

Les animaux gnotobiotiques pour mieux comprendre le microbiote et le tractus digestif

Muriel Thomas

Equipe ProbiHôte- Philippe Langella

Pôle Ecosystèmes, Micalis, INRA, Jouy-en-Josas

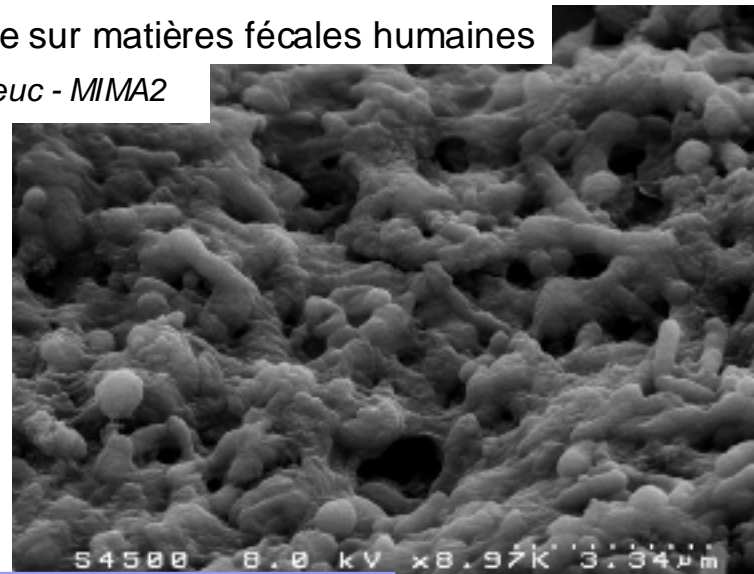
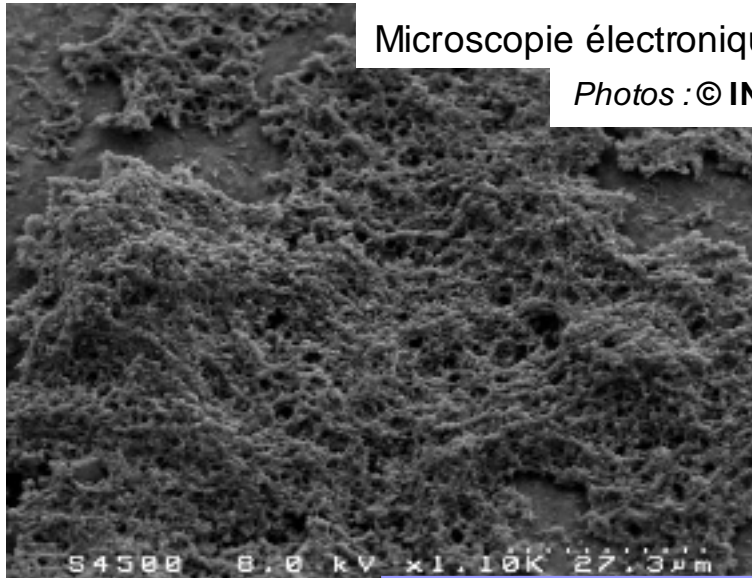


**Académie vétérinaire
- 18 octobre 2012 -**

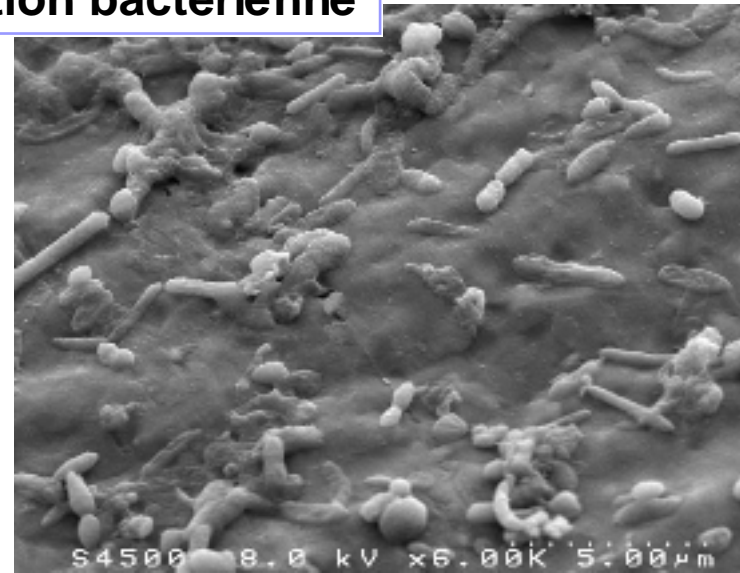
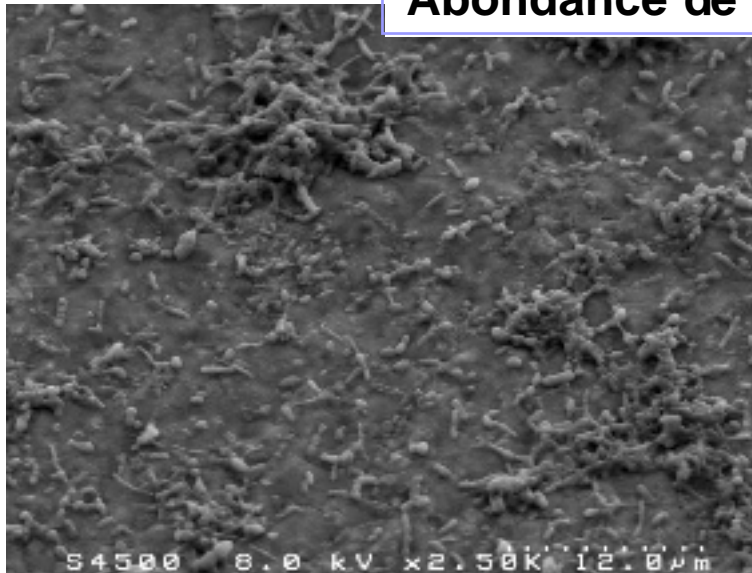
Clichés du microbiote

