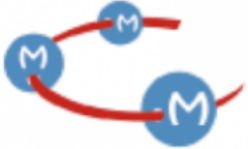




Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Microbiote : de quoi parlons nous ?

Raymond Ruimy

Service de Bactériologie Archet 2, CHU de Nice

INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

Equipe 6 : Virulence microbienne et signalisation inflammatoire (Dr L. Boyer)

L'homme est un être hybride (P. Sansonetti)

- *Cellules humaines*
+
- *Bactéries,*
- *Archaea*
- *Virus*
- *Eucaryotes : parasites (demodex, acariens) ,
champignons*

Ratio bactéries des microbiotes /Cellules humaines

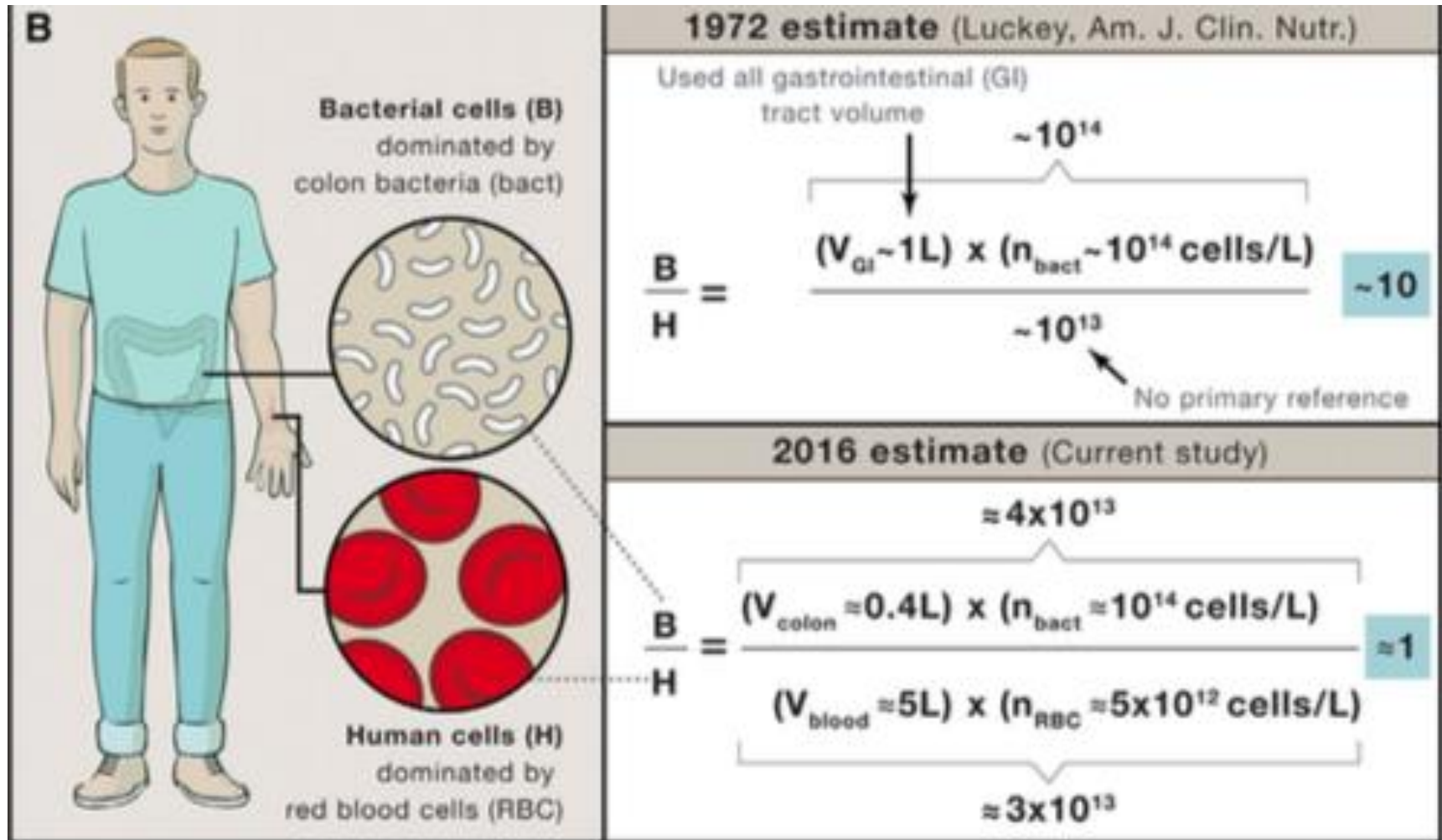


Table 1: Bounds for bacteria number in different organs, derived from bacterial concentrations and volume.

Organ / Part of the digesting system	Typical concentration of bacteria ⁽¹⁾ (number/ml content)	Volume (ml)	Order of magnitude bound for bacteria number
Colon (large intestine)	10^{11}	420 ± 90 ⁽²⁾	10^{14}
Dental plaque	10^{11}	<10	10^{12}
Saliva	10^9	<100	10^{11}
Skin	$<10^7$ per cm^2 ⁽³⁾	1.9 m^2 ⁽⁴⁾	10^{11}
Duodenum and Jejunum (upper small intestine)	10^3 - 10^4	400 ⁽⁵⁾	10^{11}
Ileum (lower small intestine)	10^8		
Stomach	10^3 - 10^4	$250^{(5)} - 900$ ⁽⁶⁾	10^7
(1) Except for skin, concentrations are according to (Berg, 1996) (2) See derivation in section below. (3) Skin surface bacteria density is taken from (Leyden et al., 1987) (4) Total skin surface is taken from (Sacco et al., 2010) (5) Volume of the organs of the gastrointestinal tract is derived from weights taken from (Eve, 1966) by assuming content density of 1.04 g/ml (Snyder et al., 1975). (6) Higher value is given in (Schiller et al., 2005)			

- Quelles sont les méthodes pour déterminer la composition des microbiotes
- Composition des microbiotes
- Comment évolue le microbiote au cours de la vie
- Rôle physio-pathologie du microbiote intestinal

- Définition et lexique sur le microbiote
- Quelles sont les méthodes pour déterminer la composition des microbiote la métagénomique ciblée
- Composition des microbiotes
- Comment évolue le microbiote au cours de la vie
- Rôle physio-pathologie du microbiote intestinal

Méthodes d'exploration des microbiotes

- Cultures bactériologiques : Culturomics
- Méthodes moléculaires :
 - Métagénomique ciblée sur un gène : ADN_r 16s
 - Métagénomique globale ou « shogun »

La culturomic

Fig. 2: The culturomic workflow.

