



**HAL**  
open science

# Dysbiose intestinale et reconstitution immunitaire chez le patient recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Marine Frayssinoux

► **To cite this version:**

Marine Frayssinoux. Dysbiose intestinale et reconstitution immunitaire chez le patient recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Sciences pharmaceutiques. 2021. hal-04517131

**HAL Id: hal-04517131**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04517131v1>**

Submitted on 22 Mar 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



FACULTÉ  
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE

2021

---

## FACULTE DE PHARMACIE

### THESE

Présentée et soutenue publiquement

le **Jeudi 7 Octobre 2021**, sur un sujet dédié à :

DYSBIOSE INTESTINALE ET RECONSTITUTION IMMUNITAIRE  
CHEZ LE PATIENT RECEVANT UNE ALLOGREFFE DE CELLULES  
SOUCHES HEMATOPOÏÏTIQUES

pour obtenir

**le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**

par **Marine FRAYSSINOUX**  
née le 11 mars 1995

### Membres du Jury

Président et Co-directeur,

**M. Christophe GANTZER**, Professeur, à l'Université de Lorraine

Directrice de thèse,

**Mme. Corentine ALAUZET**, Maître de Conférence à l'Université de Lorraine, Pharmacienne

Juges :

**Mme. Geneviève HERY-ARNAUD**, Professeur à l'Université de Brest, Pharmacienne

**Mme. Marie-Thérèse RUBIO**, Professeur à l'Université de Lorraine, Médecin

**M. Alain LOZNIIEWSKI**, Professeur à l'Université de Lorraine, Médecin



**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2021-2022**

**DOYEN**

Raphaël DUVAL

**Vice-Doyen**

Julien PERRIN

**Directrice des études**

Marie SOCHA

**Conseil de la Pédagogie**

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Présidente, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Igor CLAROT

Vice-Président, Raphaël DUVAL

**Commission de la Recherche**

Présidente, Caroline GAUCHER

**Chargés de Mission**

**Communication**

Aline BONTEMPS

**Innovation pédagogique**

Alexandrine LAMBERT

**Référente ADE**

Virginie PICHON

**Référente dotation sur projet (DSP)**

Marie-Paule SAUDER

**Référent vie associative**

Arnaud PALLOTTA

**Responsabilités**

**Filière Officine**

Caroline PERRIN-SARRADO

**Filière Industrie**

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Filière Hôpital**

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

**Pharma Plus ENSIC**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Pharma Plus ENSAIA**

Xavier BELLANGER

**Pharma Plus ENSGSI**

Igor CLAROT

**Cellule de Formation Continue et Individuelle**

Luc FERRARI

**Commission d'agrément des maîtres de stage**

François DUPUIS

**ERASMUS**

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

**PROFESSEURS EMERITES**

Chantal FINANCE

Pierre LEROY

Francine PAULUS

Philippe MAINCENT

Claude VIGNERON

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Jean-Claude BLOCK

Monique ALBERT

Pierre DIXNEUF

Mariette BEAUD

Chantal FINANCE

François BONNEAUX

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérald CATAU

Thérèse GIRARD

Jean-Claude CHEVIN

Pierre LABRUDE

Jocelyne COLLOMB

Vincent LOPPINET

Bernard DANGIEN

Alain NICOLAS

Dominique DECOLIN

Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Francine PAULUS  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Gabriel TROCKLE  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU  
COLETTE ZINUTTI

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS**

Section CNU \*      Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Alexandre HARLE <sup>H</sup>	82	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Anne SAPIN-MINET <sup>H</sup>	85	Pharmacie galénique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Caroline LAROYE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Xavier BELLANGER <sup>H</sup>	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT <sup>H</sup>	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND <sup>H</sup>	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA <sup>H</sup>	86	Physiologie
Sandrine CAPIZZI	87	Parasitologie

