



Les Maladies et l'Homme

Emilie Camiade, MCF
Département de Microbiologie
02 Juin 2017

emilie.camiade@univ-tours.fr

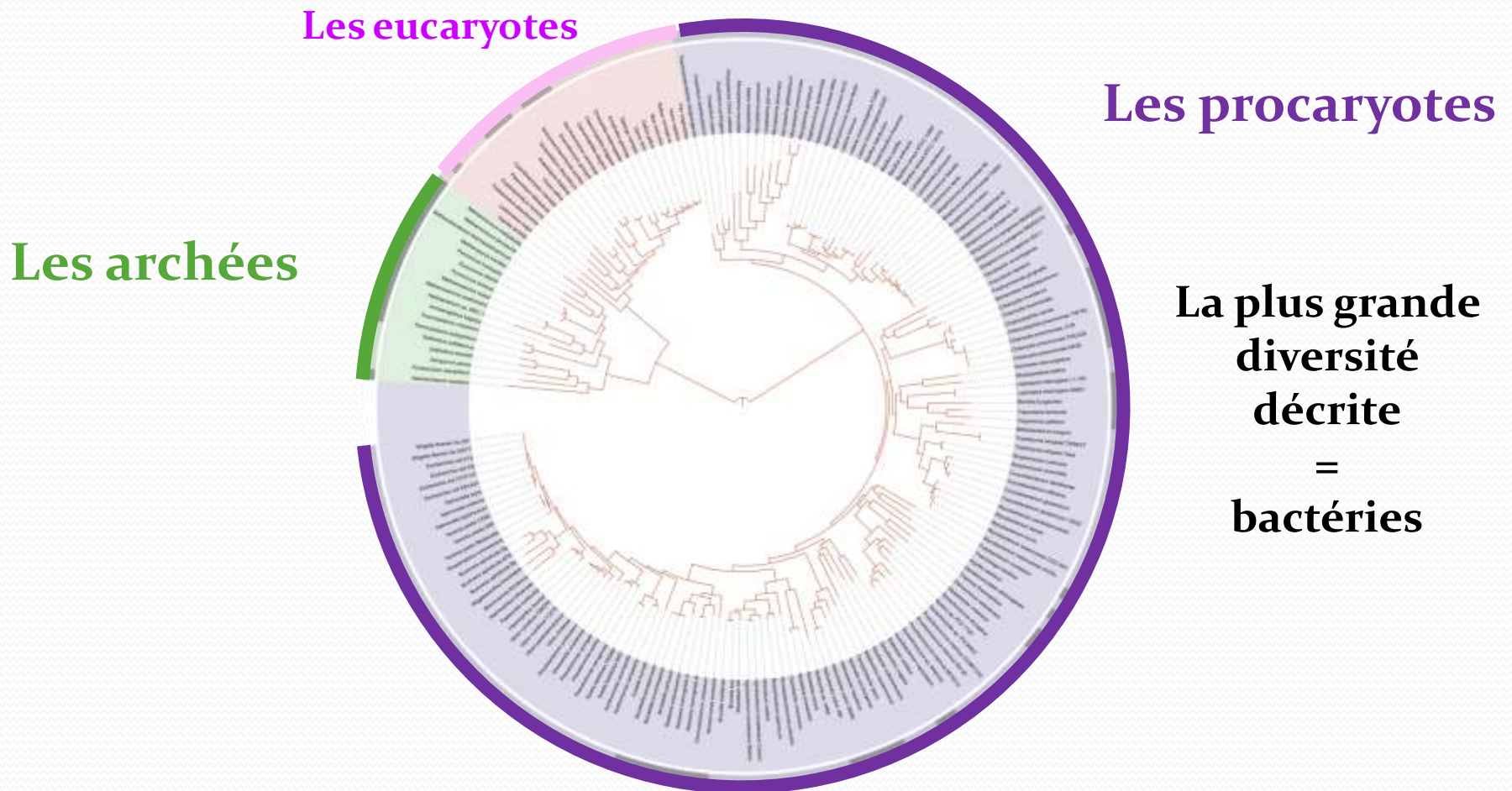
Des entrailles au cerveau,
les bactéries...

L'évolution des bactéries...

Les « nouvelles » thérapies
antibactériennes...

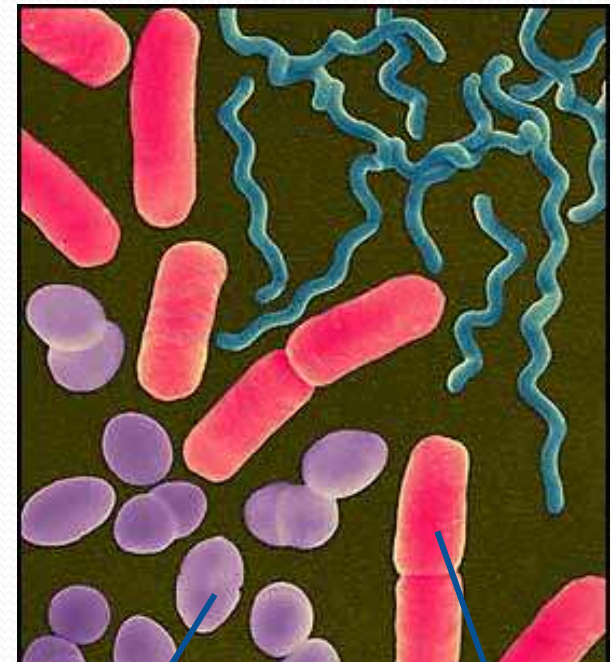
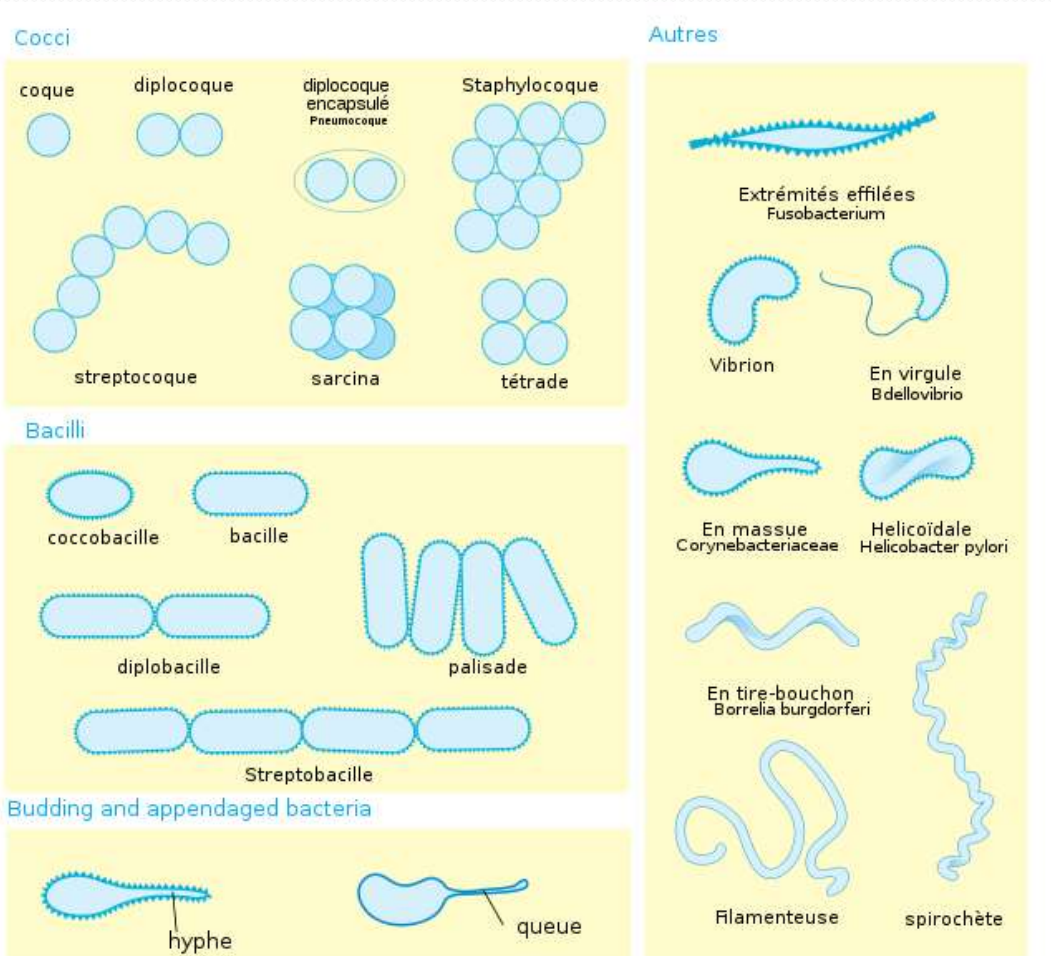
Des entrailles au cerveau,
les bactéries...

La diversité du monde vivant



Arbre phylogénétique des organismes vivants

La diversité du monde bactérien

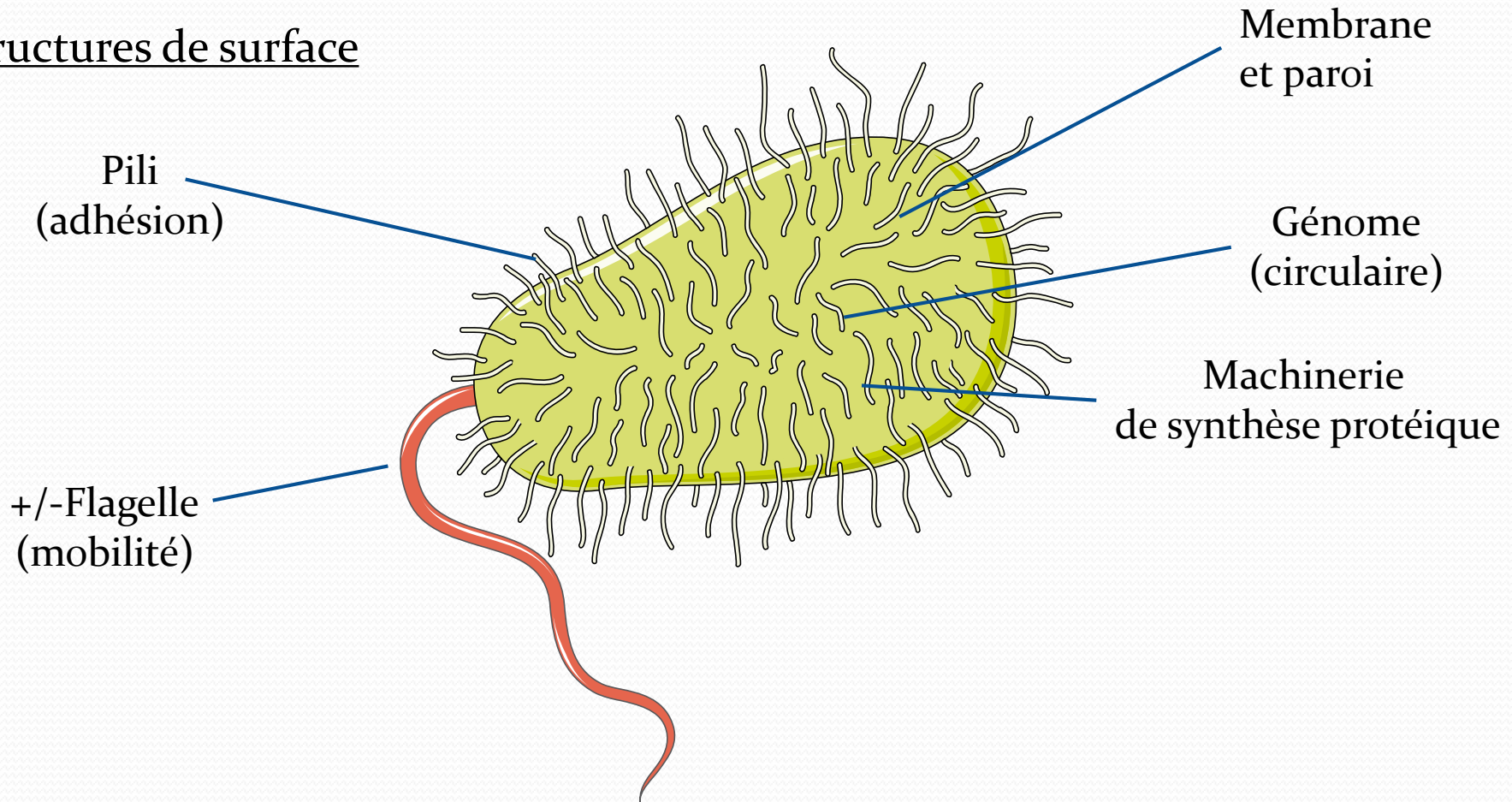


Coques

Bacilles

Petit rappel: c'est quoi une bactérie ?

Structures de surface

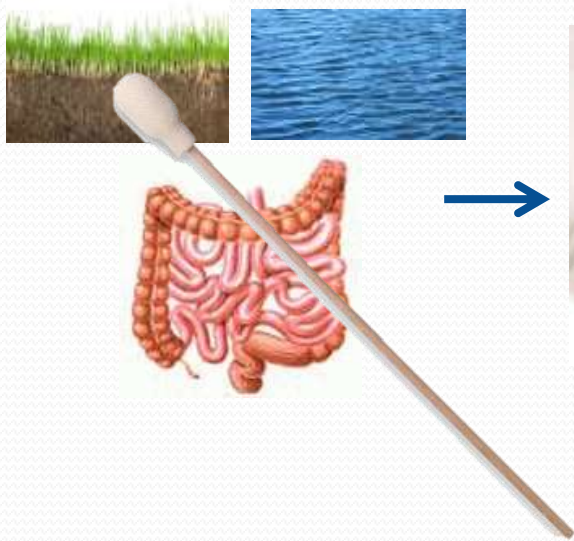


Notions d'écologie microbienne

- Les bactéries sont présentes dans tous les biotopes (sol, air, eau de mer, eau douce)
- $>10^{31}$ sur Terre
- La plupart sont non caractérisées car non cultivables...

Notions de microbiologie

**Prélèvement
Environnement**



**Milieux
d'enrichissement
et/ou sélectif**



cultures



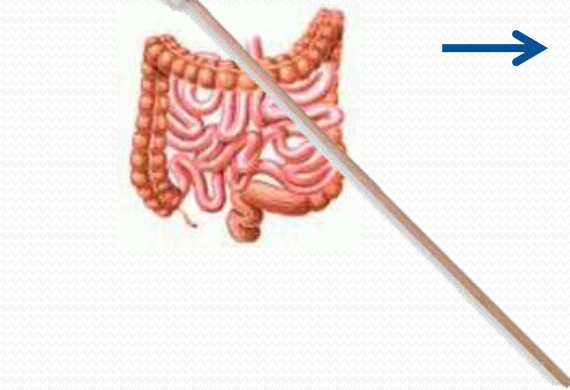
**Analyses
et caractérisations**

Notions de microbiologie

Prélèvement
Environnement



~~Milieux
d'enrichissement
et/ou sélectif~~



Toutes les bactéries ne se cultivent pas de la même façon
Certaines sont très exigeantes et ne se cultivent pas du tout !!!

Notions d'écologie microbienne

- La plupart sont non caractérisées car non cultivables...
- Exemple au niveau intestinal:

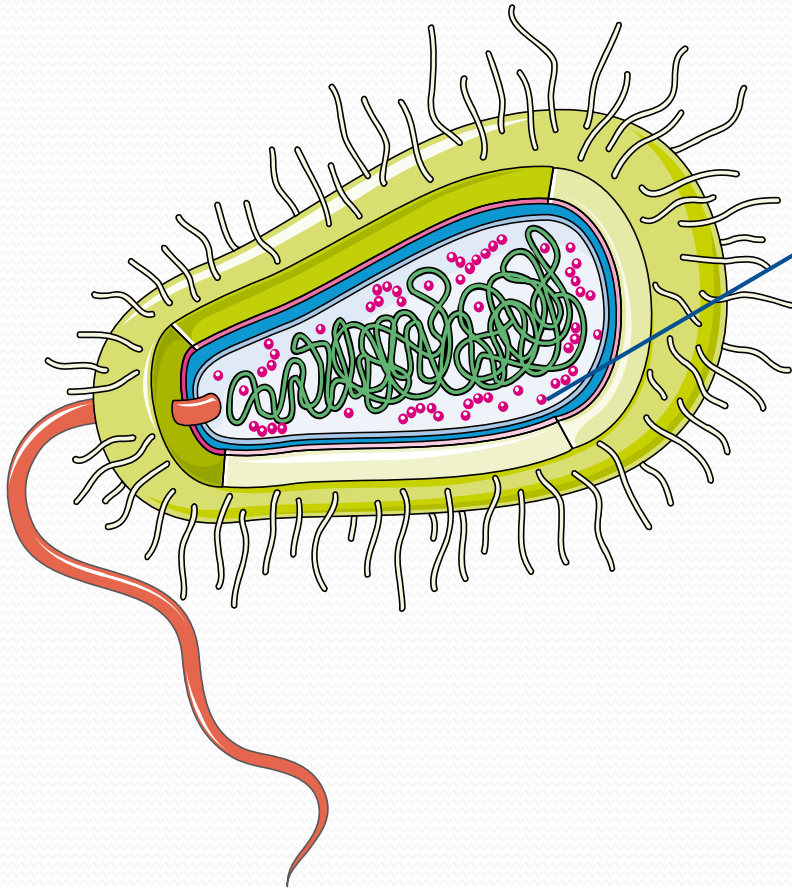


**Milieu
d'enrichissement
et/ou sélectif**



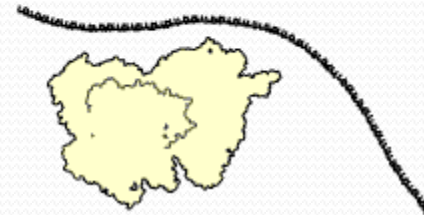
Comment les identifier ?

Identifier les espèces bactériennes non cultivables



Machinerie
de synthèse protéique :
Le ribosome

Sa composition est propre à
chaque souche de bactérie



Notions d'écologie microbienne

- La plupart sont non caractérisées car non cultivables...
- Exemple au niveau intestinal dans les années 2000

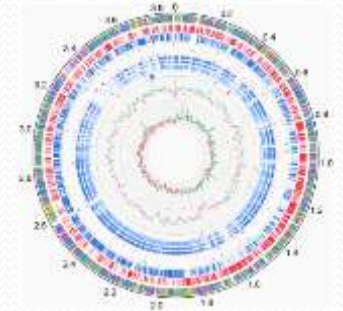


Milieu
d'enrichissement
et/ou sélectif



Caractérisation :
Génomique

Quels gènes dans
un organisme ?

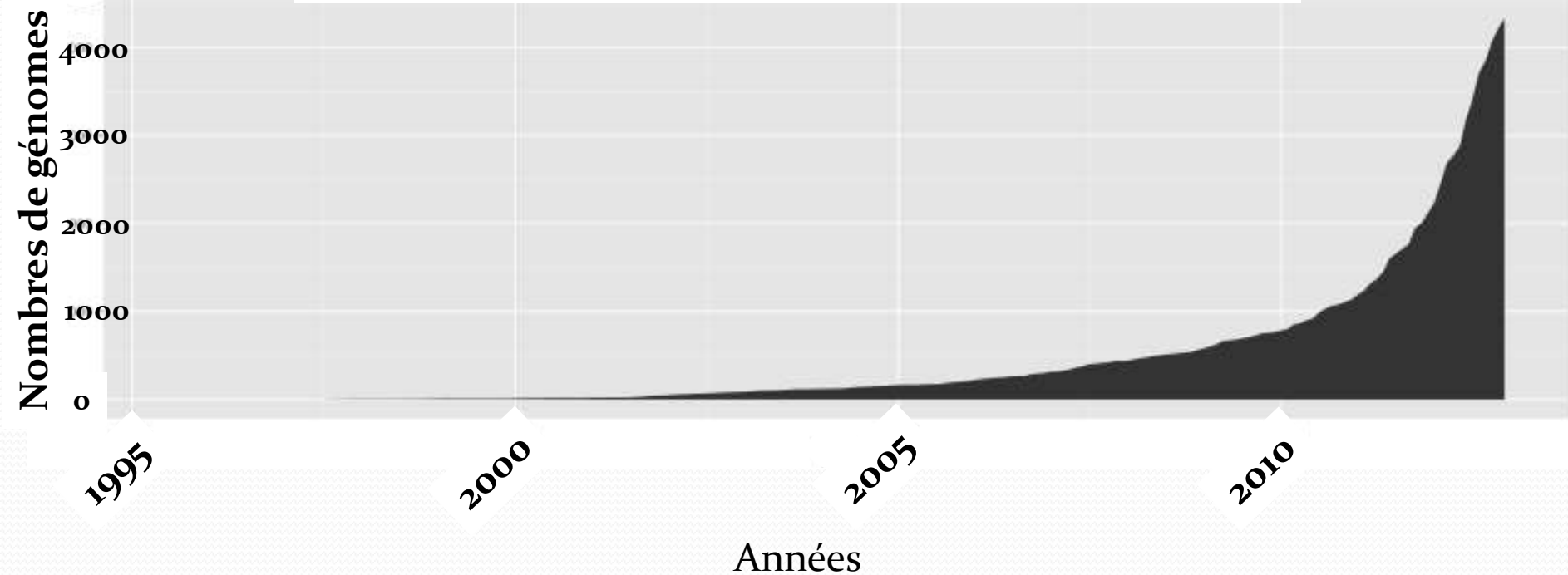


Microorganismes non caractérisés
= grande majorité (>80%)

L'ère génomique

- Une grande évolution des techniques de séquençage...

