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM) In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham (CH) : Springer ; 2015. Chapter 5
- (13) <https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents/dinformation/sequencage-de-sanger>
- (14) Khan Academy (modifié en 2020), Dna sequencing, Method of Sanger sequencing, Khan Academy (en ligne).

- (15) Juliane C. Dohm, Claudio Lottaz, Tatiana Borodina, Heinz Himmelbauer, Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing, *Nucleic Acids Research*, Volume 36, Issue 16, September 2008,
- (16) Edward David Hyman, A new method of sequencing DNA, *Analytical Biochemistry*, Volume 174, Issue 2, 1988
- (17) Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996
- (18) Bennet R, Eriksson M, Nord CE. The fecal micro-flora of 1–3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection* 2002 ; 30 :158-60
- (19) Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, et al.; INFABIO team. Déterminants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* 2011
- (20) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poulet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010
- (21) « Human Microbiome Project / Science Publications », The NIH Common Fund
- (22) Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ;
- (23) Miller CP, Bohnhoff M, Rifkind D. The effect of an antibiotic on the susceptibility tract to salmonella infection. 1957
- (24) Bernalier A., Rochet V., Leclerc M., Doré J., Pochart P. Diversity of H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacteria from feces of non-methane-producing humans. *Curr. Microbiol.*, 1996,
- (25) Schmiel D.H., Miller V.L. – Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect.*, 1999, 1, 1103-12
- (26) Organisation des Nations Unies pour l'alimentation, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria Cordoba, Argentina, 2001
- (27) Fitzpatrick K .C Probiotiques : document de travail rapport présenté à la direction des produits de santé naturels, santé Canada 2005.
- (28) Enster K, Freeburg B, Hollard C, et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*. 2019

- (29) GOULET O. « Un probiotique pas comme les autres : d'une histoire tropicale à des propriétés biologiques et des effets cliniques prouvés ». *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. Septembre 2009. Vol. 22, n°6, p. 269-272
- (30) <https://www.biolineaires.com/75-des-francais-veulent-identifier-les-probiotiques-sur-les-complements-alimentaires/>
- (31) Everard A, Lazarevic V, Gaïa N, et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J*. 2014 Oct;8(10):2116-30
- (32) Stefká AT, Feehley T, Tripathi P, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9;111(36):13145-50.
- (33) Blazquez AB, Faith JJ, Sampson HA, et al. Microbial Regulation of IgE Production in Early Life. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2): AB67
- (34) Abrahamsson TR, Wou WR, Jenmalm MC. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatr Res*.
- (35) Osborn DA, Sinn JK. Prebiotics in infants for prevention of allergy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Mar 28;3:CD00647
- (36) Cuello-Garcia CA, Brozek JL, Fiocchi A, et al. Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol*. 2015
- (37) Hol J, van Leer EHG, Elink Schuurman B, et al. The acquisition of tolerance toward cow's milk through probiotic supplementation: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2008
- (38) Zajac AE, Adams AS, Turner JH. A systematic review and metaanalysis of probiotics for the treatment of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015 Jun.
- (39) Maryline Drouet. Influence de la mutation NOD2 et d'un traitement antibiotique sur la colonisation et la pathogénicité d'AIEC dans l'exploration de la maladie de Crohn. *Médecine humaine et pathologie*. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012
- (40) Cox SR, et al. Effects of Low FODMAP Diet on Symptoms, Fecal Microbiome, and Markers of Inflammation in Patients with Quiescent Inflammatory Bowel Disease in a Randomized Trial. *Gastroenterology* 2020.
- (41) La revue des microbiotes n°6 microbiote et SII
- (42) Quigley EMM, Flourié B. Probiotics, and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. 2007
- (43) Barc MC, Bourlioux F, Rigottier-Gois L, et al. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on human fecal flora in a gnotobiotic mouse model assessed with fluorescence hybridization using group-specific 16S rRNA probes in combination with flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 200
- (44) ANSM. La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques. Novembre 2016

- (45) Ott SJ, et al. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium Difficile Infection. *Gastroenterology*. 2017
- (46) Paramsothy S, et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebocontrolled trial. *Lancet*. 2017
- (47) Paramsothy S, et al. Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Crohn's Colitis*. 2017
- (48) Johnsen PH, et al. Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018
- (49) Halkjær SI, et al. Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Gut*. 2018
- (50) Kang D-W, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. 2017
- (51) inh A, et al. Clearance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae vs vancomycin-resistant enterococci carriage after faecal microbiota transplant: a prospective comparative study. *Journal of Hospital Infection*. 2018

➤ Bibliographie

LIVRES:

- GASTROENTEROLOGY Vol. 134, No. 2, Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases
- Cah h. Nutr. Diét., 42, Hors-série 2, 2007, PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES

PROBIOTIQUES

- La revue des microbiotes Numéro 1 : des micro-organismes et des hommes
- La revue des microbiotes Numéro 4 : Microbiote intestinal, obésité et troubles

Métaboliques associés

- La revue des microbiotes Numéro 5 Microbiotes et allergies
- La revue de microbiotes Numéro 6 : Microbiote et syndrome de l'intestin irritable
- La revue de microbiotes Numéro 13 : La transplantation de microbiote fécal
- REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUILLET/AOÛT 2016 - N°484

Médecine/sciences 2016 numéro 32

SOURCES :

- <https://www.afa.asso.fr/wp-content/uploads/2020/03/TOUT-SAVOIR-SUR-LE-TUBE-DIGESTIF-ET-LA-DIGESTION.pdf>
- https://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/module_Physiologie_58.html
- <http://campus.cerimes.fr/histologie-et-embryologie-medicales/enseignement/histologie13/site/html/3.html>
- <http://campus.cerimes.fr/histologie-et-embryologie-medicales/enseignement/histologie13/site/html/cours.pdf>
- https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Anatomie_et_physiologie_du_systeme_digestif.pdf
- https://www.infirmiers.com/pdf/cours-en-vrac/appareil_digestif.pdf
- https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/10046/SKS_2011_Inflammation_chapitre2_OCR.pdf?sequence=16&isAllowed=y