Microscopie électronique à balayage sur matières fécales humaines

Photos : © INRA, T. Meylheuc - MIMA2

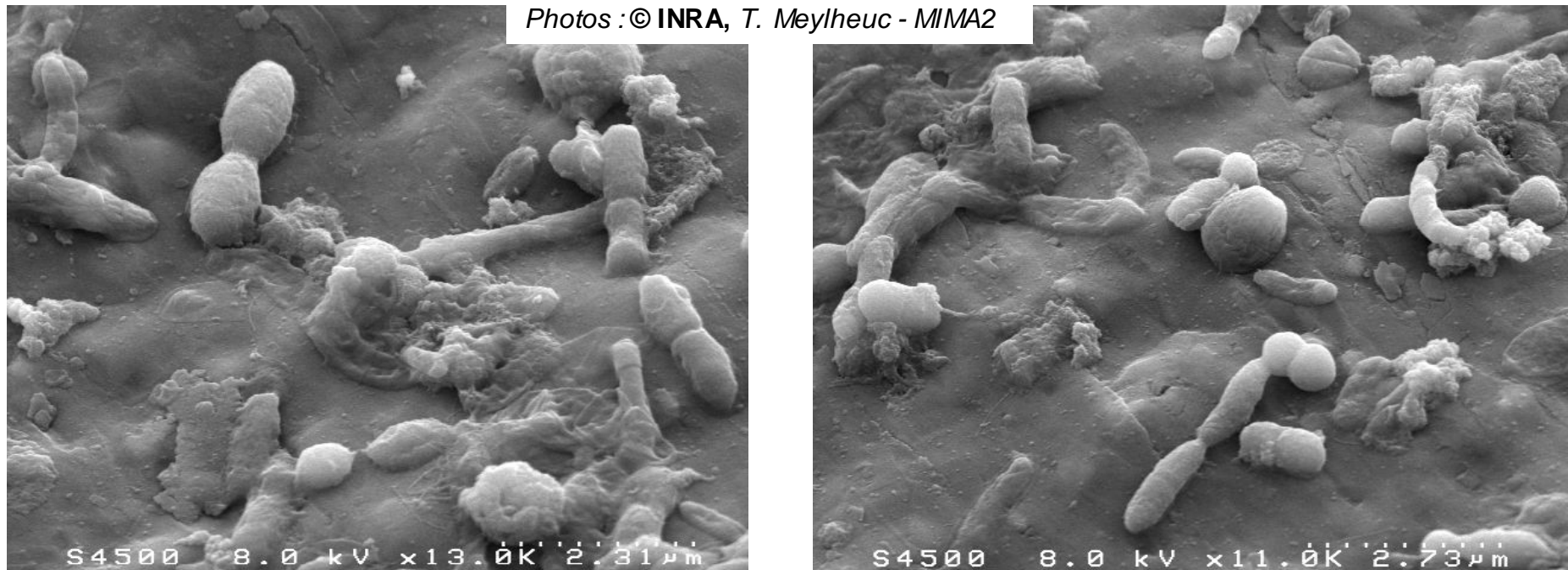


Abondance de la population bactérienne



Clichés du microbiote

Microscopie électronique à balayage sur matières fécales humaines



Diversité de la population bactérienne

Microbiote et intestin: ...un écosystème complexe

abondance



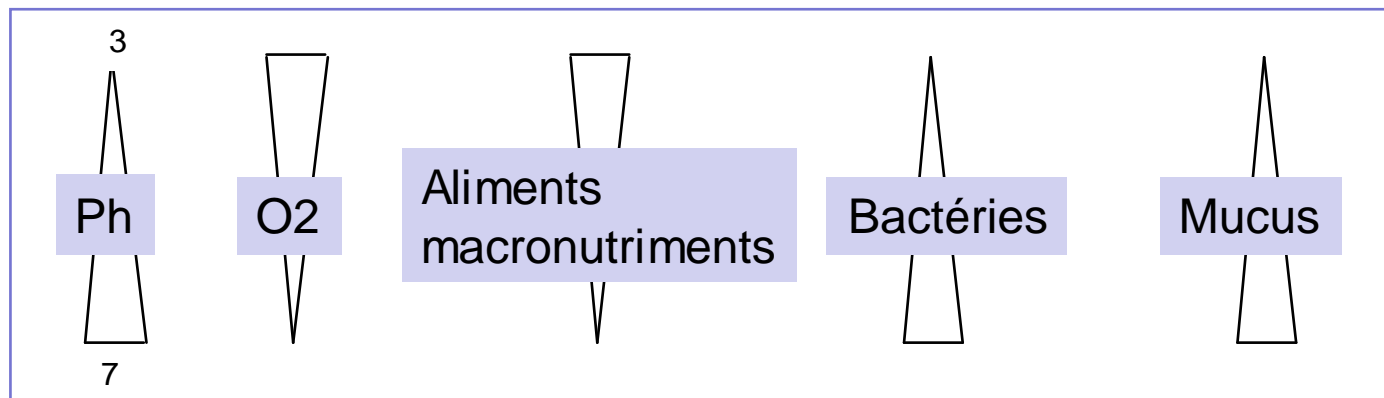
Estomac: 10^2 à 10^3 bactéries/g
Firmicutes, Actinobacteria,
Bacteroidetes, Proteobacteria,
Fusobacteria

Intestin grêle : 10^3 à 10^7 bactéries/g
Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes

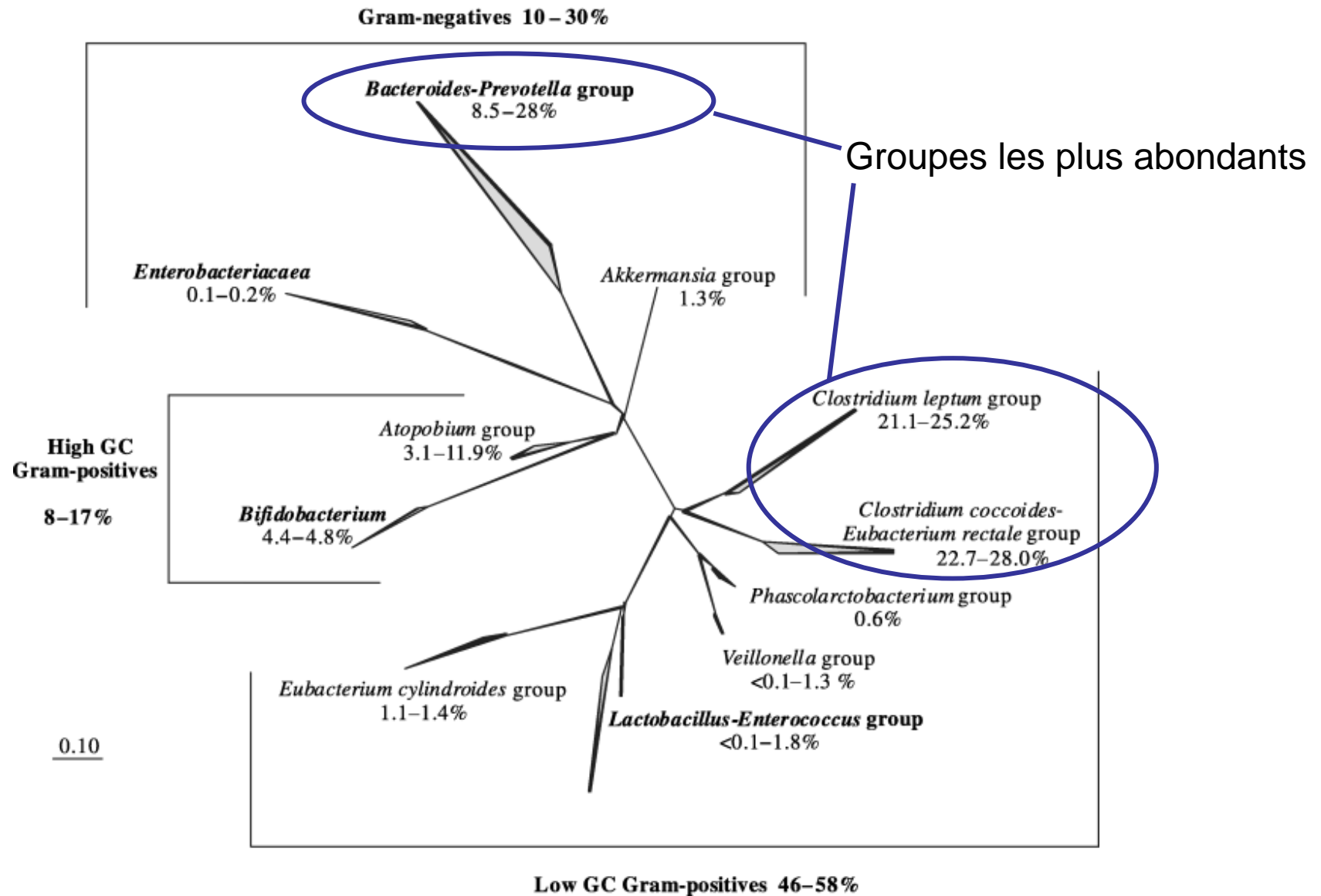
Colon : 10^{11} à 10^{12} bactéries/g
Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria
(> 500 espèces)

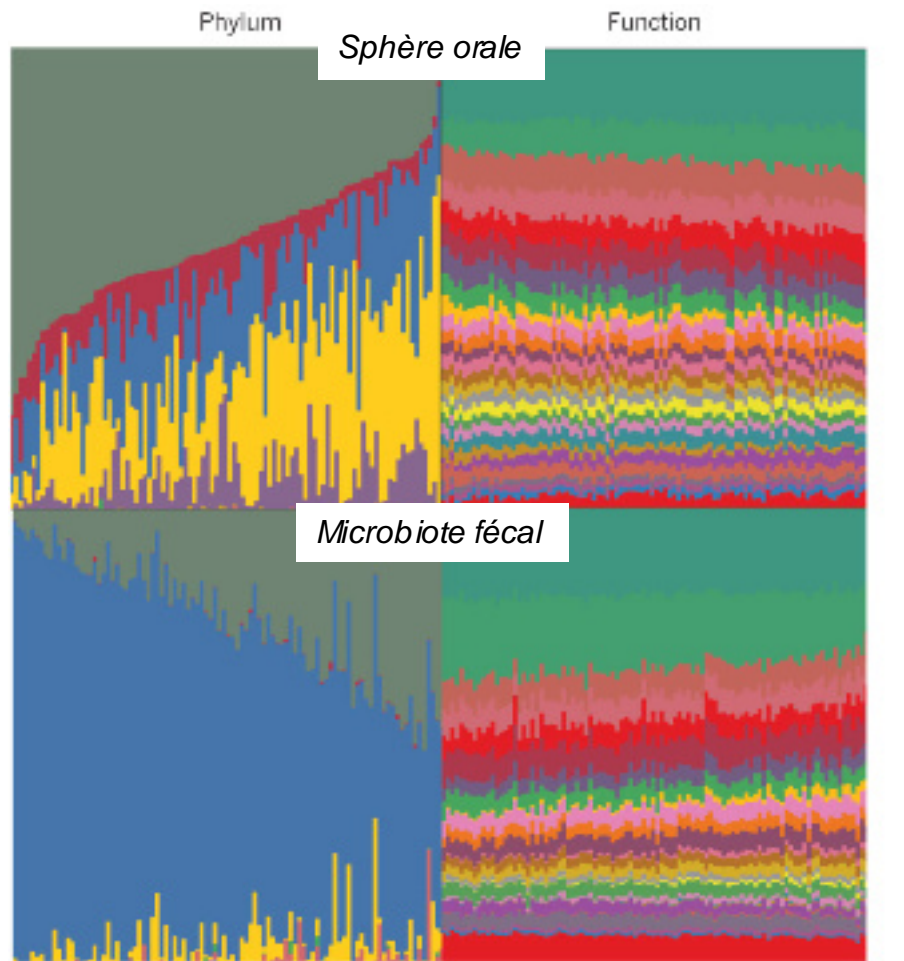
Adapté de Marchesi *J. Environmental Microbiology*, 2011

diversité



Arbre phylogénique du microbiote humain adulte





- | | |
|--|--|
| ■ Firmicutes | ■ Central carbohydrate metabolism |
| ■ Actinobacteria | ■ Cofactor and vitamin biosynthesis |
| ■ Bacteroidetes | ■ Oligosaccharide and polyol transport system |
| ■ Proteobacteria | ■ Purine metabolism |
| ■ Fusobacteria | ■ ATP synthesis |
| ■ Tenericutes | ■ Phosphate and amino acid-transport system |
| ■ Spirochaetes | ■ Aminoacyl transfer RNA |
| ■ Cyanobacteria | ■ Pyrimidine metabolism |
| ■ Verrucomicrobia | ■ Ribosome |
| ■ TM7 | ■ Aromatic amino-acid metabolism |