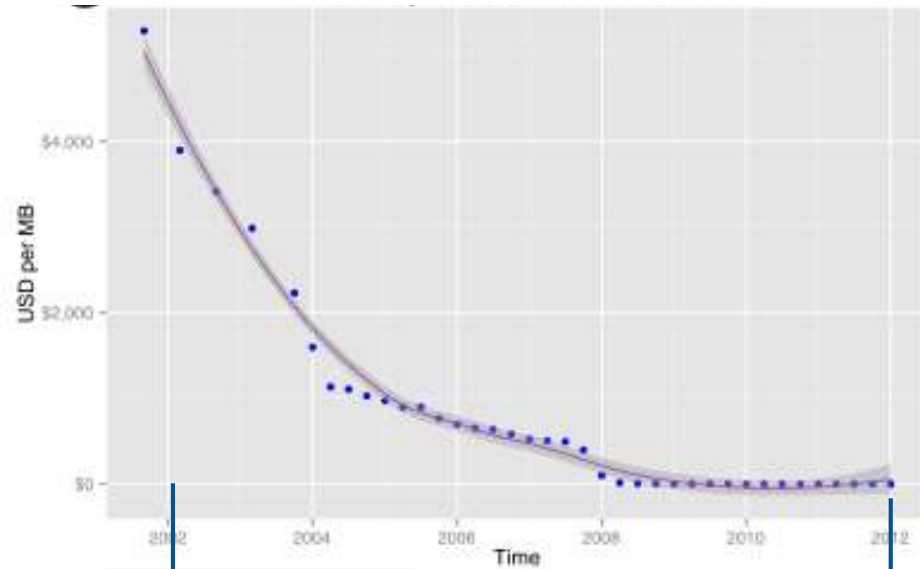
Génomes bactériens et d'archées soumis à Genbank



L'ère génomique

- ...et une forte diminution des coûts

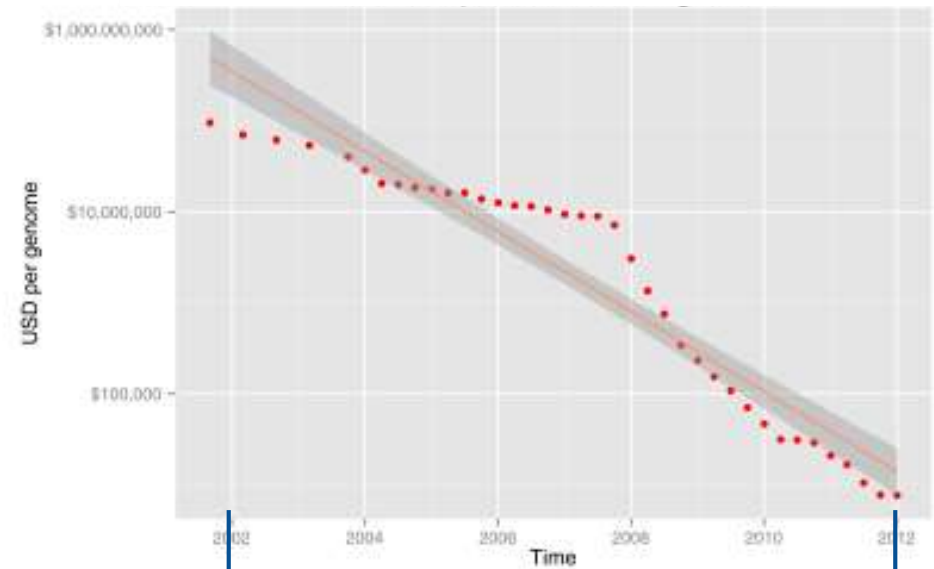
Coût du séquençage d'1 million de bases



2002:
1Mb > 4000\$

2012:
1Mb < 1\$

Coût du séquençage d'1 génome humain



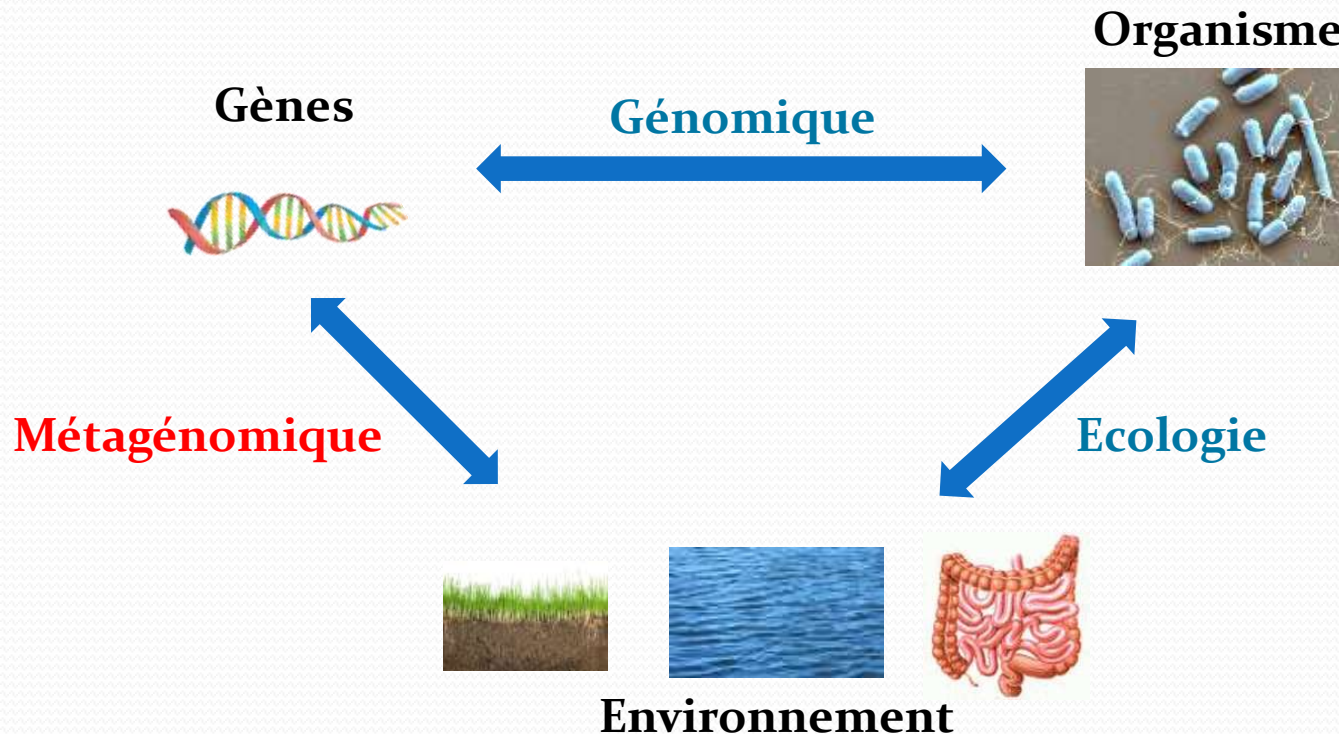
2002:
Plusieurs
Millions de \$

2012:
< 50000\$

L'ère métagénomique...

... une nouvelle façon d'appréhender l'écologie microbienne

la métagénomique = étude de l'ensemble des génomes issus d'un même milieu



L'ère métagénomique...

... une nouvelle façon d'appréhender l'écologie microbienne

la métagénomique = étude de l'ensemble des génomes issus d'un même milieu

L'environnement



Sol
Eau

Intestin

...

1. Prélèvements



2. Extraction d'ADN



3. Séquençage



4. Analyse
(aujourd'hui
= long et coûteux)

L'ère métagénomique...

... une nouvelle façon d'appréhender l'écologie microbienne

la métagénomique = étude de l'ensemble des génomes issus d'un même milieu



**Une information
devenue accessible !!!**

L'ère métagénomique...

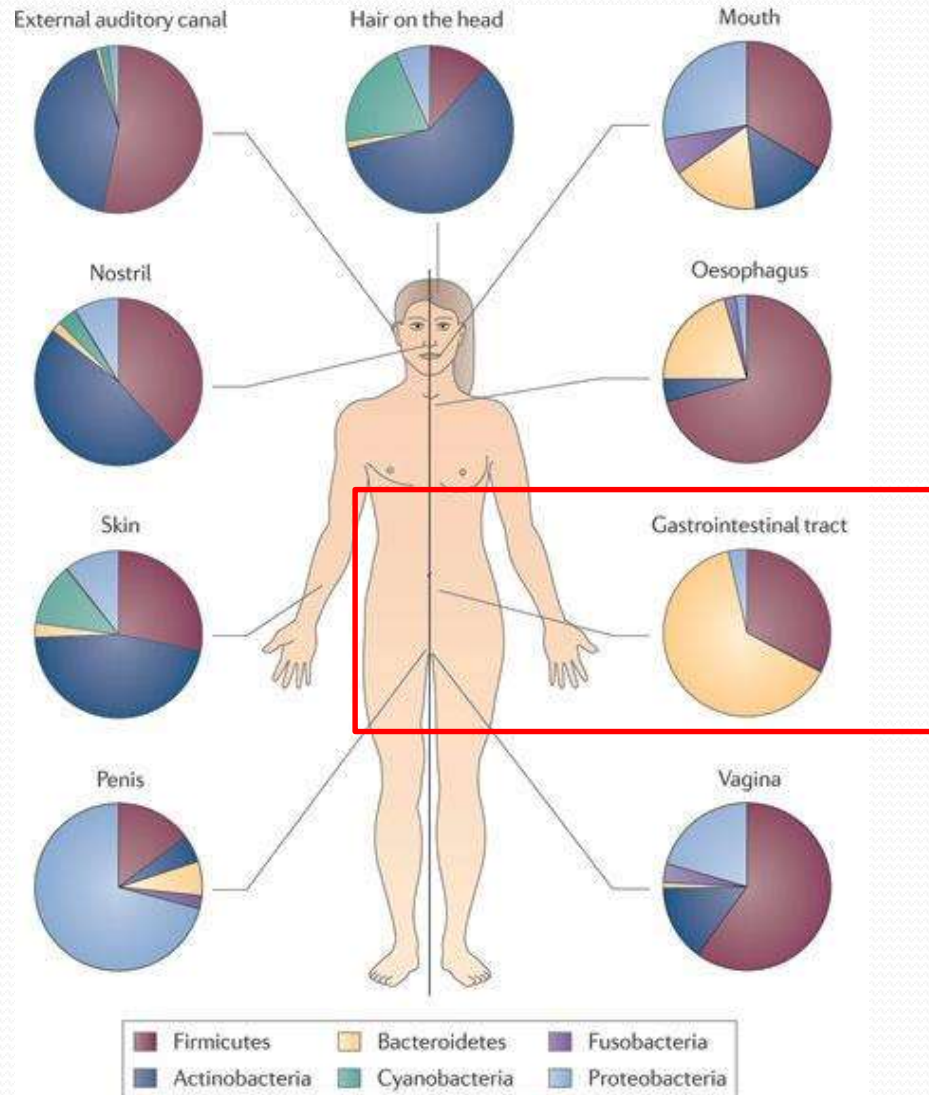
... 2 projets majeurs sur le microbiome humain :



J. Gordon

Séquençage des génomes **des bactéries**
qui colonisent le corps humain
(peau, tube digestif, muqueuses...)
(USA)

L'ère métagénomique



L'ère métagénomique...

... 2 projets majeurs sur le microbiome humain :



J. Gordon

Séquençage des génomes **des bactéries**
qui colonisent le corps humain
(peau, tube digestif, muqueuses...)
(USA)



SD. Ehrlich

Séquençage des génomes des bactéries
qui colonisent le tube digestif,
S'intéresse à la fonction
Comparaison des individus
sains vs malades
(Européen)

Le microbiote intestinal, un organe à part entière

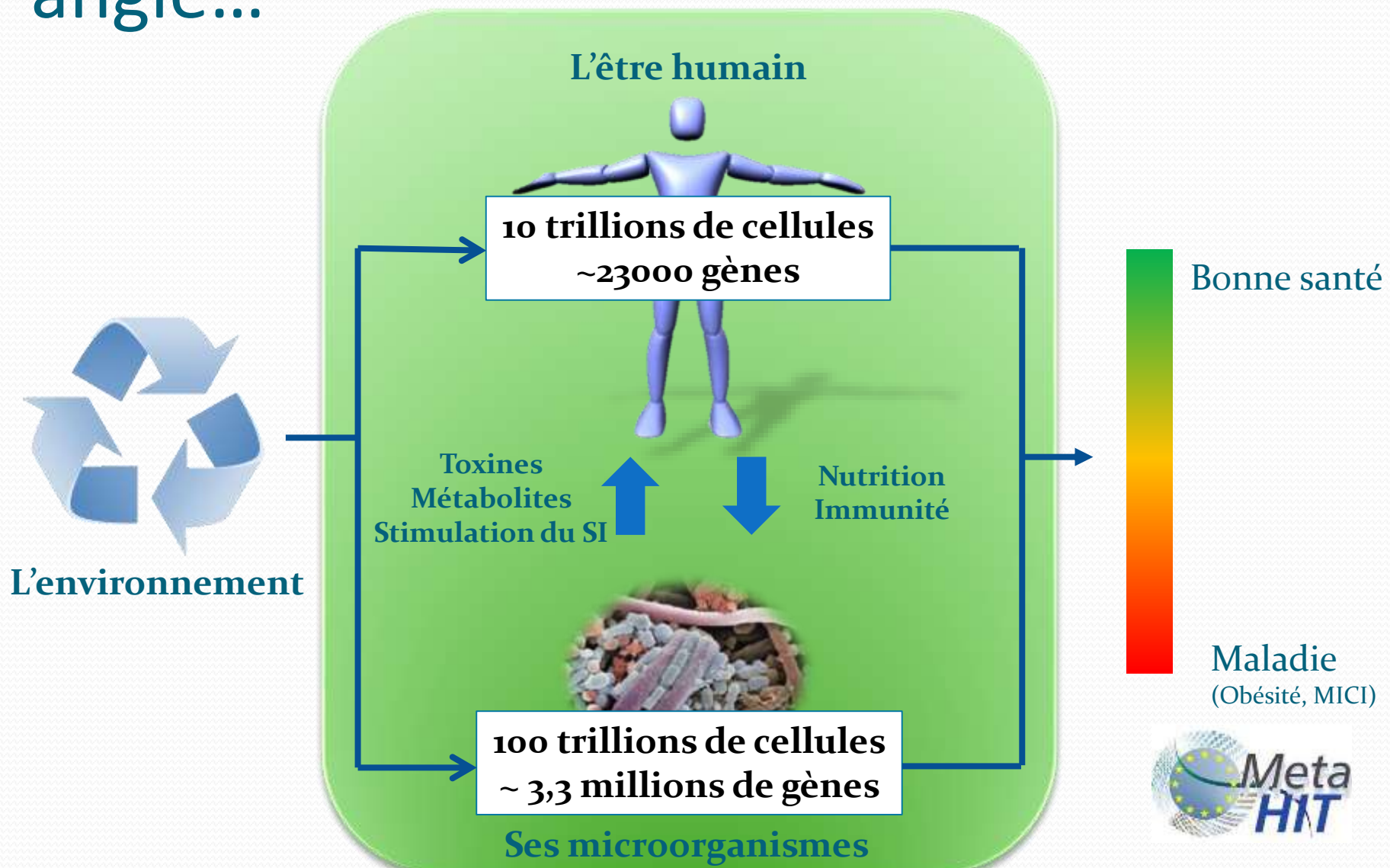
1. tube digestif = 100 000 milliards de bactéries,
(10 à 100 x le nombre de cellules de notre corps)
= 1 à 2 kg

2. un rôle important pour
notre digestion + pour notre
système immunitaire
et notre santé en général.

3. Le potentiel fonctionnel de
ces bactéries intestinales
(microbiote) est énorme = 150
fois plus de gènes que le
génomme humain
3,3 millions de gènes !!!



L'organisme humain sous un nouvel angle...