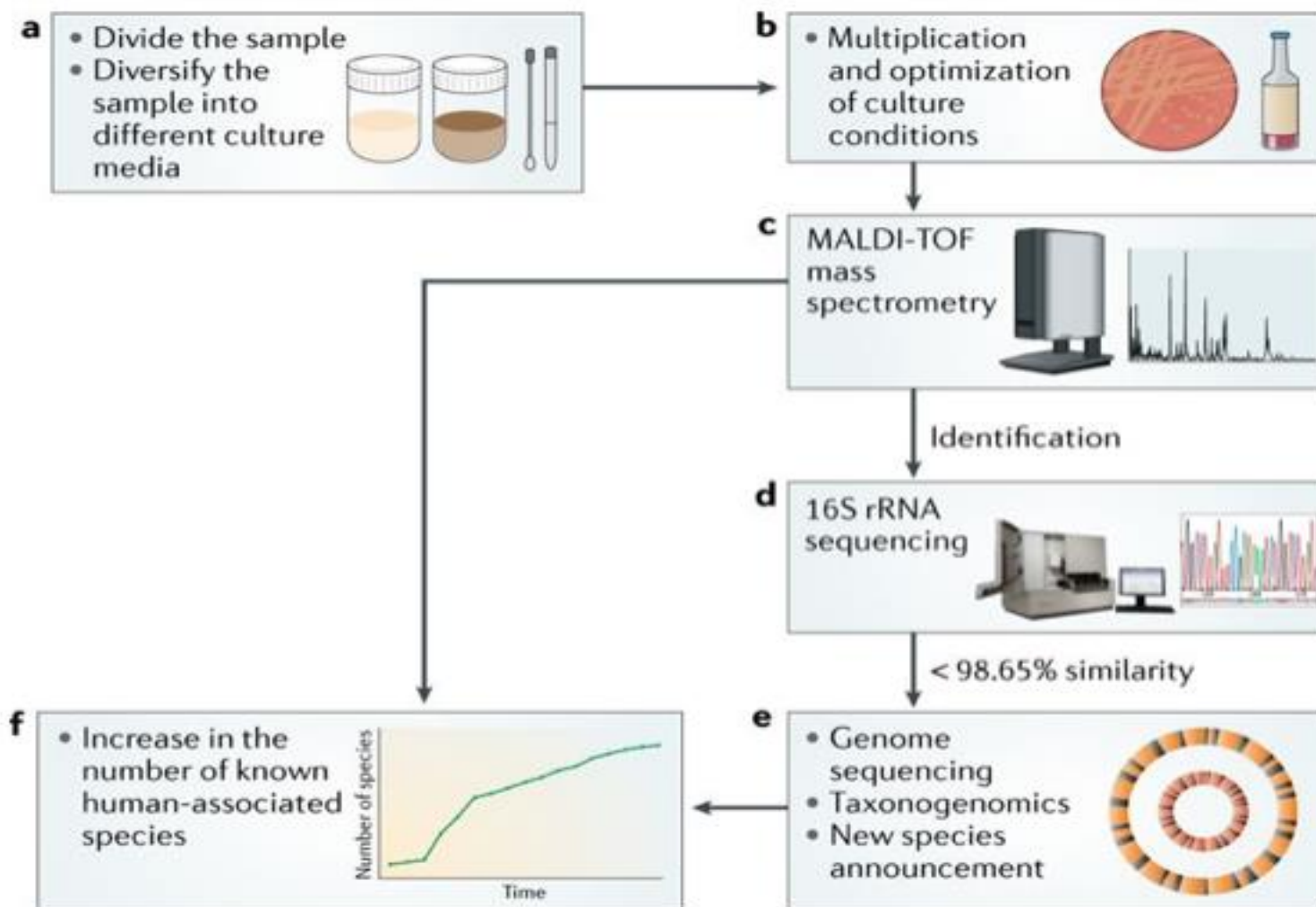
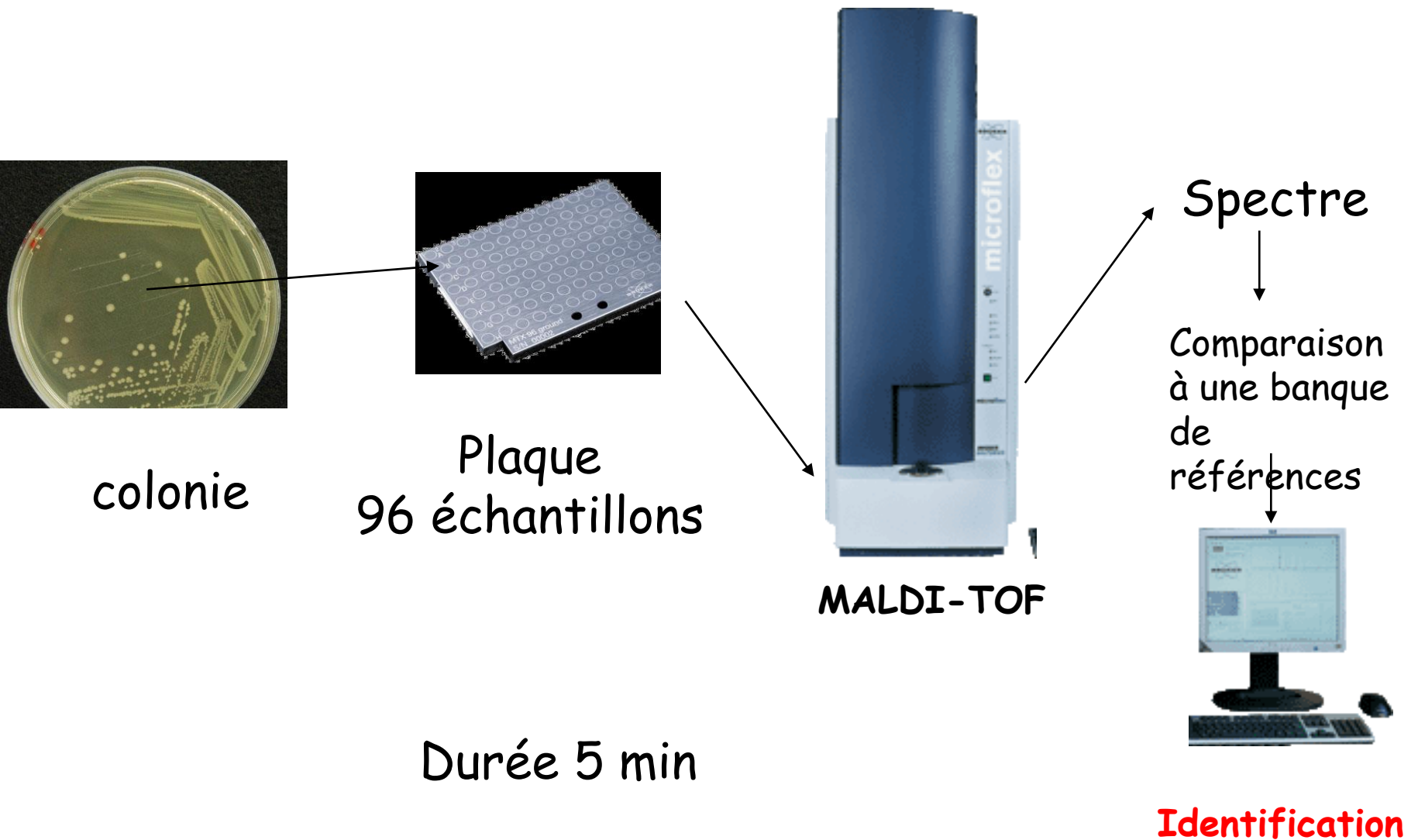
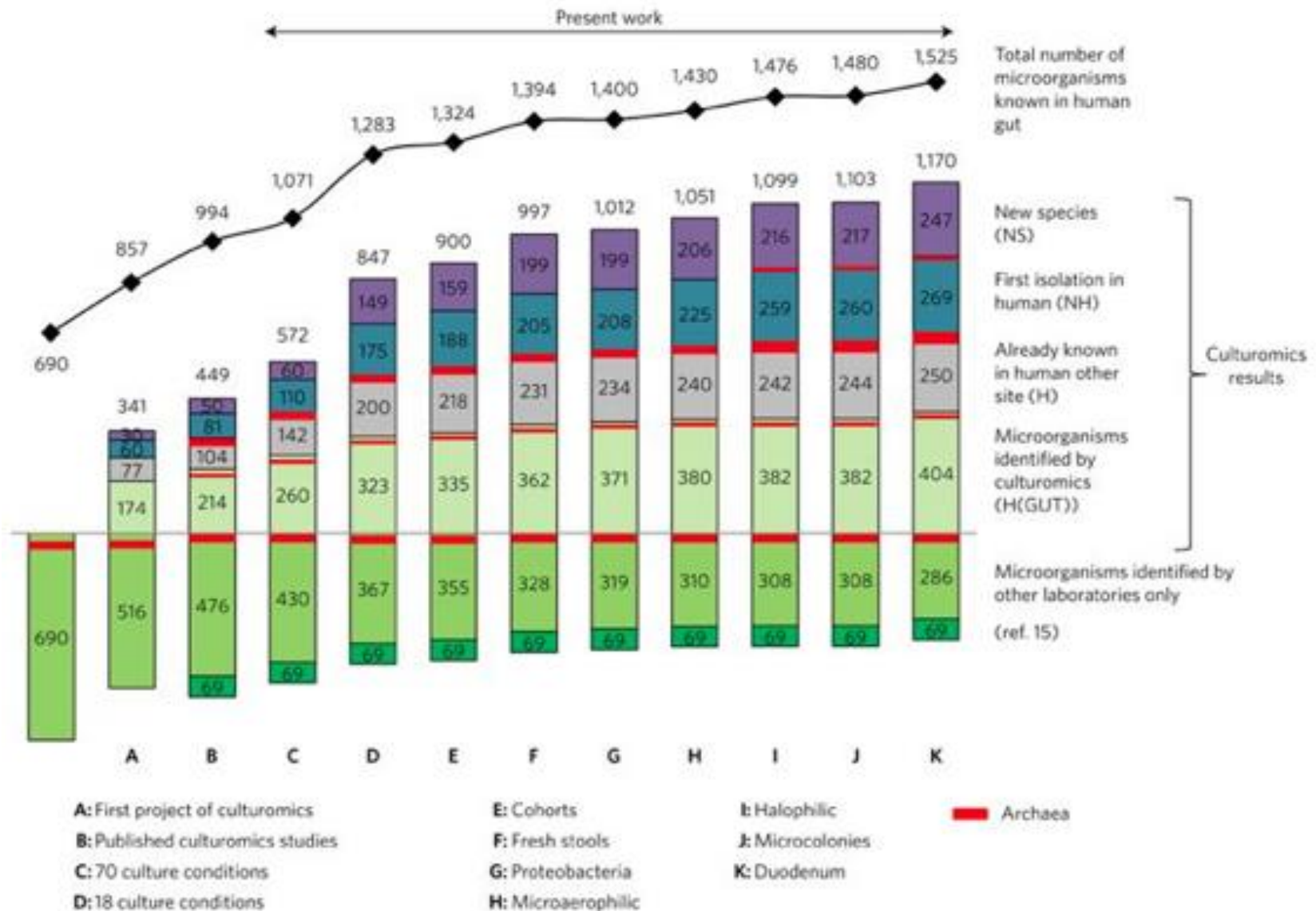


