

EM pour le TP 03

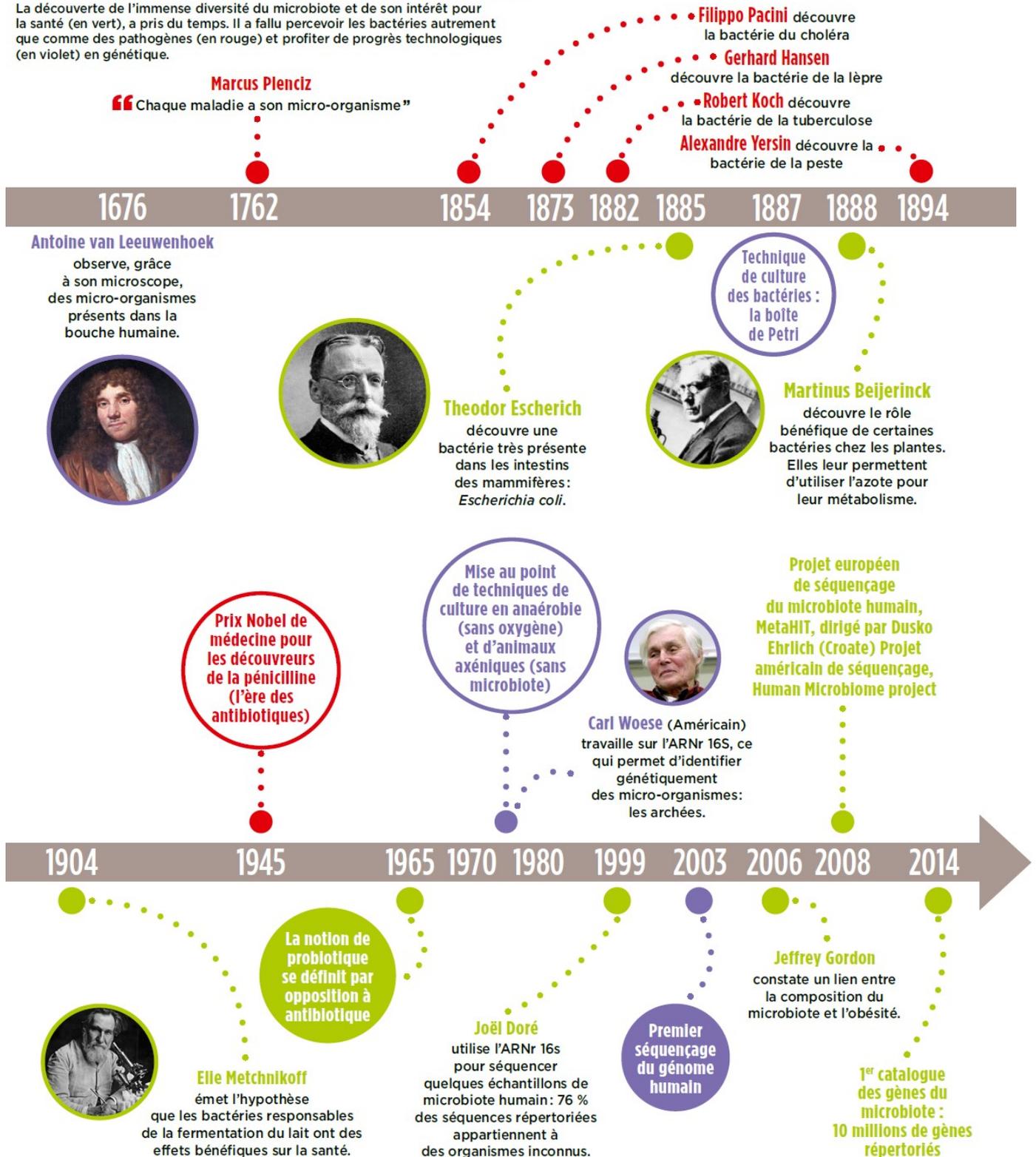
Objectifs :

0- Prendre connaissance de la chronologie des découvertes relatives à ce domaine.

La recherche de Février 2018 (n°532)

Chronologie d'une découverte (à contre-courant)

La découverte de l'immense diversité du microbiote et de son intérêt pour la santé (en vert), a pris du temps. Il a fallu percevoir les bactéries autrement que comme des pathogènes (en rouge) et profiter de progrès technologiques (en violet) en génétique.



1- Définir « microbiote », « microbiome », « Prébiotique » et « Probiotique ».

2- Trouver les différents microbiomes présents chez l'humain... Sans chercher de documentation...

L'étude se fera essentiellement sur les bactéries. L'étude de la diversité sera soumise à un problème, de nombreux groupes bactériens existent, vivent, échangent avec le milieu(leur biotope) mais ne sont **pas cultivables....**

