



# Le professeur de sciences et le B.O. : microbiote humain et santé - notion n°1

Lycée (2<sup>nd</sup>e)

Édition 1 - 2020 - Thomas Waag



## Intentions

Le sujet du microbiote humain en lien avec la santé nécessite particulièrement un regard critique de notre part, car les données à ce propos sont récentes et les niveaux de preuve sont extrêmement variables en fonction des publications. On retrouve également cette diversité dans les manuels scolaires, or il semble souhaitable de faire parvenir les élèves à établir des corrélations bien étayées chez l'humain. Cette ressource qui s'inscrit dans la nouvelle collection « Le professeur de sciences et le B.O. » vise donc à confronter une liste de sujets susceptibles d'être traités par les enseignants à une analyse critique du niveau de preuve.

Corrélations

Niveaux de preuve

Débats

## Introduction

La connaissance de l'existence de micro-organismes dans le corps humain n'est pas récente. Cependant l'importance des microbiotes et leur existence dans presque toutes les parties du corps ne sont pas des notions encore bien établies. Par exemple, le dogme clinique qui établissait que l'urine était stérile et que la présence de bactéries était associée à une infection du tractus urinaire a subsisté pendant longtemps jusqu'à l'arrivée des méthodes d'analyse métagénomiques.

Malgré tout, cet outil puissant qui a changé notre vision du microbiome humain a ses limites et les interprétations qui en découlent nécessitent d'adopter un esprit critique face aux données qui circulent au sujet des microbiotes.

## Le nouveau programme de SVT en seconde

Le point du programme de seconde qui sera abordé dans cette ressource est le suivant :

« Le microbiote humain représente l'ensemble des microorganismes qui vit sur et dans le corps humain. »

L'objectif de cette notion est pour l'élève d'avoir connaissance de l'importance quantitative des micro-organismes du microbiote humain.

## Les exemples traités dans la littérature scientifique ayant un rapport avec le nouveau programme

Les microbiotes sont nombreux. Choisir un exemple en particulier parmi ces derniers pour parvenir à la notion du programme n'est pas forcément judicieux pour comprendre l'importance possible de la part des différents types de microbiotes et une vision synthétique s'impose donc. Cependant fournir un simple document de synthèse aux élèves nécessiterait de prendre des précautions lors de son exploitation du fait des niveaux de preuve variables en fonction des données.

Il est donc proposé dans cette ressource un tableau pour les enseignants présentant l'ensemble des sujets qui pourraient être abordés en classe. Il précise également certains points auxquels il faut prêter attention lors de la préparation de nos cours.

## La nécessité d'un regard critique

Le comptage des micro-organismes du microbiome nécessite de pouvoir les détecter. Cette mise en évidence n'est pas toujours aisée et peut-être biaisée par des contaminations externes. Par ailleurs, les techniques de microscopie trouvent leurs limites lorsque le microbiote est trop dense. Il est également à prendre en compte que les micro-organismes détectés peuvent correspondre à des espèces qui occupent transitoirement l'espace étudié.

Il semble donc important de ne pas fournir un document tout fait qui présenterait des données chiffrées de l'importance des microbiotes mais de faire participer les élèves à une démarche de réflexion visant à faire des estimations par eux-mêmes afin qu'ils se rendent compte d'une partie des difficultés. Ils pourraient ainsi comprendre que l'on ne peut pas, à l'heure actuelle, avoir un discours précis sur l'importance relative des différents types de micro-organismes. L'importance du virome pourrait par exemple être fortement sous-estimée.

## Une conclusion nuancée à faire construire par les élèves

Différentes activités sont envisageables avec les élèves afin de leur faire prendre conscience de la difficulté à quantifier et même identifier des micro-organismes du microbiote. Une proposition est d'ailleurs publiée dans la partie activités du [site](#).

Après avoir repéré quelques obstacles et solutions à la quantification des microbiotes, les élèves pourraient compléter leurs analyses par quelques données extraites du tableau de synthèse de cette ressource.