Le microbiote intestinal, un organe à part entière

- Découverte des entérotypes
 - De façon analogue au groupe sanguin A, B et O, notre microbiote présente une population bactérienne dominante caractéristique (3 types) qui va interagir avec les autres bactéries



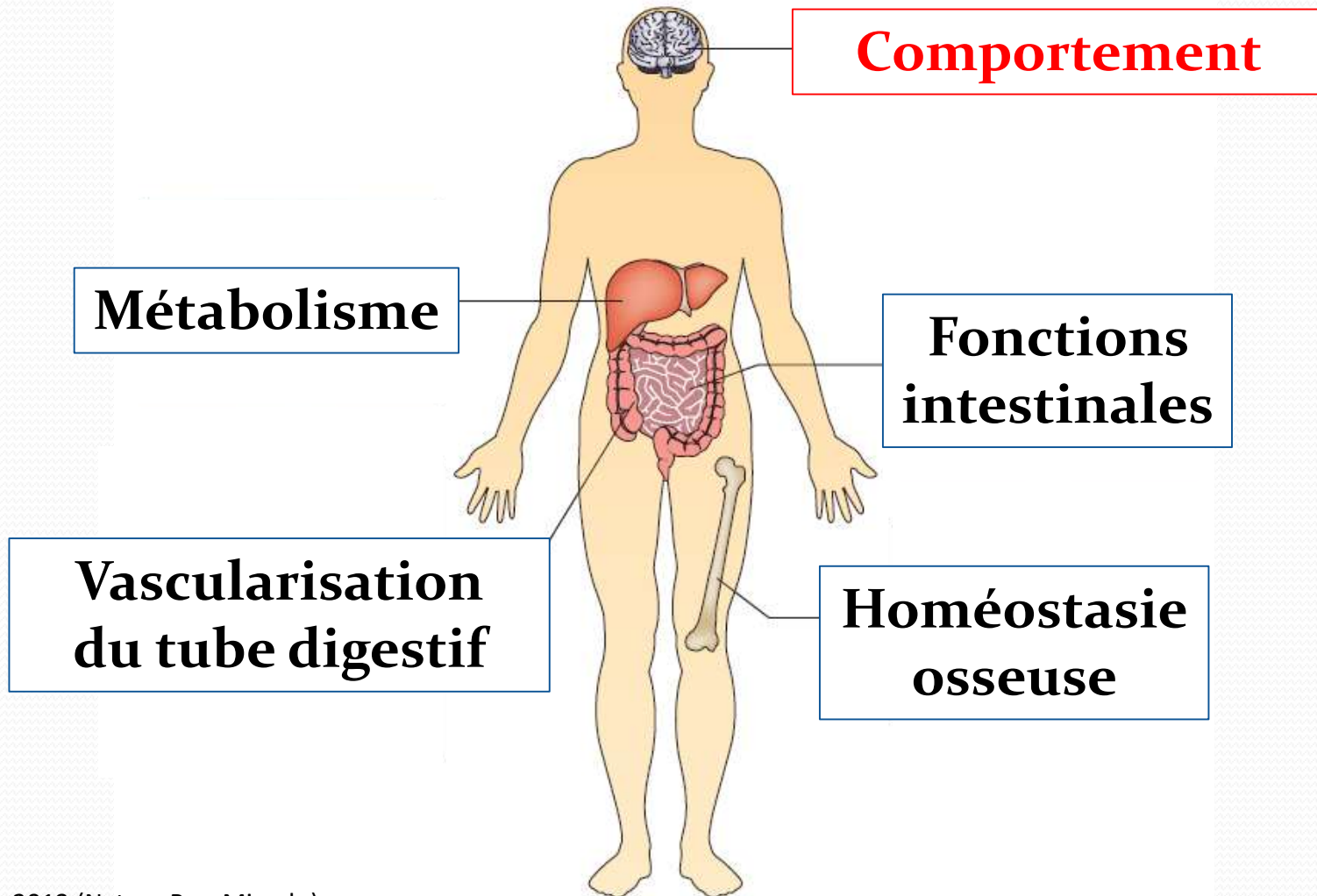
Le microbiote intestinal, un organe à part entière



Bacteroïdes

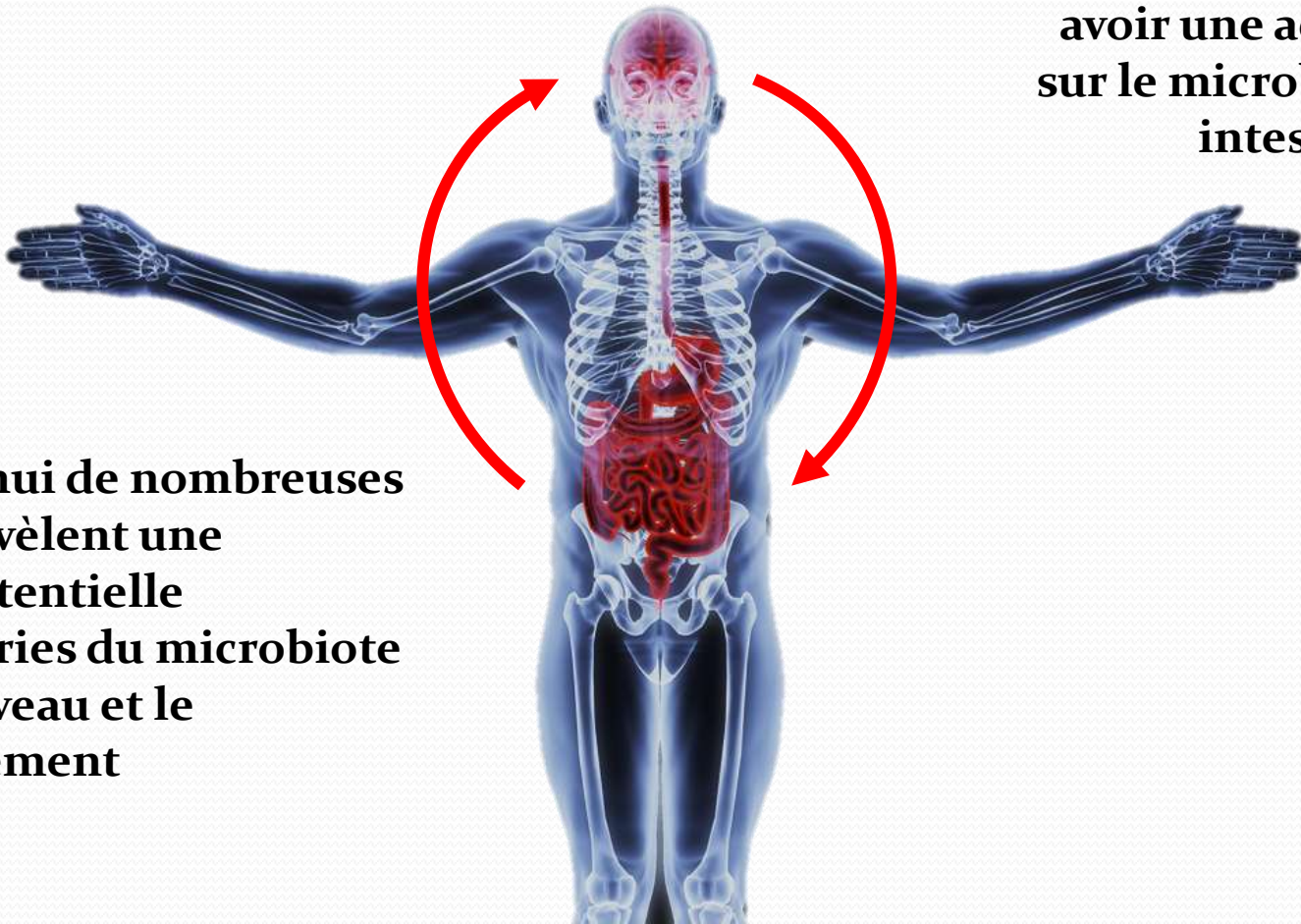


Le microbiote intestinal : un champ d'action considérable



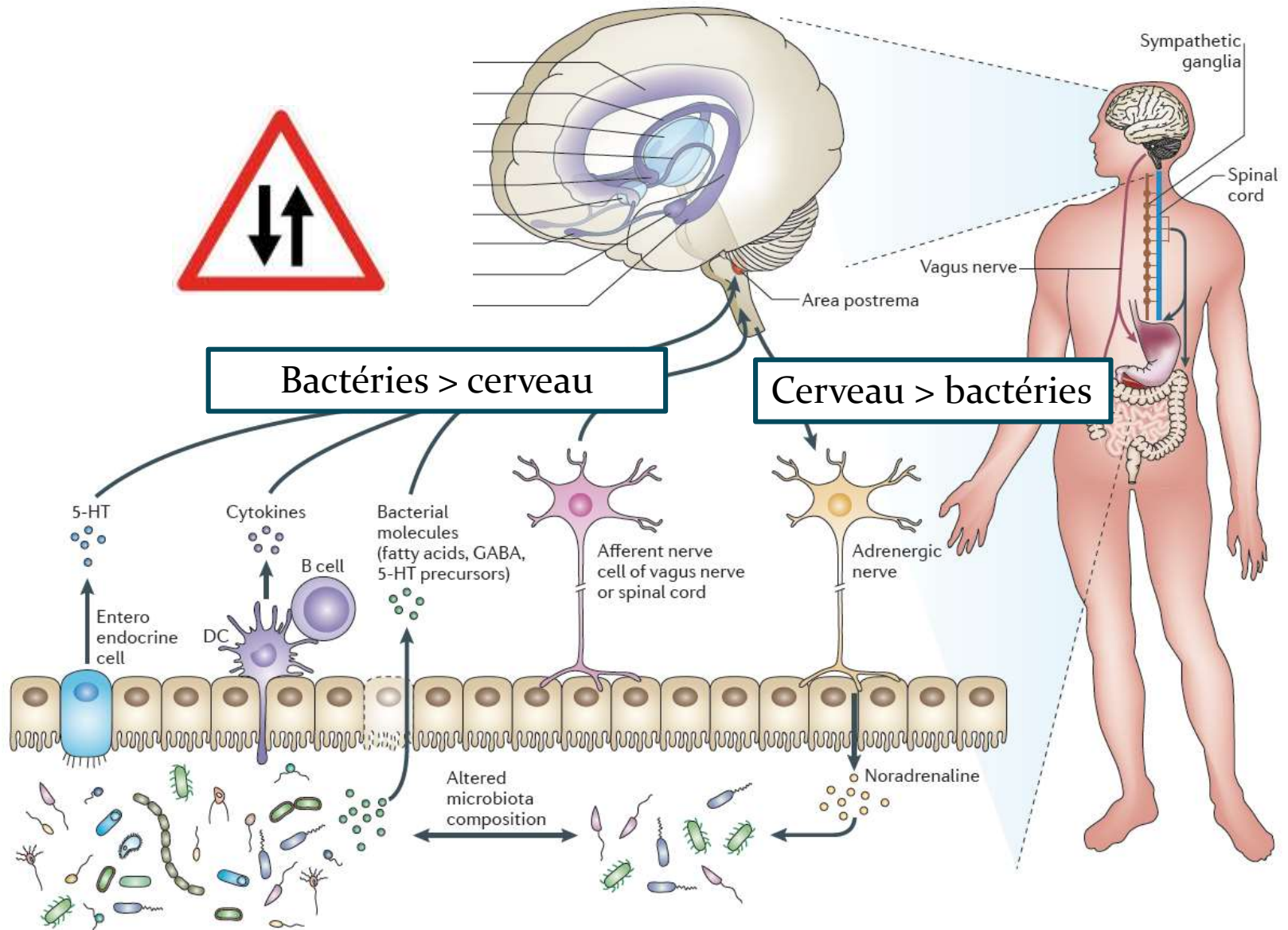
Le « Gut-brain axis »

Réciproquement,
le cerveau et les
émotions peuvent
avoir une action
sur le microbiote
intestinal



Aujourd'hui de nombreuses
études révèlent une
action potentielle
des bactéries du microbiote
sur le cerveau et le
comportement

Le « Gut-brain axis »

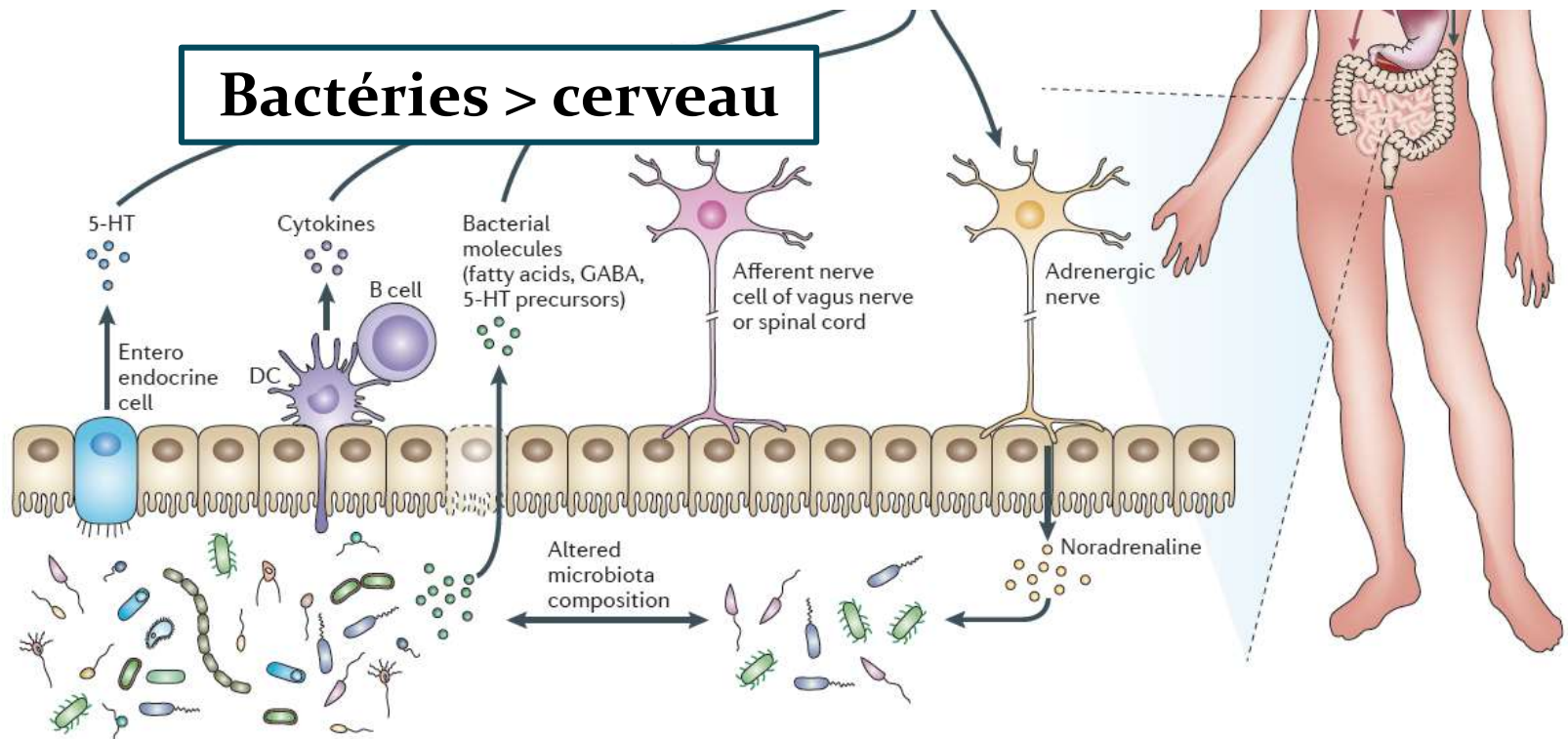


Le « Gut-brain axis »

Dialogue *via* la sécrétion de médiateurs chimiques:

- Les bactéries produisent des molécules directement actives sur le cerveau
- Des hormones sont produites par des cellules spécialisées en réponse à l'interaction avec les bactéries
- Des cytokines sont produites par les cellules du système immunitaire intestinal et vont agir sur le cerveau

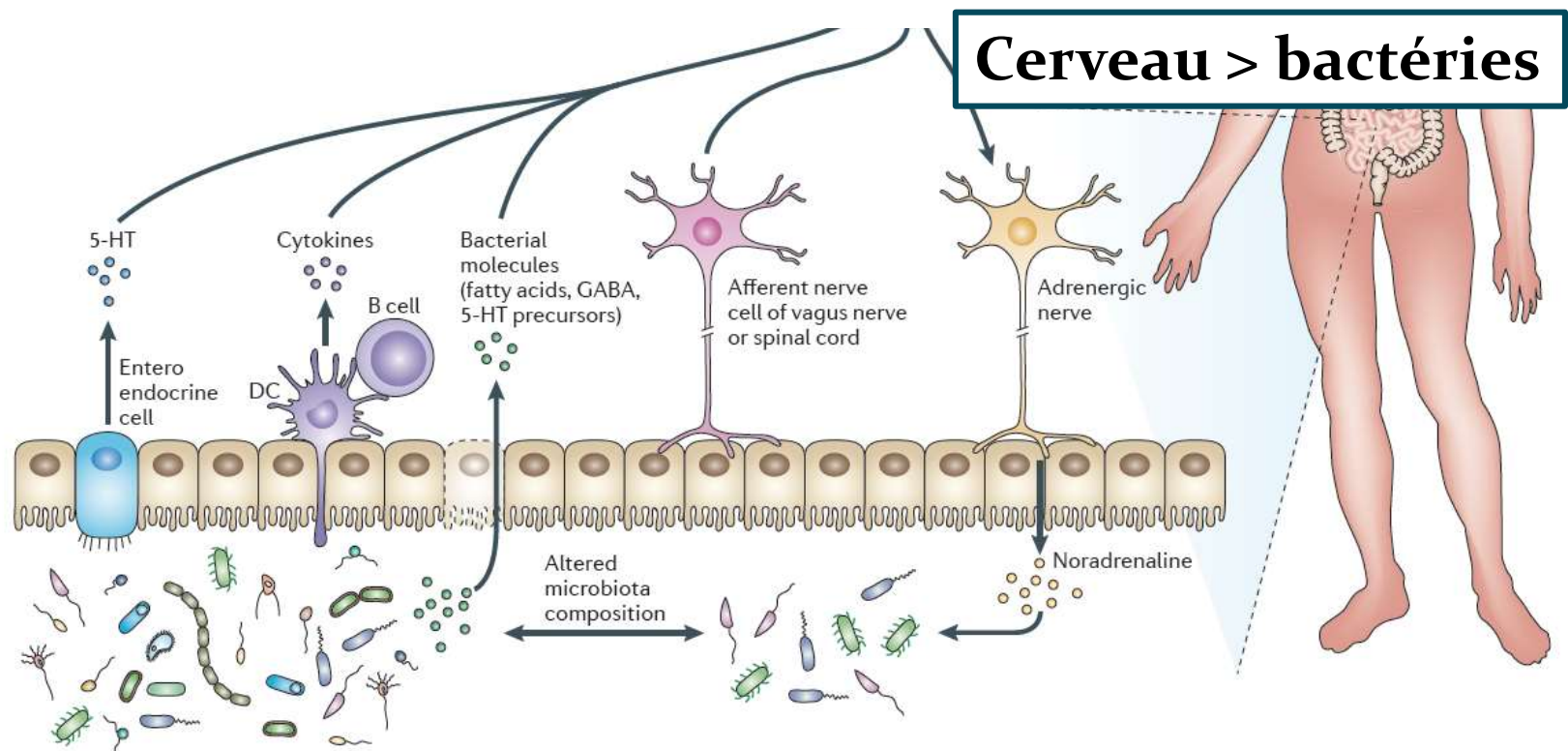
Dialogue *via* le système nerveux intestinal



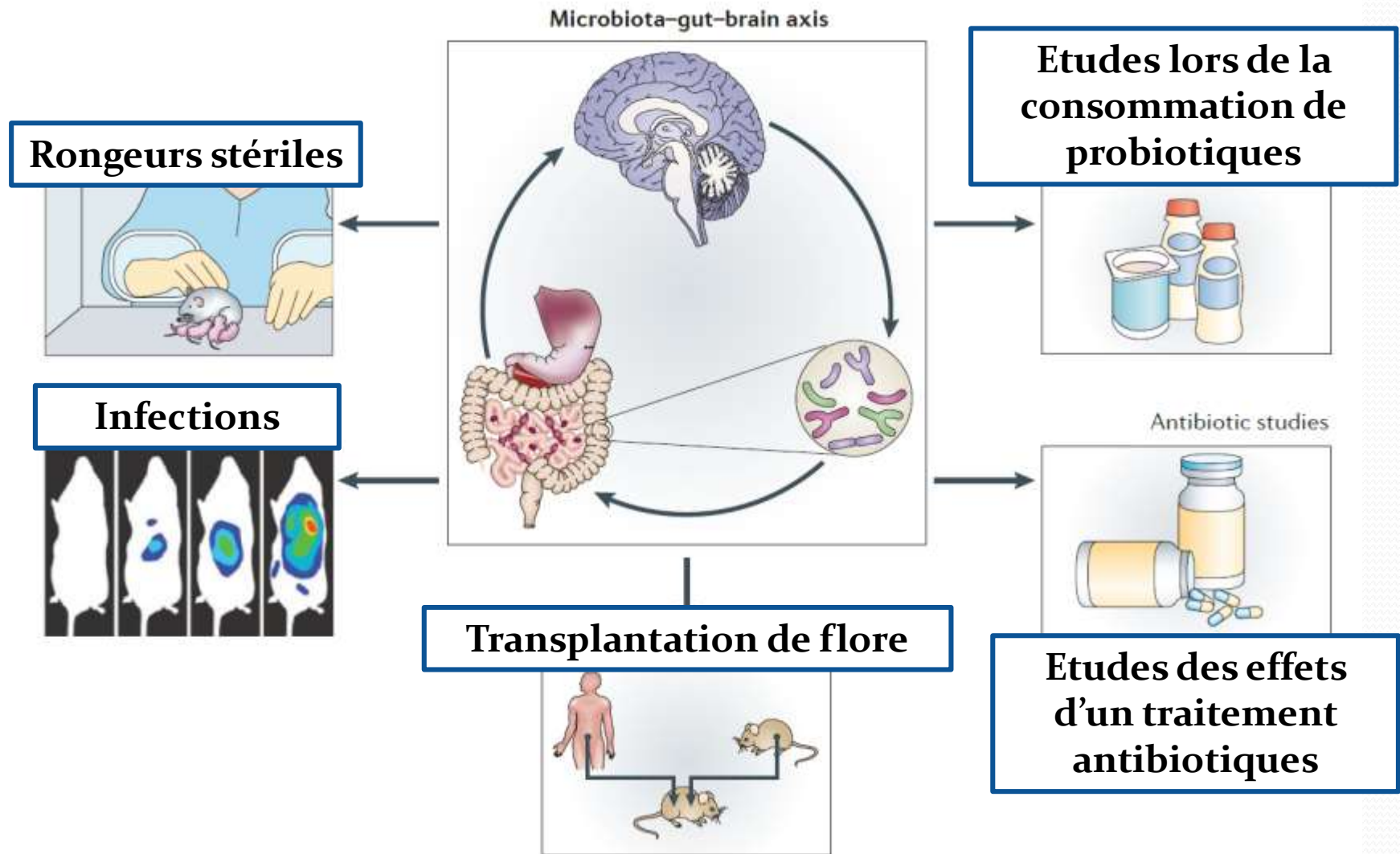
Le « Gut-brain axis »

Dialogue *via* le système nerveux intestinal

- Production de médiateurs chimiques par les cellules nerveuses vers la lumière intestinale qui vont agir sur les bactéries



Le « Gut-brain axis » : comment l'étudier ?