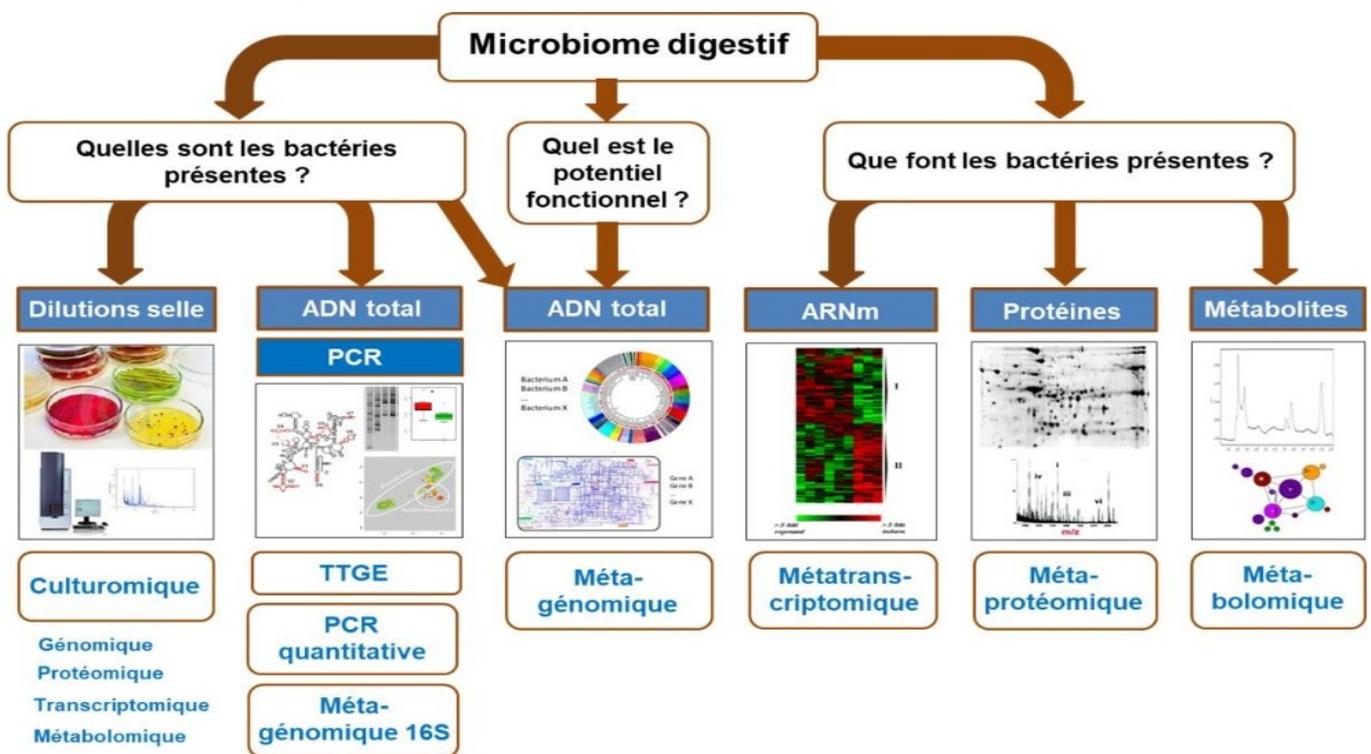
L'avènement de la **métagénomique** a permis seulement récemment, grâce au **prélèvement « en vrac » de matériel génétique**, de quantifier la diversité génétique du microbiote.

Chez les bactéries : les **phyla** correspondent à des grands groupes qui renferment de nombreuses **familles**.

Voici la classification du colibacille bien connu, ou *Escherichia coli* :

- **règne** : *Prokaryotae*
- **domaine** : *Bacteria*
- **phylum** : *Proteobacteria*
- **classe** : *Gammaproteobacteria*
- **ordre** : *Enterobacteriales*
- **famille** : *Enterobacteriaceae*
- **genre** : *Escherichia*
- **espèce** : *Escherichia coli*

Enfin, en fonction des techniques employées, on peut définir de nombreuses caractéristique du microbiote.



À voir : Vidéos de Marc André Selosse sur l'acquisition du microbiote humain.

<https://tube.reseau-canope.fr/w/2eb9dd4d-4392-4237-99e1-622d2f424992>

<https://www.youtube.com/watch?v=wJn05dqqES4&t=135s>

TP 03 Définir le microbiote et comprendre sa mise en place

Objectifs :

Observer les micro-organismes du microbiote buccal. **Observer un frottis de bactéries du microbiote de vertébrés**

Étudier la diversité et l'abondance **du microbiote** chez un individu et **la représenter**.

Étudier la diversité des microbiotes entre ethnies, en fonction de l'âge et tenter d'en expliquer l'origine.

Rq : on focalisera plutôt sur le microbiote intestinal.

1- Découvrir « le » microbiote : un poisson frais, lames pour frottis, microscope., cotons tiges propres, bleu de méthylène (et sèche cheveux?)

Doc 1 : La science se remet en question... On entend souvent parler d'une estimation de 10 à 100 fois plus de micro-organismes que notre corps a de cellules... C'est un fait admis que l'on retrouve dans beaucoup de publications scientifiques.... Cependant :

We critically revisit the "common knowledge" that bacteria outnumber human cells by a ratio of at least 10:1 in the human body. We found the total number of bacteria in the "reference man" to be $3.9 \cdot 10^{13}$, with an uncertainty (SEM) of 25%, and a variation over the population (CV) of 52%. For human cells we identify the dominant role of the hematopoietic lineage to the total count of body cells ($\approx 90\%$), and revise past estimates to reach a total of $3.0 \cdot 10^{13}$ human cells in the 70 kg "reference man" with 2% uncertainty and 14% CV. Our analysis updates the widely-cited 10:1 ratio, showing that the number of bacteria in our bodies is actually of the same order as the number of human cells. Indeed, the numbers are similar enough that each defecation event may flip the ratio to favor human cells over bacteria.

Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body

Ron Sender, Shai Fuchs, Ron Milo

doi: <https://doi.org/10.1101/036103>

Now published in *PLOS Biology* doi: [10.1371/journal.pbio.1002533](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533)

Première publication en Janvier 2016

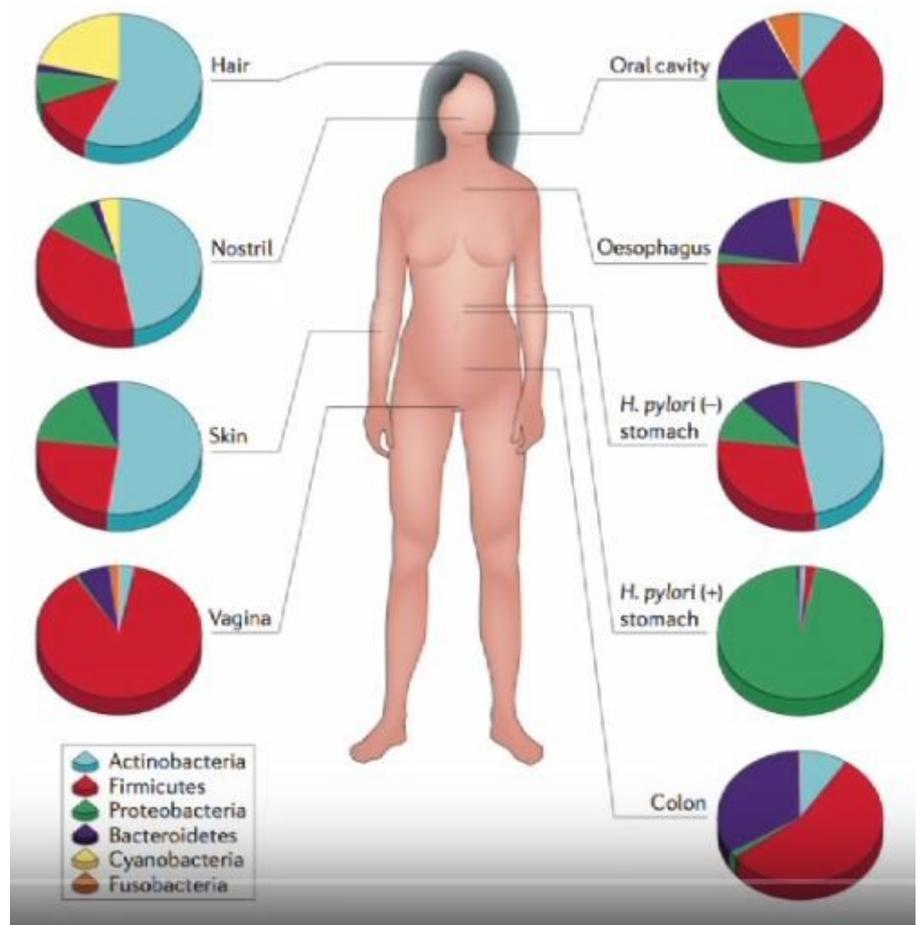
Doc 2 : Proportions des grandes familles de bactéries présentes sur les surfaces corporelles d'une femme.

a- Argumenter de façon concise l'existence d'une diversité des microbiomes sur un même organisme :

On peut peut être en ajouter un...

- Le microbiote cérébral :? à confirmer

<https://www.youtube.com/watch?v=E031NY645go>



Doc 3 : Part de la diversité génomique : Humain vs microbiote total.

Certaines sources évoquent 300 fois plus de gènes bactérien que de gènes humains dans un organisme humain... D'autres sources avancent un rapport de 1 pour 26... (23000gènes humains pour 600 000 bactériens)

Doc4 :

Microbiologie

L'équilibre du microbiote intestinal, une affaire de virus

La découverte de bactériophages virulents très infectieux dans le microbiote pourrait ouvrir de nouvelles perspectives en phagothérapie.

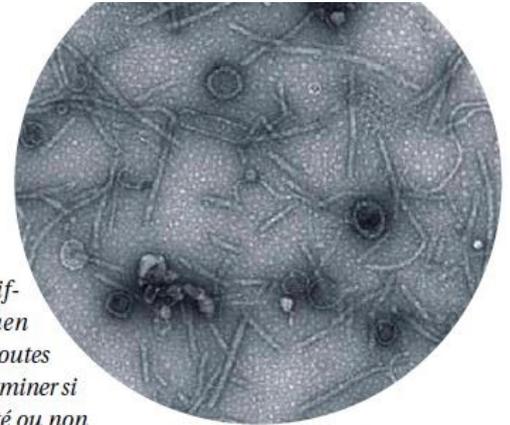
Nos intestins n'abritent pas seulement des colonies de bactéries, de nombreux virus y sont présents ! La majorité d'entre eux ciblent les bactéries. Parmi ces bactériophages, certains sont particulièrement virulents. C'est ce qu'ont mis en évidence des biologistes français de l'Inrae, en collaboration avec des laboratoires du Canada et du Danemark (1). Ces équipes étudient le rôle des phages dans la stabilité du microbiote intestinal, qui est encore largement méconnu. Elles se sont particulièrement intéressées aux capacités infectieuses des phages. En effet, deux classes de bactériophage existent : les phages tempérés et les phages virulents. Les premiers, tels des agents dormants, intègrent

leur génome au chromosome bactérien, ce qui peut conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, comme l'acquisition de facteurs de virulence. A contrario, les phages virulents sont des « tueurs-nés ». Ils détournent la machinerie bactérienne pour se reproduire et se multiplier. La bactérie éclate et libère de nouveaux phages virulents. Cette catégorie de phages est utilisée pour lutter contre des infections bactériennes. Les médecins parlent de phagothérapie.