Un exemple de conclusion nuancée à faire construire par les élèves serait :

« Le microbiote semble largement dominé par des bactéries puisqu'on évalue actuellement un nombre de cellules bactériennes de l'ordre de  $10^{14}$ .

Ces microorganismes se situeraient essentiellement au niveau de l'intestin et de la peau. Des microbiotes sont également décrits au niveau de la bouche, l'estomac, l'appareil respiratoire, l'appareil urogénital, le placenta et le sang. Il peut être également envisagé, mais sans certitude, une localisation au niveau du cerveau.

Le nombre de virus n'est pas connu, mais il se pourrait qu'il soit plus important que celui des bactéries.

Le nombre de levures semble faible au regard des bactéries mais leur importance volumique n'est pas à négliger. »

Exemples possibles en lien avec les éléments du programme	Revue de la littérature	Niveau de précision/certitude
Microbiote cutané	Il y aurait $10^{11}$ bactéries par $m^2$ (1a) et $10^6$ virus par $cm^2$ (1b). Le nombre de bactéries varie beaucoup en fonction des sites et notamment en fonction de la densité de glandes sébacées eccrines et apocrines.	<p><b>Mise en évidence :</b> Les techniques de microscopie électronique et par épifluorescence permettent de mettre en évidence le microbiote cutané.</p> <p><b>Comptage :</b> Le nombre de bactéries est estimé par les méthodes de culture. Les milieux utilisés pour l'estimation proposée sont sélectifs pour les bactéries aérobies uniquement. Cette estimation est celle que l'on rencontre un peu partout dans la littérature. Des estimations bien plus précises existent mais uniquement pour quelques sites spécifiques de la peau. Il n'y a pas d'estimation très précise pour l'ensemble du microbiote cutané du fait du temps nécessaire pour appliquer les méthodes d'étude. Le nombre de virus est estimé par microscopie par épifluorescence.</p>
Microbiote de l'estomac	La densité microbienne dans l'estomac est estimée à $10^2$ - $10^4$ CFU/mL (2a).	<p><b>Mise en évidence des bactéries :</b> Des culture et biopsies de muqueuse ont permis de mettre en évidence de nombreuses bactéries qui vivent de façon transitoire dans l'estomac (2b, 2c).</p> <p><b>Comptage :</b> Les études basées sur les cultures sous-estiment le nombre d'espèces bactériennes. L'amplification des ADNr 16S a permis d'analyser les biopsies d'estomac (2d).</p>
Microbiote intestinal	Le nombre de bactéries qui résident dans l'intestin aurait un ordre de grandeur de $10^{14}$ (3a) Selon de récentes études, 2,7 % des séquences analysées par la métagénomiques dans les selles seraient d'origine virale, 50,9 % d'origine bactérienne, 7,2 % d'origine eucaryotique et 37,2 % d'origine incertaine (3b).	<p><b>Comptage :</b> La densité bactérienne de l'intestin étant très élevée, le comptage à l'aide des techniques de microscopie est rendu difficile. La microscopie électronique permet d'identifier facilement les bactéries et de les compter mais l'échelle d'analyse est fortement réduite. Par ailleurs ces techniques nécessitent une fixation qui rend l'observation moins pertinente. Dans le colon, même avec les coupes les plus fines, les sections des cellules sont réalisées dans différents plans qui ne sont pas perpendiculaires à l'axe de l'image. Les techniques de microscopie par épifluorescence sont difficiles à utiliser pour distinguer les cellules (3c).</p>
