

COLLOQUE 2018

**Le microbiote intestinal et son hôte :
entente ou mésentente ?**

**Les probiotiques de nouvelle génération pour prévenir
et traiter les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Philippe LANGELLA

PhD, Directeur de Recherche,

Responsable de l'équipe des Interactions des Bactéries Commensales et Probiotiques avec l'Hôte
(Institut MICALIS, INRA, Jouy-en-Josas)

[Les notes renvoient à la page des références.](#)

INTRODUCTION

Il n'est plus besoin de démonstrations pour confirmer l'importance du microbiote intestinal dans la santé humaine, le rôle majeur de cet organe étant maintenant bien établi. Celui-ci apparaît particulièrement actif dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

En 2008, *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) a été la première bactérie commensale anti-inflammatoire identifiée sur la base de données cliniques humaines (comparaison de microbiotes de patients MICI en rémission et en rechute). Depuis cette découverte, de nombreux travaux ont confirmé les corrélations entre *F. prausnitzii* et les maladies dysbiotiques intestinales humaines. Cette bactérie abondante et ubiquitaire de notre microbiote intestinal pourrait jouer dans un proche avenir un rôle majeur dans les nouvelles stratégies préventives et curatives des maladies gastro-intestinales. *F. prausnitzii* présente donc un fort potentiel en tant que probiotique de nouvelle génération chez les patients atteints de MICI.

LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LA SANTÉ HUMAINE

Deux phyla majeurs ont été identifiés dans le microbiote intestinal^[1-3] : les Firmicutes et les Bacteroidetes qui sont respectivement des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces deux phyla représentent 80 à 90% du microbiote. Parmi les bactéries du phylum des Firmicutes, *F. prausnitzii* () est le principal représentant du cluster IV des *Clostridium leptum*.

La dysbiose du microbiote est souvent associée à une dérégulation immunologique. La situation d'eubiose correspond à un équilibre entre les symbiotes, régulateurs, et les pathobiontes, pathogènes pro-inflammatoires. Une prépondérance des pathobiontes signe une dysbiose, déséquilibre immunitaire associé à l'installation d'un processus inflammatoire. Une revue de Round et al^[4] traitant de l'influence de la colonisation bactérienne intestinale sur le développement du système immunitaire adaptatif, confirme que les perturbations du microbiote bactérien entraînent une dérégulation des cellules immunitaires adaptatives. Les auteurs voient dans ce processus l'origine de nombreuses maladies immunitaires chroniques, en particulier les MICI.^[4]

Dès 2004, on rapportait une dysbiose liée aux diarrhées associées aux antibiotiques.^[5] Par la suite, de nombreux travaux ont mis en évidence une association entre la dysbiose et la maladie de Crohn^[6-11] et entre la dysbiose et la rectocolite hémorragique.^[7-12-13] De même, Rajilic-Stojanovic et al^[14] ont montré que des patients atteints de syndrome de l'intestin irritable (SII) présentaient une dysbiose du microbiote intestinal.

En santé humaine, le microbiote joue plusieurs rôles : fonction de barrière, fonction métabolique, immunitaire, protection contre les pathogènes, avec en particulier un rôle dans l'axe intestin/cerveau. Le microbiote intestinal s'est révélé un acteur majeur dans de nombreuses pathologies (cancer colorectal, arthrose, autisme, diabète, SII, MII, ...). Ces observations ont conduit à suggérer que microbiote et dysbiose pourraient être utilisés comme source potentielle de bactéries probiotiques de nouvelle génération.^[15] Celles-ci seraient sélectionnées de façon rationnelle sur la base de données cliniques humaines comme a été identifiée *F. prausnitzii*.

Les probiotiques traditionnels (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* et *Escherichia coli*) sont utilisés de longue date. Ils sont présents dans les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires. Les probiotiques de nouvelle génération, dénomination qu'on retrouve souvent dans la littérature sous le vocable anglais de « live biotherapeutics » sont des microorganismes-médicaments, et les prototypes en sont

Akkermansia, *Bacteroides* et *Faecalibacterium*.^[16] Des bactéries lactiques, alimentaires, sont aussi utilisées dans certains laboratoires comme bactéries-médicaments : elles sont ainsi manipulées génétiquement dans l'objectif de produire des protéines intéressantes en santé humaine.

FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII

Description de F. prausnitzii

F. prausnitzii est un bacille à Gram positif, membre du core phylogénétique comme cela a été démontré dans l'étude MetaHit.^[17] Dans cette étude, *F. prausnitzii* faisait partie d'un groupe de 18 bactéries identifiées chez les 120 volontaires sains dont le microbiote avait été analysé.^[17] Cette bactérie est la plus abondante dans le microbiote intestinal (3,5 à 5% des bactéries commensales) quelle que soit la région du monde où est faite l'analyse. *F. prausnitzii* est également un des producteurs majeurs de butyrate, acide gras à chaîne courte. Cependant, cette bactérie présente une extrême sensibilité à l'oxygène, ce qui rend délicates sa croissance et sa manipulation. La nécessité de la cultiver en chambre anaérobie rend techniquement difficile sa production et demande une grande expertise.

Histoire de l'identification de *F. prausnitzii*

Celle-ci s'est réalisée dans le cadre d'une collaboration INRA / Hôpital Saint-Antoine. Une étude a été menée sur 20 patients souffrant de maladie de Crohn iléale et devant subir une résection iléo-caecale. Avant résection, deux groupes de patients ont été identifiés : un groupe comportant un niveau de population normale de *F. prausnitzii* et un deuxième groupe montrant un déficit de *F. prausnitzii*. Six mois après la chirurgie, un groupe était en rémission endoscopique alors que l'autre était en rechute. Les patients en rémission étaient ceux présentant une population normale de *F. prausnitzii* et les patients en rechute, ceux accusant un déficit en *F. prausnitzii*. Sur la base de ce résultat, une étude concernant d'éventuelles corrélations entre la récurrence de MII et la diminution de *F. prausnitzii* a été menée à la recherche d'effets protecteurs et anti-inflammatoires potentiels de *F. prausnitzii*, dans un modèle murin de colite induite par le TNBS (trinitrobenzène sulfonate ou acide trinitrobenzènesulfonique).^[8] Cette étude a montré, dans ce modèle, que la bactérie et le surnageant avaient tous les deux des effets protecteurs, liés à la diminution de cytokines pro-inflammatoires et à l'augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires.^[8] Ce travail, publié dans PNAS il y a dix ans, a permis d'identifier les « good guys » (symbiotes) et les « bad guys » (pathobiontes) acteurs de notre microbiote. Cette étude, tenue pour pionnière, est toujours considérée aujourd'hui comme une référence dans le domaine du microbiote intestinal et fait partie des 10 publications les plus citées dans le domaine du microbiote.

Nouvelle stratégie fondée sur la dysbiose pour sélectionner des probiotiques de nouvelle génération

Une nouvelle stratégie d'isolement de bactéries probiotiques a été introduite à la suite des résultats de cette étude. La procédure classique d'isolement de nouvelles souches probiotiques est basée sur un panel de 50 à 100 candidats bactériens dont les effets potentiels sur la santé sont évalués dans des modèles cellulaires ou animaux. Cette procédure assez lourde peut aboutir à l'isolement de 1 à 3 nouvelles bactéries probiotiques. Le point de départ de la stratégie que nous proposons est basé sur l'observation d'une dysbiose identifiée en comparant les microbiotes de sujets sains ou en rémission à ceux de sujets en rechute. On peut ainsi identifier les bactéries manquantes chez les sujets en rechute et ensuite étudier leurs propriétés. Nous avons ainsi identifié *F. prausnitzii* dont on a validé les propriétés bénéfiques dans des modèles cellulaires ou animaux.

IMPLICATION DE *F. PRAUSNITZII* DANS LA DYSBIOSE

Parallèlement à l'étude pionnière, divers travaux ont pu mettre en évidence que le taux de *F. prausnitzii* était faible chez les patients atteints de MICI.^[9-18-19] On peut donc considérer aujourd'hui *F. prausnitzii* comme une sorte de biomarqueur de la santé intestinale, car, non seulement, il a été identifié dans la maladie de Crohn et dans la rectocolite hémorragique, mais il apparaît également diminué chez les patients souffrant de cancer colorectal et chez des patients atteints de SII.^[9-18-19]

Une autre étude a montré une corrélation entre le niveau de *F. prausnitzii* et le risque de rechute chez des patients atteints de maladie de Crohn et traités par infliximab.^[20] Au moment de l'arrêt du traitement par infliximab, on notait un niveau plus ou moins élevé de *F. prausnitzii* selon les patients. Les courbes de rémission ont montré que plus le niveau de *F. prausnitzii* était élevé, moins les patients rechutaient. Ces données confirment que *F. prausnitzii* est prédictif de rechute chez les patients atteints de maladie de Crohn et traités par infliximab.^[20]