Les phages séquencés

Pour savoir quelle classe de phages prédomine dans nos intestins, l'équipe de Marie-Agnès Petit, de l'Institut Micalis (Inrae), a entrepris une vaste étude sur 650 prélèvements fécaux d'enfants

âgés d'1 an. « La difficulté a été l'examen manuel et visuel de toutes les cultures pour déterminer si tel phage avait infecté ou non telle bactérie », précise Marie-Agnès Petit. Les biologistes ont extrait, cultivé et séquencé plus d'une centaine de bactériophages dirigés contre *Escherichia coli*. Celle-ci est l'une des premières bactéries à coloniser l'intestin et représente plus de 1 % de toutes les espèces du microbiote intestinal durant l'enfance. Les chercheurs ont montré une prédominance de phages tempérés dirigés contre *E. coli*. Les phages virulents, même s'ils sont moins nombreux, possèdent un pouvoir infectieux plus important que ceux déjà décrits dans la littérature scientifique. De plus,



▲ Examen par microscopie électronique des bactériophages extraits d'un échantillon fécal.

ces phages peuvent infecter beaucoup d'autres espèces de bactéries.

Cette étude pionnière ouvre des horizons en phagothérapie : ces phages pourraient être une alternative à l'utilisation d'antibiotiques. D'abord, il est nécessaire de comprendre pourquoi ces bactériophages sont si infectieux, ainsi que leur rôle dans la dynamique du microbiote intestinal.

Élise Gasiorowski

(1) A. Mathieu et al., *Nat. Commun.*, 11, 378, 2020.

La recherche N°447 Mars 2020

b- Ajouter à votre liste des composants du microbiote des éléments étranges en précisant leur rôle.

c- Réaliser l'observation d'un microbiote :

- Une observation microscopique d'une petite partie du microbiote : cellules buccales. (Ne pas se laver les dents le matin !!!)

Protocole :

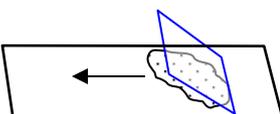
1. Racler doucement la face interne de la joue à l'aide d'un coton tige stérile
2. Tenir le coton vers le bas au dessus d'un verre de montre et laisser couler 4-5 gouttes d'eau (puis jeter le coton tige : usage unique !)
3. ajouter un goutte de bleu de méthylène (colore les noyaux et les bactéries) dans le verre de montre. (attente 4 mn)
4. Mettre une goutte du mélange avec un pipette entre lame et lamelle.

- Une observation microscopique d'un frottis du contenu du tube digestif d'un vertébrés.

Protocole :

1. Faire un frottis très mince (environ 10 µl de contenu intestinal), étalé sur une lame grâce à une lamelle positionnée en biais.
2. sécher le frottis en chauffant modérément (sèche cheveux par en dessous) jusqu'à ce que la surface prenne un aspect mat (un chauffage excessif risque d'altérer les bactéries)
3. mettre une goutte de bleu de méthylène puis rincer délicatement à l'eau du robinet ou retourner la lame pour éliminer l'excès de colorant
4. sécher

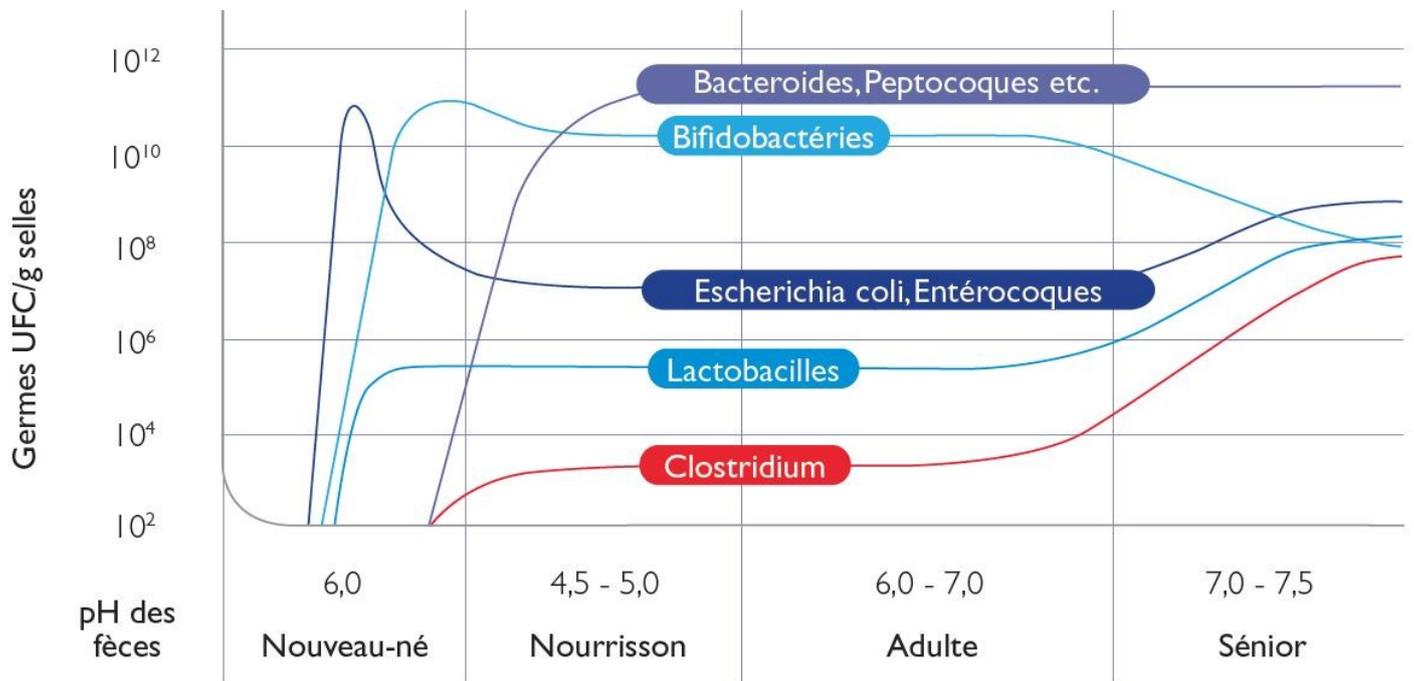
méthode pro... pour info : 2. Fixer dans le méthanol pendant 5 minutes // 3. Colorer au trichrome modifié pendant 90 minutes (diminué à 10 minutes en chauffant le colorant à 50 °C) // 4. Rincer avec l'alcool acidifié pendant 10 secondes // 5. Rincer brièvement dans l'alcool 95 % // 6. Placer dans l'alcool 95 % pendant 5 minutes. // 7. Placer dans l'alcool 100 % pendant 10 minutes // 8. Placer dans le CitriSolv pendant 10 minutes. // 9. Monter les frottis au Permount et examiner à l'objectif 100X. Résultats : Microsporidies : spores ovoïdes, rosées à rouges (1-2 µm) avec zones claires à l'intérieur Débris et bactéries : vert pâle, parfois rose