Notion de
« core microbiome fonctionnel »

Le microbiote: un partenaire obligatoire de l'intestin



Fonctions de protection

Compétition avec des pathogènes
Production de composés anti-microbiens



Fonctions de structure

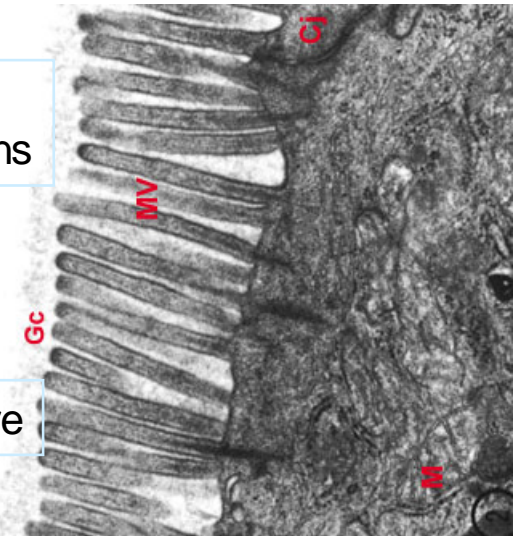
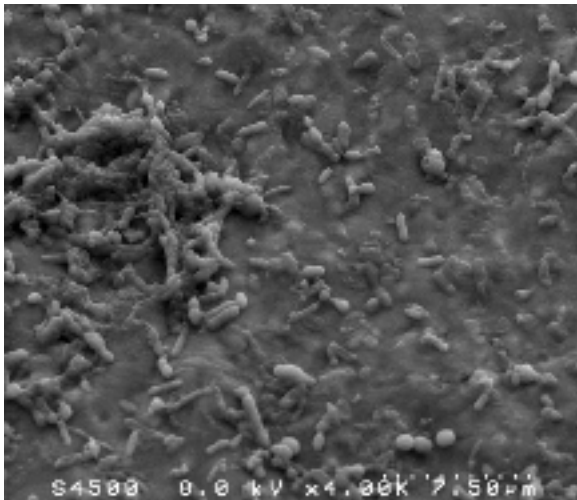
Développement du système immunitaire

Structure et fonction de l'épithélium

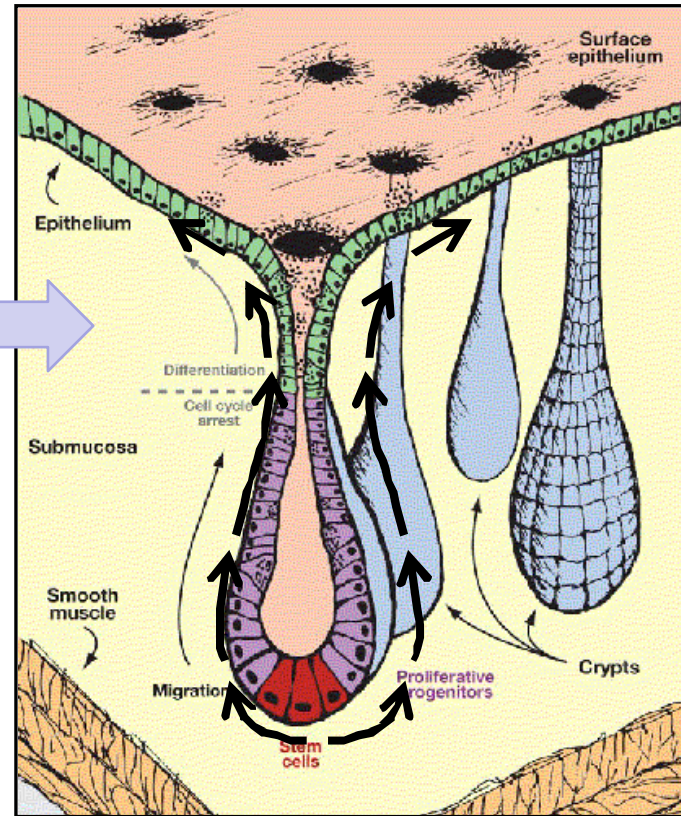
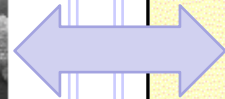
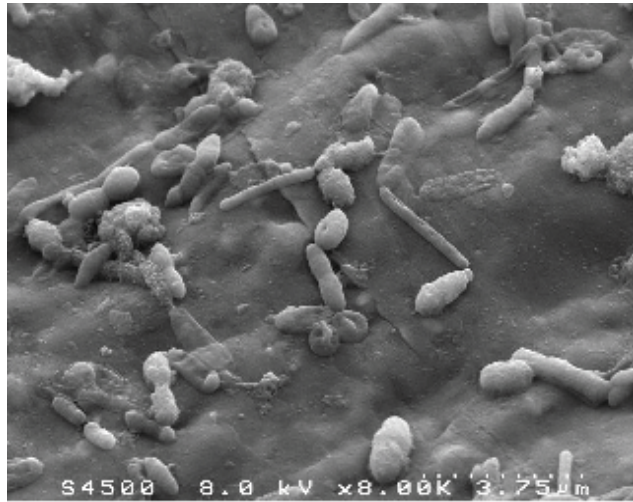