Figure 3



Nombre de différentes bactéries et archées isolées au cours des études de culturomique



LES AVANTAGES ET LIMITES de la culturomic

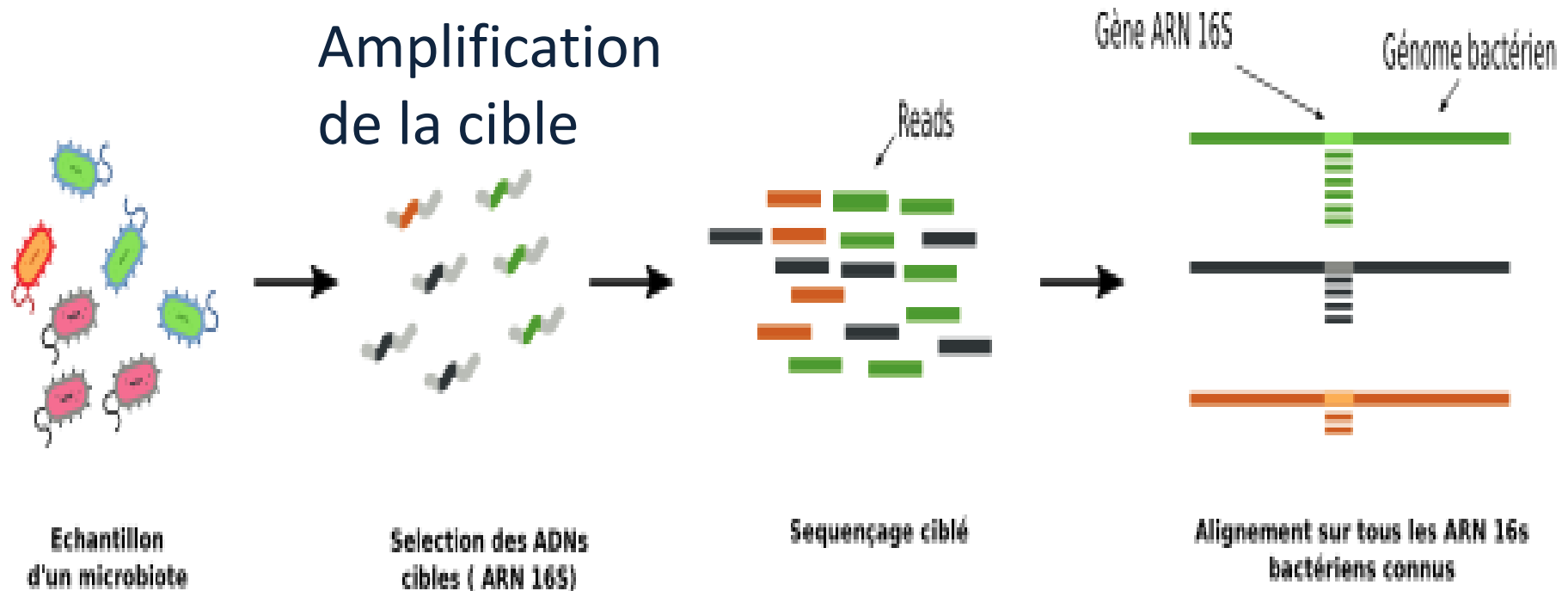
- Sensibilité 10^2 CFU /g de selles
- Apprécie mieux la diversité
- Description de nouvelles espèces à étudier
- Temps travail long, fastidieux et (plusieurs centaines de conditions de culture de milieux et des conditions) = finalement coûteux

Méthodes d'exploration des microbiotes

- Cultures bactériologiques : Culturomics
- Méthodes moléculaires :
 - Métagénomique ciblée sur un gène : ADN_r 16s
 - Métagénomique globale ou « shogun »