2- Étudier « la » diversité des microbiotes : (tiroir/EM??)

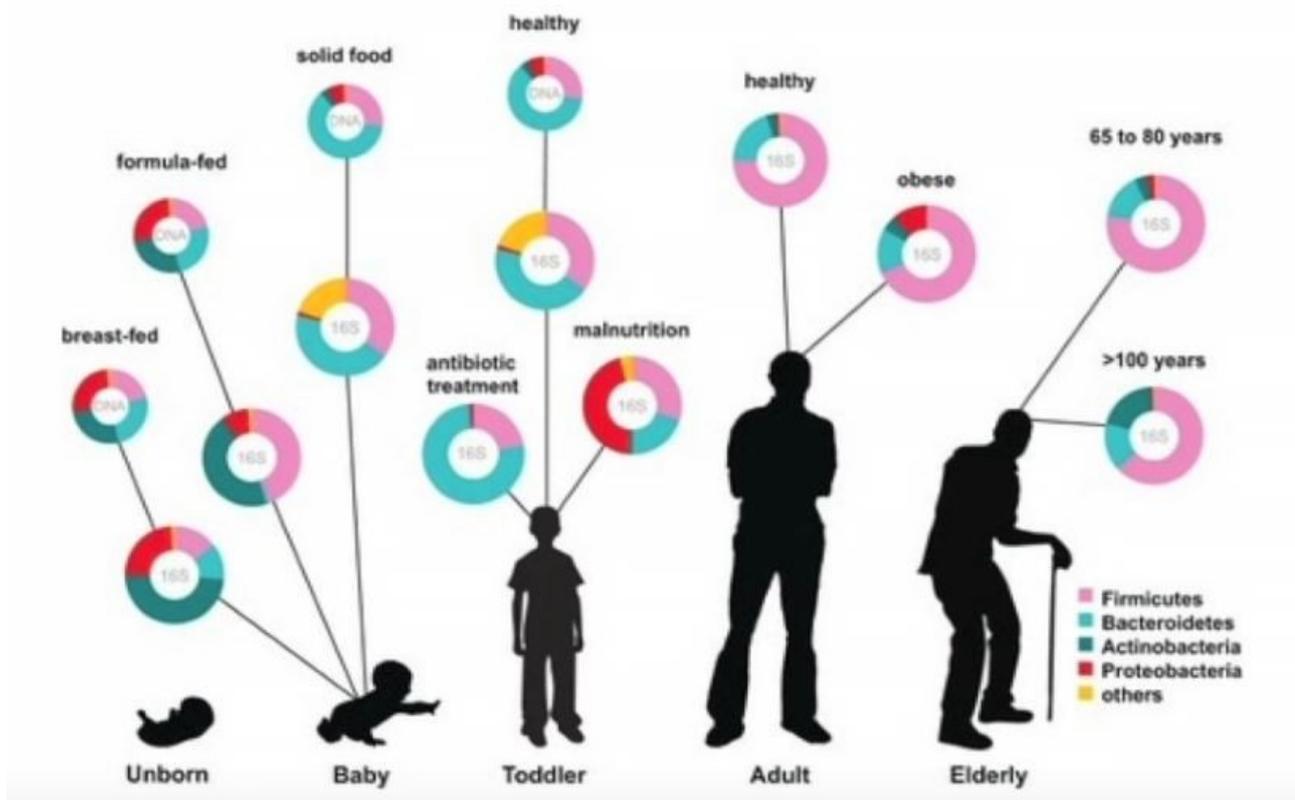
Déduire de cet ensemble documentaire les variabilités existant entre les microbiotes.