Évaluer le stress, la dépression et l'anxiété chez les animaux



Test du labyrinthe

Evaluer le stress, la dépression et l'anxiété chez les animaux



Test du passage lumière/obscurité

Quelques exemples de résultats marquants

- Les animaux dépourvus de flore sont diminués dans leurs capacités de mémorisation et d'apprentissage ce qui augmente leur taux de stress (N. Sudo, 2004)
- Cet effet peut être corrigé par l'implantation d'une bactérie qui colonise typiquement l'intestin à la naissance (*Bifidobacterium infantis*)
- L'échange de flore entre 2 races de souris ayant des comportements caractéristiques permet d'échanger leur comportement
- La consommation de certains probiotiques permettrait de moduler certaines activités cérébrales...

Perspectives

- Des liens commencent à s'établir entre certaines maladies intestinales et le microbiote (obésité, Maladies inflammatoires chroniques)
- Des liens pourront peut-être s'établir entre le microbiote intestinal et certaines maladies entraînant des troubles psychiatriques (autisme, schizophrénie, dépression, anxiété...)
- La modulation de ce microbiote intestinal pourrait constituer une stratégie thérapeutique

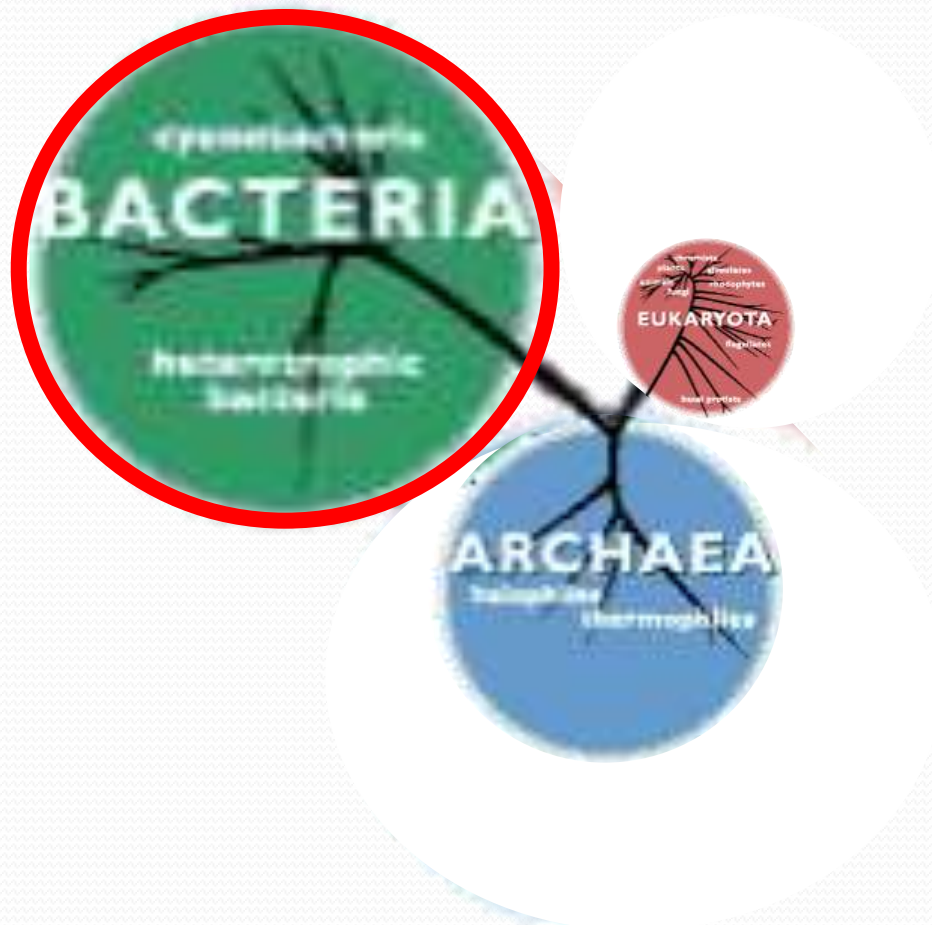
L'évolution des bactéries...

...Exemple de l'immunité
bactérienne anti-virale

Les bactériophages

=

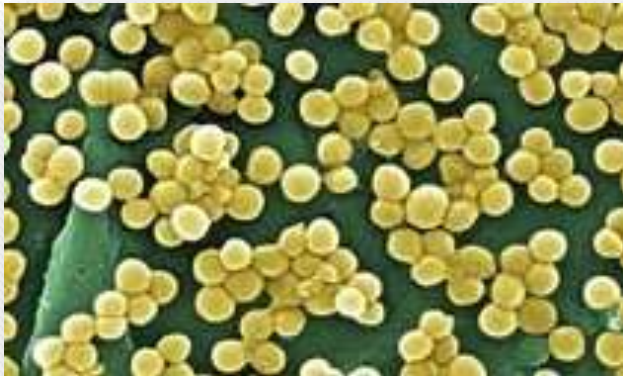
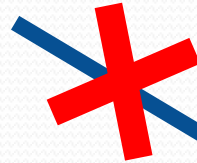
Des virus qui infectent uniquement les bactéries



Les bactériophages sont spécifiques d'une et une seule espèce bactérienne

Phage de *Staphylococcus*

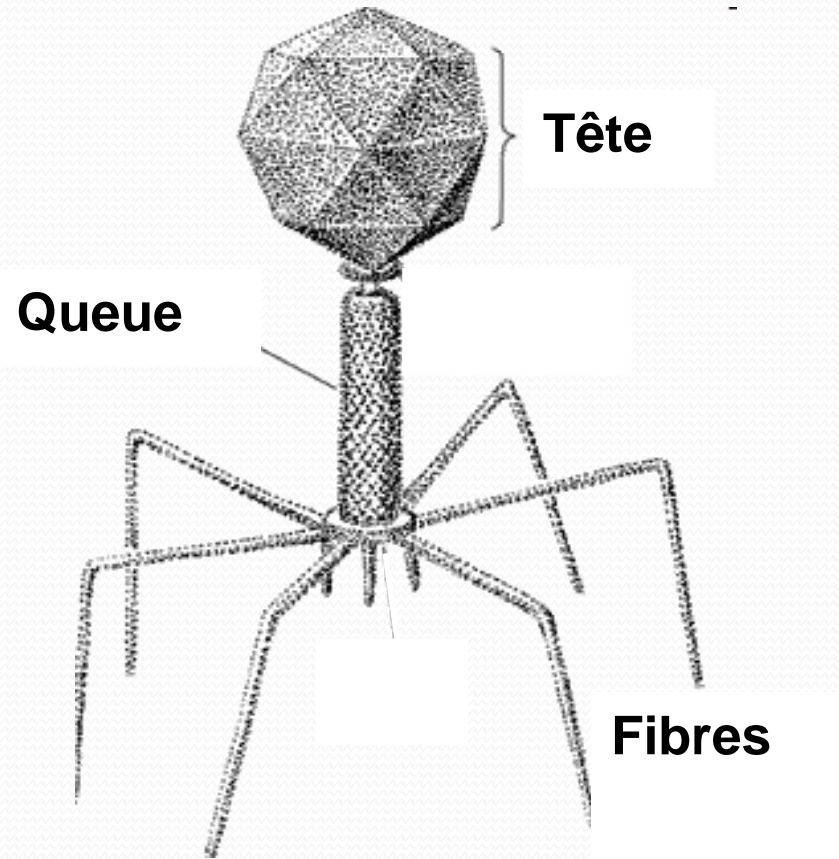
Phage de *Pseudomonas*



Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa

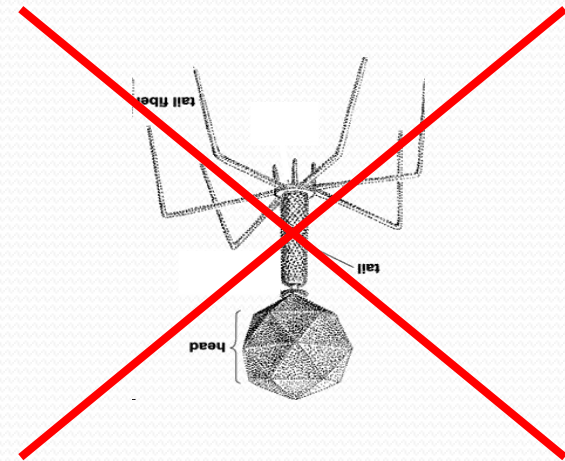
Les virus de microbes : classification



96% des virus de bactéries appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* (ADN db)

VIDEO DU
FONCTIONNEMENT DU
PHAGE

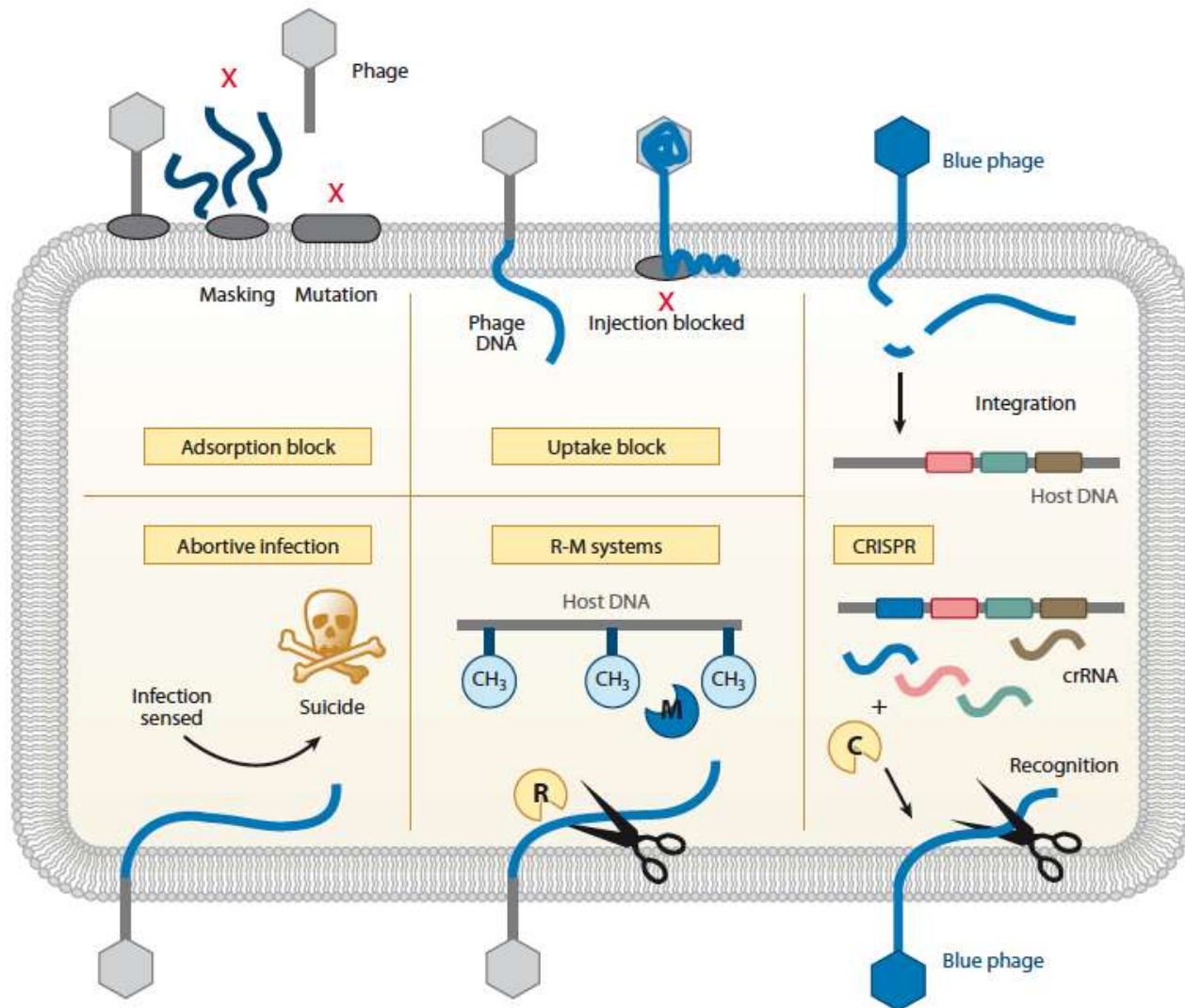
Immunité bactérienne



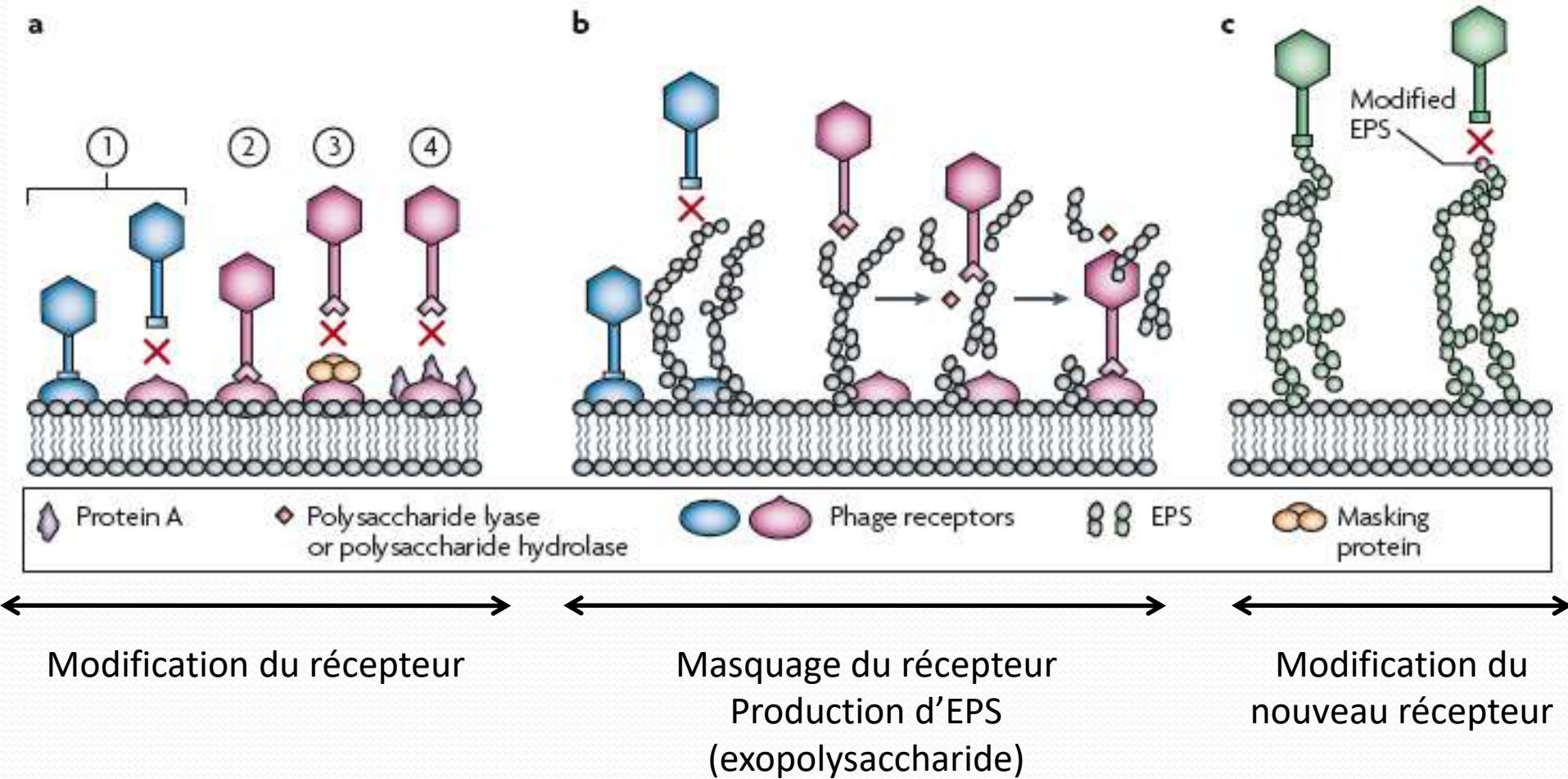
Généralités

- Les procaryotes sont sans cesse « attaqués » par des ADN étrangers de phages et plasmides.
- Ils existe environ 10^{31} phages sur Terre dont environ 10^{25} participent à l'infection de bactéries toutes les secondes en affectant leurs cycles biochimiques (ex. cycle du carbone)
- Sous cette pression intense: évolution de nombreux mécanismes « d'immunité »

Systemes de defense des bacteries contre les virus



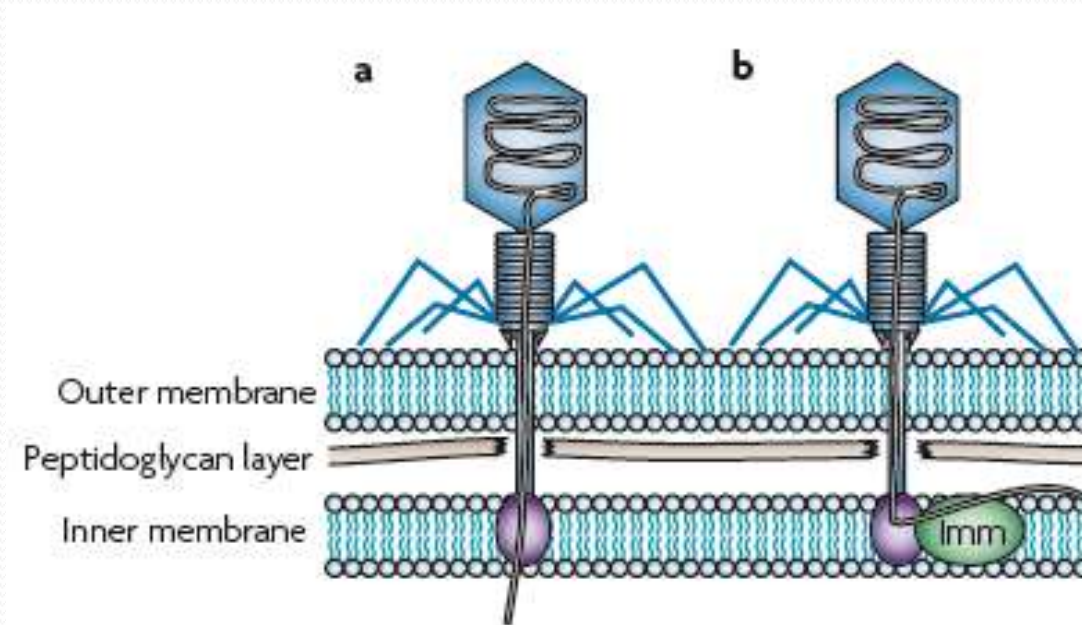
Systemes de defense des bacteries contre les virus: adsorption



Jeu constant d'évolution de la bactérie mais aussi du phage

Systemes de defense des bacteries contre les virus: injection de l'ADN

Systeme Sie: SuperInfection exclusion

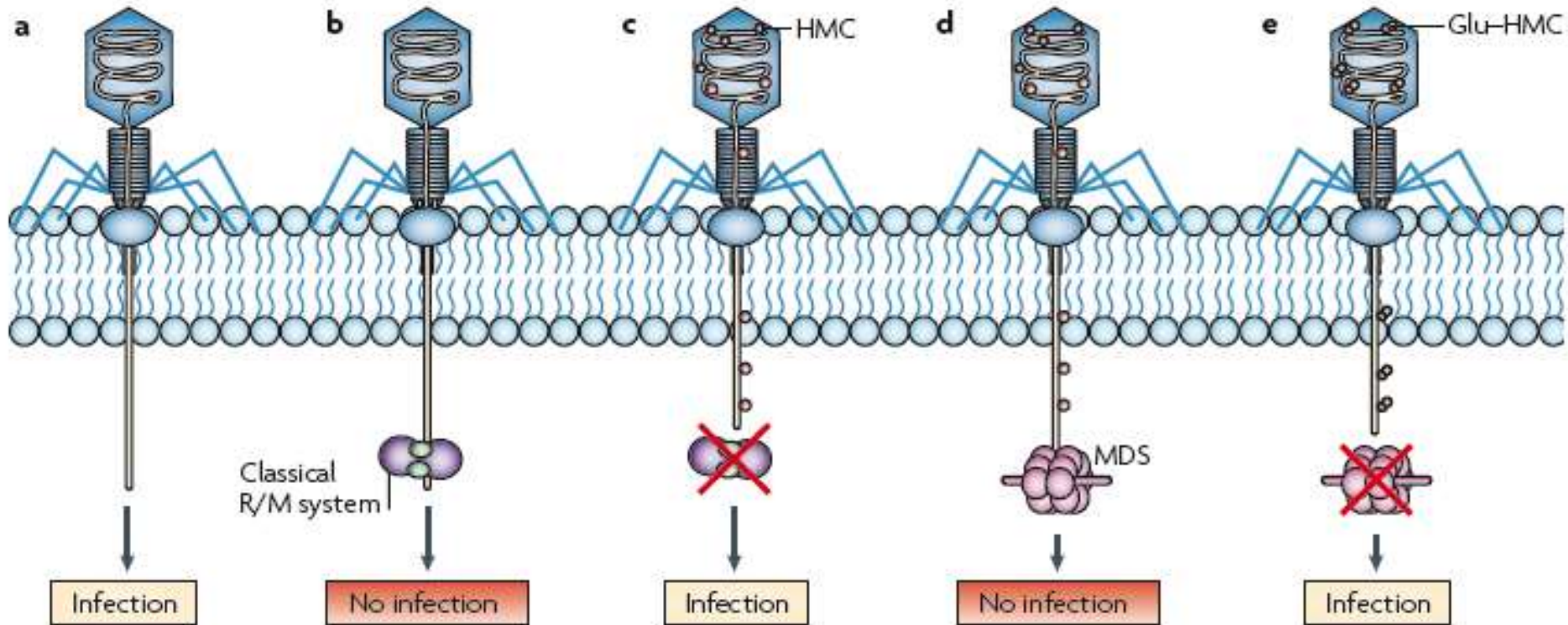


1^{ère} étape: infection par un phage dont l'ADN va s'incorporer à l'ADN bactérien => prophage

2^{ème} étape: infection par un phage de même famille

=> prophage code une protéine empêchant l'entrée de l'ADN du 2d phage.