Antoine CAROF	85	Informatique
Frédérique CHANGEY	87	Microbiologie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Natacha DREUMONT <sup>H</sup>	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS <sup>H</sup>	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER <sup>H</sup>	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD <sup>H</sup>	86	Pharmacie clinique
Jérémie GOUYON	85	Chimie analytique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT <sup>H</sup>	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD <sup>H</sup>	86/01	Droit en Santé
Balbine MAILLOU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Christophe MERLIN <sup>H</sup>	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER <sup>H</sup>	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	85	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL <sup>H</sup>	85	Informatique en Santé (e-santé)
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER <sup>H</sup>	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT <sup>H</sup>	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU <sup>H</sup>	87	Biochimie et Biologie moléculaire

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

**MAITRE DE CONFÉRENCE ASSOCIE**

Pualine GILSON	82	Biologie cellulaire oncologique
----------------	----	---------------------------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

<sup>H</sup> Maître de conférences titulaire HDR

\* Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

## **SERMENT DE GALIEN**

**En** présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

**En** aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**De** ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

**De** faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

**De** coopérer avec les autres professionnels de santé

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI  
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A  
LEUR AUTEUR ».

## REMERCIEMENTS

### **Aux membres de mon jury,**

Au Président de mon jury, le Professeur Christophe Gantzer, vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Veuillez recevoir ici, l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Professeur Marie-Thérèse Rubio, merci pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime.

Au Professeur Geneviève Héry-Arnaud, en votre qualité de microbiologiste et pour vos travaux dans le domaine du microbiote, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Au Professeur Alain Lozniewski, je vous suis reconnaissante pour votre disponibilité et vos nombreux conseils de relecture. Travailler au sein de votre équipe a été un réel plaisir.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à ma directrice de thèse, le Docteur Corentine Alauzet. Un grand merci pour m'avoir proposé de travailler sur ce sujet et de m'accorder ta confiance pour mener à bien ce projet. Merci pour ta bienveillance et ton soutien. Je suis très heureuse de pouvoir continuer ma formation à tes côtés.

## **À ma famille,**

À mes parents et à Jean, merci de m'avoir toujours encouragée. Vous avez été de véritables soutiens pendant toutes ces longues années d'étude, toujours présents. Aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous trois que j'en suis là. J'espère vous rendre fiers dans mon travail et dans ma vie. Je vous aime.

À mes grands-mères et à mon grand-père, malgré la distance qui nous sépare je pense à vous et j'espère vous retrouver bientôt.

## **À Julien,**

J'ai une pensée toute particulière pour toi... Merci de m'avoir encouragée dès le début dans cette folle aventure de l'internat. Ces trois années sans toi à mes côtés m'ont paru être une éternité, plus qu'une année et je te retrouve enfin. Je t'aime.

## **A mes amis et co-internes,**

A Mélissa, Stéphanie et Tom,

Stéphanie, je suis heureuse de t'avoir rencontrée. Merci d'être toi, tout simplement. Tu es le petit rayon de soleil de chacune des personnes que tu croises. Et Tom, derrière tes apparences de grand rôleur, tu resteras une personne qui compte beaucoup pour moi. De vous deux (on ne vous croise jamais l'un sans l'autre), je garderai de formidables souvenirs et j'espère en créer d'autres encore et encore. Mélissa, tu es une des plus belles rencontres que j'ai pu faire à Nancy. Merci d'être la personne que tu es, une amie. Tu pourras toujours compter sur moi.

A cette colocation qui aura rassemblé un Lyonnais, une Corse, une Bretonne et une Toulousaine ou dans une toute autre version, un Grinch, une Mamie, une Gueuse et un Dragon. A ces moments qui marqueront mes années nancéiennes : le remake du générique « Brooklyn 99 », le mur de la honte, les *Just Dance*, à nos pizzalantah, aux sessions coiffure durant le confinement, à nos randonnées du dimanches et nos soirées sushi, à ces cours de sport qui n'auront jamais porté leurs fruits, à nos rires et nos délires. A cet appartement que j'ai fini par appeler « ma maison », preuve qu'avec vous je me suis sentie chez moi.