Fonctions métaboliques

Récupération d'énergie
Digestion des nutriments
Productions de métabolites



Le microbiote façonne l'épithélium intestinal



Apoptose

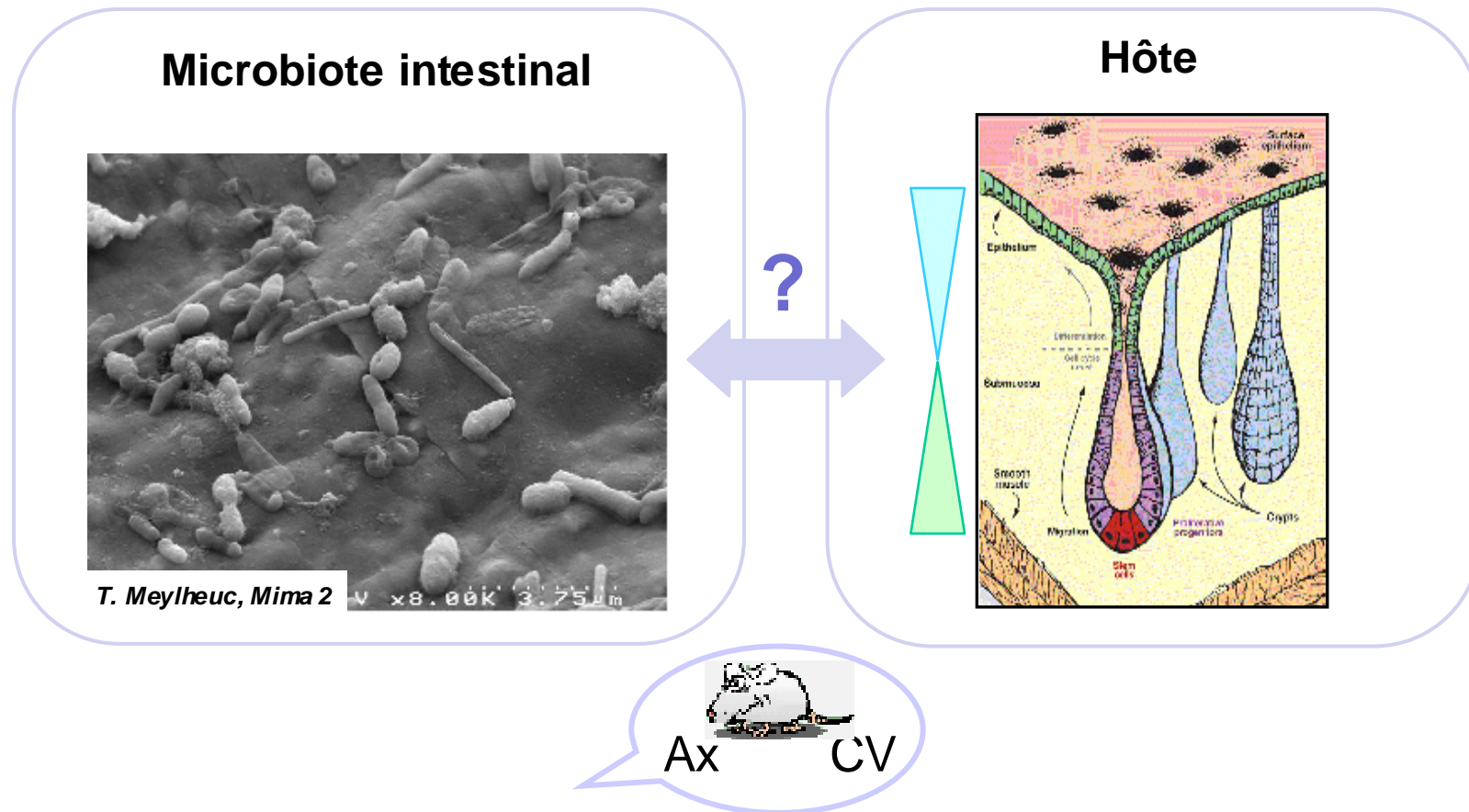
Différentiation

Prolifération

Sancho *et al*, 2004

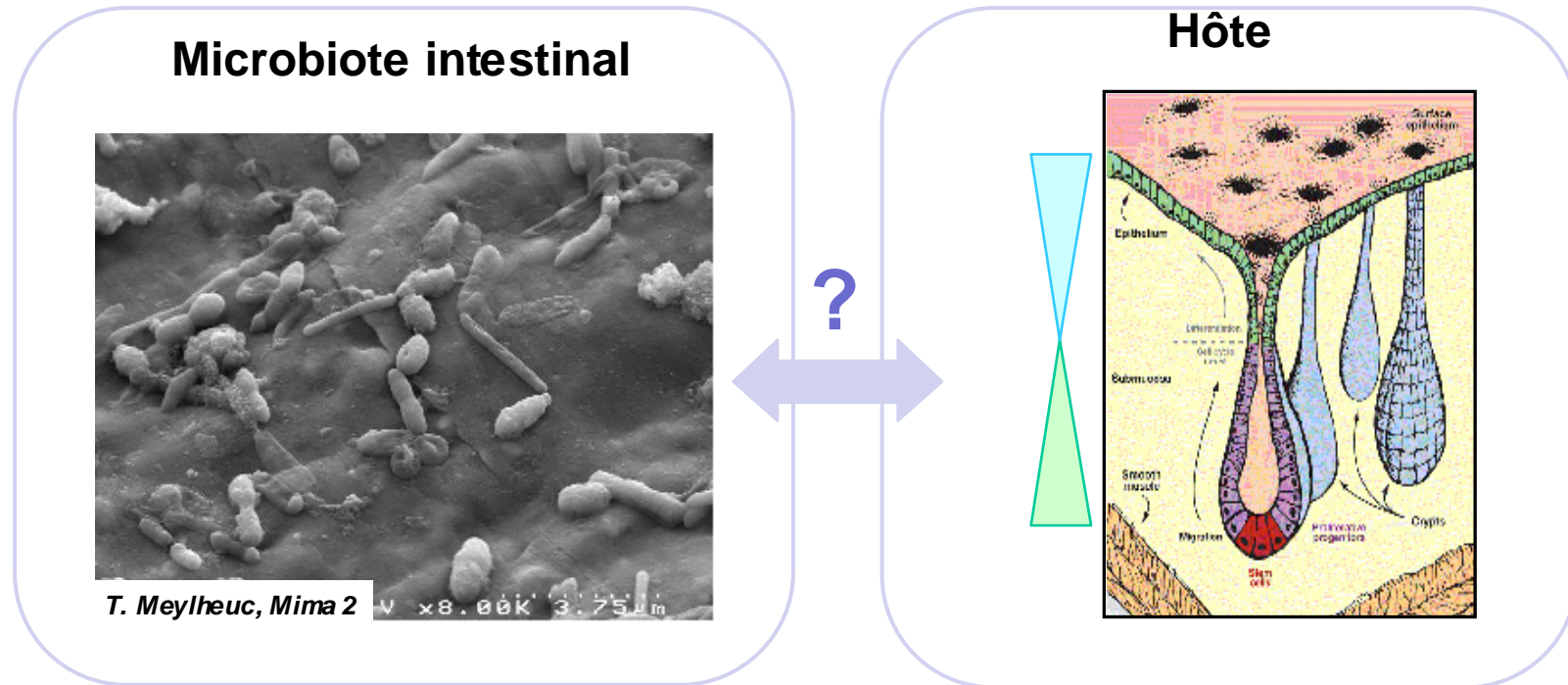
Alam *et al*, 1994 - Willing *et al*, 2007 - Buchon *et al*, 2009 - Rakoff-Nahoum *et al*, 2004 -
Samba-Louaka *et al*, 2008 –
Cherbuy *et al*, 2004 – Cherbuy *et al*, 2010 – Tomas *et al*, 2012 (en révision)

Effet morphogénique du microbiote sur l'épithélium

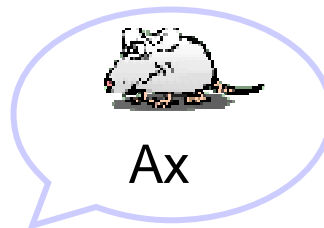


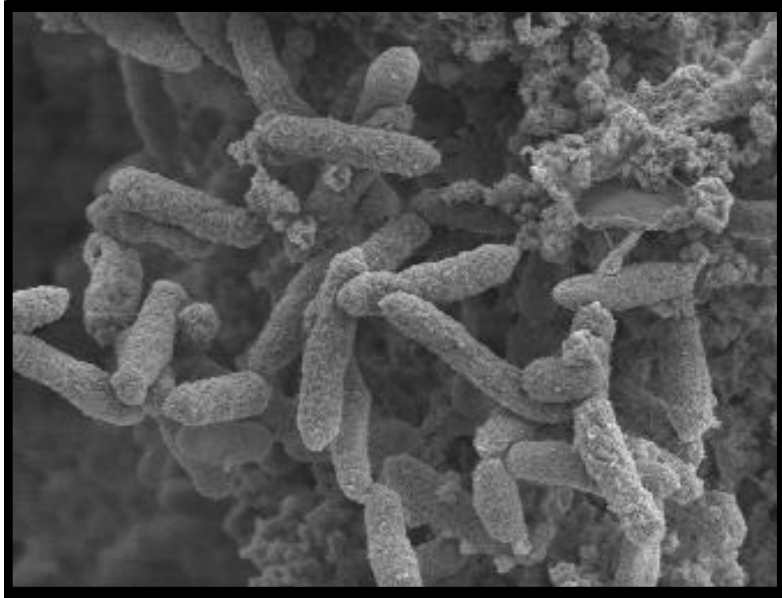
- Le microbiote
- ❄ augmente la surface de l'épithélium
 - ❄ module les protéines du cycle de vie de l'épithélium de façon très orchestrée Cherbuy *et al*, 2010 – Am. J. Physiol.

Qui fait quoi?



Stratégie : simplifier le dialogue





(© Plateforme MIMA2, T. Meylheuc)

Bacteroides thetaiotaomicron

- ✓ Membre majeur du phylum *Bacteroidetes*
- ✓ Bactérie commensale modèle

- ✓ Producteur d'acétate

- ✓ Génome séquencé: spécialiste du métabolisme des polysaccharides

- ✓ Sa capacité à dégrader les polysaccharides du mucus ou de l'alimentation → importance pour la survie dans l'intestin