Métagénomique ciblée

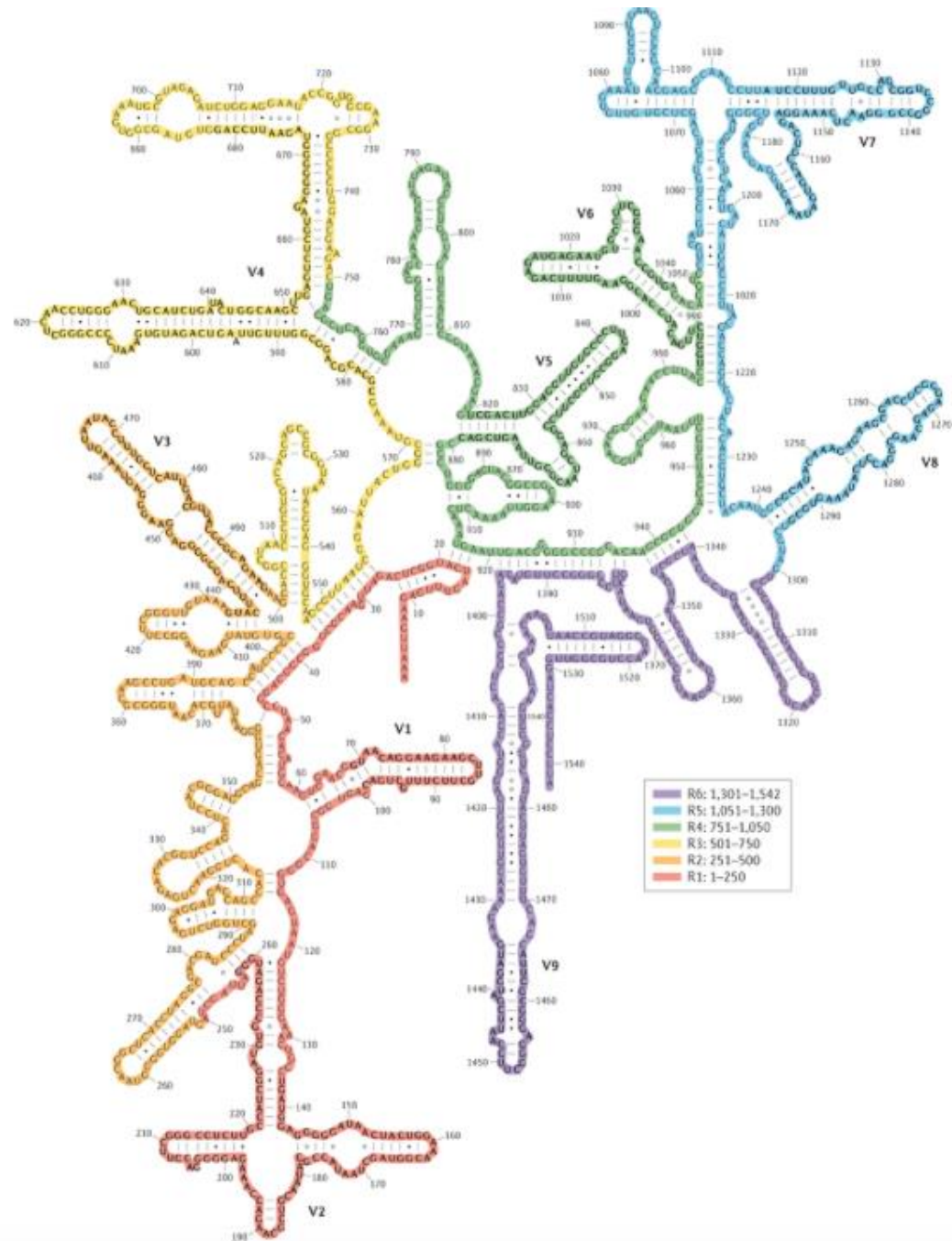
ADNr16S = 16S profiling



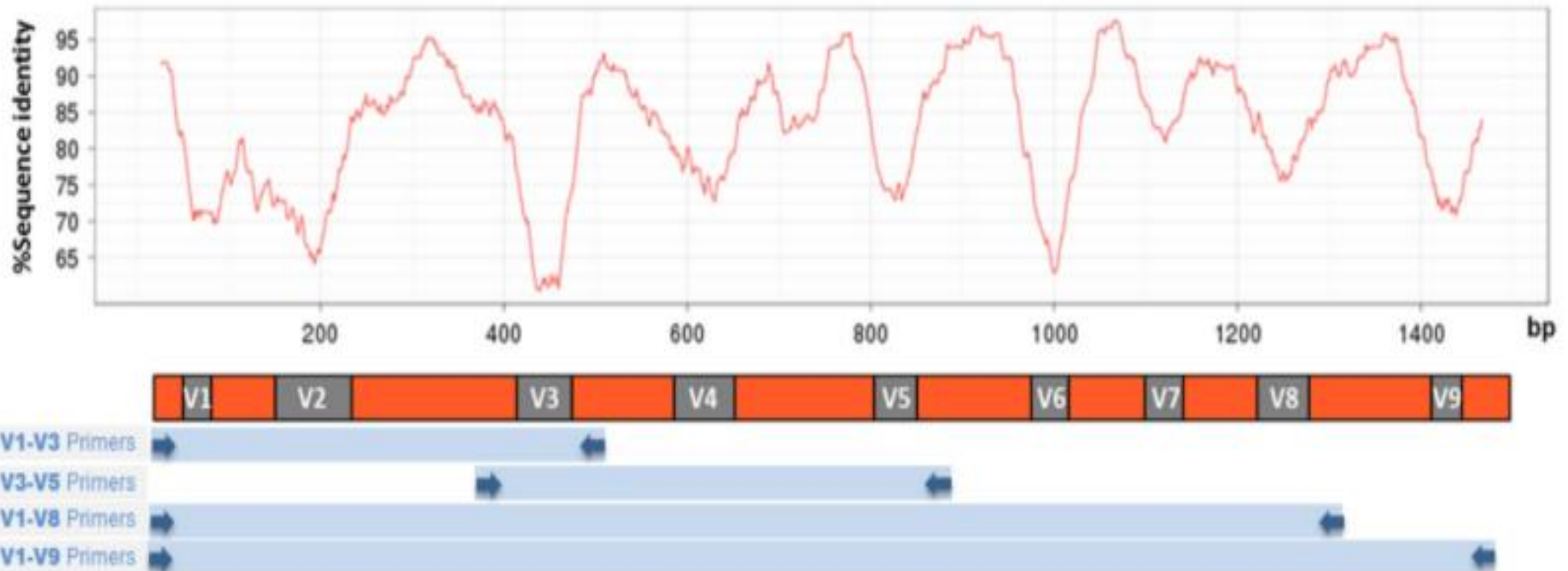
ARNr 16S :

ADNr 16S gène 1500 bp

- molécule universelle
- succession de séquence conservée, variable, hypervariable
- phylum, class, ordre, famille, genre voire espèce
- classification taxonomique
- La plus grande banque de données de séquences commun > 500 000



Succession de zones conservées et variables



Métagénomique ciblée les différentes étapes

Echantillon microbiote →



Extraction ADN



Amplification amorces
« Universelles 16S »

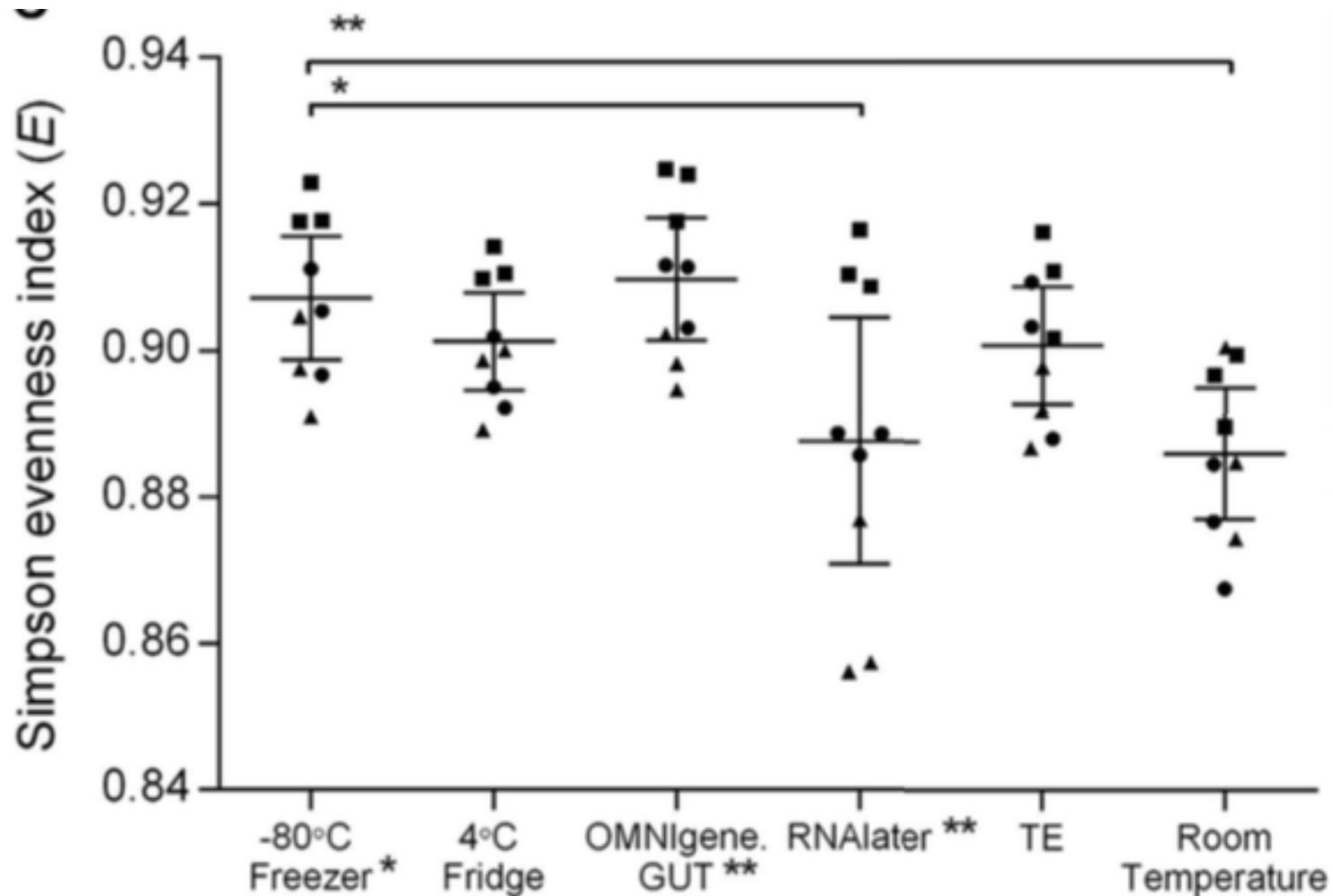


Librairie,
multiplexage
Séquençage au débit



Analyse bioinformatique
Alignement, détermination d'OTU
Analyse statistique

Mode de Conservation des Echantillons peut influencer les résultats



Méthodes d'extraction d'ADN

- L'ADN humain constitue une source de contamination qui diminue les rendements d'extraction d'ADN Bactérien
- Méthode commune
 - Gram Positif ou *Archea* (plus résistant aux actions enzymatiques) nécessite action mécanique
 - Gram - ou Archée ont une paroi qui résiste à des enzymes et nécessite une action mécanique supplémentaire

Introduire des témoins positifs et négatifs

Amplification de l'ADNr16S

- Séquences cibles *pas strictement conservées* utilisation de position dégénérée donc pas suffisamment discriminant pour identifier jusqu'au niveau des espèces

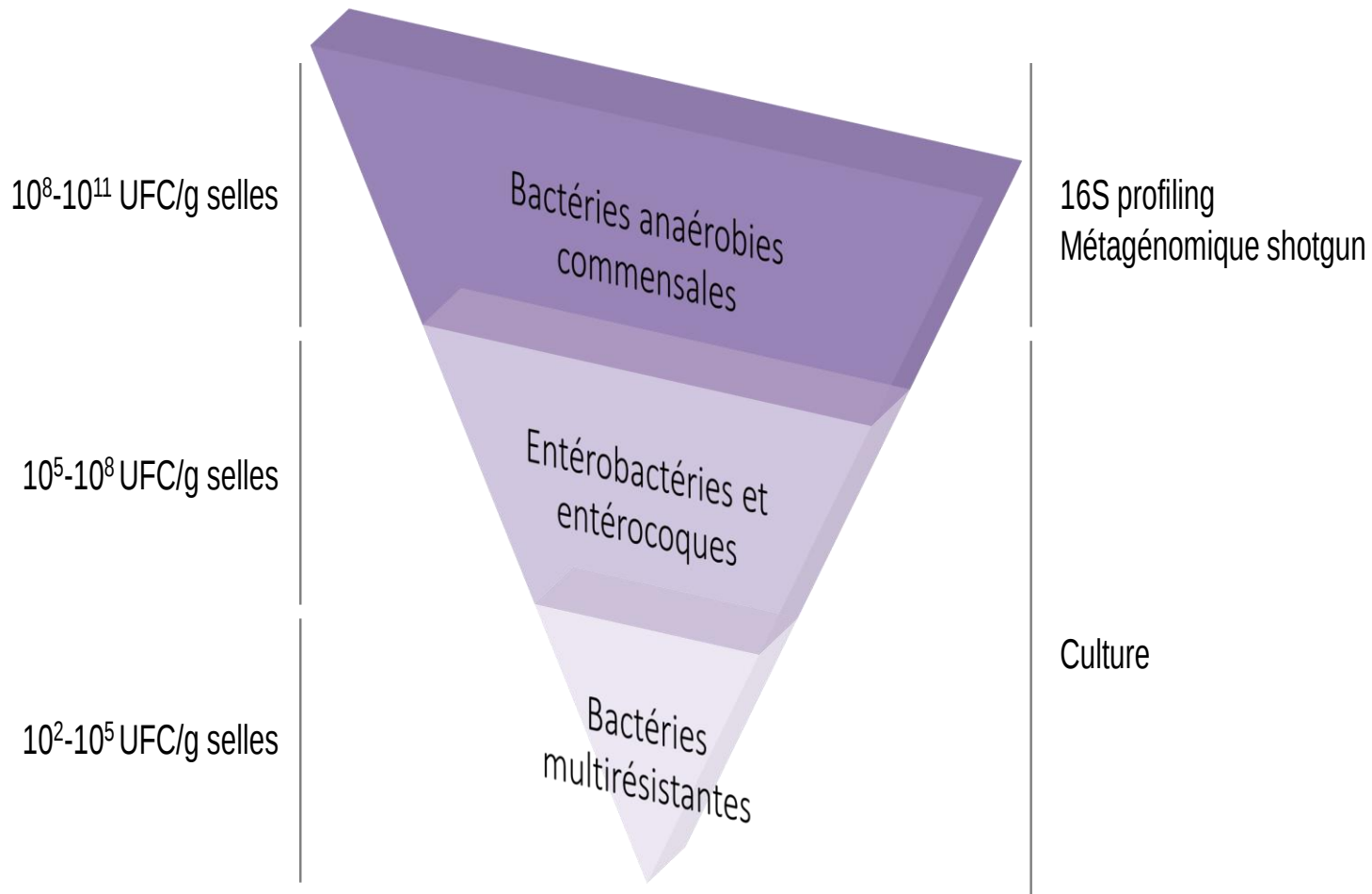
Etant donné les étapes d'extraction et d'amplification :