A Méline et Adrien toujours au rendez-vous pour un bon repas entre amis ! Mais surtout merci à Félix qui a su pimenter mes lendemains de garde en me sautant dessus pour ensuite s'affaler sur le coussin

d'à côté. Toutes mes excuses, mais malgré sa délicatesse légendaire nous n'avons pas réussi à en faire une star de tiktok...

A Guillaume S, malgré ton petit caractère de cochon, tu es une personne au grand cœur qui aura énormément compté. Et même si tu n'aimes pas cette ville, elle aura au moins eu le mérite de permettre notre rencontre !

A Anne-Julie et Guillaume D, on en aura vu des choses durant notre semestre déménagement option biochimie ! Maintenant tous les deux vous êtes bien loin des CIQ foireux et des problèmes de tubes égarés. AnneJul je te souhaite de continuer de faire de ce métier ta passion en faisant plein de petits bébés. Guillaume continue à sauver des vies, tu es fait pour ce job : toujours à l'écoute et bienveillant !

À Clémence, co-interne et amie, travailler avec toi a été un plaisir et j'espère que tu seras épanouie dans ta vie professionnelle et personnelle surtout.

À Stanislas, avec un prénom pareil, tu étais destiné à venir étudier ici et j'en suis bien contente. A ta bonne humeur constante et surtout à ton style si particulier (big-up au collier-clés et à la banane gros-bide).

À Maxime (Nini), Pauline (Popo) et Solène (Soso), pour votre bonne humeur.

Nini, tu as su faire de mes aller-retours entre Nancy et Metz un petit intermède entre le dodo et le boulot. Tu as toujours été à l'écoute avec moi surtout quand je râlais de ces longues journées à courir à droite et à gauche, je te remercie pour ça.

Popo, toi et moi on se suit depuis un petit moment déjà ! Soso, je ne dirai que deux mots : *Crazy filter*. Toujours un plaisir de vous voir et de partager des petits moments avec vous.

À ces voisins (et parasites) du premier qui sont devenus des amis : Ophélie, Julien, Alexandre, Chloé et plus particulièrement Donovan et Quentin. Vous avez su égayé mes samedis soirs !

À toutes ces personnes qui auront animé mes années étudiantes et plus particulièrement à Pauline (Popi) et à Marie qui me manquent toutes les deux. Popi tu auras été ma rencontre PACES, j'espère te retrouver bientôt. Marie, même si nous sommes loin l'une de l'autre, je sais que je pourrais toujours compter sur toi.

À ces amis de toujours, et à ceux qui se sont rajoutés au fil du temps : Romane, Camille, Alice, Simon, Marc-Antoine, Lisa, Julien, Marie, Florian, Léna, Boris, Ludo. Rendez-vous au *Four Monkeys*, dès que possible.

Vous qui faites partie de cette famille que l'on choisit : merci !

## **A ces personnes croisées pendant cet internat,**

À l'équipe de bactériologie du CHRU de Nancy avec qui tout a commencé. Merci à l'ensemble des techniciens, vous avez tous su prendre le temps de répondre à mes nombreuses questions. Petite dédicace à Sébastien qui n'a presque jamais rechigné à effectuer tous mes tests complémentaires sur ces bactéries si suspectes d'être des TRI, et à Julien qui n'est jamais bien loin... A Sabrina, Kévin, Mélissa, Jenny, Céline, Fabienne, Romain, Marina, Elodie, Ouioui, Florine, Mimi, Laurie, Hélène, Vanina et à tous ceux que j'oublie sûrement. C'est en grande partie grâce à vous que je m'engage dans le domaine de la bactériologie.

Un grand merci à Nejla, Tahar, Philippe, Anne-Sophie, Hélène et Corentine, vous avez su me transmettre un peu de votre savoir et beaucoup de votre passion pour ces bactéries qui n'en finissent pas de nous embêter. Big up à ces coccobacilles à Gram variable. J'ai pris plaisir à travailler avec chacun d'entre vous.