Microbiote buccal	La quantité de bactéries dans la salive varie entre 500 et 250 000 CFU/mL pour les bactéries saccharolytiques et entre $9,5 \times 10^6$ et $7,8 \times 10^8$ CFU/mL pour les bactéries protéolytiques en fonction de la concentration en différents métabolites dans la salive (4a). Il y aurait $10^{11}$ bactéries/mL dans la plaque dentaire (4b). Les Archaea constituent une faible part du microbiote oral. Elles peuvent être observées chez les sujets sains mais leur prévalence et nombre sont élevés chez les individus ayant une périodontite (4d). Les Fungi constituent une part importante du microbiote oral à la fois en tant qu'opportunistes pathogènes chez le sujet âgé mais aussi en tant que microbiote sain. (4e) La plupart des virus du microbiote oral sont associés à des états pathologiques (4d).	<p><b>Mise en évidence :</b> La majeure partie des données sont issues de méthodes culture-dépendantes qui sous-estiment fortement la composition du microbiote oral (4d).</p> <p><b>Comptage :</b> Les bactéries de la plaque dentaire forment des agrégats cellulaires robustes et complexes qui empêchent un comptage rigoureux par les méthodes de microscopie par épifluorescence (4f).</p>
Microbiote de l'appareil respiratoire	Il y aurait $2,2 \times 10^3$ génomes bactériens par $cm^2$ dans les poumons ce qui permet de penser que la quantité est équivalente à celle du duodénum (soit $10^4$ bactéries/mL) (5a). Il y aurait $2,8 \times 10^8$ particules virales par mL (1b).	<p><b>Comptage des virus :</b> direct par microscopie (épifluorescence)</p> <p><b>Mise en évidence des bactéries :</b> - Identification de séquences d'ADNr 16S grâce à des méthodes de culture ou sans culture directement sur des échantillons pulmonaires. - Le microbiote pulmonaire ne correspond peut-être pas à des bactéries résidentes. - Une étude mettrait en évidence une dominance de phénomènes immigratoires et d'élimination à l'origine des communautés bactériennes (5b).</p>
Microbiote urinaire	Les analyses d'urines révèlent la présence de bactéries (6). Il y aurait $3,7 \times 10^6$ particules virales par mL (1b).	<p><b>Comptage des virus :</b> direct par microscopie (épifluorescence)</p> <p><b>Mise en évidence des bactéries :</b> - Observation au microscope et séquences d'ADNr 16S - Aucune mise en évidence par des cultures bactériennes</p>
Microbiote du cerveau	Des bactéries ont été identifiées sur des coupes de cerveau (7).	<p><b>Mise en évidence :</b> - Observations au microscope électronique - Identification de séquences codant pour l'ADNr 16S. - Source possible issue d'une contamination des échantillons cadavériques</p>