l'abondance observée des taxons ne reflète pas la quantité de bactéries initiales des bactéries

- Clostridium (15 opérons)

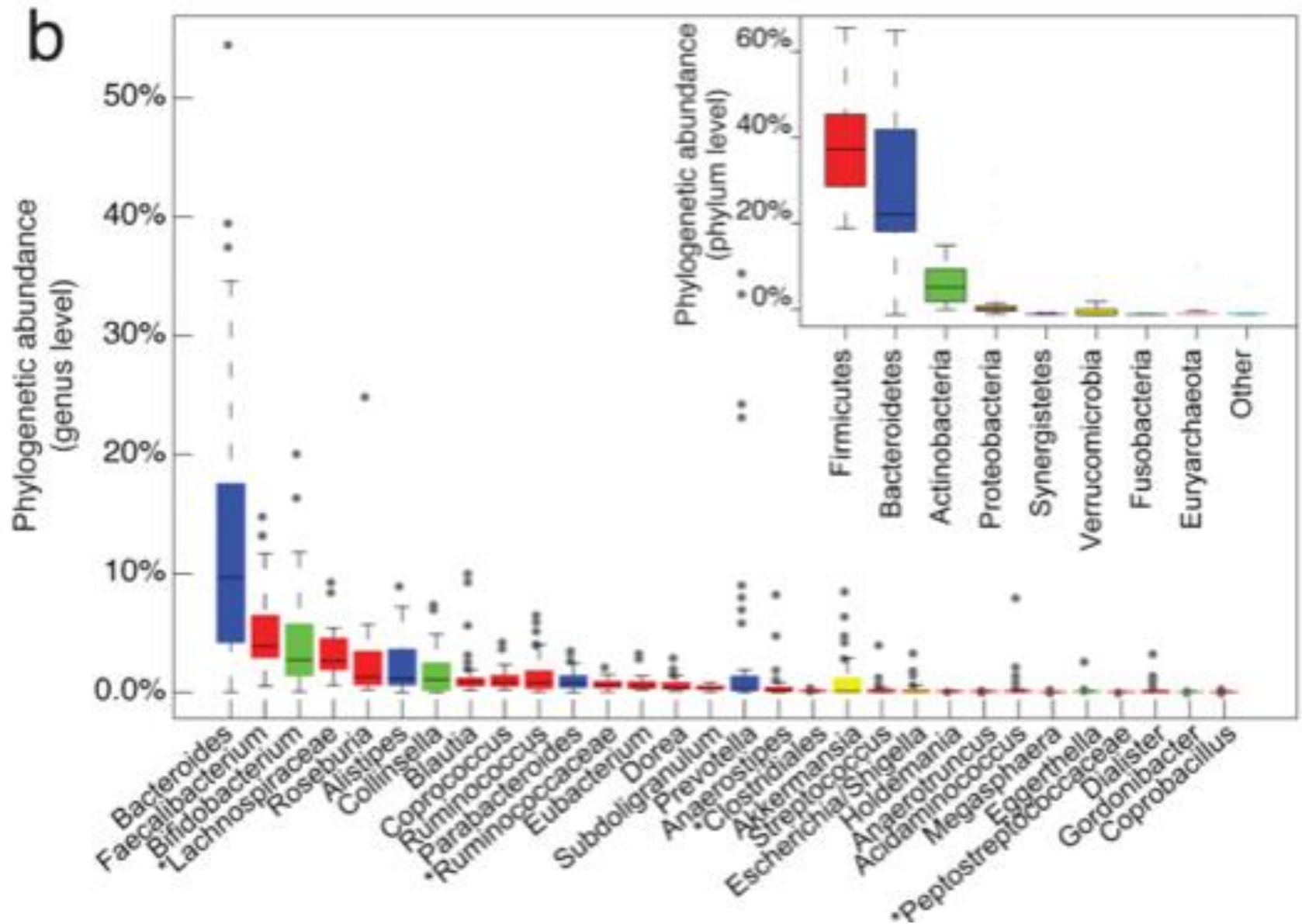
Klappenbach et al. , Applied Environ Microbiol 2000

Sensibilité des méthodes d'étude du microbiote intestinal (d'après Ruppé et al.)

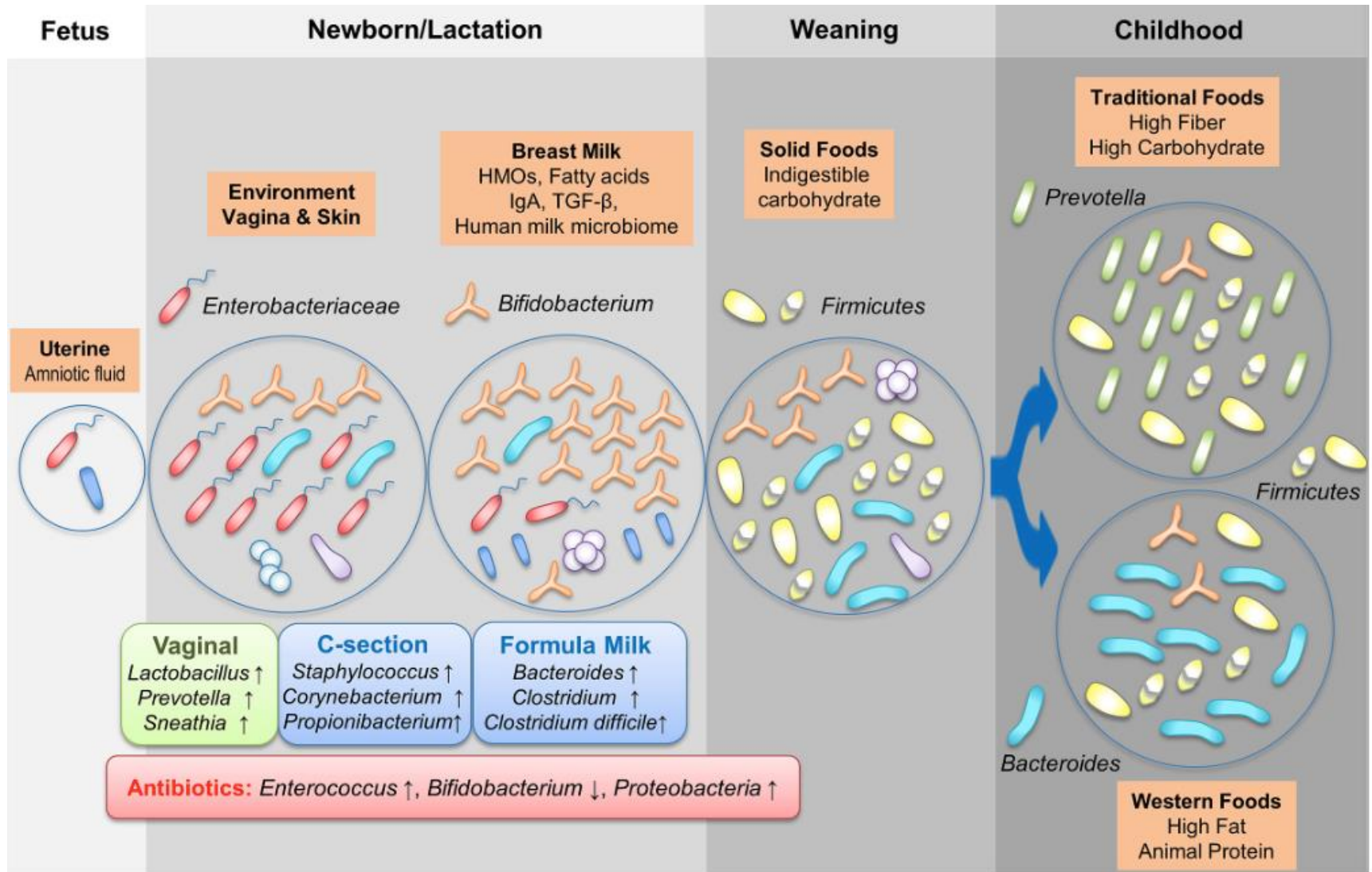


Composition du microbiote intestinal sujet sain

Arumugam et al, Nature, 2011



Acquisition du microbiote du nouveau-né à l'enfance et les facteurs impliqués sa diversité