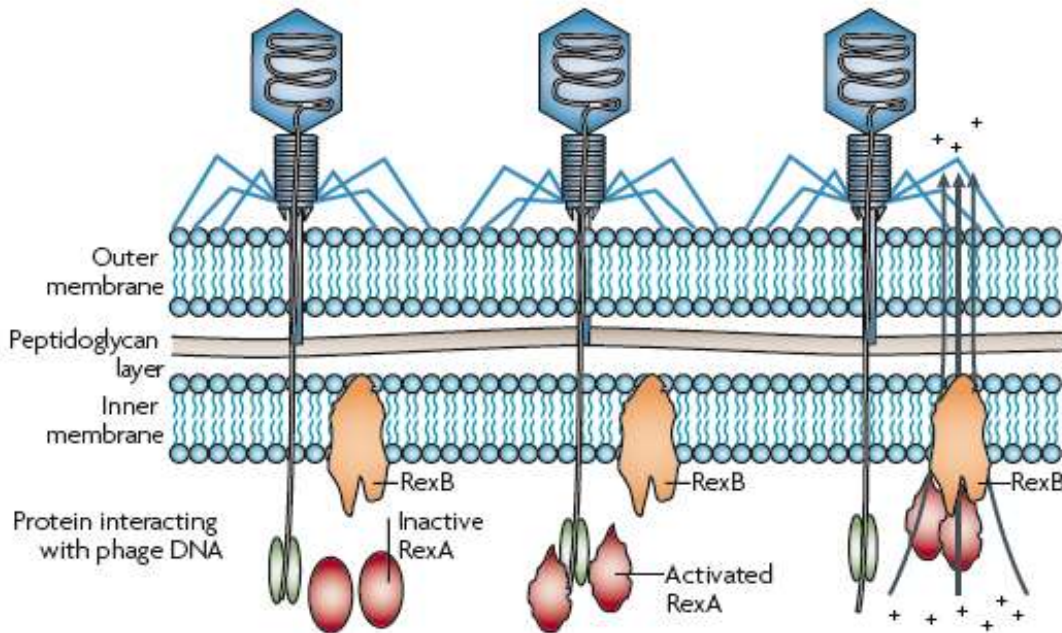
Systemes de defense des bacteries contre les virus: restriction-modification



Jeu: Lequel des deux acteurs évoluera le plus vite??

Systemes de defense des bacteries contre les virus: infection abortive

Abi systems : abortive infection systems

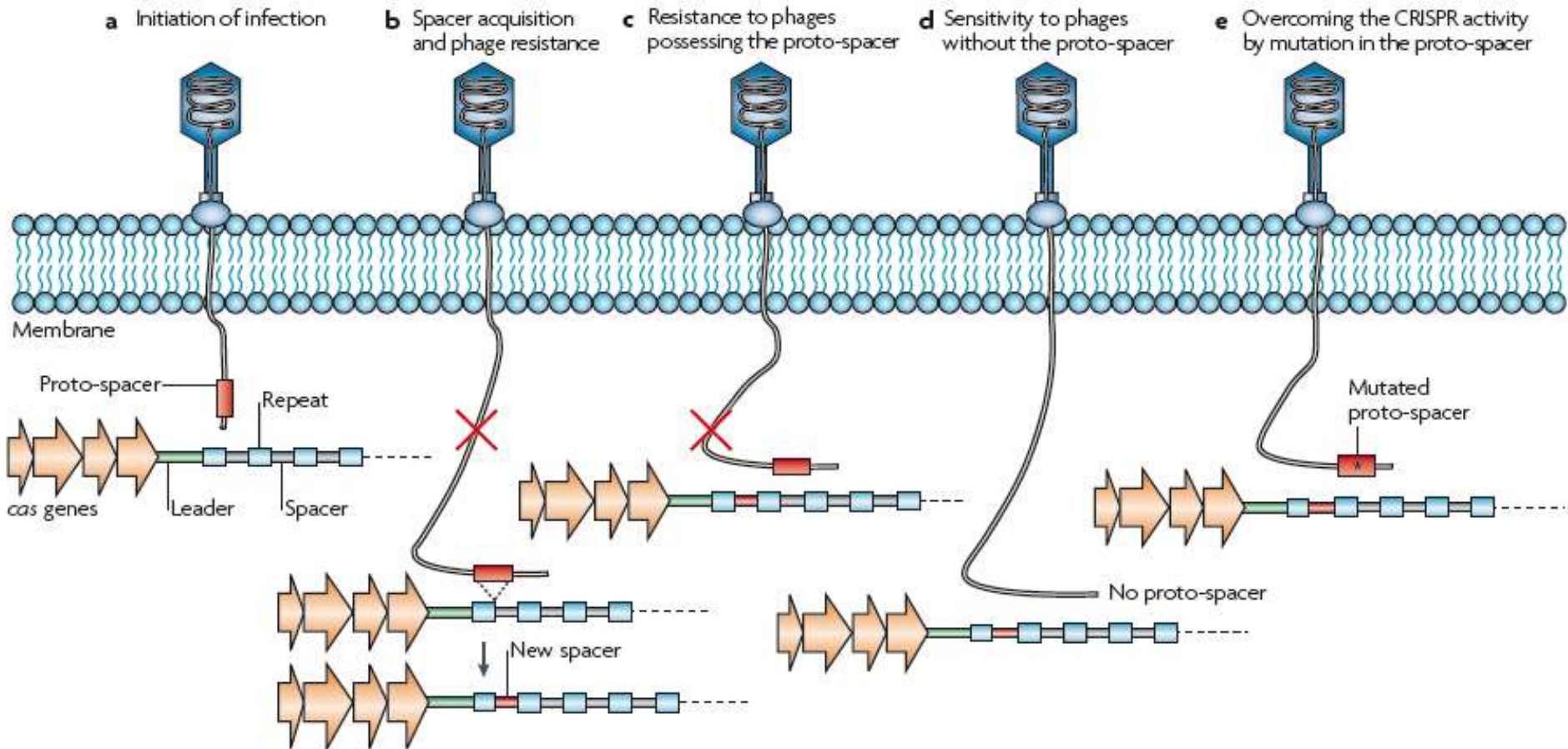


Suicide de la bacterie

-En g6n6ral: l'Abi cible une 6tape cruciale de la multiplication phagique (r6plication, transcription, traduction)
-Syst6me Rex: activation du senseur RexA via le complexe ADN-prot6ine viral => activation effecteur RexB => changement de potentiel membranaire => baisse de l'ATP cellulaire => baisse synth6se macromol6cules et arr6t de multiplication.
Finalit6: mort de la cellule = suicide...

Systemes de defense des bacteries contre les virus: CRISPR/Cas

CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



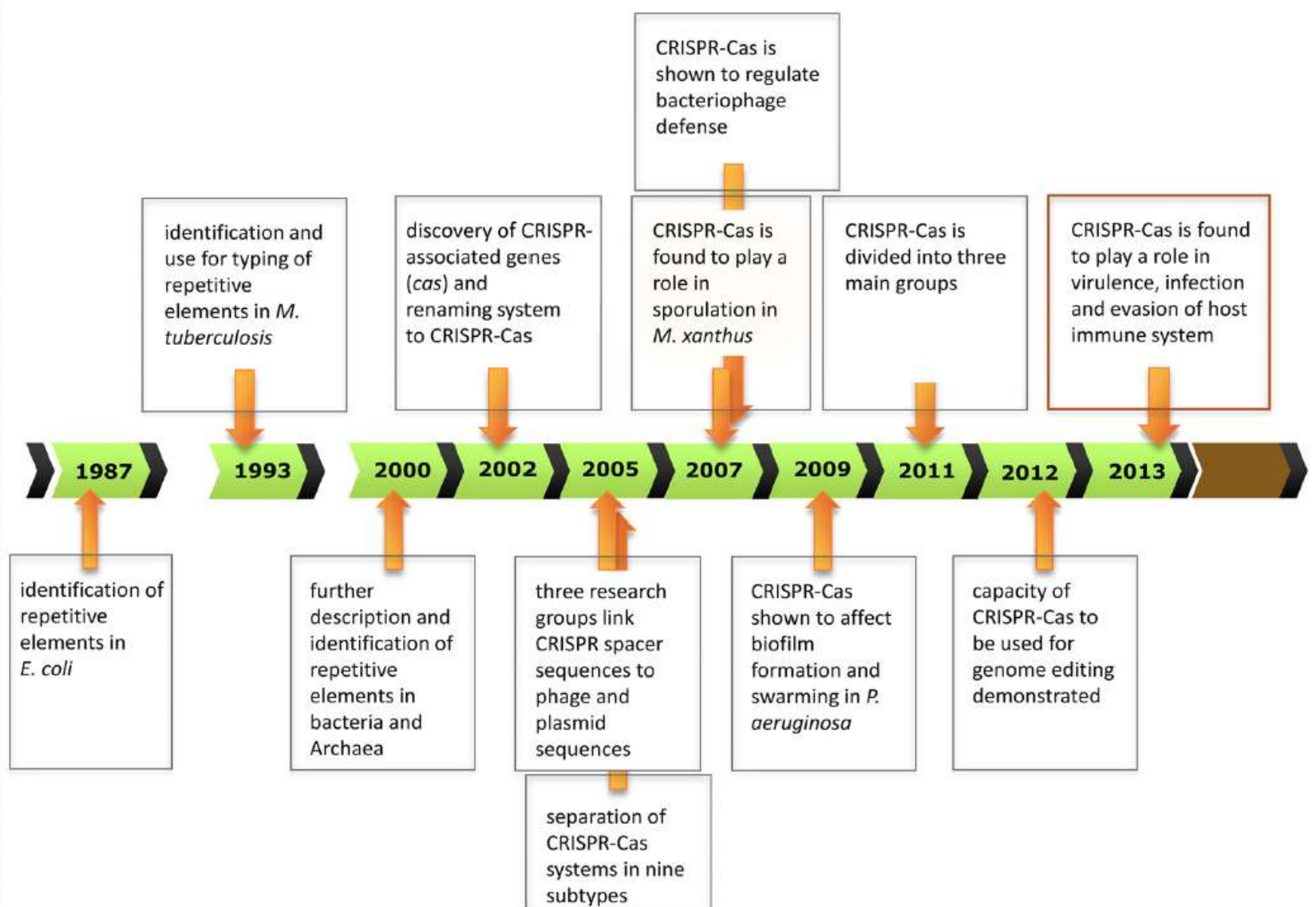
Histoire des CRISPR/Cas

- Découverte en 1987 par Ishino *et al.* chez *E. coli*
 - 14 répétitions de 29pb (= repeats)
 - Espacées de séquences non répétées de 32-33pb (= spacers)
- Années suivantes: découverte de mêmes schémas chez d'autres eubactéries (40%-50%) et archae (90%).

CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

- 2002: Jansen *et al.* ont identifié 4 gènes CAS (CRISPR **A**ssociated) proches des séquences CRISPR puis 45 de plus par d'autres études ensuite.
 - Les CAS sont absents des génomes qui ne contiennent pas de CRISPR
- 2005: découverte des spacers (100% identiques aux séq phagiques ou plasmidiques) => hypothèse: nouveau système de défense?

Résumé des découvertes



A quoi ressemblent-ils?

- CAS = CRISPR ASsociated protein
- 10 sous-types chacun composé de 1 à 5 sous sous-types
- Forme un complexe multimérique avec le transcrit du CRISPR (crRNA)

a



- Séquence allant jusqu'à 550pb
- 5' des CRISPR
- Riche en AT
- Pas d'ORF, non conservés entre les espèces
- Promoteur du CRISPR transcrit?

- Uniques chez 1 même CRISPR (sauf exceptions)
- Identité de séquences avec phages ou autres EGM

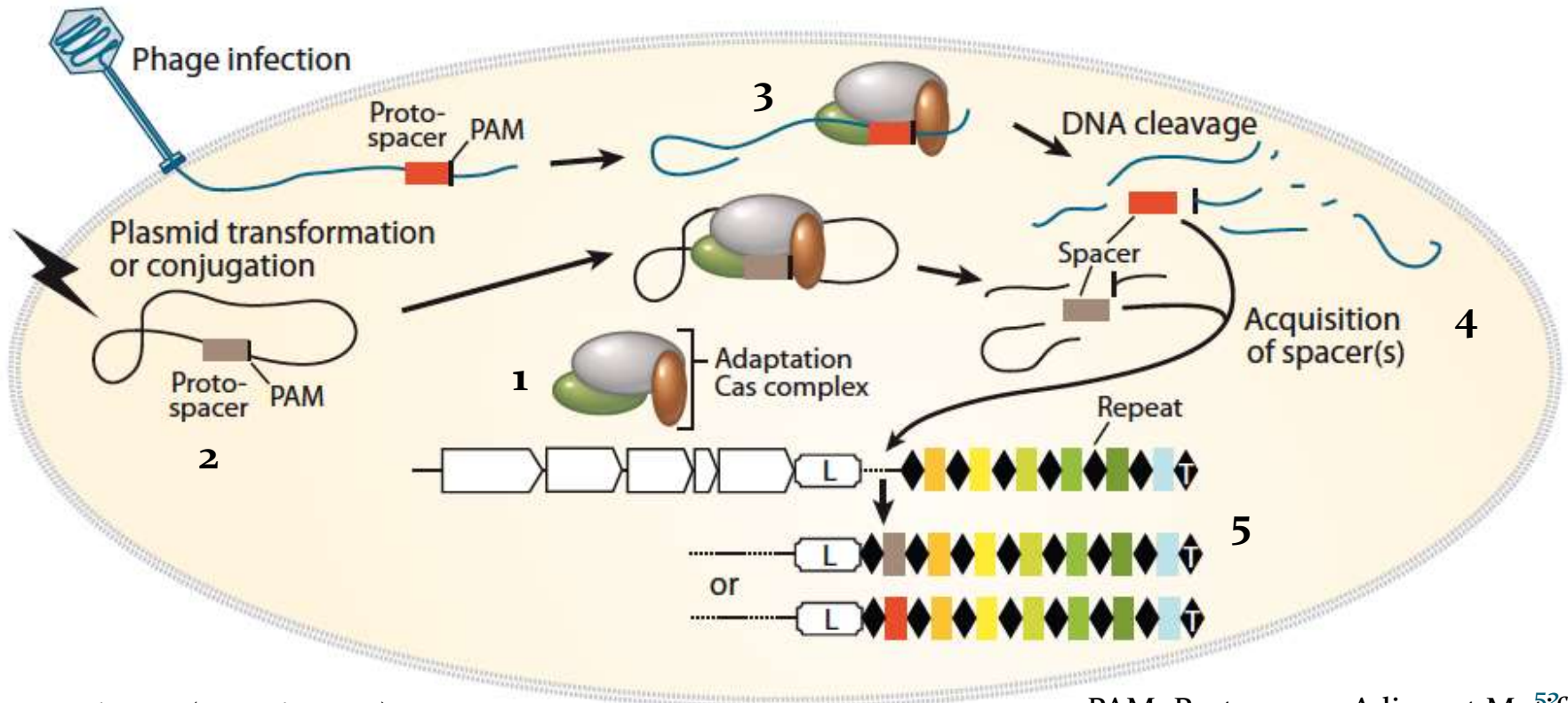
- Identiques chez 1 CRISPR d'1 bactérie.
- Palindromes imparfaits=> structure tige/boucle d'ARN
- Séquence 3' conservée GAAA (C/G)



Comment ça marche?