Modèles animaux de colites et de stress

L'étude de Sokol et al^[8] a utilisé un modèle murin classique dans la mesure où un seul challenge était effectué avec le TNBS pour induire une colite dans ce modèle reproduisant une crise chez un patient atteint de MICI. Plus récemment, un modèle chronique a été utilisé, celui-ci reproduisant mieux la chronicité et la succession de poussées observée dans la maladie de Crohn.^[21] Nous avons pu ainsi montrer que *F. prausnitzii* et son surnageant avaient des effets positifs : *F. prausnitzii* montre un rôle protecteur sur l'épithélium dans la colite chronique induite par le DNBS (dinitrobenzène sulfonate ou acide dinitrobenzènesulfonique).

L'impact éventuel de *F. prausnitzii* sur la douleur abdominale a été étudié dans un modèle murin de stress basée sur la séparation néonatale des souriceaux, durant les 10 premiers jours après la naissance, qui induit une hypersensibilité viscérale.^[22] Comparées aux souriceaux non séparés de la mère, les souris du groupe séparation néonatale ont montré une augmentation significative de l'hypersensibilité viscérale. Dans ces modèles, le traitement avec *F. prausnitzii*, évalué en termes de réponse viscéro-motrice, a révélé un effet anti-nociceptif significatif sur l'hypersensibilité viscérale. La perméabilité intestinale, augmentée par le stress de séparation néonatale, a été restaurée par le traitement avec *F. prausnitzii* qui a ainsi montré sa capacité à renforcer la barrière épithéliale de l'intestin.^[22]