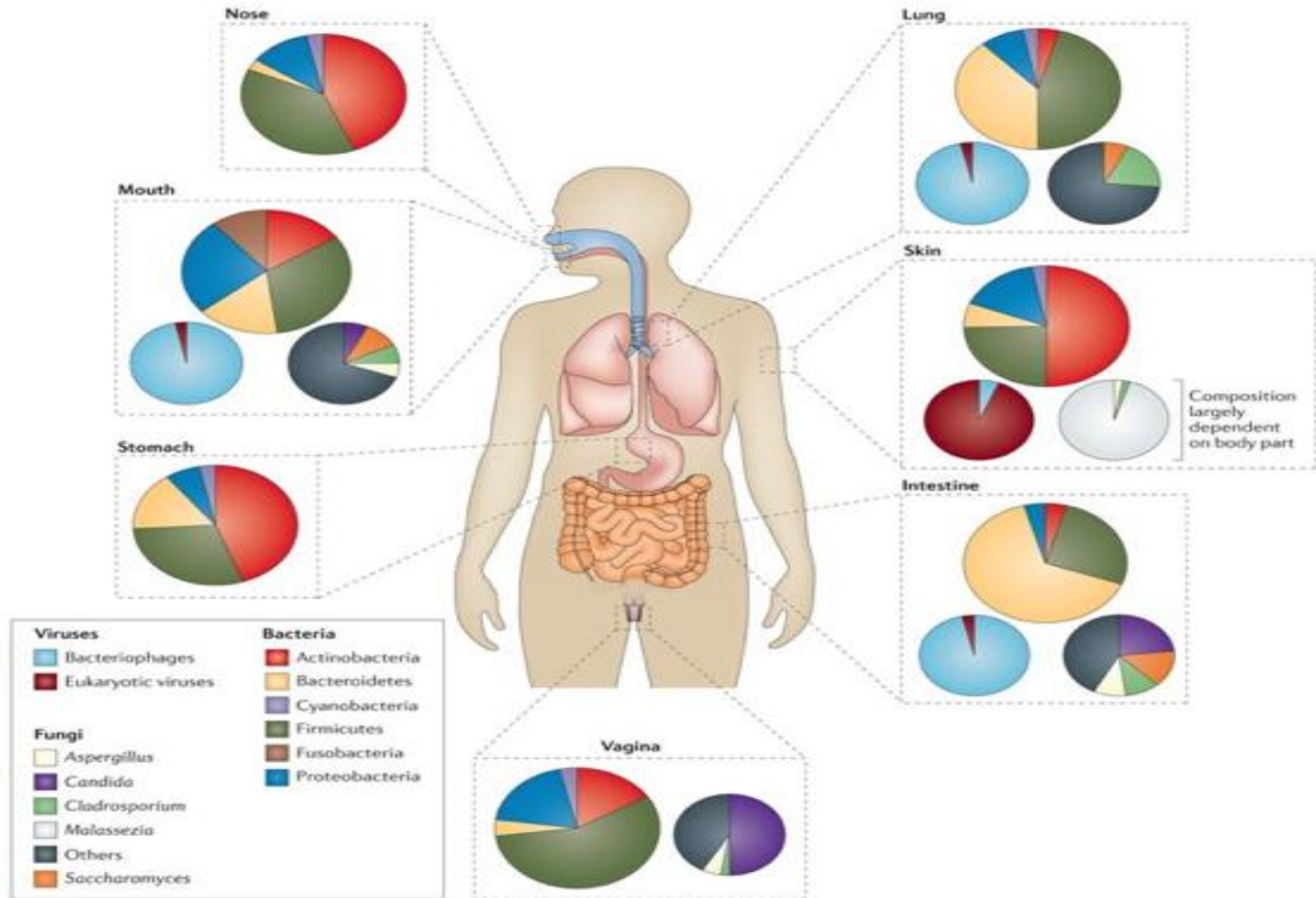


Microbiote intestinal

- Ecosystème dynamique, sa composition varie au cours du temps en fonction :
 - Facteurs endogènes
 - Génétiques ou épigénétiques
 - Facteurs exogènes
 - Changements de régime alimentaire
 - Prise de médicaments ex : antibiotiques

Grande capacité à revenir à sa composition initiale après une perturbation : capacité de résilience

Figure 1: The composition of the bacterial, fungal and viral microbiota at distinct body sites.



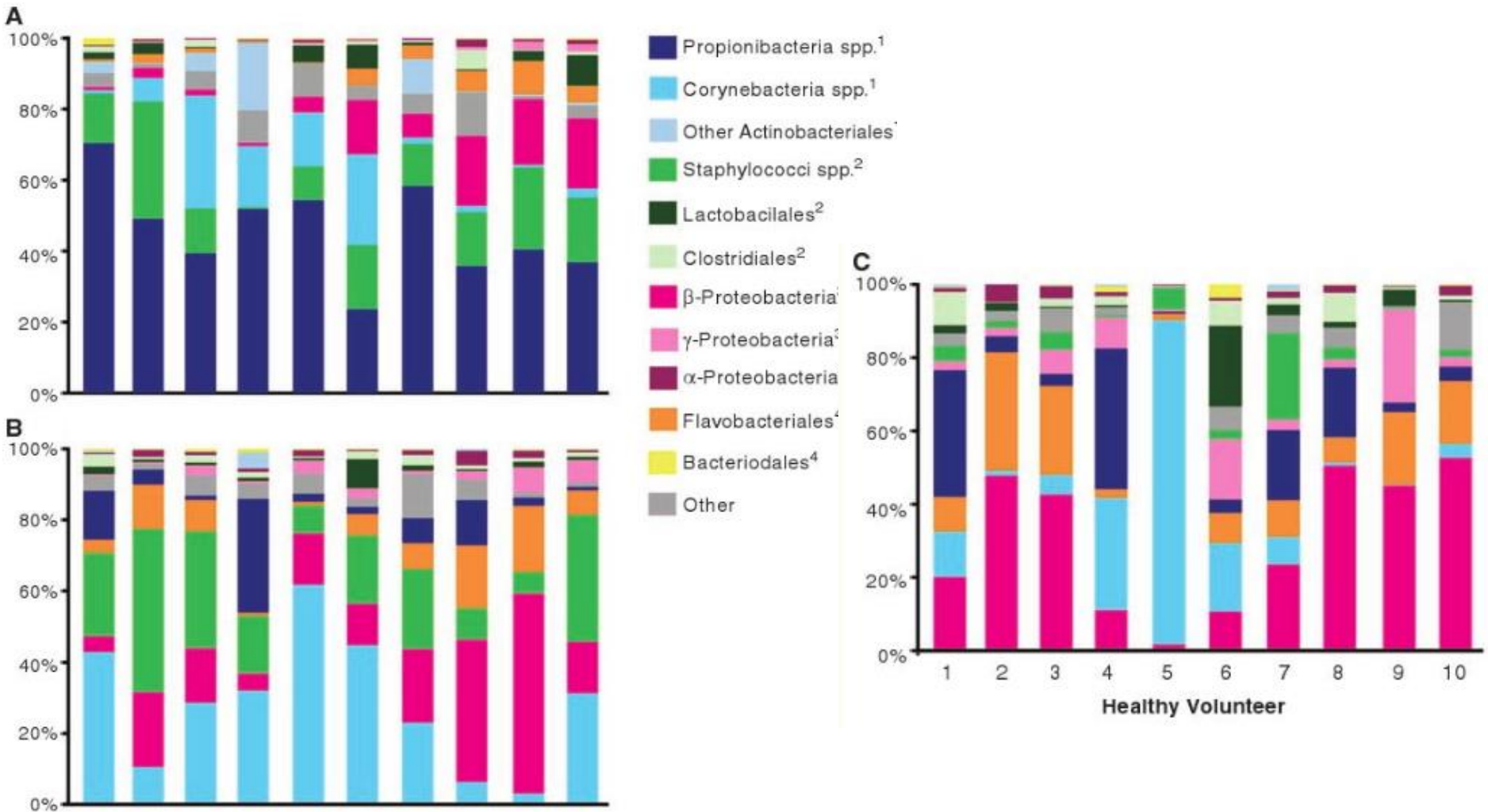
Le Microbiote cutané

- Bactéries
 - Archaea
 - Champignons : *Malassezia furfur*
 - Virus
 - Acariens (demodex)
-
- Etude est complexe :
 - Autant de microbiote que de niches
 - Dépend des conditions zones séborrhéiques (glandes sébacées), zone humides (glandes sudoripares), zones sèches