Hooper *et al.*, Science, 2001

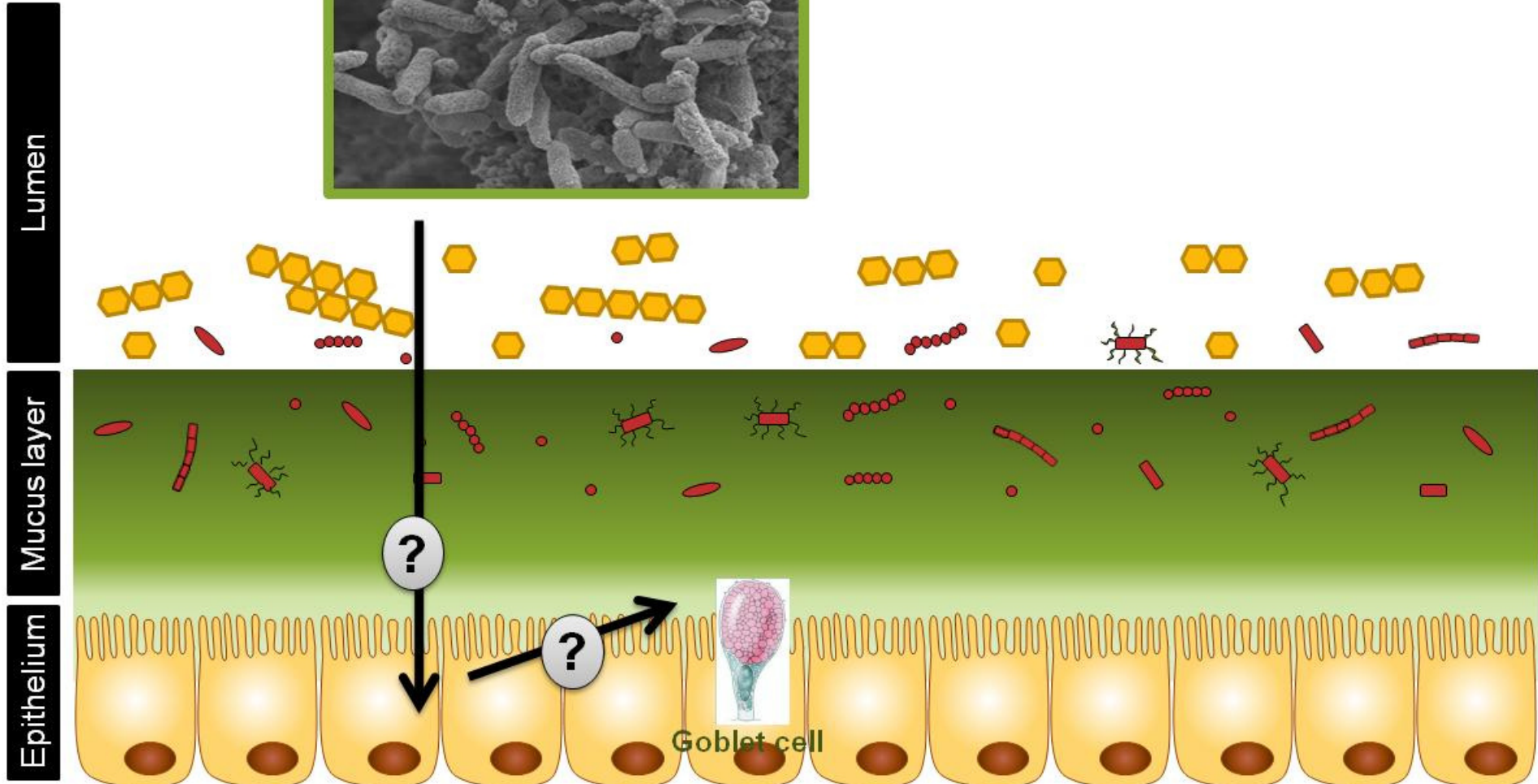
Xu *et al.*, Science, 2003

Sonnenburg *et al.*, Science, 2005

Martens *et al.*, Cell Host Microbe, 2008

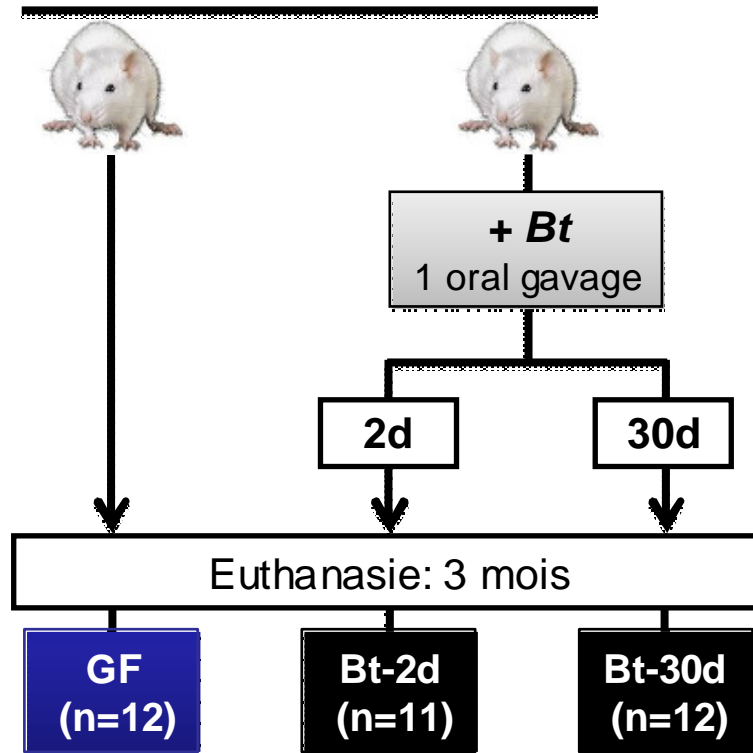
Hypothèse de travail

Fermentation des polysaccharides



Protocole expérimental

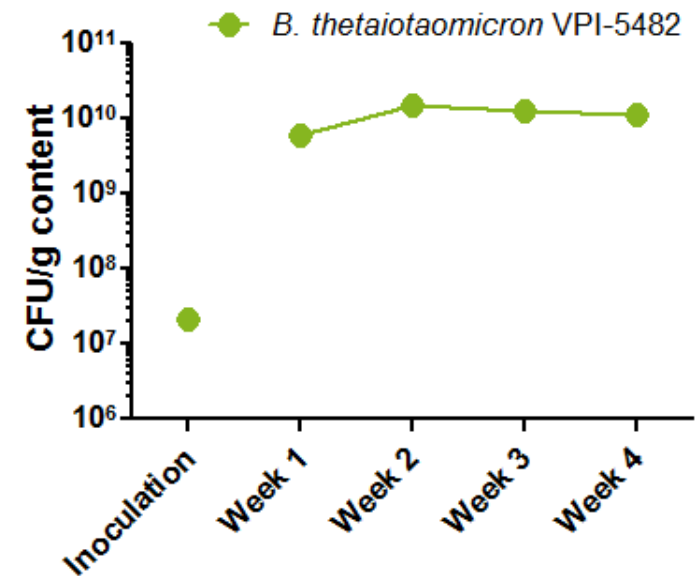
Rats axéniques



Colon & Caecum

- Histology
- Protein & mRNA
- SCFA

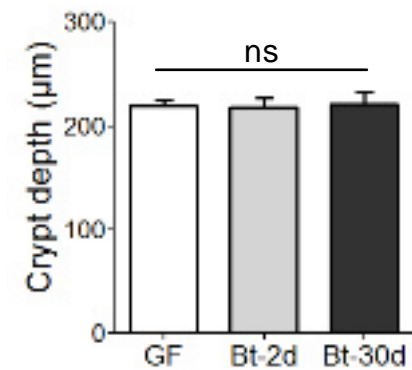
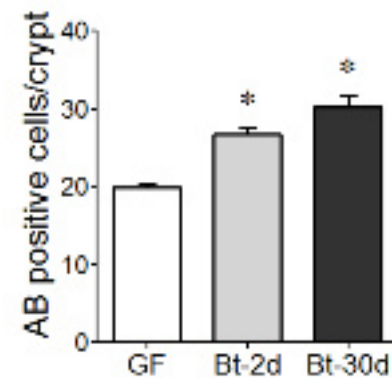
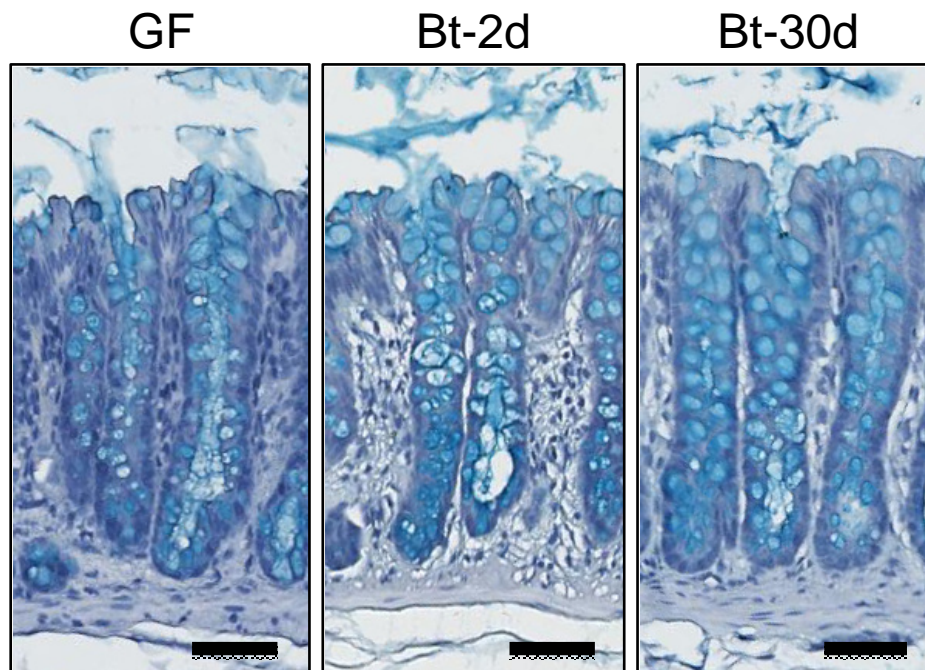
Bt rats mono-associés