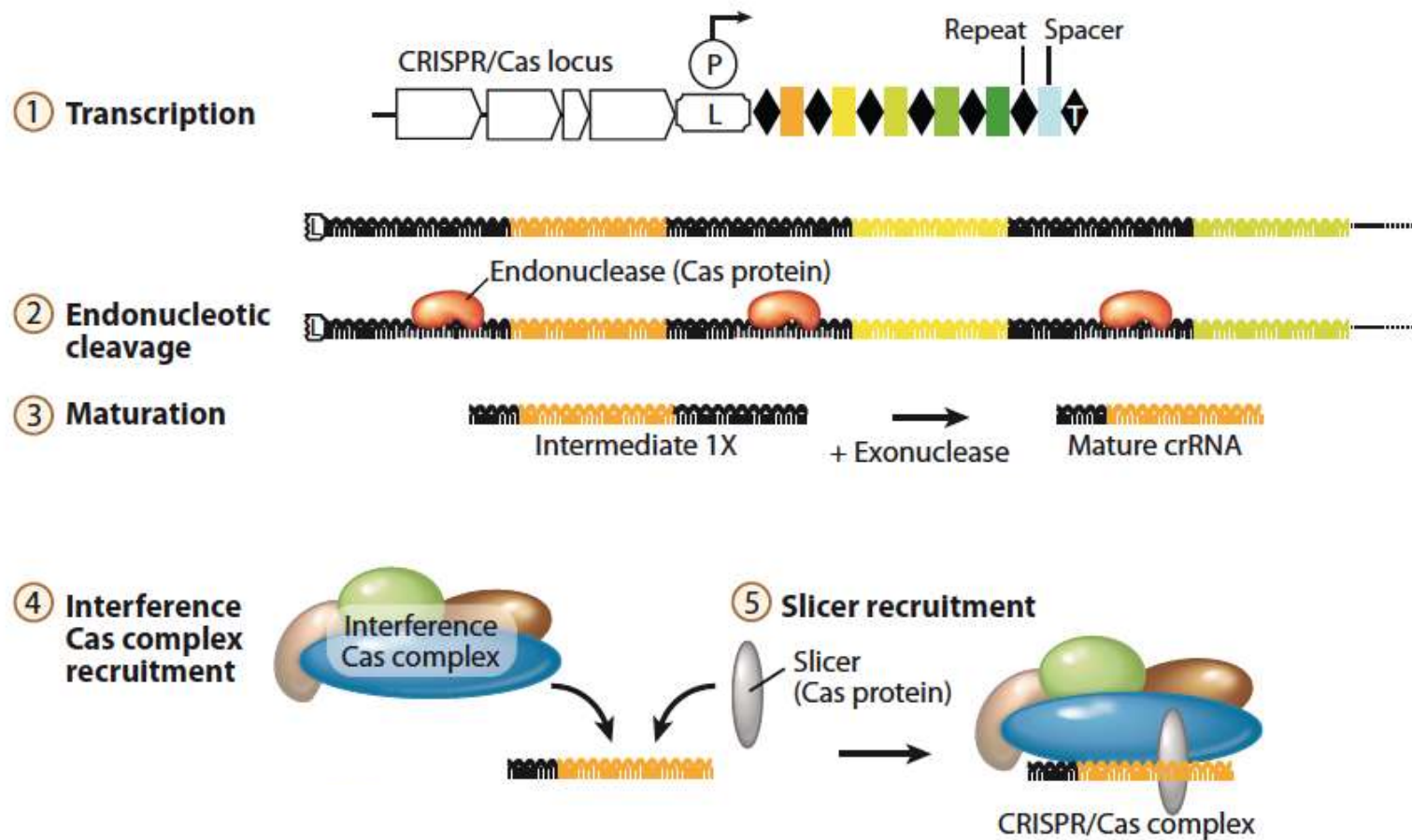
- Système immunitaire adaptatif de la bactérie!!!
- 3 grandes étapes:
 - Adaptation
 - Expression
 - Interférence

Adaptation



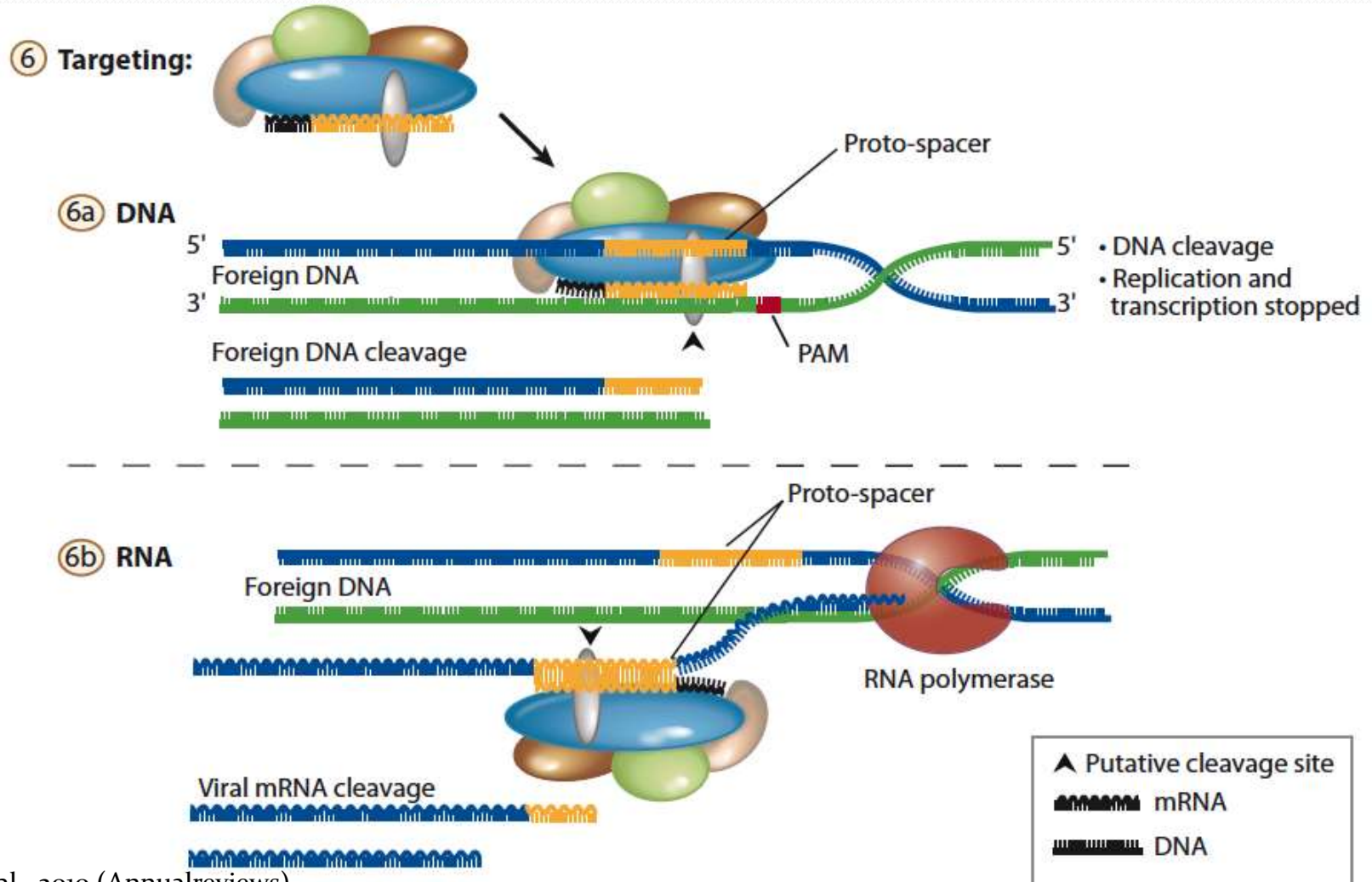
Comment ça marche?

Expression



Comment ça marche?

Interférence



Les « nouvelles » thérapies
antibactériennes
prometteuses...
Quelques exemples



La thérapie par les phages

Importance écologique majeure des bactériophages

- Ils constituent **la plus grande source de biodiversité** retrouvée sur la planète
- En régulant la quantité de bactéries sur Terre, ils sont la base souvent insoupçonnée de nombreux écosystèmes
 - On estime qu'en 48H, la communauté bactérienne est entièrement renouvelée.
 - **Sans les bactériophages, il n'y aurait probablement pas de vie sur terre**
- Où les trouve-t-on ?
 - **Partout où vous trouvez des bactéries**
 - D'un point de vue général, l'environnement aqueux est la source la plus riche en bactériophages.

Il y a presque 100 ans, l'application thérapeutique

En 1896: Hankin montre l'effet bactéricide des eaux du Gange et de la Jumna sur *Vibrio cholerae*

En 1917 Félix d'Herelle a isolé ses premiers bactériophages à partir de selles de patients atteints de dysenterie. Il propose alors que la « guérison naturelle » de certains patients était due aux bactériophages.



1919: naissance de la phagothérapie

1920-1940: l'âge d'or de la phagothérapie (succès et échecs)

France, Brésil, Egypte, Indes, Géorgie...

1940-1960: le déclin (utilisation générale des antibiotiques)

Déclin dans les pays Occidentaux, mais
développement

dans les pays de l'Europe de l'Est.

Phagothérapie expérimentale

- La liste des bactéries pour lesquelles des essais de phagothérapie chez l'animal ont été décrits avec succès s'allonge:

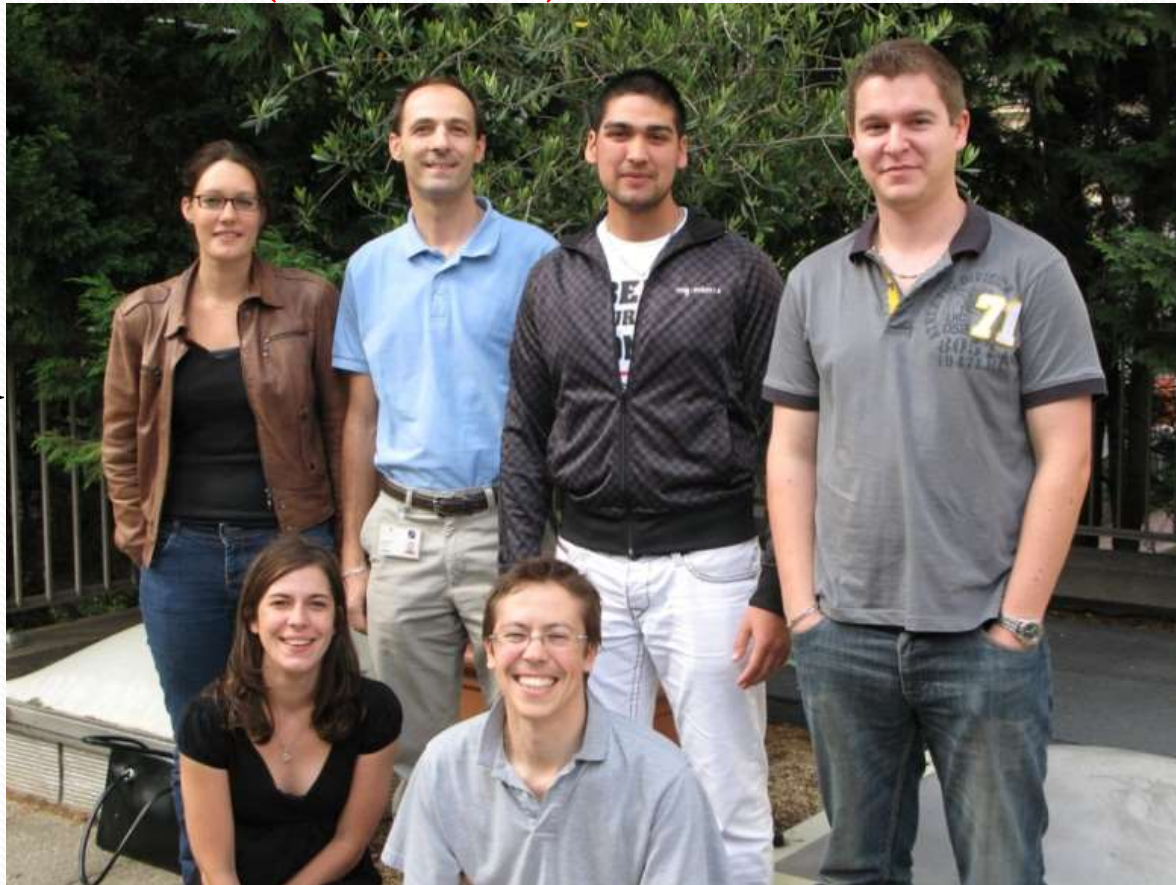
Acinetobacter, Enterococcus, Escherichia coli, Salmonella, Staphylococcus, Vibrio...

...Un exemple avec *Pseudomonas aeruginosa* une bactérie pathogène opportuniste responsable d'infections respiratoires

Un exemple de phagothérapie expérimentale

L. Debarbieux

(The boss) M. Galthier



E. Sausserau

D. Maura

M. Henry E. Morello

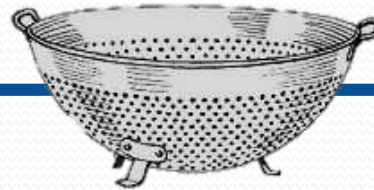
Isolement des bactériophages

Comment isoler des bactériophages à partir d'eaux usées ?

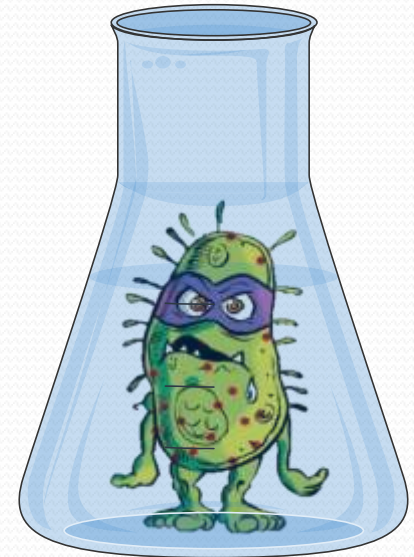
1) Amplification des bactériophages à l'aide de la bactérie ciblée, en la cultivant une nuit dans un milieu contenant de l'eau usée



eaux usées de Paris



Filtration
pour éliminer
les bactéries
du
prélèvement



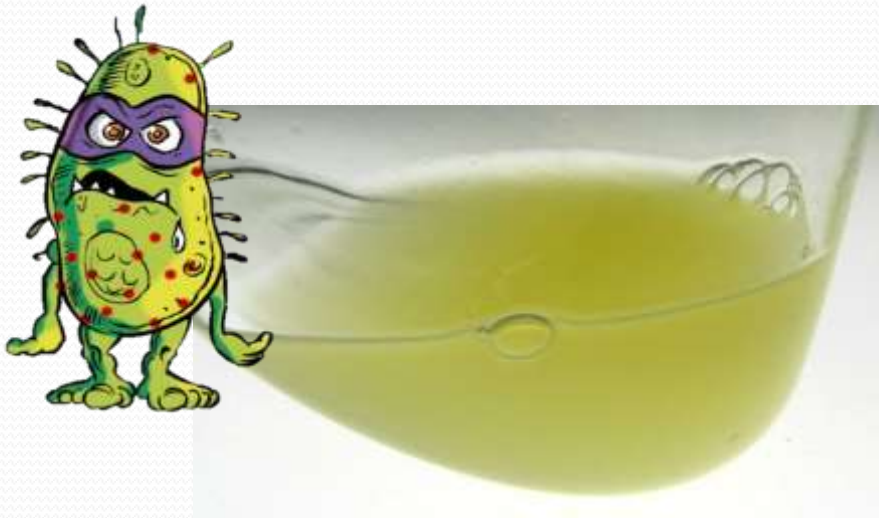
Bactérie
ciblée:
*Pseudomonas
aeruginosa* ⁶¹

Isolement des bactériophages

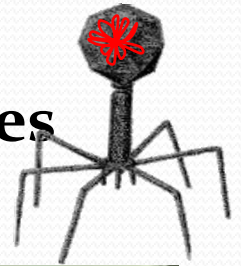
Comment isoler des bactériophages à partir d'eaux usées ?

1) Amplification des bactériophages à l'aide de la bactérie ciblée, en la cultivant une nuit dans un milieu contenant de l'eau usée

Sans eaux usées



Avec eaux usées

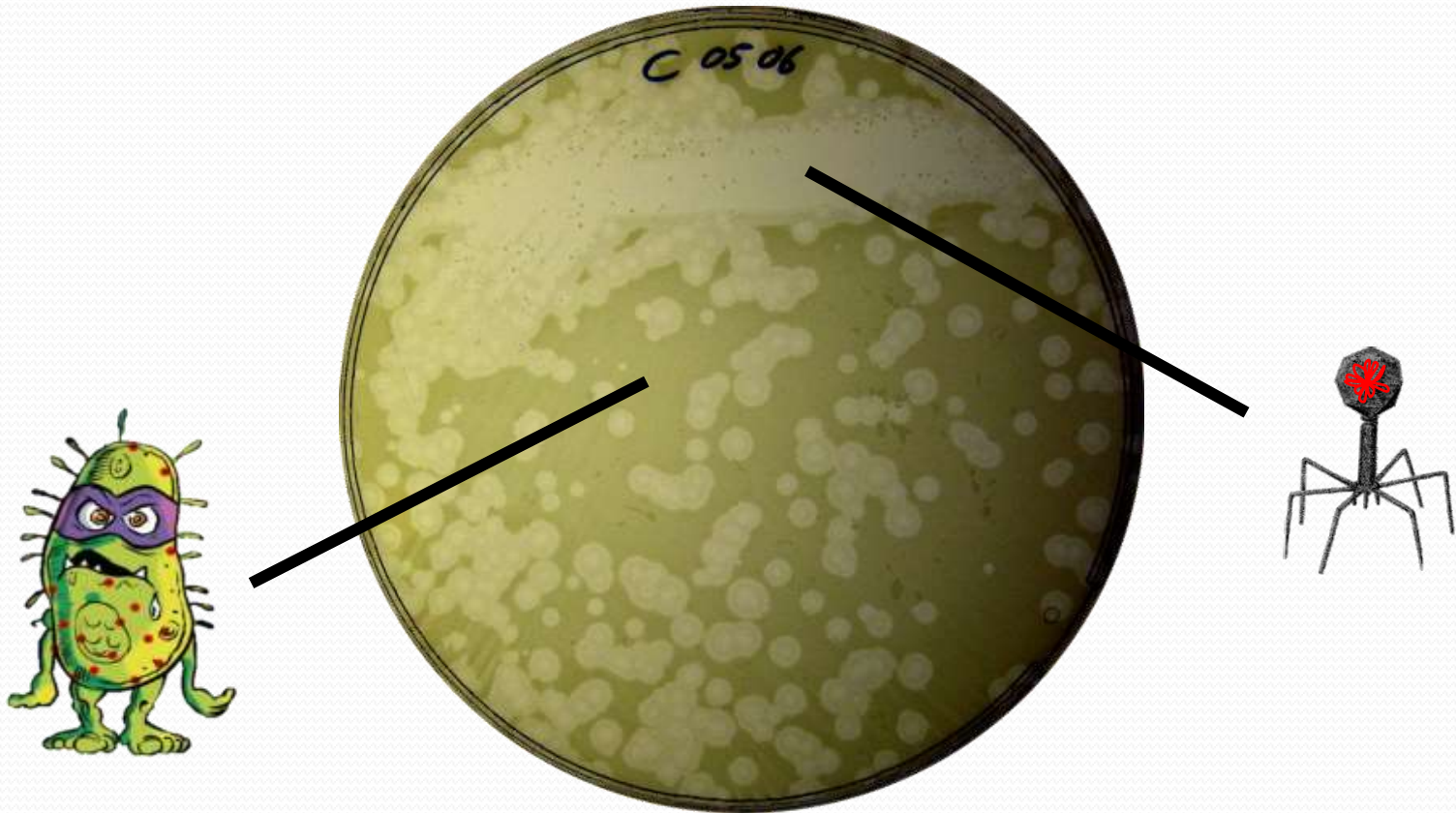


Isolement des bactériophages

Comment isoler des bactériophages à partir d'eaux usées ?