Phylum et genres dominants :

- Actinobacteria : *Propionibacterium* et *Corynebacterium*
- Firmicutes : Staphylocoques

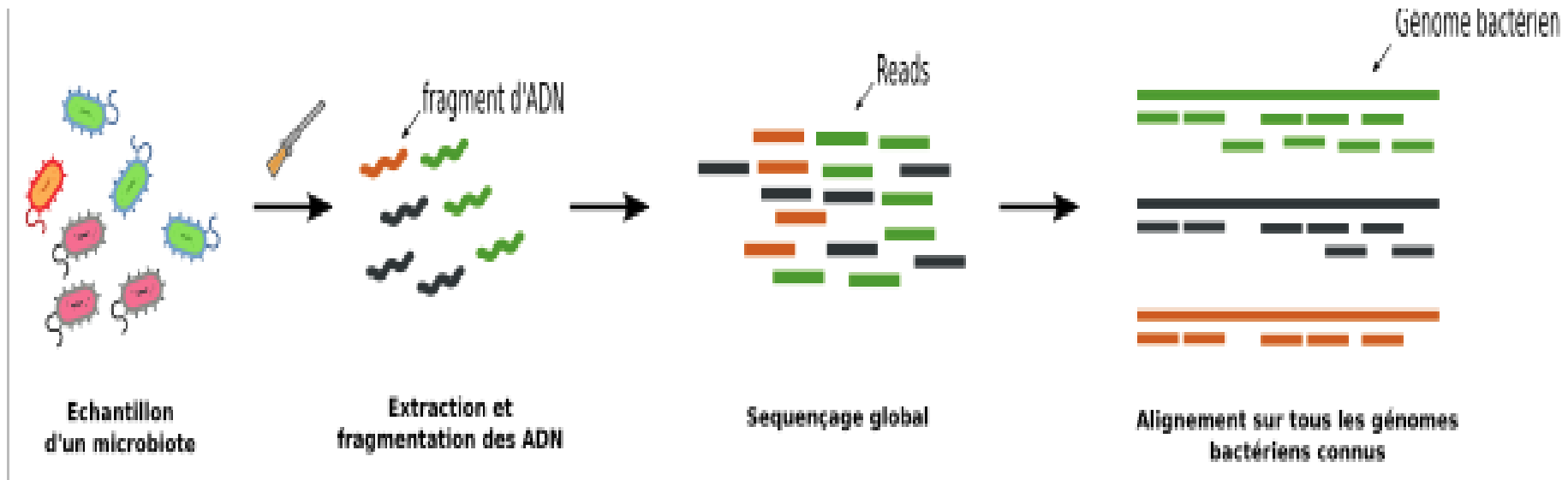
Microbiote cutané en fonction des zones (A : zone séborrhéique , B : zone humide, C :zone sèche)



Méthodes d'exploration des microbiotes

- Cultures bactériologiques : Culturomics
- Méthodes moléculaires :
 - Métagénomique ciblée sur un gène : ADNr 16s
 - Métagénomique globale ou « shogun »

Métagénomique globale : « shotgun » principe

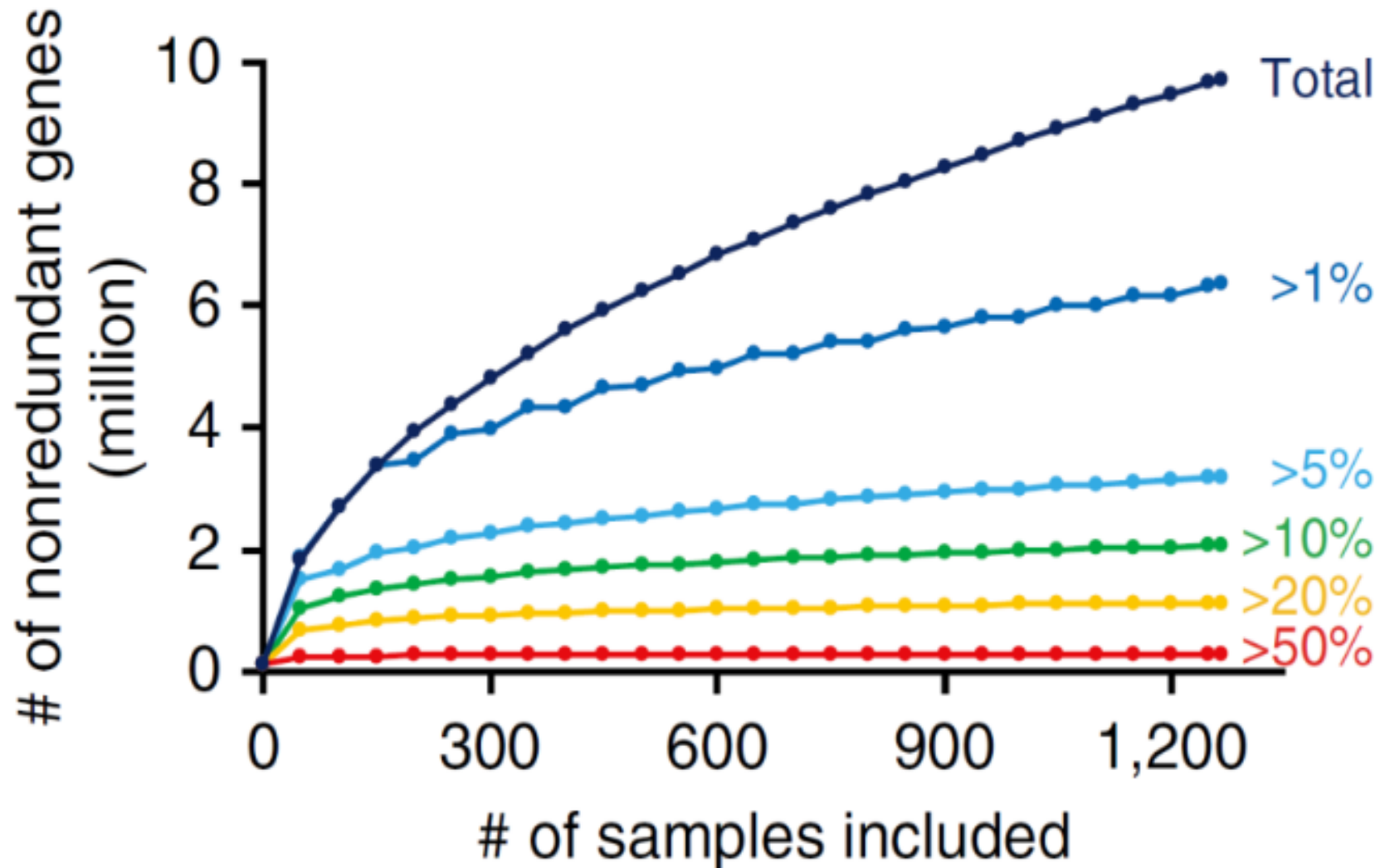


Métagénomique globale

- Séquencage en « Whole genome shot gun » direct sans amplification
 - Pas d'à priori
 - Information maximale
 - Complexité de l'analyse
- ADN humain doit être préalablement éliminé pour enrichir en ADN bactérien
- Métagénomique globale non seulement taxonomique mais également fonctionnel