Résultats

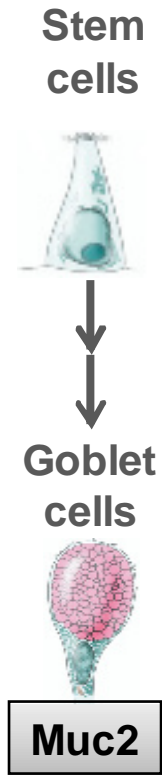


Coupes de colon colorées au bleu alcian

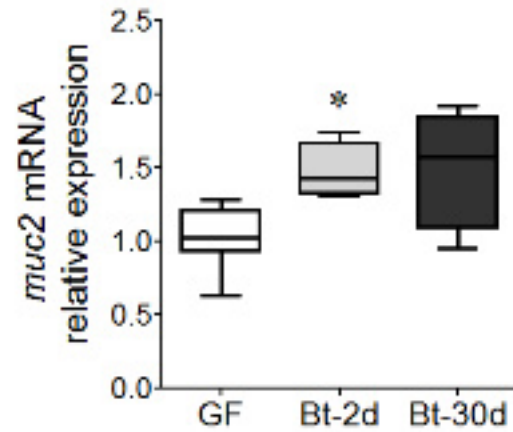


Le nombre de cellules à mucus augmente en présence de *B. thetaiotaomicron*.

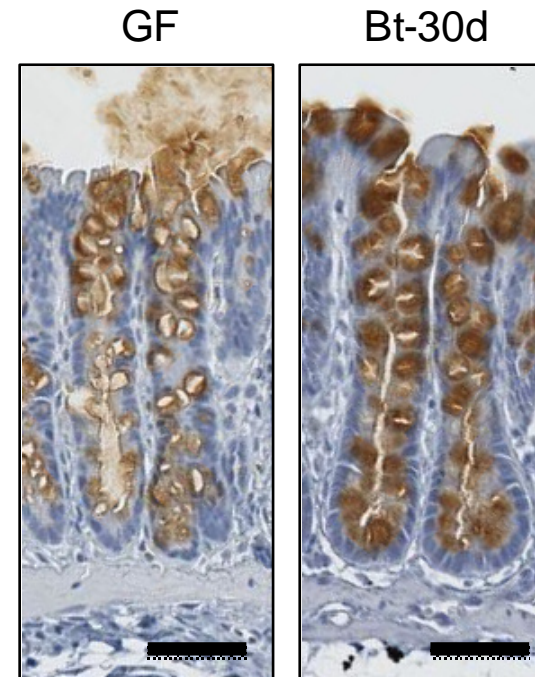
Résultats



muc2 mRNA

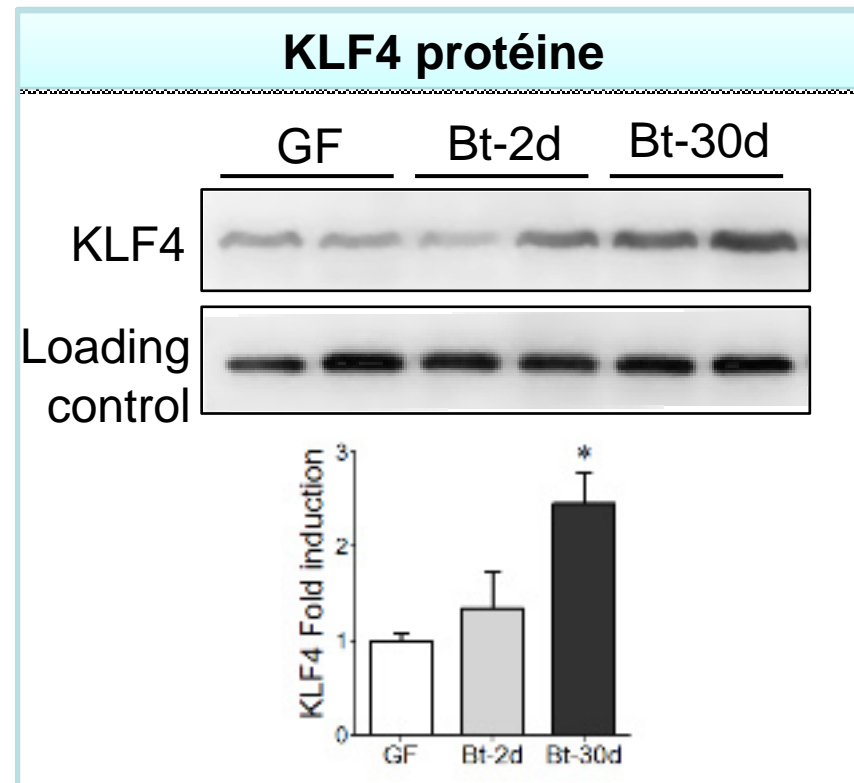
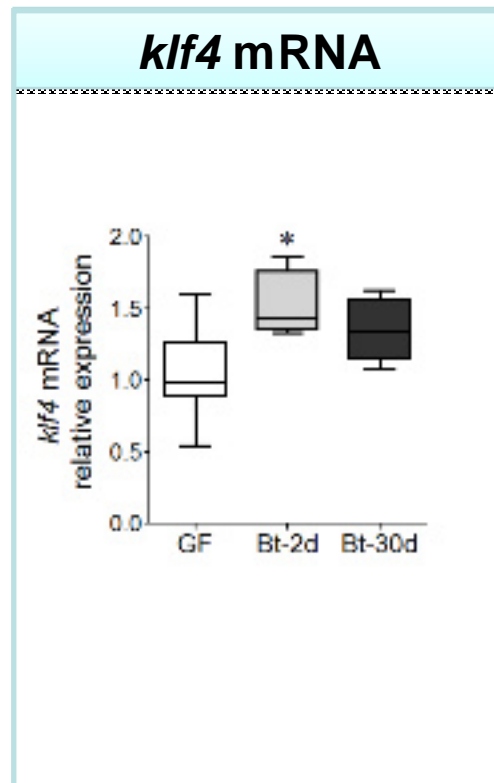
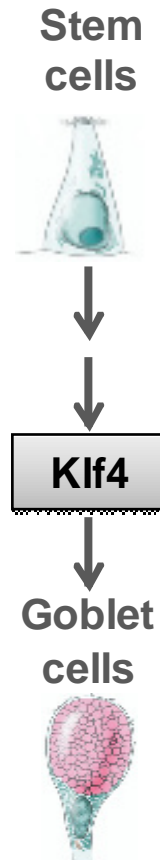


MUC2 protéine



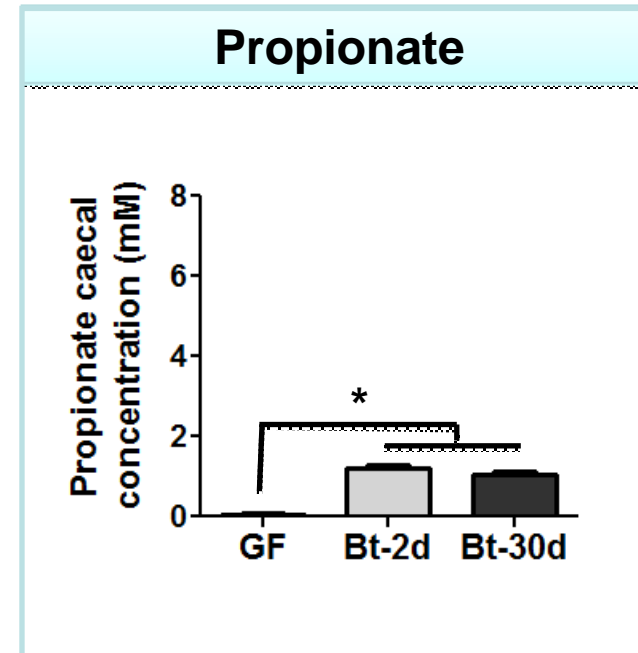
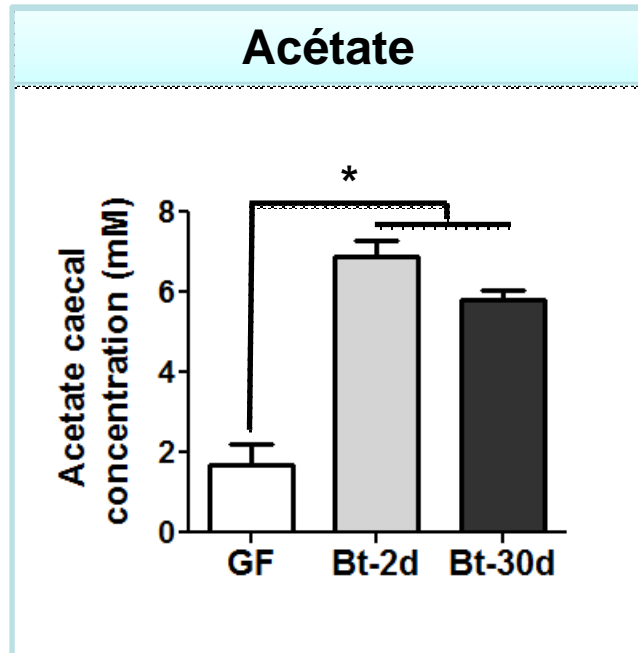
Muc2 est induit en présence de *B. thetaiotaomicron*.