Exemples possibles en lien avec les éléments du programme	Revue de la littérature	Niveau de précision/certitude
Microbiote du sang	Du matériel génétique bactérien est identifié dans le sang d'individus sains. La confirmation au microscope nécessite un examen approfondi. Il y aurait $1 \times 10^5$ particules virales par mL (8).	<p><b>Comptage des virus</b> : direct par microscopie (épifluorescence)</p> <p><b>Mise en évidence des bactéries</b> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Observations au microscope mais les structures observées pourraient correspondre à des particules protéiques.</li> <li>- Identification de séquences codant pour l'ADNr 16S</li> <li>- Identification de bactéries par des cultures mais basées en général sur des échantillons de volume faible et les contrôles permettant de vérifier que les bactéries ne proviennent pas d'une contamination externe sont souvent inexistantes ou peu fiables.</li> <li>- Identification d'ARN bactérien.</li> <li>- Aucune des méthodes ne permet de savoir si les bactéries du sang sont vivantes, actives ou non.</li> </ul>
Microbiote du placenta	Une étude chez 160 individus a révélé que le placenta ne contenait pas d'ADN d'origine bactérienne sauf dans 5 % des cas où l'on pouvait détecter la bactérie <i>Streptococcus agalactiae</i> associée à des infections (9).	<p><b>Mise en évidence</b> :</p> <p>Des biopsies de placenta ont été analysées grâce aux méthodes de la métagénomique.</p>
Microbiote de l'utérus	Les estimations indiquent qu'il y aurait 100 à 10 000 fois moins de bactéries que dans le vagin (10a).	<p><b>Mise en évidence</b> :</p> <p>L'abondance des microorganismes étant très faible les risques de mauvaise interprétation sont élevés. Ces bactéries peuvent provenir d'une contamination des échantillons ou d'une transmission dans l'utérus (10b) depuis plusieurs sources (depuis la circulation sanguine, le vagin ou la glaire cervicale). Des faux positifs sont courants si les contrôles ne sont pas assez rigoureux. Ces derniers sont d'ailleurs très différents en fonction des études. Certaines utilisent des prélèvements de peau stérilisée du patient et des gants du docteur (10c).</p>
Microbiote vaginal	Une femme en âge de porter un enfant produit environ 1 à 4 mL de sécrétions vaginales contenant environ $10^6$ à $10^8$ bactéries par mL (11)	<p><b>Mise en évidence</b> :</p> <p>Les analyses proviennent essentiellement de données basées sur les méthodes de cultures qui ne détectent que 20 % des bactéries du microbiote vaginal. Les méthodes moléculaires sous-estiment également la présence de certaines espèces puisque certaines ne sont pas présentes dans les bases de données métagénomiques (11).</p>
Microbiote nasal	Il y aurait $10^6$ à $10^7$ bactéries par narine (12a).	<p>Le microbiote nasal est très exposé à des contaminations bactériennes puisqu'il y a <math>10^4</math>–<math>10^6</math> bactéries par <math>m^3</math> d'air inhalé par jour (12b).</p>
Microbiote de la surface oculaire	Il y aurait 100 CFU/mL dans le film lacrymal (13a).	<p><b>Mise en évidence</b> :</p> <p>Des analyses de prélèvement de surface, des hybridations in-situ avec des sondes spécifiques et des l'utilisation des méthodes basées sur les cultures bactériennes permettent de mettre en évidence ce microbiote. Lorsqu'il s'agit des études de métagénomique, il n'y a aucun protocole standardisé pour éliminer des données les bactéries issues de contaminations. Les résultats des études sont donc assez divergeants concernant ce microbiote (13b).</p>
Virome	Le nombre de virus total dans l'organisme n'est pas encore connu mais dans l'environnement on estime qu'il y a 10 virus pour une bactérie (14). Une estimation du nombre de virus au niveau de la bouche, des poumons, de l'intestin distal, de la peau, du vagin et du tractus urinaire serait $3 \times 10^{12}$ (1b).	<p><b>Comptage</b> : direct (microscopie, épifluorescence)</p> <p><b>Mise en évidence</b> :</p> <p>Les méthodes de métagénomique virale sont biaisées par le fait que les catalogues sont essentiellement constitués de séquences de virus pathogènes.</p>
Mycobiome	Le nombre de levures est très faible par rapport au nombre de bactéries (15a). Cependant le volume d'une levure est beaucoup plus important que celui des bactéries (15b).	<p><b>Comptage</b> : direct par microscopie</p> <p>Les estimations du nombre de levures dans l'organisme diffèrent beaucoup en fonction des études.</p> <p><b>Mise en évidence</b> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Microscopie</li> <li>- Analyses de cultures essentiellement</li> <li>- Le catalogue de gènes utilisé dans les études métagénomiques est essentiellement d'origine bactérienne (15c).</li> </ul>
Archaeome	Il est estimé que 10 % des anaérobies de l'intestin sont des archaea (16a).	<p><b>Comptage</b> : les méthodes et estimations concernant l'importance des archaea sont variables en fonction des études.</p> <p><b>Mise en évidence</b> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultures (beaucoup de difficultés) (16b)</li> <li>- Microscopie</li> <li>- Identification de séquences d'ADNr 16S et du gène <i>mcrA</i> (manque d'uniformité des méthodes de détection)</li> </ul>