Aux (supers) assistants du service d'immunologie, Anita et Maxime. Anita merci de m'avoir éclairée sur le domaine de la reconstitution immunitaire. Sans ton travail, je n'aurais jamais su par où commencer. Maxime, merci d'avoir pris le temps de relire, raturer, corriger, simplifier cette première partie sur l'allogreffe ! Sans ta relecture sur le sujet, tout aurait été brouillon sur le papier comme dans ma tête. Pour votre aide à tous les deux, je vous suis redevable de beaucoup de chouquettes. Votre prix sera le mien.

A l'ensemble de l'équipe SIMPA de l'Université de Lorraine et notamment à Lisiane qui m'a accompagnée durant mes longues manip. C'est un plaisir de travailler avec toi.

Aux techniciennes de nuit qui m'auront nourrie de gâteaux, de bonbons et autres fondues savoyardes.. Et plus particulièrement à Maria, avec qui j'aurais passé quelques nuits blanches au BBB non pas parce que les bilans s'enchaînaient mais parce qu'on ne pouvait pas s'arrêter de parler... De vraies pipelettes, je vous jure...

A tous ces techniciens, cadres, secrétaires, biologistes qui ont croisé ma route. Merci de m'avoir accompagnée pendant toutes ces années. J'ai appris de nombreuses choses professionnellement et personnellement auprès de chacun de vous.

A ces co-internes biologistes et non biologistes qui auront également marqué mes années d'internat : Benoît, Cécile, Gaétan, Safa, Jonas, Alizée, Clara et Caroline. Merci pour les semestres que nous avons partagés. Toujours de très bonnes équipes et de bons moments.

Et enfin pour finir, je remercie mes deux invités mystères \_\_\_\_\_ et \_\_\_\_\_ qui auront fait tant de kilomètres pour venir me voir (ou pas).

PS : C'était plus simple d'écrire 80 pages sur des bactéries que de trouver les mots justes pour chacun d'entre vous.



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
<b>I. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE ET GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES</b> .....	<b>6</b>
A. GREFFE DE CSH ET PRISE EN CHARGE DES HEMOPATHIES .....	6
1. <i>Généralités</i> .....	6
2. <i>Greffe et compatibilité immunologique : la relation hôte-greffon</i> .....	7
3. <i>Déroulement de l'allogreffe</i> .....	9
B. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST-GREFFE DE CSH .....	13
1. <i>Reconstitution du système immunitaire inné</i> .....	13
2. <i>Reconstitution du système immunitaire adaptatif</i> .....	15
C. COMPLICATIONS DE L'ALLOGREFFE .....	17
1. <i>Complications infectieuses, hémorragiques et anémiques</i> .....	17
2. <i>Complications métaboliques</i> .....	18
3. <i>Rejet du greffon</i> .....	19
4. <i>GVHD chez le patient allogreffé</i> .....	19
<b>II. LE MICROBIOTE INTESTINAL</b> .....	<b>25</b>
A. COLONISATION ET COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL .....	26
1. <i>Implantation du microbiote intestinal</i> .....	26
2. <i>Composition du microbiote intestinal</i> .....	34
B. FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL : .....	39
1. <i>Fonctions métaboliques</i> .....	39
2. <i>Fonctions protectrices</i> .....	42
C. DYSBIOSE INTESTINALE .....	53
1. <i>Principales causes de dysbiose intestinale</i> .....	53
2. <i>Conséquences de la dysbiose intestinale</i> .....	56
<b>III. MICROBIOTE INTESTINAL, DYSBIOSE ET ALLOGREFFE DE CSH</b> .....	<b>61</b>
A. CONSÉQUENCES DE L'ALLOGREFFE DE CSH SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL .....	61
1. <i>Perte de la diversité bactérienne</i> .....	61
2. <i>Développement d'une domination bactérienne au sein du microbiote intestinal</i> .....	63
3. <i>Altérations des fonctions du microbiote intestinal</i> .....	65
B. CONSÉQUENCES DE LA DYSBIOSE INTESTINALE CHEZ LE PATIENT ALLOGREFFÉ .....	67
1. <i>Mortalité accrue</i> .....	67
2. <i>Risque d'infections</i> .....	71
3. <i>Reconstitution immunitaire, GVHD et microbiote intestinal</i> .....	72