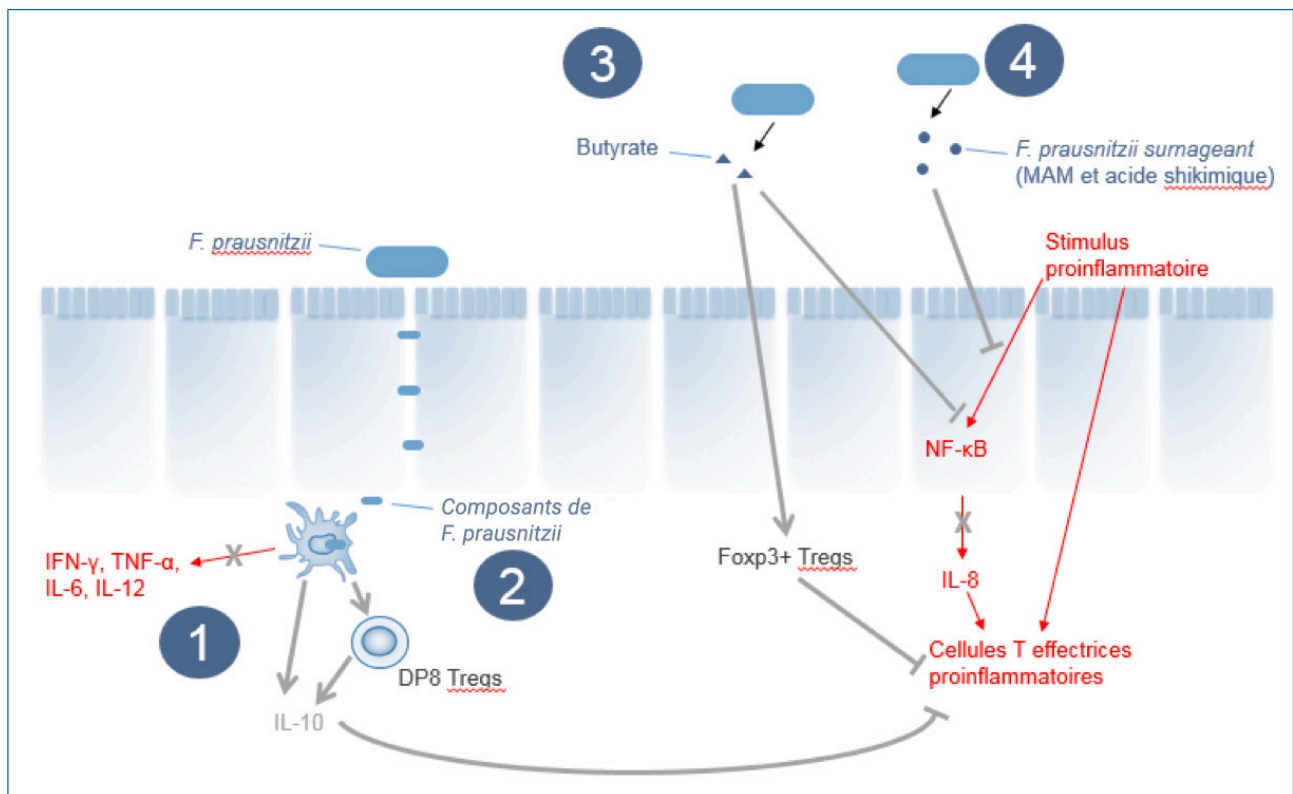
Modes d'action de *F. prausnitzii*

Diverses analyses ont été effectuées afin de déterminer le mode d'action qui régit le fonctionnement de *F. prausnitzii*.^[8,23-26]

Dans un premier temps, sept peptides ont pu être identifiés dans le surnageant par spectrométrie de masse. In vitro, une analyse métabolomique dans un système simplifié a ensuite permis d'identifier des métabolites susceptibles d'avoir un effet dans les mécanismes d'action de *F. prausnitzii*. In vivo, dans des souris axéniques, *Escherichia coli* a été utilisé comme compagnon pour permettre l'implantation de *F. prausnitzii*. L'induction d'une colite par le DNBS a permis de montrer un effet protecteur contre la colite chez les souris hébergeant *E. coli* et *F. prausnitzii*. Une analyse métabolomique simple a révélé que chez ces souris protégées apparaissaient des métabolites comme le raffinose, l'acide shikimique et l'acide salicylique, deux acides connus pour leurs effets anti-nociceptifs et anti-inflammatoires.^[23]

L'analyse du surnageant a également révélé sept peptides dérivant tous d'une protéine MAM (pour Microbial Anti-inflammatory Molecule) qui joue un rôle essentiel dans les modes d'action anti-inflammatoires de *F. prausnitzii*. L'utilisation de lactocoques délivrant l'ADNc de la MAM a montré des impacts positifs dans un modèle de colite induite par le DNBS). Des effets protecteurs significatifs de MAM ont aussi pu être observés dans un modèle de colite induite par le DSS.^[24]

Les différents mécanismes d'action identifiés par des études conduites dans cet objectif sont présentés dans la Figure 1.^[8,23-26]

Figure 1. *Faecalibacterium prausnitzii*, résumé des différents mécanismes d'action publiés.^[8,23-26]

Des nouvelles souches de *F. prausnitzii* ont été découvertes récemment. La sélection de la souche CNCM-4573^[27] et le séquençage du génome de ces bactéries^[28] ont permis une meilleure connaissance de ces nouvelles souches de *F. prausnitzii*.

COMMENT UTILISER *F. PRAUSNITZII* APRES 10 ANS DE TRAVAUX SUR L'IDENTIFICATION DE SES PROPRIETES ?

Il apparaît intéressant, depuis l'identification de *F. prausnitzii* et de ses effets, d'utiliser des probiotiques et des prébiotiques pour en augmenter la population. On peut aussi envisager de l'employer seul, soit comme médicament, soit comme « novel food » (cf. la législation européenne). Enfin, on peut s'en servir pour produire des post-biotiques comme la protéine MAM ou d'autres molécules sécrétées par *F. prausnitzii*, et les utiliser en tant que médicaments.

Sur la base des modèles précliniques menés chez la souris, la preuve de concept (Proof of concept) chez l'humain a été obtenue avec succès selon les trois étapes suivantes :

- 1/ Production de *F. prausnitzii* en tant que lyophilisat biologiquement actif produit dans les conditions GMP (Good Manufacturing Practices ou bonnes pratiques de fabrication),
- 2/ Exploration de son mode d'action,
- 3/ Démonstration de son absence de toxicité.

En tant que probiotique de nouvelle génération, *F. prausnitzii* fera l'objet d'ici deux ans d'essais cliniques menés par la start-up Exeliom Biosciences (créée par l'INRA en novembre 2016) chez des patients atteints de MICI. L'objectif est de pouvoir disposer de capsules lyophilisées de *F. prausnitzii* qui pourraient être administrées à des patients atteints de MICI.