Doc5 : Age et microbiote :

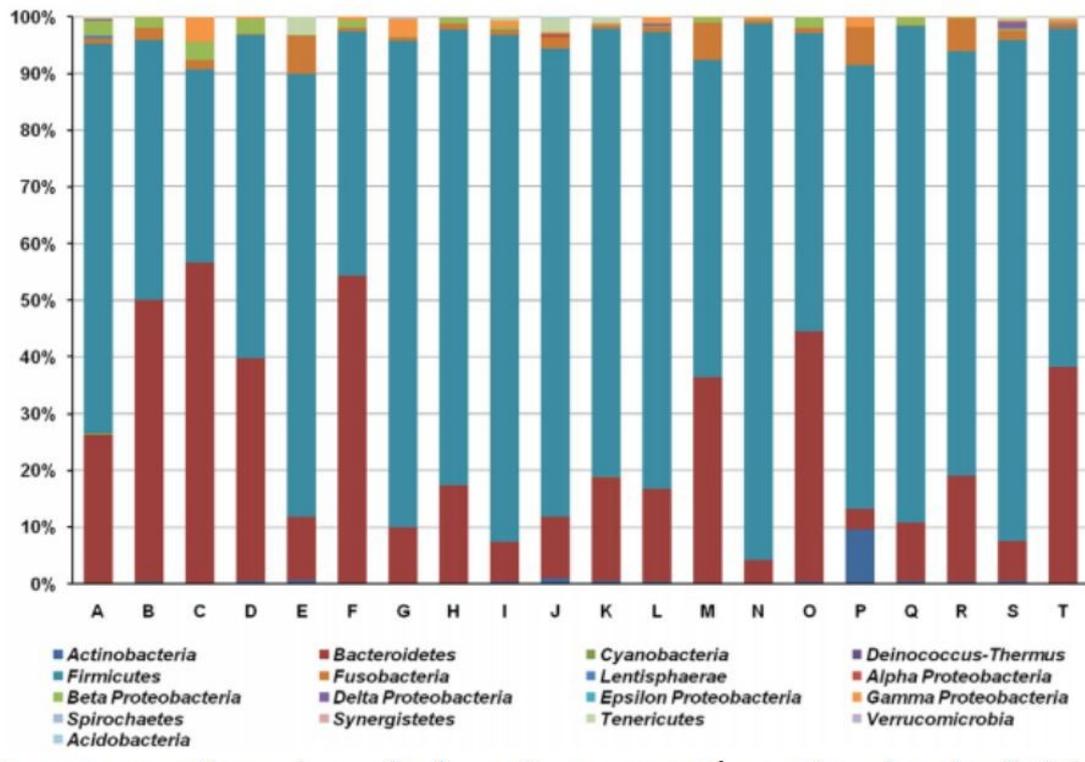


UFC = Unité formant colonie

Doc5 bis : Résultats 16S reposent sur des études de molécules particulières, ADN sur l'étude des ADN bactériens.



Doc6 : Au sein d'une cohorte de coréens du sud. Vivants dans la même ville. Nam et al. PLoS One. 2011
a : proportion des phyla de bactéries chez 20 coréens



b : proportion des familles de bactéries (un certain nombre de familles ne sont pas quantifiées, cela correspond au gap entre le haut de chaque histogramme et le 100%)

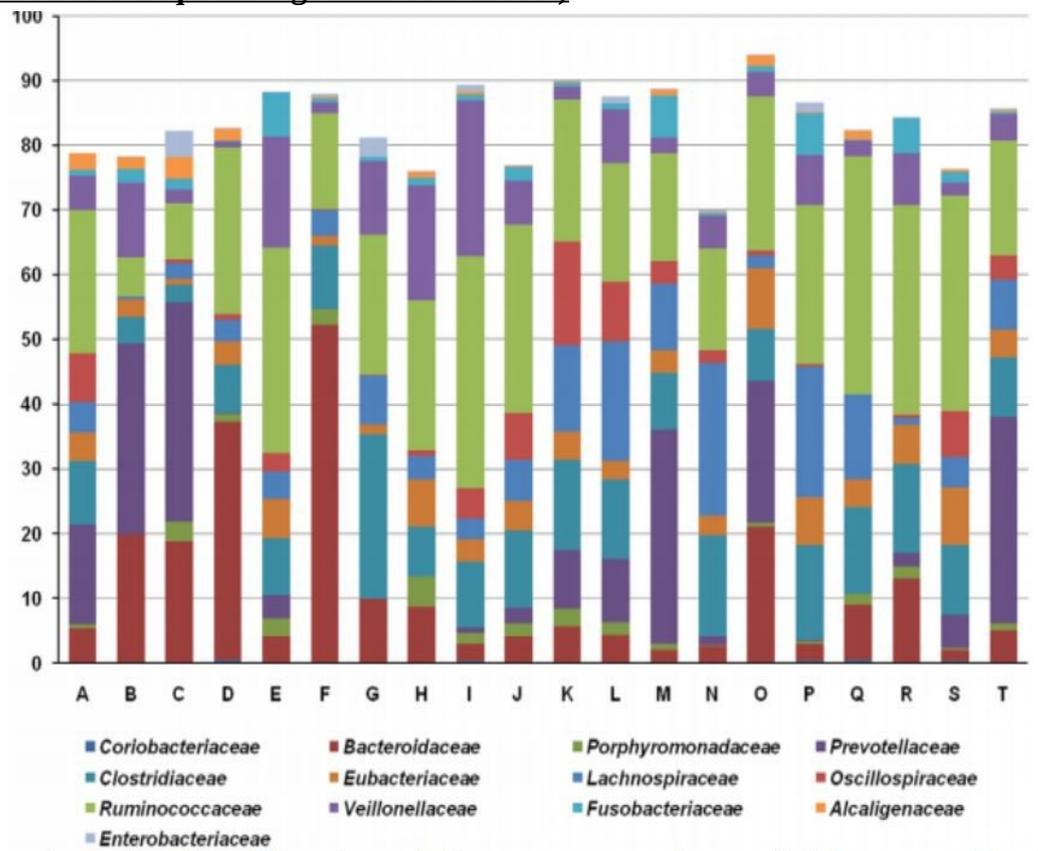
Correspondance
Phylum :
Famille

- Actinobacteria :**
Coriobacteriaceae
- Fimicutes :**
Clostridiaceae
Ruminococcaceae
Eubacteriaceae
Veillonellaceae
Lachnospiraceae
osillospiraceae