<b>IV. ETUDE PARI-DYS</b> .....	<b>77</b>
A. PRESENTATION DE L'ETUDE.....	77
1. <i>Description générale de l'étude</i> .....	77
2. <i>Déroulement de l'étude</i> .....	78
B. POINT SUR LE DEROULEMENT DE L'ETUDE.....	80
1. <i>Objectif initial d'inclusion</i> .....	80
2. <i>Inclusion des patients au cours du temps</i> .....	80
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>83</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>85</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>87</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>94</b>
ANNEXE 1 QUESTIONNAIRE D'AUTO-EVALUATION DE STRESS PERÇU DE COHEN .....	94
ANNEXE 2 QUESTIONNAIRE D'ANXIETE GENERALE DE SPIELBERGER .....	95
ANNEXE 3 PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN DANS LES FECES .....	96

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** = acide désoxyribonucléique

**ADNr 16S** = ADN ribosomique 16S

**AGCC** = acides gras à courte chaîne

**AMP** = *anti-microbial peptides* pour peptides anti-microbiens

**AR** = abondance relative

**BDNF** = *Brain Derived Neurotrophic Factor*

**CB** = charge bactérienne

**CD** = cellules dendritiques

**CHRU** = Centre Hospitalier Régional Universitaire

**CMH** = complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA** = cellules présentatrices des antigènes

**CRB** = Centre de Ressources Biologiques Lorrain

**CRP** = *C-reactive protein* pour protéine C-réactive

**CSH** = cellules souches hématopoïétiques

**DT2** = diabète de type 2

**EAF** = épithélium associé aux follicules

**EHEC** = *Escherichia coli* entérohémorragique

**ERG** = entérocoques résistants aux glycopeptides

**ET B** = entérotype B

**ET P** = entérotype P

**ET F** = entérotype F

**G-CSF** = *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* pour facteur de croissance hématopoïétique granulocytaire

**GALT** = *Gut-Associated Lymphoid Tissue* pour tissu lymphoïde associé à l'intestin

**GVHD** = « *Graft Versus Host disease* » pour maladie du greffon contre l'hôte

**GVH** = « *Graft Versus Host* » pour greffon contre l'hôte

**GVHa** = GVH aiguë

**GVHc** = GVH chronique

**GVL** = « *Graft Versus Leukemia* » pour la réaction du greffon contre la leucémie

**HLA** = *human leukocyte antigen* pour antigènes des leucocytes humains

**ICT** = irradiation corporelle totale

**IFN- $\gamma$**  = interféron  $\gamma$

**IgA** = immunoglobulines de type A

**IgAs** = IgA sécrétoires

**IgG** = immunoglobulines de type G  
**IgM** = immunoglobulines de type M  
**IL-1** = interleukine 1  
**IL-1 $\beta$**  = interleukine 1 $\beta$   
**IL-2** = interleukine 2  
**IL-4** = interleukine 4  
**IL-6** = interleukine 6  
**IL-10** = interleukine 10  
**IMC** = indice de masse corporelle  
**IMoPA** = Ingéniérie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire  
**iNKT** = LT Natural Killer invariants  
**LAL** = leucémie aiguë lymphoïde  
**LAM** = leucémie aiguë myéloïde  
**LB** = lymphocytes B  
**LNH** = lymphome non hodgkinien  
**LPS** = lipopolysaccharide  
**LT** = lymphocytes T  
**MALT** = *Mucosa Associated Lymphoid Tissue* pour tissu lymphoïde associé aux muqueuses  
**MetaHIT** = *METAgenomics of the Human Intestinal Tracts*  
**MC** = maladie de Crohn  
**MI** = microbiote intestinal  
**MICI** = maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
**NGS** = *Next-Generation Sequencing* pour séquençage de l'ADN de nouvelle génération  
**NK** = cellules *natural killer* ou lymphocytes cytotoxiques naturels  
**NLR** = *NOD-like receptor* ou récepteurs de type NOD  
**NF- $\kappa$ B** = *nuclear factor-kappa B*  
**NOD2** = *nucleotide-binding oligomerization domain 2*  
**PAMPs** = *Pathogen Associated Molecular Patterns* pour motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes  
**PCR** = *Polymerase Chain Reaction* pour réaction en chaîne par polymérase  
**PGE2** = prostaglandine E2  
**PNN** = polynucléaires neutrophiles  
**PRR** = *Pattern Recognition Receptor* pour récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires  
**PSA** = polysaccharide A  
**qPCR** = PCR quantitative  
**RCH** = rectocolite hémorragique