Résultats



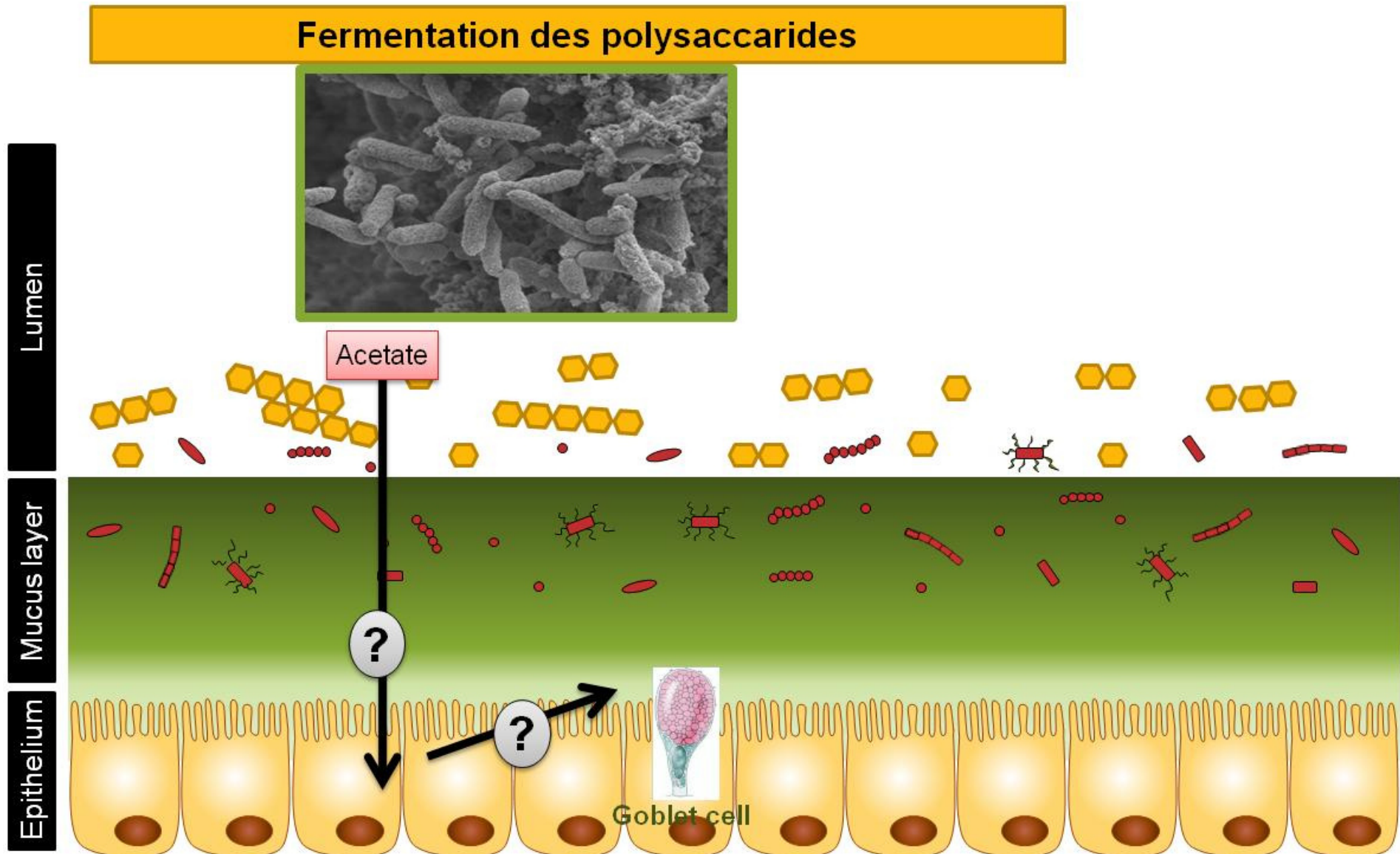
KLF4 est induit en présence de *B. thetaiotaomicron*.