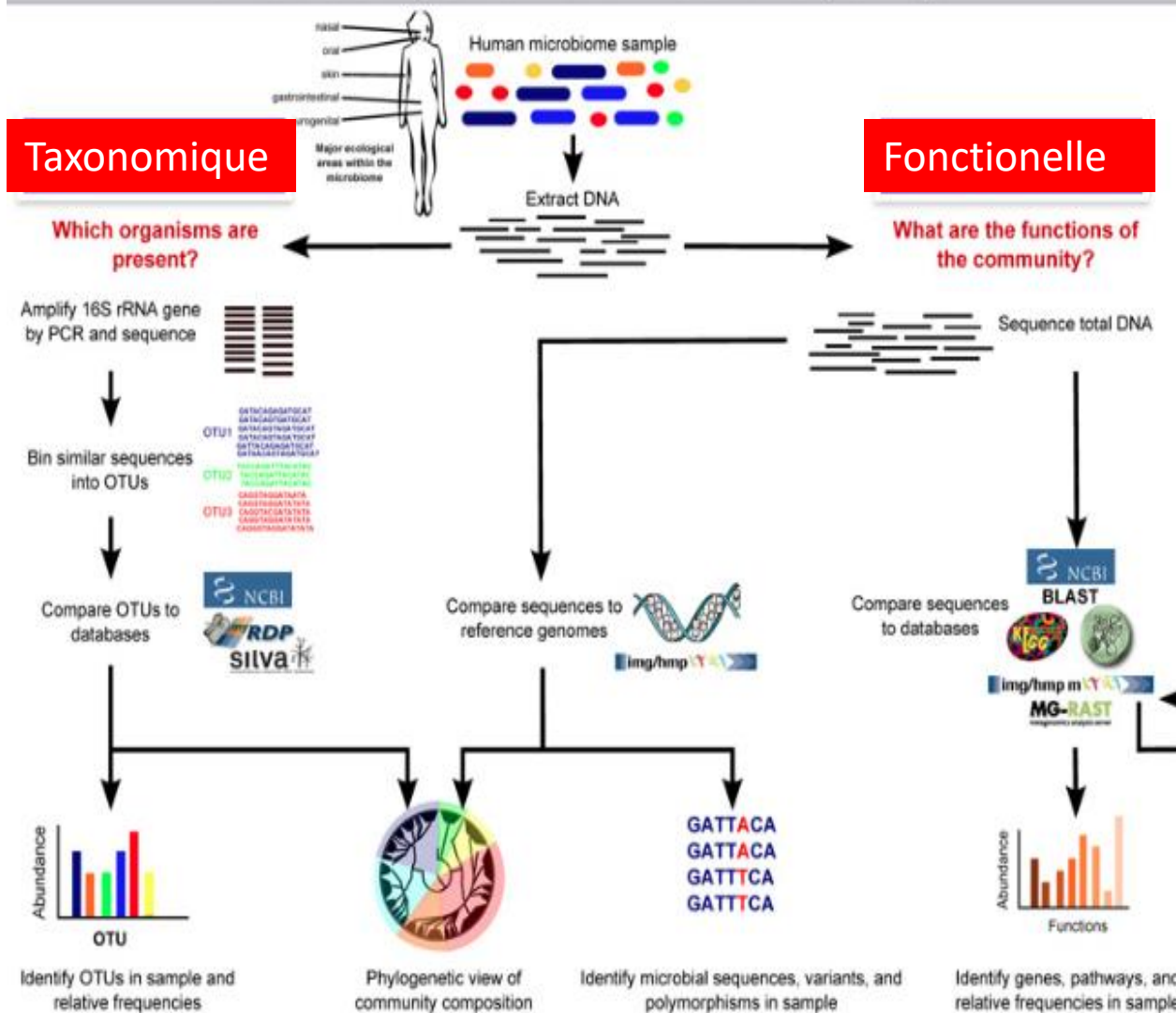
Un catalogue de 10 M de gènes bactériens

Li, J. Nat. Biotechnol. 32, 834–841 (2014)

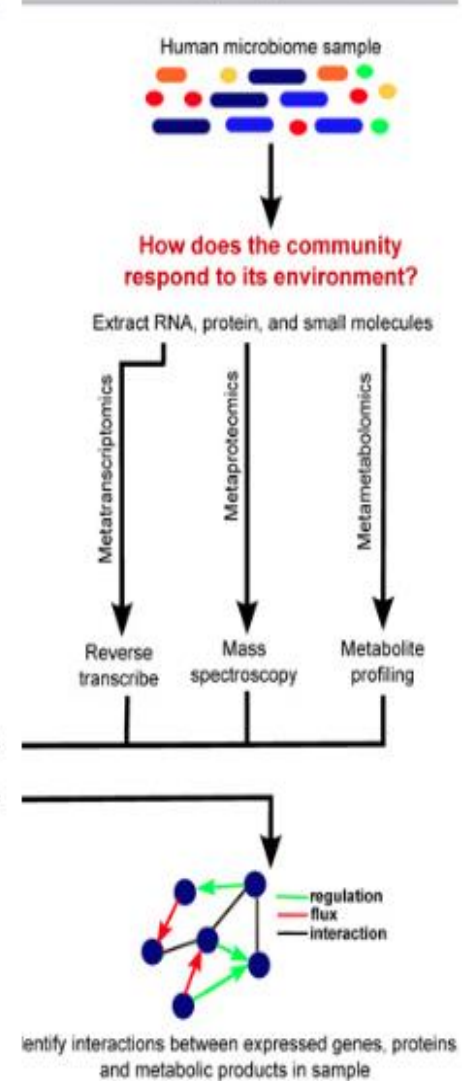


Métagénomique Ciblée et Globale

Current techniques for human microbiome profiling



Emerging methods



- Définition et lexique sur le microbiote
- Quelles sont les méthodes pour déterminer la composition des microbiote la métagénomique globale
- Composition des microbiotes
- Comment évolue le microbiote au cours de la vie
- Rôle physio-pathologie du microbiote intestinal

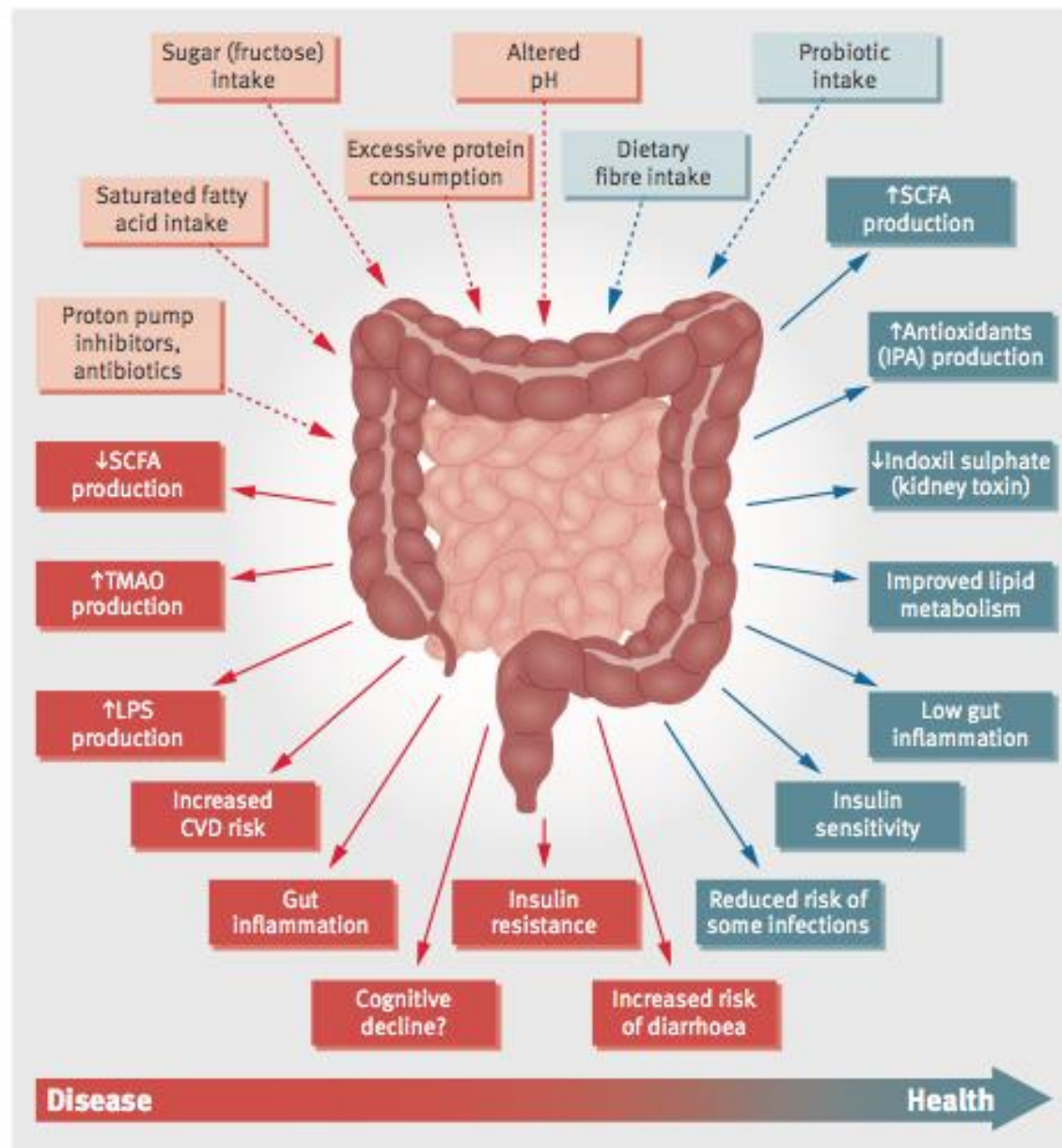


Fig 1 | Schematic representation of the role of the gut microbiota in health and disease giving some examples of inputs and outputs. CVD=cardiovascular disease; IPA=indolepropionic acid; LPS=lipopolysaccharide; SCFA=short chain fatty acids; TMAO=trimethylamine N-oxide

Conclusion :

- L'avènement des techniques de séquençage maintenant **largement accessible**
- **Accumulation de données** par des méthodes différentes (séquençage et culturomic)
- **Approche multidisciplinaire et transversale** (de la microbiologie à la médecine à l'immunologie)
- Mieux comprendre le rôle du microbiote et **interaction avec le système immunitaire** clef de voute de la compréhension de pathologie