- <http://campus.cerimes.fr/histologie-et-embryologie-medicales/enseignement/histologie13/site/html/cours.pdf>
- cri-net.com/ckfinder/userfiles/files/formation/fichesImmuno/Chap_1.pdf
- <https://biologiepathologie.chu-lille.fr/enseignement/Immunologie%20IFSI%20pdf.pdf>
- http://backup.mediterranee-infection.com/arkotheque/client/ihumed/_depot_arko/articles/346/ifsi-textoris
- <http://www.ifsidijon.info/v2/wp-content/uploads/2014/11/la-structure-generale-du-systeme-immunitaire-2014>
- <https://www.inserm.fr/dossier/microbiote-intestinal-flore-intestinale/#:~:text=Un%20microbiote%20est%20l'ensemble,%2C%20du%20vagin%2C%20des%20poumons%E2%80%A6>
- <https://sante.lefigaro.fr/article/les-microbes-de-la-mere-peuplent-l-intestin-du-bebe/>
- <https://dridk.me/metagenomique.html>
- <https://blog.nahibu.com/quelle-est-la-meilleure-analyse-du-microbiote-intestinal/>
- <https://lejournel.cnrs.fr/articles/la-revolution-metagenomique>
- Comparative Analysis of Intestinal Tract Models, February 2015 Annual Review of Food Science and Technology 6 DOI: 10.1146/annurev-food-022814-015429
- http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/fiche_ensavoirplus_lien_PCR_vf.pdf
- <https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents-dinformation/sequencage-de-sanger>
- <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hsmolecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
- <https://tice.agrocampus-ouest.fr/mod/glossary/showentry.php?eid=432>
- <http://www.biorigami.com/?tag=ion-torrent>
- <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-revolution-de-la-genomique-les-nouvelles-methodes-de>
- <https://hmpdacc.org/hmp/>
- [http://www.microbes-edu.org/etudiant/intro.html#:~:text=D'une%20mani%C3%A8re%20g%C3%A9n%C3%A9rale%2C%20la,Ex.%20%3A%20Escherichia%20coli\).](http://www.microbes-edu.org/etudiant/intro.html#:~:text=D'une%20mani%C3%A8re%20g%C3%A9n%C3%A9rale%2C%20la,Ex.%20%3A%20Escherichia%20coli).)
- <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/les-microbiotes-humains-des-allies-pour-notre-sante/>

- <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/fr/ce-que-les-acides-gras-chaine-courte-font-pour-votre-sante/>
- chr-hansen.com/fr/human-health-and-probiotics/cards/article-cards/probiotic-facts
- <https://medicament.ooreka.fr/astuce/voir/278242/probiotiques-definition-et-utilisation>
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In: et al. The Impact of Food Bioactives on Health. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_5
- <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/fr/les-probiotiques>
- <https://www.indiamart.com/proddetail/lactobacillus-rhamnosus-20701830233.html>
- <https://www.chr-hansen.com/fr/human-health-and-probiotics/our-probiotic-strains/bb-12>
- <https://www.biolineintegratori.com/en/i-probiotici-intestinali/ultra55/>
- https://www.therascience.com/fr_fr/nos-actifs/souches-de-microbiote/streptococcus-thermophilus-sp4
- <https://www.biolineaires.com/75-des-francais-veulent-identifier-les-probiotiques-sur-les-complements-alimentaires/>
- <https://www.afa.asso.fr/maladie-inflammatoire-chronique-de-lintestin/se-soigner/traitements-non-medicamenteux-mici/transplantation-fecale-mici/>
- <https://www.dijo.fr/pages/etudes-scientifiques>
- <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hsmolecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
- <https://www.genibio.fr/probiotiques.html>
- <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques>

SOURCES DES FIGURES :

- Figure 1 : https://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/module_Physiologie_58.html
- Figure 2: Comparative Analysis of Intestinal Tract Models, February 2015 Annual Review of Food Science and Technology 6
- Figure 3: Comparative Analysis of Intestinal Tract Models, February 2015 Annual Review of Food Science and Technology 6
- Figure 4: Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In: et al. The Impact of Food Bioactives on Health. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_5
- Figure 5:
- Figure 6 : <https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/documents-dinformation/sequencage-de-sanger>
- Figure 7 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Pyros%C3%A9quen%C3%A7age>
- Figure 8: GASTROENTEROLOGY Vol. 134, No. 2, Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases R. BALFOUR SARTOR page 2
- Figure 9 : EMC Gastro-entérologie Le microbiote intestinal p.4
- Figure 10 : Cah. Nutr. Diét., 42, Hors-série 2, 2007, PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES PROBIOTIQUES Probiotiques et intestin, Bernard Flourié, Stéphane Nancey
- Figure 11 : <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/fr/les-probiotiques>
- Figure 12 : <https://www.indiamart.com/proddetail/lactobacillus-rhamnosus-20701830233.html>
- Figure 13 : <https://www.biolineintegratori.com/en/i-probiotici-intestinali/ultra55/>
- Figure 14 : https://www.therascience.com/fr_fr/nos-actifs/souches-de-microbiote/streptococcus-thermophilus-sp4
- Figure 15 : <https://www.afa.asso.fr/maladie-inflammatoire-chronique-de-lintestin/se-soigner/traitements-non-medicamenteux-mici/transplantation-fecale-mici/>

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.