Résultats



***B. thetaioamicron* produit principalement de l'acétate et du propionate**

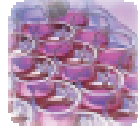
Hypothèse du rôle de l'acétate



Hypothèse du rôle de l'acétate

In vitro

HT29-MTX :
Mucus-producing cells

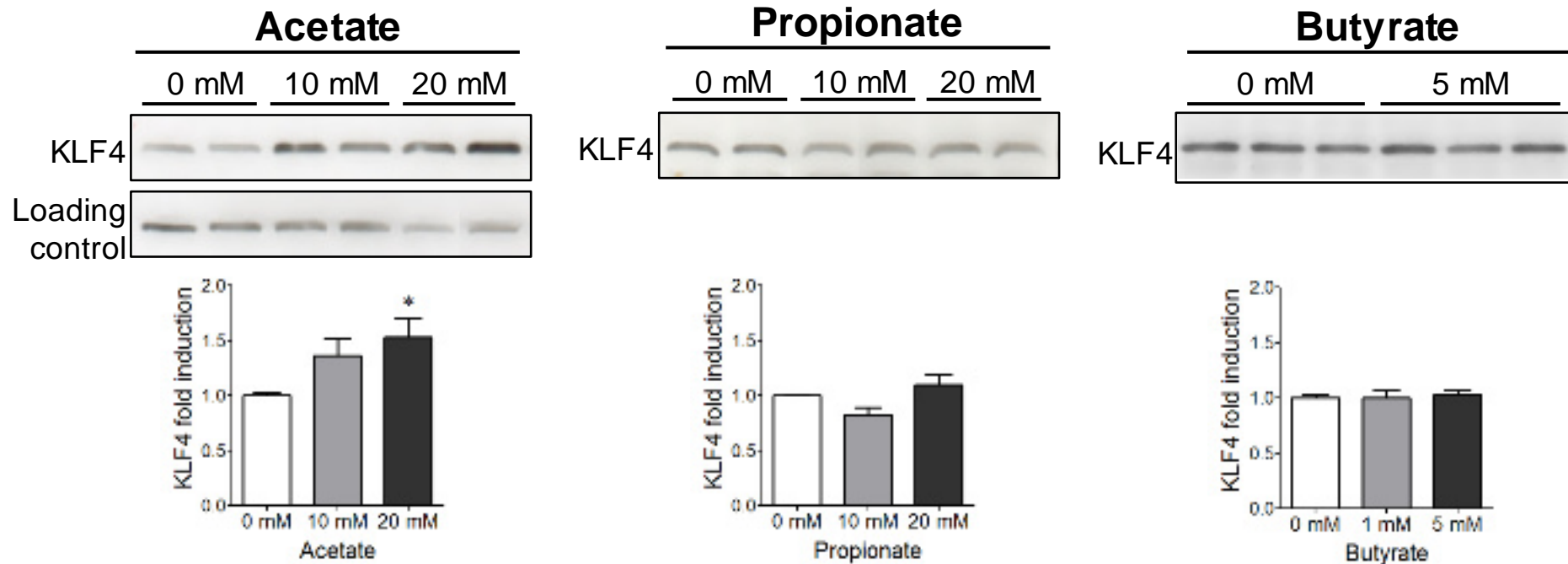


Confluent cells

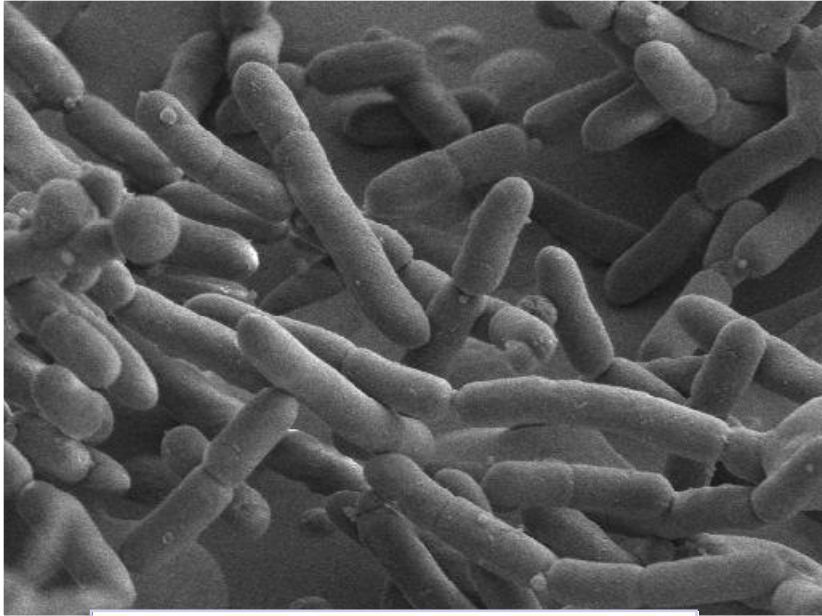
**+/- SCFA
17h**

Protein extraction

Lesuffleur *et al.*, *J Cell Science*. 1993



Effet de l'acétate sur l'induction de la protéine KLF4 *in vitro*



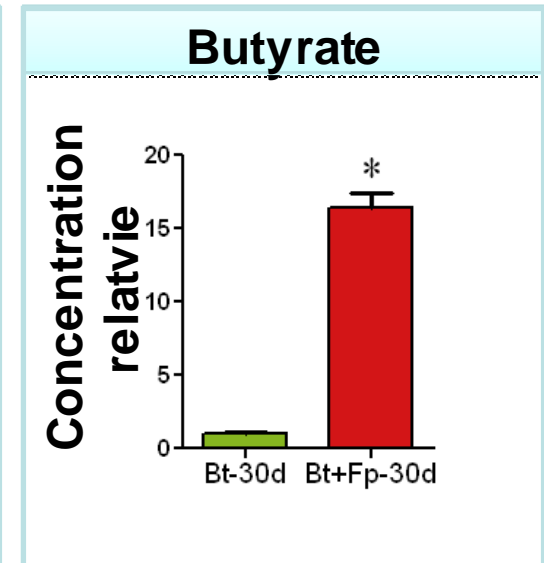
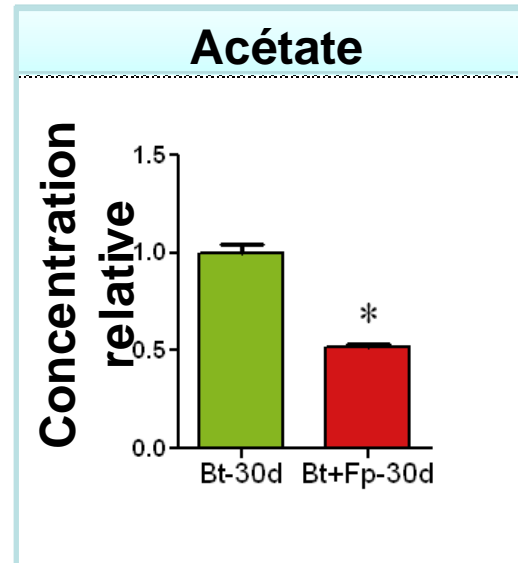
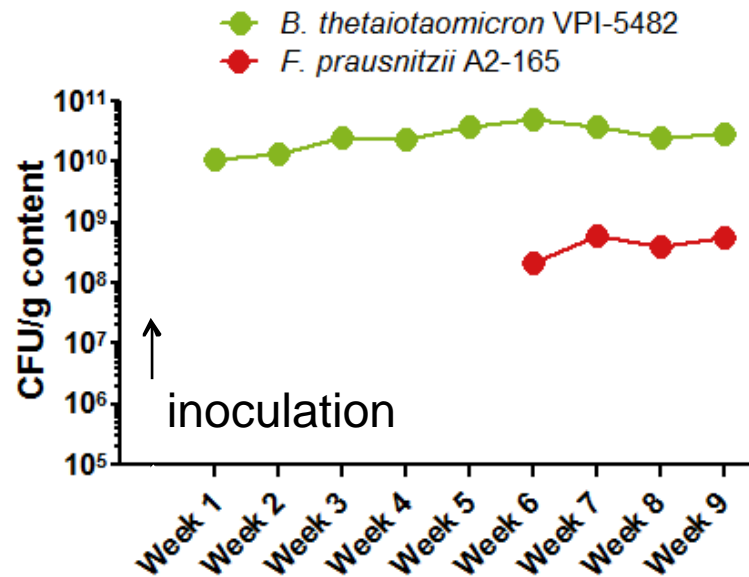
(© Platform MIMA2, T. Meylheuc)

Hypothèse du rôle de l'acétate

- ✓ membre du phylum Firmicutes
→ *Clostridium leptum*
- ✓ Très sensible à l'O₂
- ✓ Consommatrice d'acétate
- ✓ *F. prausnitzii* est un acteur et un marqueur de la santé intestinale

Moduler l'acétate *in vivo*

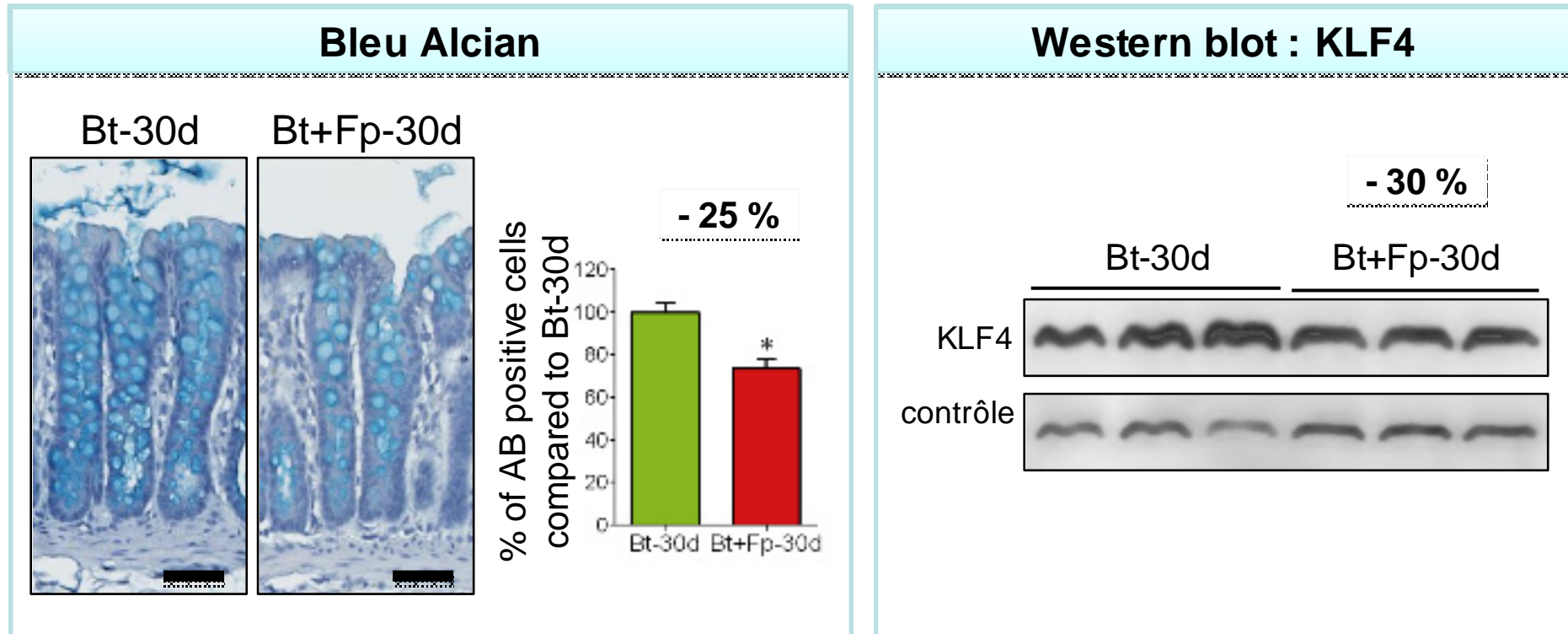
Rats di-associés *Bt+Fp*



- équilibre entre les deux bactéries
- *B. thetaiotaomicron*: dominant

Nouveau modèle gnotobiotique avec deux représentants majeurs du microbiote humain adulte

Etude de l'épithélium du colon dans les animaux di-associés



En présence des deux bactéries (Bt+Fp), l'effet de *B. thetaiotaomicron* sur la voie du mucus semble atténué

❄ le microbiote est un acteur agissant sur la structure et l'homéostasie de l'épithélium colique



Philippe LANGELLA



Laura Wrzosek



Sylvie MIQUEL

Marie-Louise NOORDINE
Chantal BRIDONNEAU
Claire CHERBUY
Julie TOMAS
Camille MAYEUR
Véronique ROBERT
Catherine PHILIPPE



P. GUILLAUME F. JULY



St. BOUET



T. MEYLHEUC