Des souches de lactobacilles producteurs d'agonistes AhR, d'autres probiotiques de nouvelle génération

Des travaux récents sur la souris Card9 (gène de susceptibilité à la maladie de Crohn) KO ont permis d'identifier de nouvelles souches de bactéries probiotiques. Une étude d'induction à la colite a été menée sur des souris Card9 KO avec pour objectif l'identification des bactéries probiotiques de nouvelle génération.^[29] Chez ce type de souris, le métabolisme du tryptophane est déficient. L'étude a montré que l'addition d'un trio de lactobacilles producteurs de métabolites du tryptophane a permis de protéger la souris contre les effets de la colite induite, un effet qui s'explique par une augmentation de l'activité AhR et de la sécrétion d'IL-22.^[29] Ces résultats suggèrent que les lactobacilles producteurs d'agonistes AhR pourraient être utilisés comme probiotiques de nouvelle génération, seuls ou en combinaison avec d'autres probiotiques de nouvelle génération.

COMMENTAIRES, CONCLUSIONS

De nombreux travaux ont à l'heure actuelle fait la preuve que les gènes peuvent transformer le microbiote intestinal et sa fonction, impactant fortement la santé humaine. Dans les MICI, la fonction du microbiote intestinal est altérée, mais cette dysbiose semble pouvoir être diminuée par des bactéries probiotiques de nouvelle génération issues du microbiote.

A ce jour, les futures perspectives pour la recherche sont la poursuite de la caractérisation de probiotiques de nouvelle génération prometteurs et de leur mode d'action, la comparaison de leurs effets en mono-souches ou en consortiums et l'initiation d'essais cliniques chez l'homme. Leur objectif serait d'obtenir des preuves de concept de l'utilisation de ces probiotiques de nouvelle génération chez des patients atteints de MICI.

RÉFÉRENCES (Les références soulignées renvoient aux abstracts correspondants sur PubMed)

1. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 2007; 449(7164):811-818.
2. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; 320(5883):1647-1651.
3. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 2009; 11(10):2574-2584.
4. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5):313-323.
5. Beaugerie L, Petit JC. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2):337-352.
6. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Doré J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52(2):237-242.
7. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Doré J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(2):106-111.
8. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn's disease patients. *PNAS* 2008; 105 (43):16731-16736.
9. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(8):1183-1189.
10. Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Järnerot G, Tysk C, Apajalahti J, Engstrand L, Jansson JK. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J* 2008; 2(7):716-727.
11. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(5):653-660.
12. Martinez C, Antolin M, Santos J, Torrejon A, Casellas F, Borruel N, Guarner F, Malagelada JR. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(3):643-648.

13. Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejón A, Borrueal N, Casellas F, Guarner F, Antolin M. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38(2):151-161.
 14. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, de Vos WM. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011; 141(5):1792-1801.
 15. Patel R, DuPont HL. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis* 2015; 60 Suppl 2:S108-121.
 16. O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2017; 2:17057.
 17. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al; MetaHIT Consortium. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473(7346):174-180.
 18. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, Järnerot G, Tysk C, Jansson JK, Engstrand L. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010; 139(6):1844-1854.
 19. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ, Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012; 13(9):R79.
 20. Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20(6):978-986.
 21. Martín R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, Sokol H, Verdu EF, Bercik P, Bermúdez-Humarán LG, Langella P. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20(3):417-430.
 22. Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschalié A, Ardid D, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, Thomas M, Theodorou V, Langella P, Carvalho FA. Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep* 2016; 6:19399.
 23. Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016; 65(3):415-425.
 24. Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo VA, Langella P, Chatel JM. Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- κ B pathway. *Front Microbiol* 2017; 8:114.
 25. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, Hudault S, Bridonneau C, Northen T, Bowen B, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, Thomas M, Langella P. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio* 2015; 6(2). pii: e00300-15.
 26. Sarraeyrouse G, Bossard C, Chauvin JM, Jarry A, Meurette G, Quévrain E, et al. CD4CD8 $\alpha\alpha$ lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol* 2014; 12(4):e1001833.
 27. Martín R, Miquel S, Benevides L, et al. Functional characterization of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from healthy volunteers: a step forward in the use of *F. prausnitzii* as a next-generation probiotic. *Front Microbiol* 2017; 8:1226.
 28. Benevides L, Burman S, Martin R, et al. New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium*. *Front Microbiol* 2017; 8:1790.
 29. Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham HP, Michel ML, Da Costa G, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 2016; 22(6):598-605.
-