## RÉFÉRENCES

- 1a. Leyden J, McGinley K, Nordstrom K, Webster G. Skin microflora. *J Invest Dermatol* 1987;65–72.
- 1b. Haynes M, Rohwer F. The Human Virome. In: *Metagenomics of the Human Body*. New York: Springer; 2010. pp. 63e77. *Immigrations : Dickson* 2015
- 2a. GASTRIC MICROBIOTA: TRACING THE CULPRIT, CRISTIAN VASILE PETRA - *Clujul Medical*, Vol.90, No.4, 2017: 369-376
- 2b. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107–133.
- 2c. Stark CA, Adamsson I, Edlund C, Sjösted S, Seensalu R, Wikström B, et al. Effects of omeprazole and amoxicillin on the human oral and gastrointestinal microflora in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38(6):927–939.
- 2d. Monstein HJ, Tiveljung A, Kraft CH, Borch K, Jonasson J. Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. *J Med Microbiol.* 2000;49(9):817– 822.
- 3a. Backhed F. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920 doi:10.1126/science.1104816
- 3b. Norman J.M., Handley S.A., Baldrige M.T., Droit L., Liu C.Y., Keller B.C., Kambal A., Monaco C.L., Zhao G., Fleshner P., et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2015;160:447–460. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.002
- 3c. Tropini, *The Gut Microbiome : Connecting Spatial Organization to Function* - *Cell Host & Microbe* 21, April 12, 2017
- 4a. Gardner, *Determining bacterial and host contributions to the human salivary metabolome* - *Journal of Oral Microbiology* Volume 11, 2019 - Issue 1
- 4b. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996; 4:430–5
- 4d. Zhang, *Human oral microbiota and its modulation for oral health* - *Biomedicine & Pharmacotherapy* 99 (2018) 883–893
- 4e. B.P. Krom, S. Kidwai, J.M. ten Cate, *Candida and other fungal species forgotten players of healthy oral microbiota*, *J. Dent. Res.* 93 (5) (2014) 445–451.
- 4f. Filoche, *A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms* - *J Microbiol Methods.* 2007 Jun;69(3):489-96. Epub 2007 Mar 3
- 5a. Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., et al. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5:e8578. doi: 10.1371/journal.pone.0008578
- 5b. Dickson RP, Erb Downward JR, Freeman CM, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(6):821- 830.
6. Fouts, D. E., Pieper, R., Szpakowski, S., Pohl, H., Knoblach, S., Suh, M.-J., et al. (2012). Integrated next-generation sequencing of the 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J. Transl. Med.* 10, 174. doi : 10.1186/1479-5876-10-174
7. Do gut bacteria make a second home in our brains ?, Kelly Servick - doi:10.1126/science.aaw0147
8. McLaughlin, R. W., Vali, H., Lau, P. C., Palfree, R. G., De Ciccio, A., Sirois, M., et al. (2002). Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? *J. Clin. Microbiol.* 40, 4771–4775. doi: 10.1128/JCM.40.12.4771-4775.2002
9. De Goffau, *Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens* - *Nature* 2019
- 10a. Chen, *The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases* - *Nature* 2017
- 10b. Baker, *Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or invaders ?* - *Frontiers in Immunology* 2018

- 10c. Chen C, Song XL, Wei WX, Zhong HZ, Dai JJ, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun* (2017) 8(1):875. doi:10.1038/s41467-017-00901-0
11. Diop, Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota - *Human Microbiome Journal* 2019
- 12a. Wilson, *Bacteriology of Humans: An Ecological Perspective* - ISBN: 978-1-405-16165-7 (p.142)
- 12b. Kumpitsch, The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease - *BMC Biology* (2019) 17:87
- 13a. Berry M, Harris A, Lumb R, Powell K. Commensal ocular bacteria degrade mucins. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1412–1416
- 13b. Ozkan, The Ocular Microbiome: Molecular Characterization of a Unique and Low Microbial Environment - *Current Eye Research* 2019
14. Zarate, Human Virome - *Archives of Medical Research* 48 (2017) 701e716
- 15a. Kapitan, Fungi as Part of the Microbiota and Interactions with Intestinal Bacteria - *Current Topics in Microbiology and Immunology* DOI 10.1007/82\_2018\_117
- 15b. Chaudhuri A (2016) Cell biology by the numbers. *Yale J Biol Med* 89(3):425–426
- 15c. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285):59–65.
- 16a. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes, Christine Moissl-Eichinger - *Trends in Microbiology*
- 16b. Archaea associated with human surfaces: not to be underestimated, Corinna Bang - *FEMS Microbiology Reviews*, fuv010, 39, 2015, 631–648