- Bacteroidetes :**
Bacteroidaceae
Porphyromonadaceae
Prevotellaceae

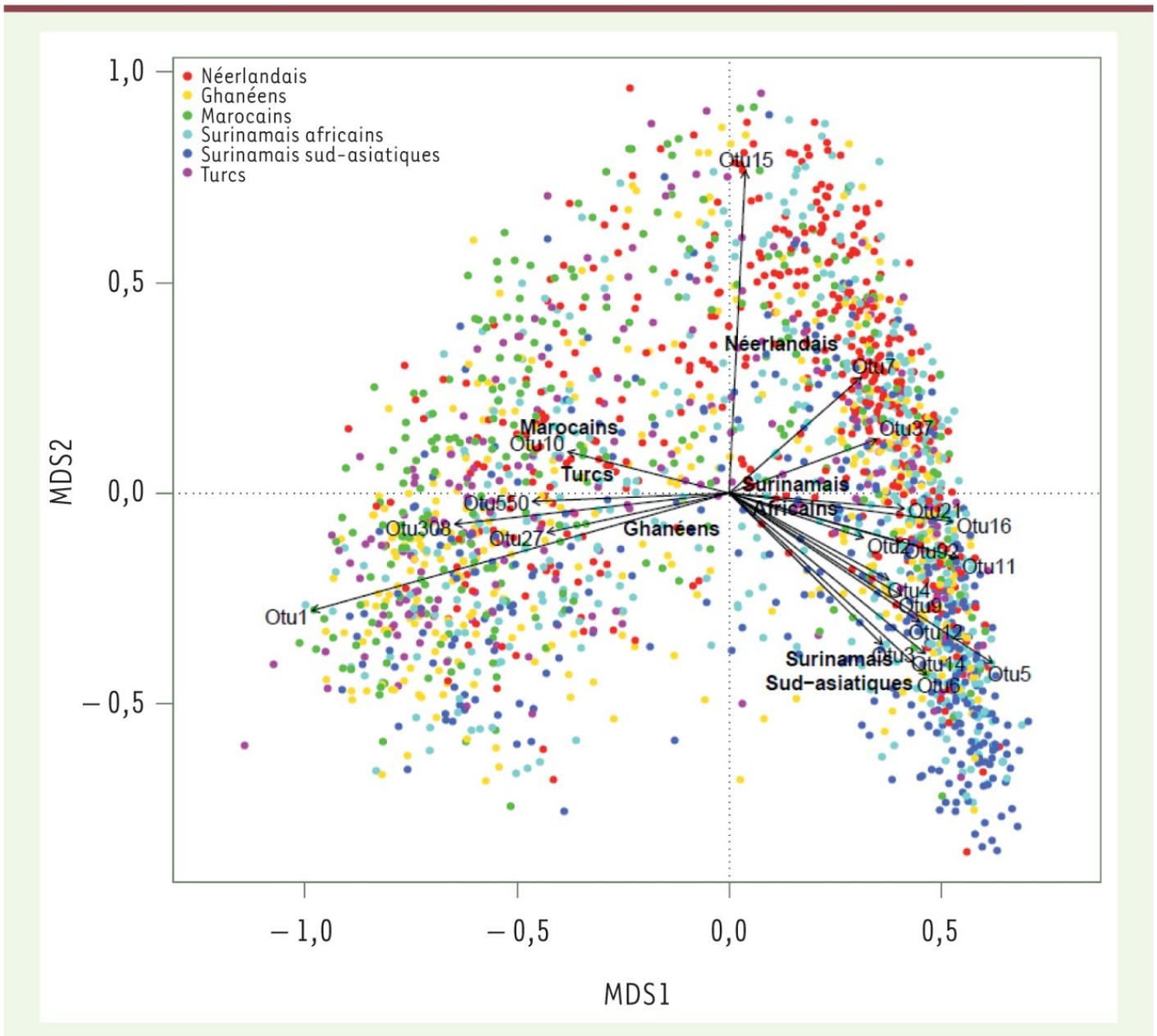
- Proteobacteria :**
Alcaligenaceae
Enterobacteriaceae

- Fusobacteria**
Fusobacteriaceae



Consigne parallèle : Tracer deux histogrammes « camembert » à partir du document a pour comparer les microbiotes de M et N.

Doc 7 : Jeu « bon courage pour le comprendre !!! »



Dissimilarités de composition du microbiote intestinal au sein de 2084 individus issus de la cohorte multi-ethnique HELIUS (ils vivent tous à Amsterdam et appartiennent à l'un des six groupes ethniques les plus représentés dans la ville: des Néerlandais (n = 439) et des immigrants de 1re ou 2e génération originaires du Suriname (ascendance africaine, n = 443 ou sud-asiatique, n = 358), de Turquie (n = 197), du Maroc (n = 280) et du Ghana (n = 367).)

Représentation par analyse en coordonnées principales (*multidimensional scaling* [MDS]) utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis calculé sur les abondances relatives d'OTU (*operational taxonomic unit*). Une OTU est une espèce moléculaire caractéristique d'un élément du microbiote (si on a cette molécule dans l'intestin, on héberge une bactérie en particulier car elle est la seule à pouvoir produire cette molécule...).

Chaque point sur la figure correspond à la composition globale du microbiote intestinal pour une personne. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est compris entre 0 (les deux échantillons ont la même composition) à 1 (les échantillons sont totalement dissemblables). On fait ça par individu, pour chaque OTU présent dans son intestin. On utilise ici 20 OTU pour différencier les individus.