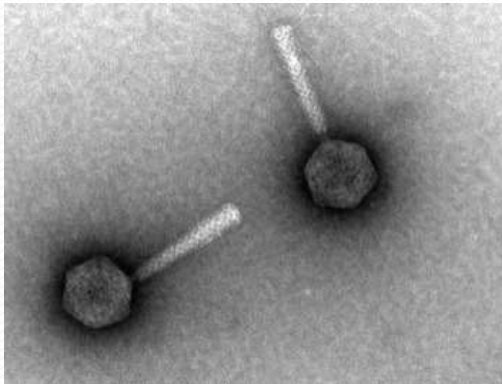
2) Isoler des plaques individuelles (plaque=zone de bactéries lysées)

Ex : eau de Clichy

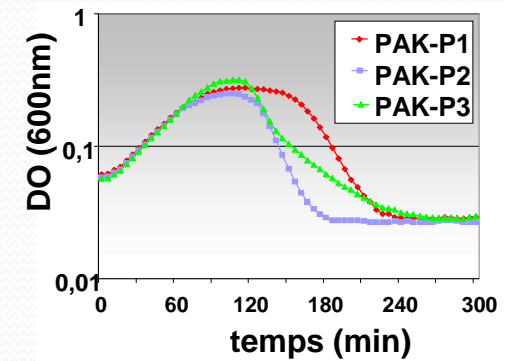


Caractérisation des bactériophages

Microscopie électronique



Cinétique de lyse



Spectre d'hôte



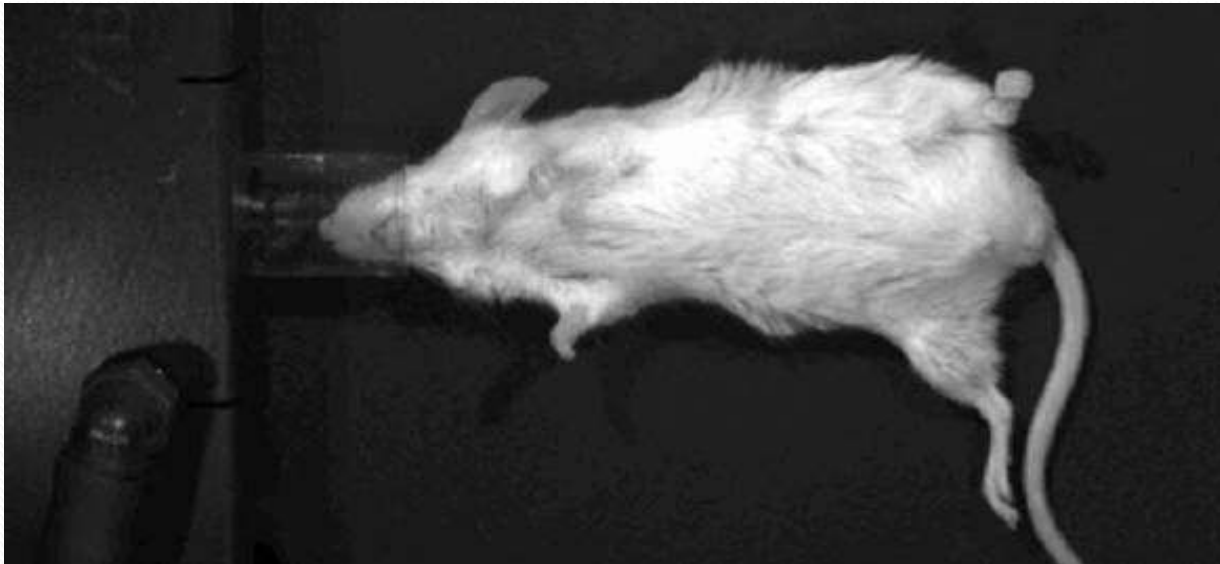
Interactions bactériophages/bactéries chez l'animal

Les technologies actuelles permettent de suivre le développement du processus infectieux chez l'**animal vivant** en utilisant des bactéries reportrices (**fluorescence**, **luminescence**).

Avantages de la bioluminescence:

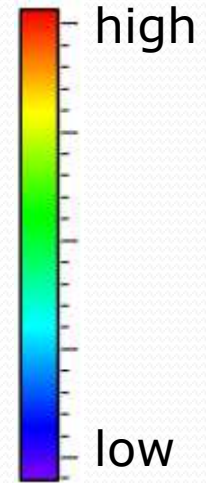
suivi de chaque animal (pas d'euthanasie)

quantification de l'infection

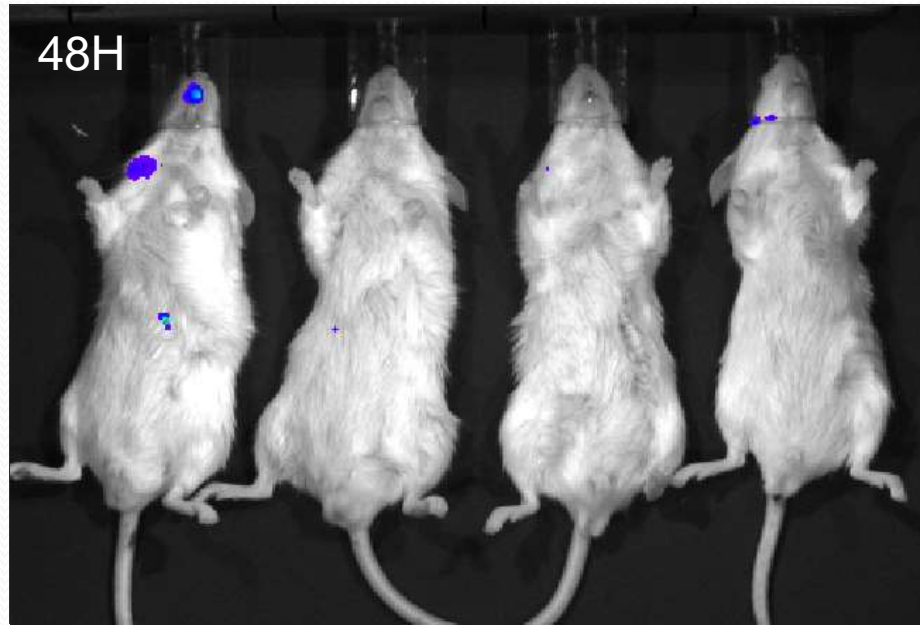


48H

100% death



48H



Infection à T0
par 1.0×10^7 bactéries

Infection à T0
Par 1.0×10^7 bactéries
2 heures après
Traitement avec
 1.0×10^8 bactériophages

Conclusions

Souris infectées

Forte quantité de bactéries

Inflammation élevée

Fortes lésions des poumons

Souris meurent

vs

Infectées+traitées à 2H

Faible quantité de bactéries

Inflammation réduite

Faible lésions des poumons

Souris survivent

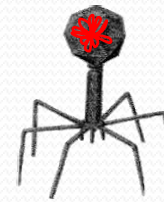
Les souris traitées aux phages **survivent** car les **lésions** des poumons sont **réduites** parce que les bactéries ont été éliminées par les phages avant que les lésions ne soient irréversibles.

A l'aube du XXI^{ème} siècle...

... une situation paradoxale

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur pour lequel, il faut trouver de nouvelles solutions.

La phagothérapie possède le potentiel pour traiter des infections bactériennes chez l'homme.



Pourquoi la phagothérapie n'est pas disponible ?

très peu de données scientifiques modernes permettent aux autorités médicales de considérer la phagothérapie comme une thérapie moderne = **en accord avec la réglementation**₆₈

Les petites entreprises de biotechnologies

→ développement de la **phagothérapie appliquée au domaine agroalimentaire**.

- traitement des infections bactériennes (**plantes**) soit de réduire les niveaux de contaminations au cours des procédés de fabrication des aliments (**viandes**).

En Septembre 2006 l'organisme de régulation américain FDA (Food and Drug Administration) a autorisé l'utilisation de bactériophages **anti-Listeria** sur des viandes destinées à la **consommation humaine**. Depuis l'autorisation s'est étendue à tous les types d'aliments.

La transplantation de flore

Problématique: bactéries résistantes

Staphylococcus aureus R méthicilline (SARM),
entérobactéries ayant β -lactamases à spectre étendu (BLSE),
entérocoques résistants à la vancomycine (ERV),
Clostridium difficile

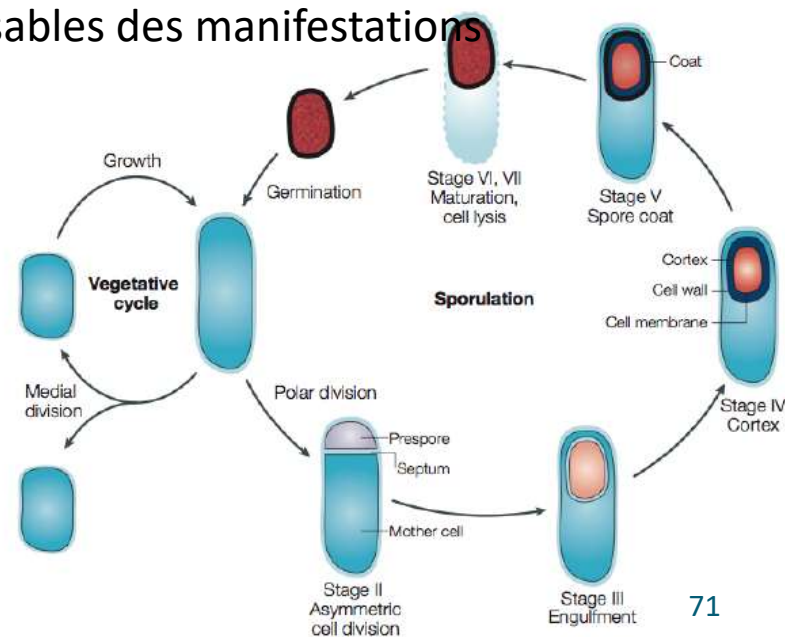
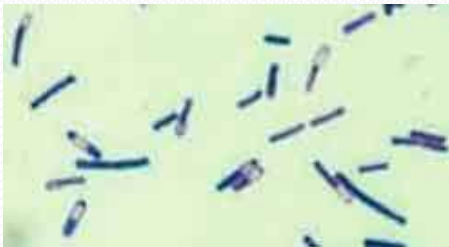
Depuis 2014: MEDICAMENT EXPERIMENTAL

Clostridium difficile et colite pseudo-membraneuse

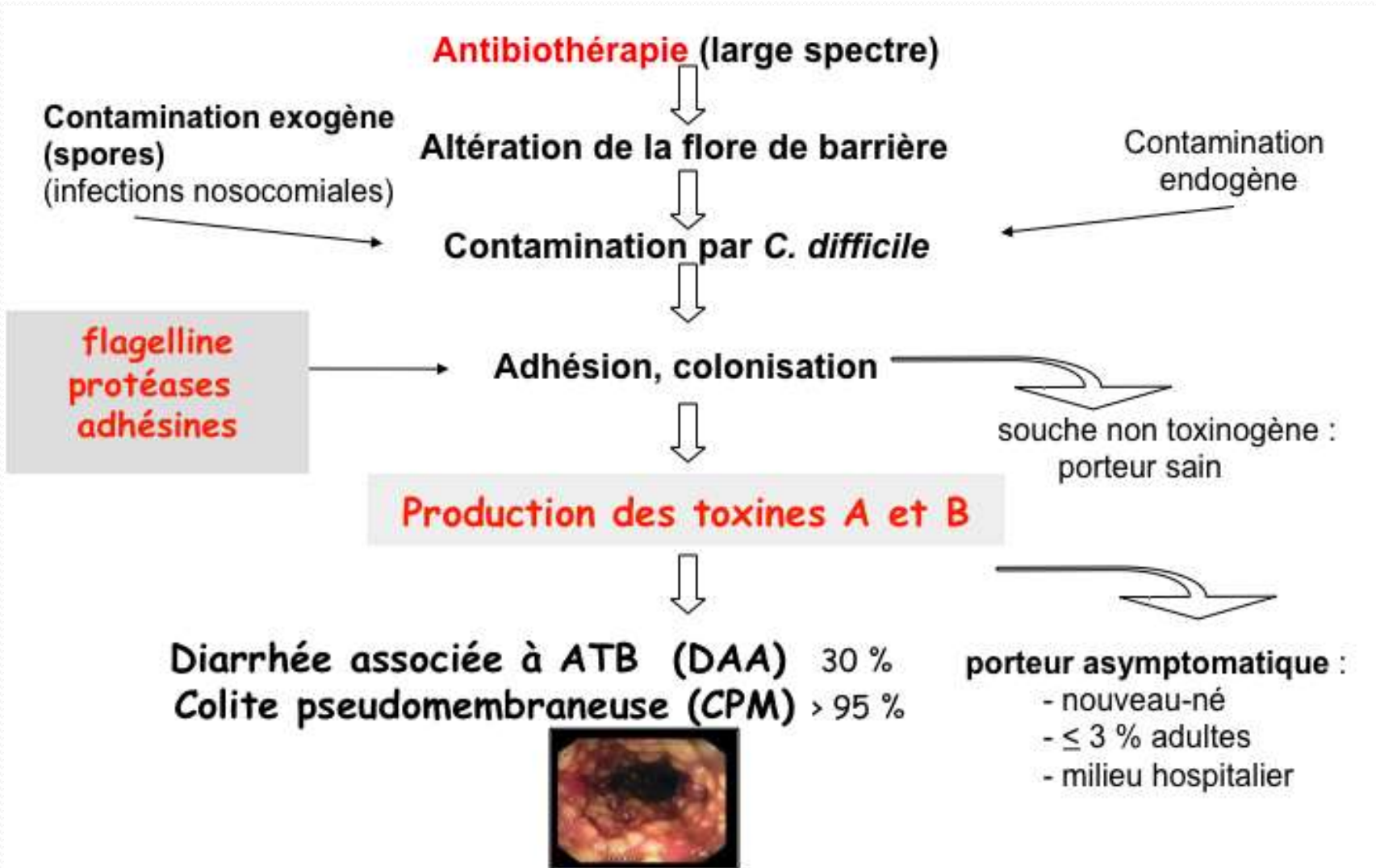
- Bacille Gram +, anaérobie strict, sporulé
- Réservoir : tube digestif homme et animaux, hôpital
- **Entéropathogène majeur**
(10-30% diarrhées associées-ATB, 95-100% CPM)
Aux USA: 500 000 cas et 29 000 décès par an



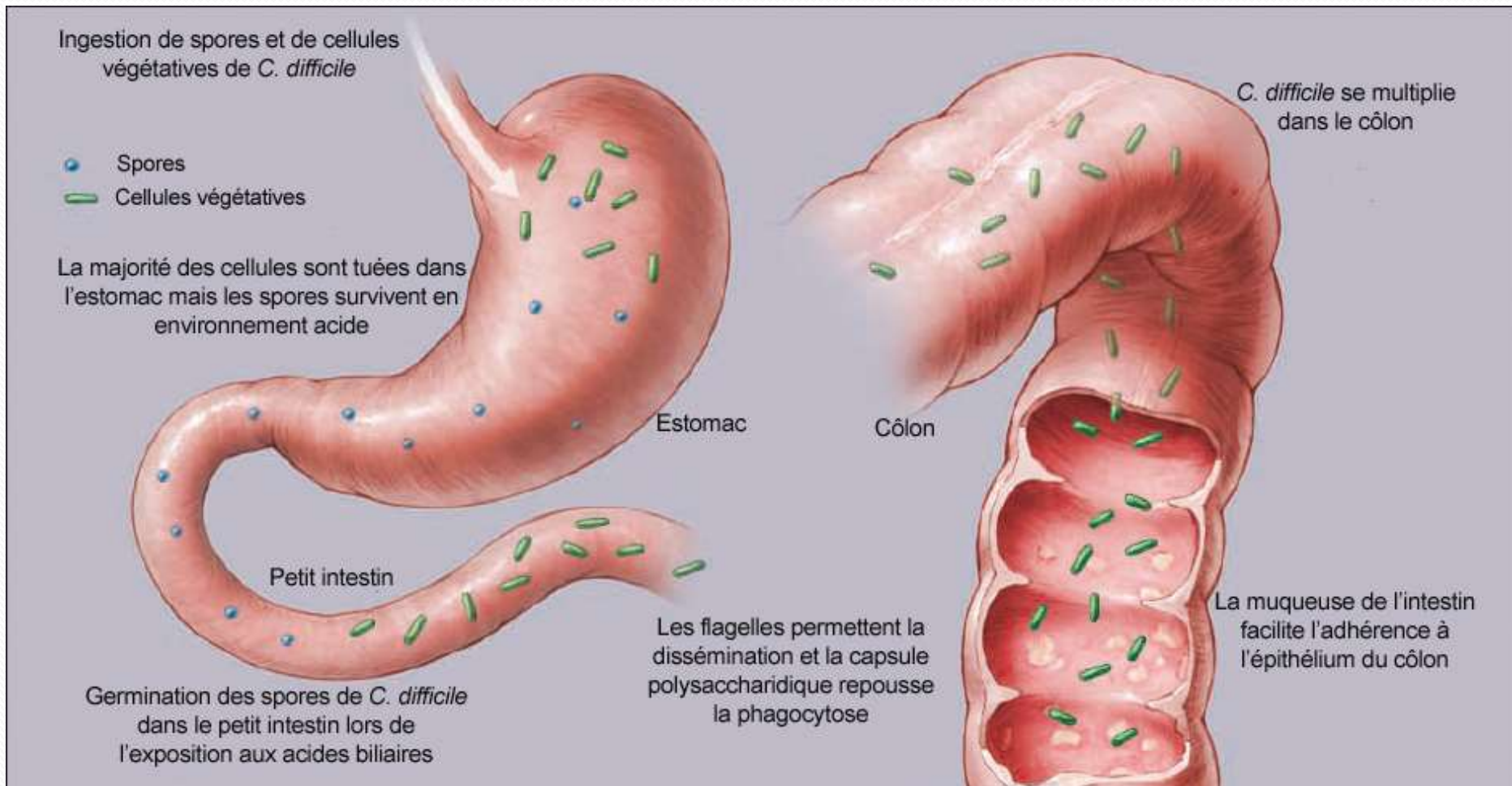
- 2 toxines: TcdA (toxine A) et TcdB (toxine B) responsables des manifestations
- **Nosocomial, épidémiogène, communautaire**
 - nombreuses épidémies
 - surveillance



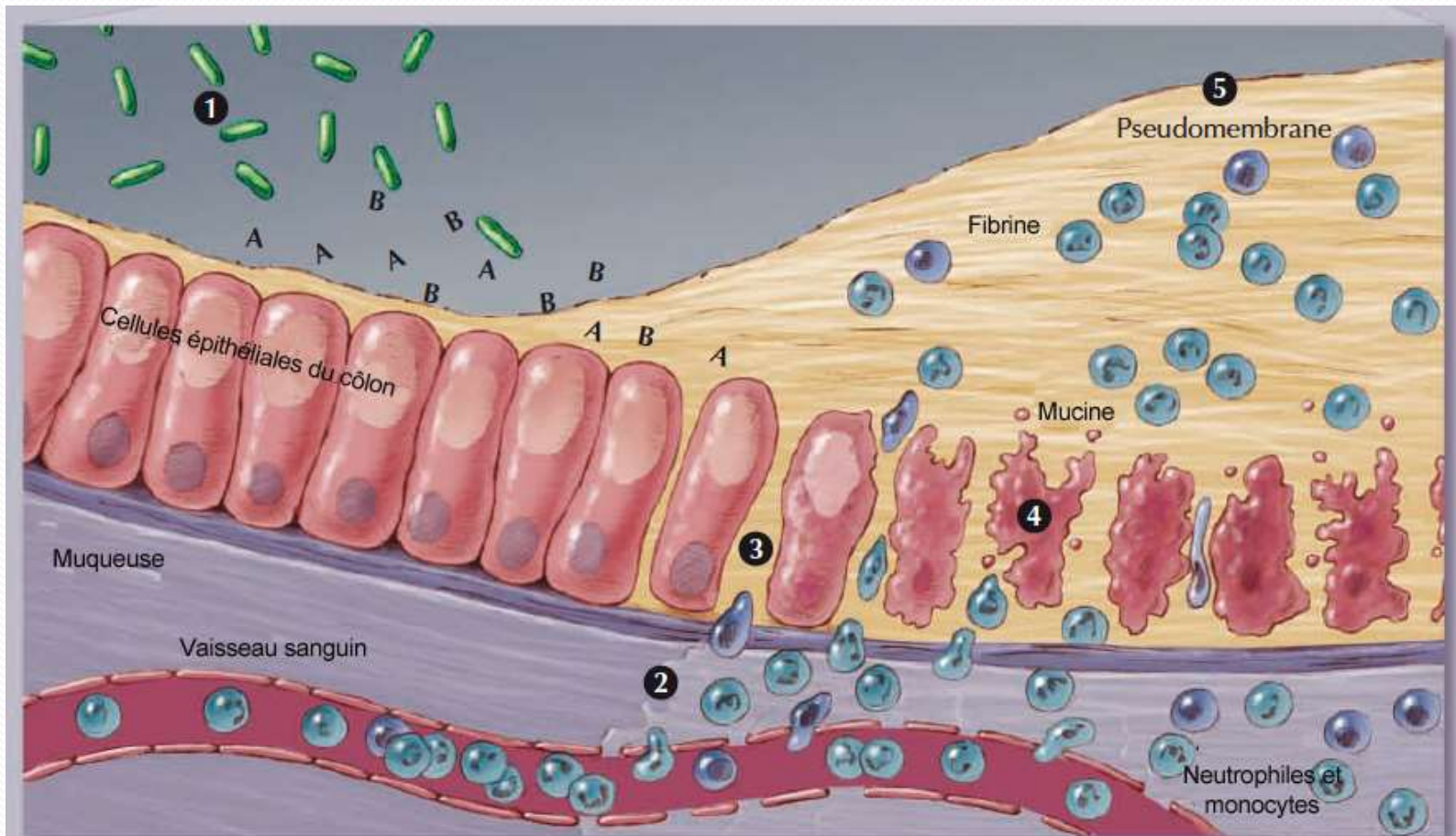
Clostridium difficile et colite pseudo-membraneuse