**SAA** = sérum amyloïde A protéine

**SAL** = sérum anti-lymphocytaire

**SCI** = syndrome du côlon irritable

**SFB** = bactéries filamenteuses segmentées

**SIMPA** = Stress, IMMunité, PAtogènes

**SMD** = syndrome myélodysplasique

**SMP** = syndrome myéloprolifératif

**SNP** = *single-nucleotide polymorphism* pour polymorphismes nucléotidiques simples

**TCR** = *T cell receptor* pour récepteur des cellules T

**TGF- $\beta$**  = *transforming growth factor  $\beta$*  pour facteur de croissance transformant  $\beta$

**TLR** = *Toll-like receptors* ou récepteurs Toll-like

**TNF- $\alpha$**  = *tumor necrosis factor  $\alpha$*  pour facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

**Treg** = LT régulateurs

**VdC** = visite de conditionnement

## INTRODUCTION

Aujourd'hui considéré comme un organe à part entière, le microbiote intestinal (MI) joue un rôle décisif dans notre santé. Autrefois appelé « flore intestinale », le MI est composé de plus de 10 000 milliards de bactéries et autres micro-organismes au sein du tractus digestif. Son équilibre et sa composition sont impactés tout au long de la vie par divers facteurs (âge, infections, hormones, alimentation, prise de médicaments...). Cet équilibre est essentiel aux nombreuses fonctions exercées par les bactéries commensales et sa perturbation, appelée dysbiose, est de plus en plus associée au développement ou à l'aggravation de certaines pathologies. Au cours des dernières années, le développement du séquençage à haut débit a facilité l'analyse de la diversité des écosystèmes microbiens (notamment par le séquençage de l'ADNr 16S bactérien) et a permis d'approfondir les connaissances sur la composition des microbiotes et leur rôle clé dans la santé de leur hôte. La majorité des études suggère l'implication d'une dysbiose intestinale dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), de l'obésité et du cancer colorectal. Mais depuis quelques années, des articles rapportent le rôle crucial du MI dans diverses pathologies non digestives ou dans l'évolution des patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Le MI est en passe de devenir une nouvelle cible thérapeutique dans la prise en charge de ces différents troubles via des stratégies variées visant à restaurer son équilibre.

L'allogreffe de CSH, malgré son risque élevé de mortalité, reste dans certaines situations le seul traitement curatif de certaines hémopathies. Cette stratégie d'immunothérapie cellulaire vise à détruire la moelle osseuse du patient et à réinjecter des CSH d'un donneur sain dans le but de reconstituer une moelle saine et de détruire les cellules tumorales résiduelles grâce aux lymphocytes T (LT) du donneur, c'est l'effet GVL (*Graft versus Leukemia*). Les principales complications de l'allogreffe de CSH sont les infections liées à l'immunodépression et la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD, *Graft versus Host Disease*). Le MI semble jouer un rôle dans l'apparition de ces effets indésirables. L'amélioration des connaissances dans la physiopathologie de ces complications est essentielle pour une prise en charge optimale de ces patients à haut risque.

L'objectif de cette thèse est de mettre en relation entre le MI et la reconstitution immunitaire chez les patients allogreffés à partir des nombreuses données de la littérature.