Bref :

Voici l'équation permettant le calcul de la distance de Bray-Curtis : ici, deux échantillons j et k sont comparés

$$BC_{jk} = 1 - \frac{2 \sum_{i=1}^p \min(N_{ij}, N_{ik})}{\sum_{i=1}^p (N_{ij} + N_{ik})}$$

Où N_{ij} est l'abondance d'une espèce i dans l'échantillon j et N_{ik} l'abondance de la même espèce i dans l'échantillon k . Le terme $\min(.,.)$ correspond au minimum obtenu pour deux comptes sur les mêmes échantillons. Les sommes situés au numérateurs et dénominateur sont réalisées sur l'ensemble des espèces présentes dans les échantillons. On fait ça pour chaque espèce bactérienne parmi les 20 OTU choisies...

Chaque vecteur OTU a deux composantes : MSD1 et MSD2.

L'**ethnicité** explique 5,7 % des dissimilarités de composition du microbiote intestinal. Le **centroïde** correspondant à chaque groupe ethnique est représenté par le nom de ce groupe sur la figure. Les 20 OTU(espèces bactériennes) contribuant le plus aux dissimilarités de composition entre individus sont représentés sur la figure[« il y en a beaucoup plus... »]. De bas en haut et de gauche à droite : Otu1 *Prevotella copri*, Otu27 *Prevotella*, Otu308 *Prevotella copri*, Otu550 *Prevotella copri*, Otu10 *Dialister*, Otu15 *Oscillospira*, Otu7 *Ruminococcus bromii*, Otu37 *Coprococcus*, Otu21 *Coprococcus*, Otu16 *Bacteroides uniformis*, Otu92 *Clostridium* [Clostridiaceæ], Otu11 Lachnospiraceæ, Otu2 *Fæcalibacterium prausnitzii*, Otu4 *Bifidobacterium*, Otu9 *Blautia*, Otu5 *Bacteroides*, Otu12 *Bacteroides*, Otu14 *Coprococcus*, Otu6 *Blautia*, Otu3 *Roseburia Fæcis*.

Le premier axe d'analyse en coordonnées principales (MDS1) porte 18,4 % de variabilité et le second axe (MDS2) en porte 6,3 %.

L'**ethnicité** comprend de nombreux aspects – génétique, habitudes culturelles, migration (par exemple, statut socio-économique, recours aux soins de santé et aux antibiotiques, milieu de vie lors de l'enfance) – qui peuvent contribuer à façonner le microbiote intestinal de manière spécifique (exposition aux nutriments et aux xénobiotiques, régulation du système immunitaire, colonisation microbienne initiale et ultérieure)

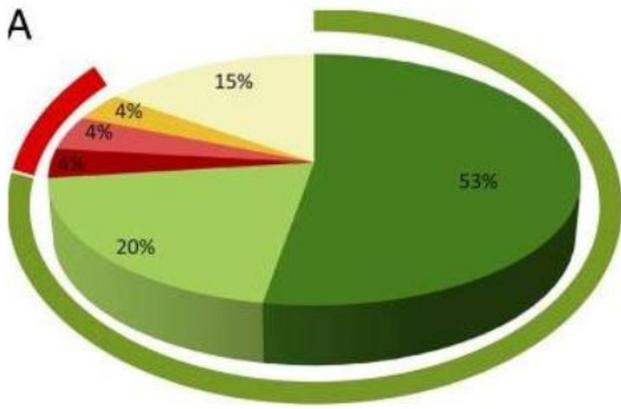
Vocabulaire :

le **centroïde** correspond à l'intersection des diagonales du polygone entourant les entités choisies.

Consigne parallèle : Une série de questions pour vous aidez à comprendre ce document assez complexe :

- A quel type de graphique avons nous affaire ?
- Combien de points se trouvent sur ce graphique ?
- Que représentent chacun de ces points ?
- A quoi correspond l'origine des différentes axes OTU ?
- Enfin ,dîtes ce que l'on peut interpréter de cette étude.

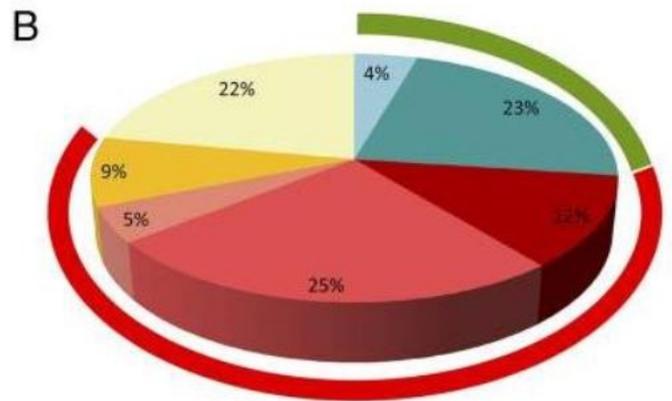
Doc 8 : Microbiote et milieu de vie. Proportions des familles bactériennes dans les microbiotes de deux humains issus et vivants dans des régions géographiques différentes.



BF

■ Prevotella	} Bacteroidetes
■ Xylanibacter	
■ Acetivomaculum	} Firmicutes
■ Faecalibacterium	
■ Subdoligranulum	
■ Others	

Burkina Faso



EU

■ Alistipes	} Bacteroidetes
■ Bacteroides	
■ Acetivomaculum	} Firmicutes
■ Faecalibacterium	
■ Roseburia	
■ Subdoligranulum	
■ Others	

Italie