Physiopathologie d'une infection à *C. difficile*



Physiopathologie d'une infection à *C. difficile*

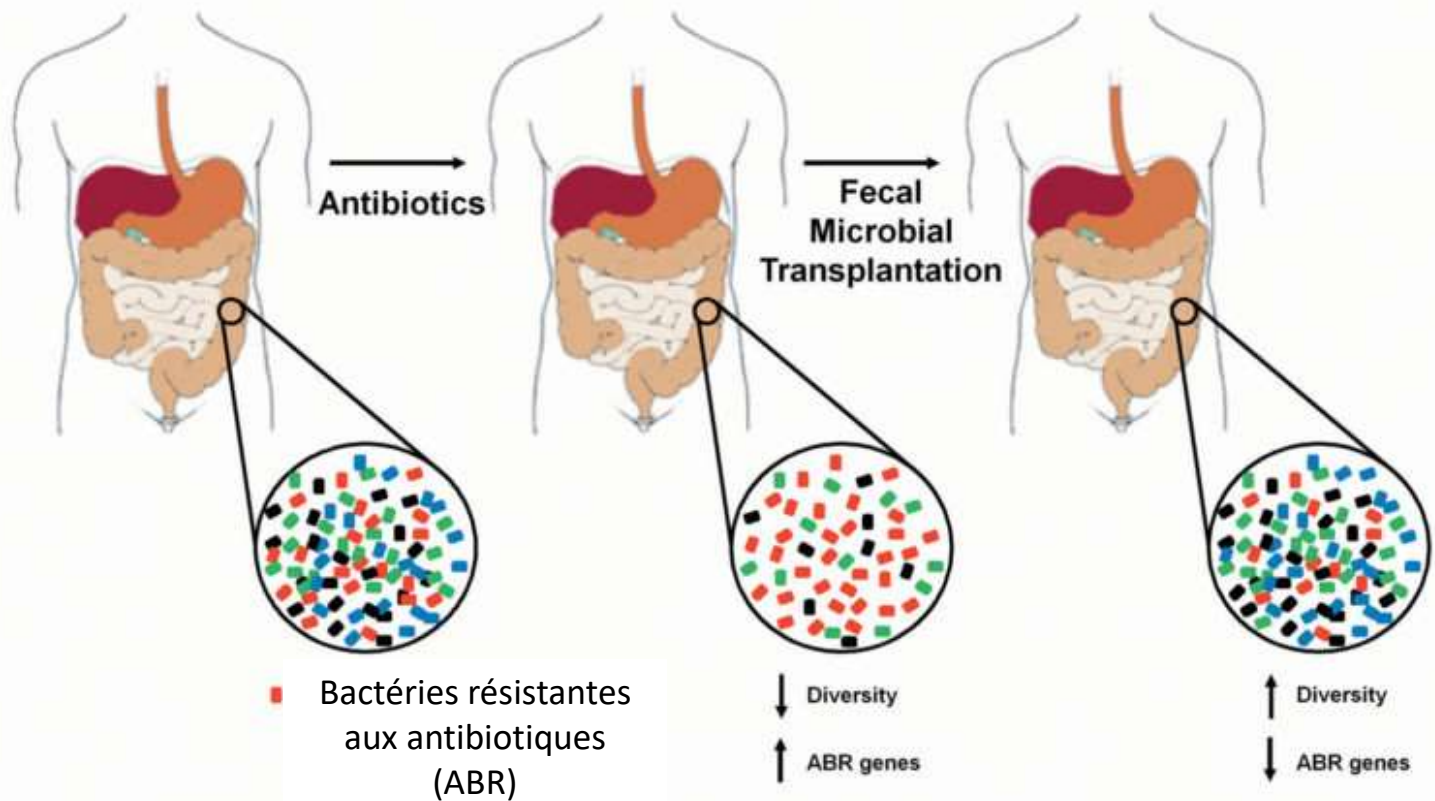


Les cellules végétatives de *C. difficile* produisent les toxines A et B ainsi que des protéines hydrolytiques (1). La production locale des toxines A et B conduit à la production du facteur alpha de nécrose tissulaire et d'interleukines pro-inflammatoires, augmentation de la perméabilité vasculaire, recrutement

de neutrophiles et monocytes (2), ouverture des jonctions des cellules épithéliales (3), et mort cellulaire par apoptose (4). La production locale d'enzymes hydrolytiques conduit à la dégradation des tissus conjonctifs provoquant une colite, la formation de pseudomembrane (5) et une diarrhée aqueuse.

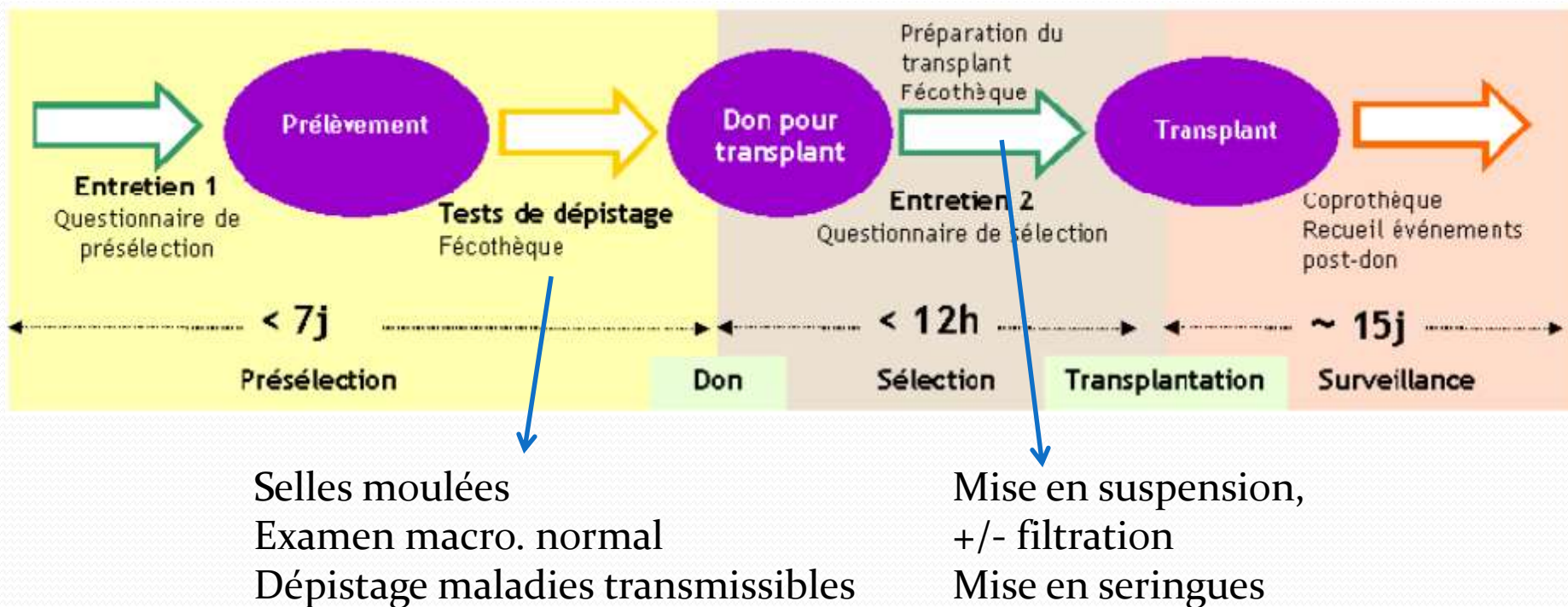
La transplantation de flore

Idée



La transplantation de flore

Mode d'emploi



La transplantation de flore

Pour résumer : profil « idéal » du donneur

- **Age : 18-65 ans**
- **IMC<30**
- **Absence de pathologies chroniques**
- **Absence de traitement curatif au long cours**
- **Absence de prise d'antibiotiques dans les 3 mois précédant le don**
- **Absence de séjour à l'étranger dans les 3 mois précédant le don**
- **Absence de résidence de plusieurs années en zone intertropicale**
- **Absence d'hospitalisation à l'étranger dans les 12 mois précédant le don**
- **Absence de troubles digestifs à type de diarrhée aiguë ou chronique dans les 3 mois précédant le don**
- **Absence d'antécédents de fièvre typhoïde**
- **Aspect macroscopique normal des selles**
- **Dépistage négatif d'agents infectieux** (*cf. liste proposée en annexe 1*)

La transplantation de flore

Gravement malade, elle est sauvée par un don de... selles

Modifié le 26/09/2013 à 21:52

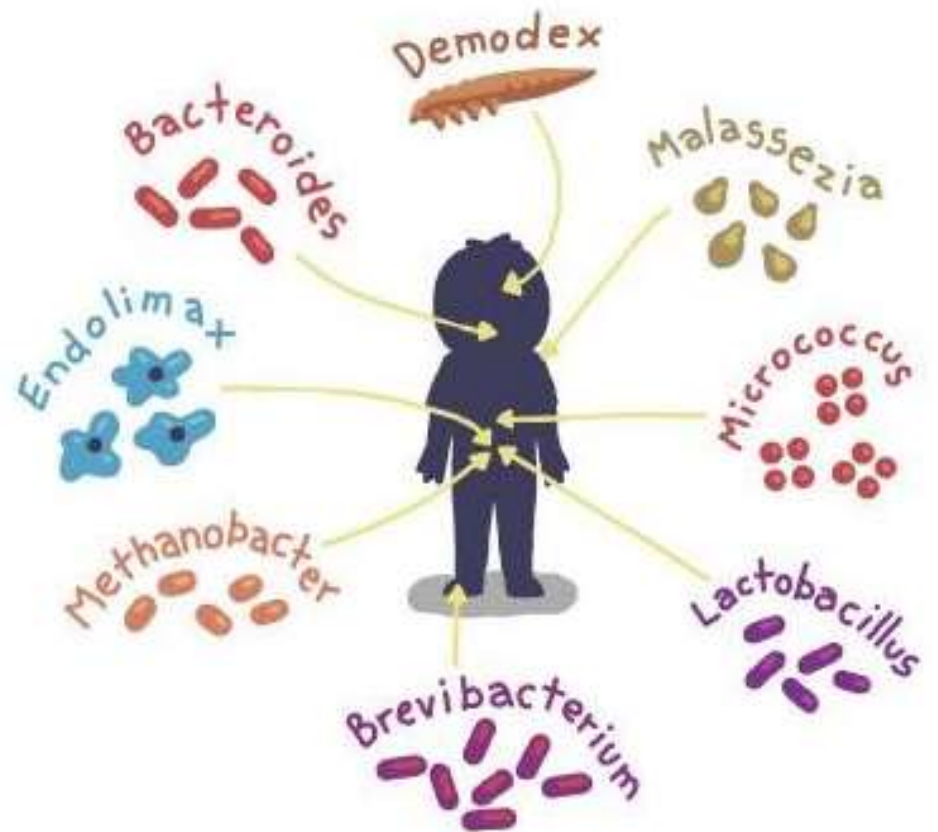
 Écouter



Feeling lonely?



Just remember,
you're not alone.



YOU ARE NEVER ALONE.



Merci à tous

UFR Sciences et Techniques
Département de Microbiologie

emilie.camiade@univ-tours.fr

La photothérapie

Comment ça marche?

PAM: Protospacer Adjacent Motif

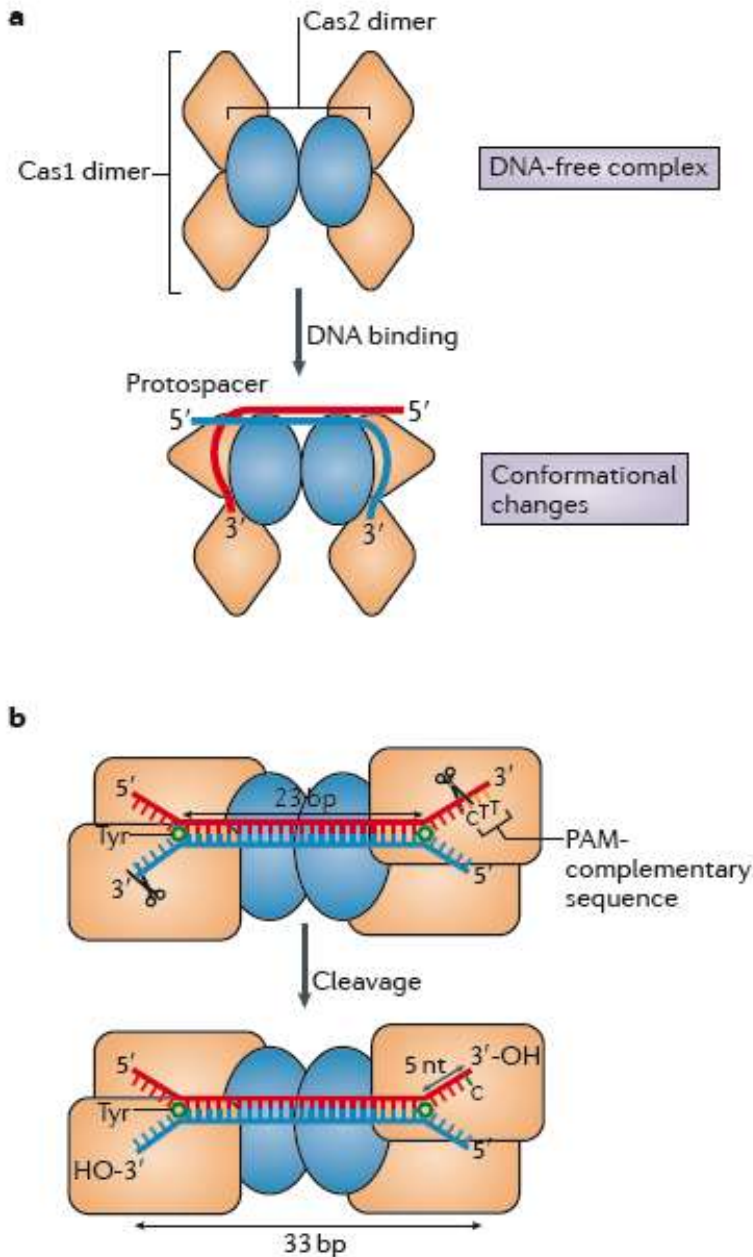
= petite séquence d'ADN reconnue par le complexe CAS

Type CRISPR	PAM 5'-3'	Espèce bactérienne
IA-IB	Protospacer-NGG	<i>Listeria monocytogenes</i>
IC	Protospacer-GAA	<i>Streptococcus pyogenes</i>
IF	Protospacer-GG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14
IIA	WTTCTNN-	<i>Strepto. Thermophilus</i>
IIB	Protospacer CCN-Protospacer	<i>Strepto. pyogenes</i>
IIIA	Pas de PAM	<i>Staphylococcus epidermidis</i>



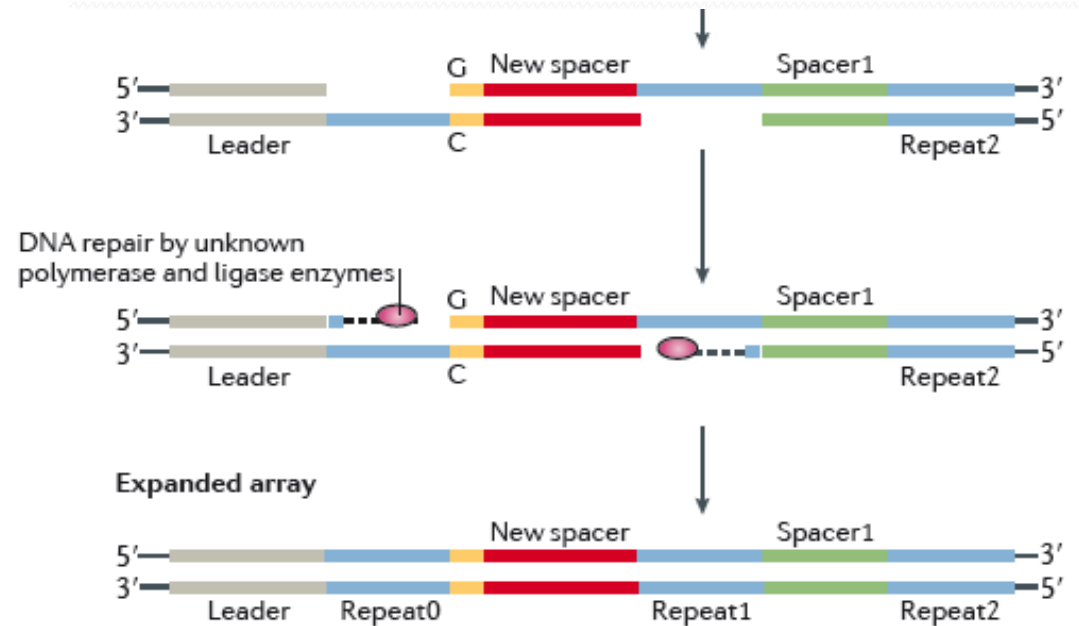
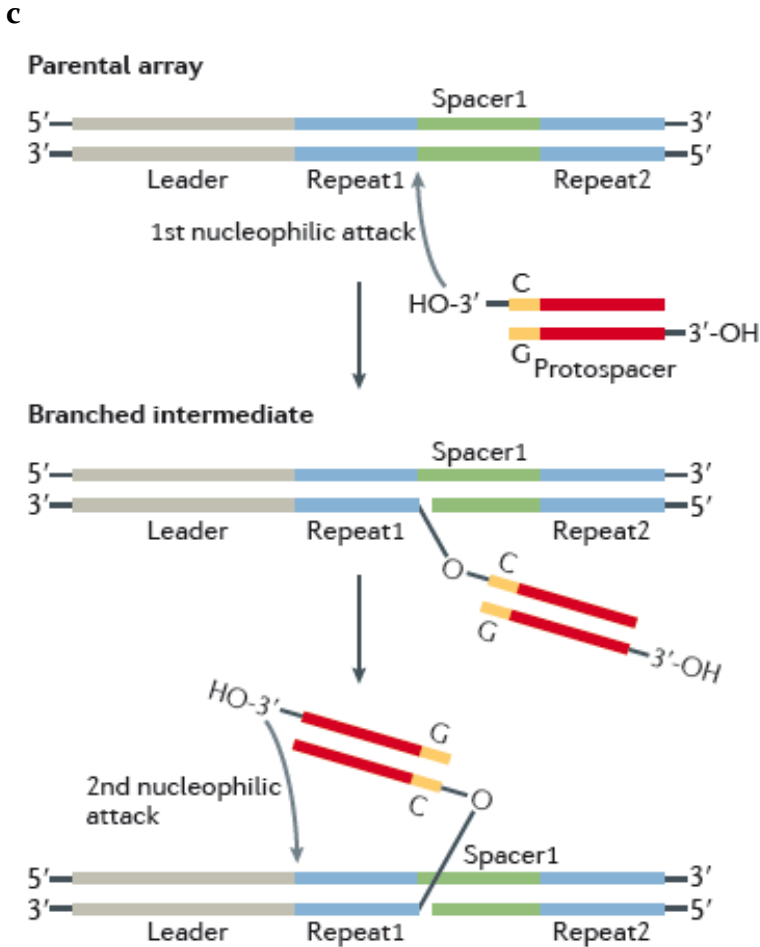
Comment ça marche?

Adaptation



Comment ça marche?

Adaptation



Amitai and Sorek, 2016 (Nature Rev. Micro.)

Figure 3 | Spacer integration into the CRISPR array. c | A model for protospacer integration into the CRISPR array. The protospacer 3'-OH group carries out a nucleophilic attack on the 5' end of the first repeat, thus initiating spacer acquisition by forming a branched intermediate in which a single strand of the protospacer is ligated to a single strand of the CRISPR array. The 3'-OH group on the other protospacer strand generates a second nucleophilic attack on the 5' end of the opposing DNA strand of the repeat, which is juxtaposed to the leader sequence. The product of this reaction is an expanded CRISPR array with a new spacer and a duplicated repeat. The ssDNA gaps that are produced at the repeat sequences are filled and repaired by uncharacterized enzymes.