Dans une première partie, les grands principes de l'allogreffe de CSH, de la reconstitution immunitaire et des principales complications après transplantation seront présentés. Dans un deuxième temps, nous définirons ce qu'est un MI sain, son installation et sa composition, puis nous discuterons de ses principales fonctions au sein du tractus digestif. Enfin, nous analyserons les différentes interactions entre le MI et le système immunitaire au cours du processus d'allogreffe, notamment dans le cadre de l'étude PARI-DYS qui se déroule actuellement au CHRU de Nancy.

# I. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE ET GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

## A. GREFFE DE CSH ET PRISE EN CHARGE DES HEMOPATHIES

### 1. Généralités

Les CSH sont des cellules multipotentes présentes en faible quantité dans la moelle osseuse. Ces cellules sont capables de se différencier et de donner naissance à l'ensemble des éléments figurés du sang (érythrocytes, leucocytes, thrombocytes). En plus de leur capacité à générer l'ensemble des cellules sanguines, elles sont également capables d'autorenouvellement. Elles présentent un intérêt thérapeutique chez les patients dont la moelle osseuse est détruite, endommagée ou dysfonctionnelle.

La greffe de CSH est une arme thérapeutique incontournable en hématologie [1, 2]. Aujourd'hui encore, elle constitue souvent le seul traitement curatif pour de nombreuses hémopathies malignes de mauvais pronostic et pour certaines maladies non malignes de la moelle osseuse ou du système immunitaire. Elle permet le remplacement du tissu hématopoïétique déficient par un tissu sain grâce à une injection de CSH. Un traitement de conditionnement (chimiothérapie associée ou non à de la radiothérapie) vise à éradiquer la masse tumorale dont la toxicité hématologique est létale sans le support de la greffe. Dans les jours suivant l'injection, les CSH coloniseront la moelle osseuse du patient receveur et reconstitueront les trois lignées sanguines en deux à quatre semaines.

Les principales indications d'une greffe de CSH sont de nature oncologique : leucémies aiguës myéloïdes (LAM), leucémies aiguës lymphoïdes (LAL), syndromes myélodysplasiques (SMD) ou myéloprolifératifs (SMP), lymphomes non hodgkiniens (LNH)... Ce type de greffe peut également être indiqué dans le cadre de pathologies non oncologiques telles que les aplasies médullaires, les déficits immunitaires congénitaux et les hémoglobinopathies [1]...

Il existe deux types de greffes : autogreffe et allogreffe. Dans la greffe autologue ou autogreffe, le patient est son propre donneur de CSH. Les greffes allogéniques ou allogreffes

désignent des greffes pour lesquelles le donneur et le receveur sont deux personnes différentes.

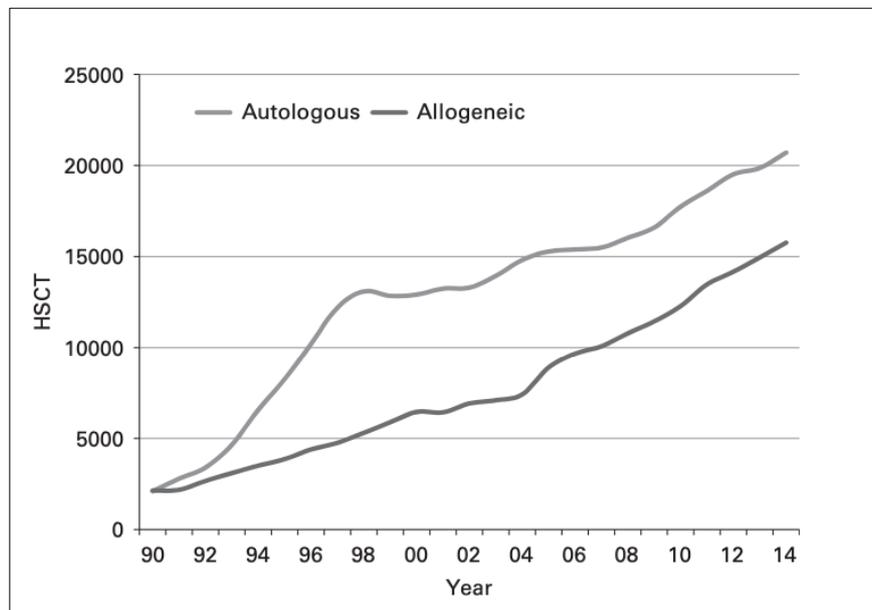


Figure 1 - Évolution du nombre de greffes de CSH en Europe [3] entre 1990 et 2015. Le trait gris clair correspond aux greffes autologues de CSH, et le trait gris foncé aux allogreffes de CSH.

Le nombre annuel d'allogreffe de CSH est en constante augmentation en Europe (Figure 1) [3]. D'après l'Agence de Biomédecine, en France, en 2019, près de 5000 patients ont reçu une greffe de CSH : environ 60% de greffes autologues contre 40% de greffes allogéniques [4]. En lien avec l'évolution des techniques de greffes et notamment l'utilisation de conditionnement d'intensité réduite et la diversification des sources de greffons de CSH : l'activité d'allogreffe de CSH en France a augmenté entre 2010 et 2019.

## 2. Greffe et compatibilité immunologique : la relation hôte-greffon

La réalisation des greffes (organiques ou cellulaires) repose sur le concept d'histocompatibilité qui traduit une compatibilité d'ordre immunologique entre le donneur et le receveur. Cette compatibilité se traduit par le biais des molécules du système du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) ou HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Le système du CMH, découpé en deux classes, est un ensemble de glycoprotéines présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules nucléées (CMH de classe I) et également à la surface des

cellules présentatrices d'antigènes (CPA, CMH de classe II). Ces molécules du CMH participent à l'activation du système immunitaire et possèdent un rôle unique dans la reconnaissance du « soi » et du « non soi » ainsi que dans l'initiation de la réponse immune par présentation de peptides aux LT.

La compatibilité HLA joue un rôle majeur dans la relation hôte-greffon. Trois types de greffes allogéniques peuvent être différenciées : les greffes géno-identiques, les greffes phéno-identiques et les greffes haplo-identiques [5]. En première intention, le donneur sera recherché au sein de la famille pour une greffe géno-identique (Figure 2). Le meilleur donneur est le frère ou la sœur identique au receveur pour HLA. Dans le cas particulier des jumeaux homozygotes, on parle de greffe syngénique qui s'apparente alors à une autogreffe. Pour les 75% de patients n'ayant pas de fratrie HLA-identique, un donneur non apparenté ou donneur volontaire de moelle sera recherché dans les fichiers nationaux et internationaux. Une compatibilité pour les dix allèles des cinq gènes HLA de classe I (HLA-A, -B et -C) et de classe II (-DRB1 et -DQB1) est recherchée. On parle de greffe phéno-identique 10/10. Seulement 30 à 60% des patients ont un donneur volontaire de moelle phéno-identique 10/10. En l'absence de donneur non apparenté phéno-identique 10/10, la greffe peut être réalisée avec un donneur non apparenté 9/10, un donneur familial haplo-identique ou avec du sang placentaire. Les greffes haplo-identiques sont des greffes pour lesquelles il n'existe pas de donneur géno-identique ou de donneur phéno-identique. Elles sont réalisées avec un donneur familial qui n'a qu'un haplotype HLA en commun avec le patient receveur.

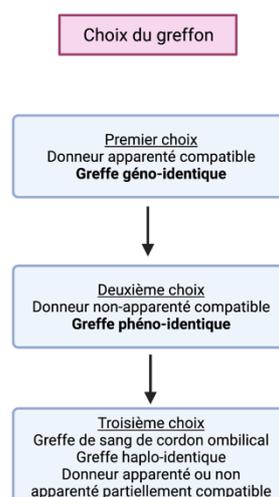


Figure 2 - **Ordre de choix de greffon.**

### 3. Déroulement de l'allogreffe

L'allogreffe de CSH se déroule en 4 étapes distinctes : (1) la collecte de CSH chez le patient donneur ; (2) la préparation du patient à recevoir le greffon par un traitement de conditionnement ; (3) la transfusion de CSH et (4) le suivi post-allogreffe (Figure 3).

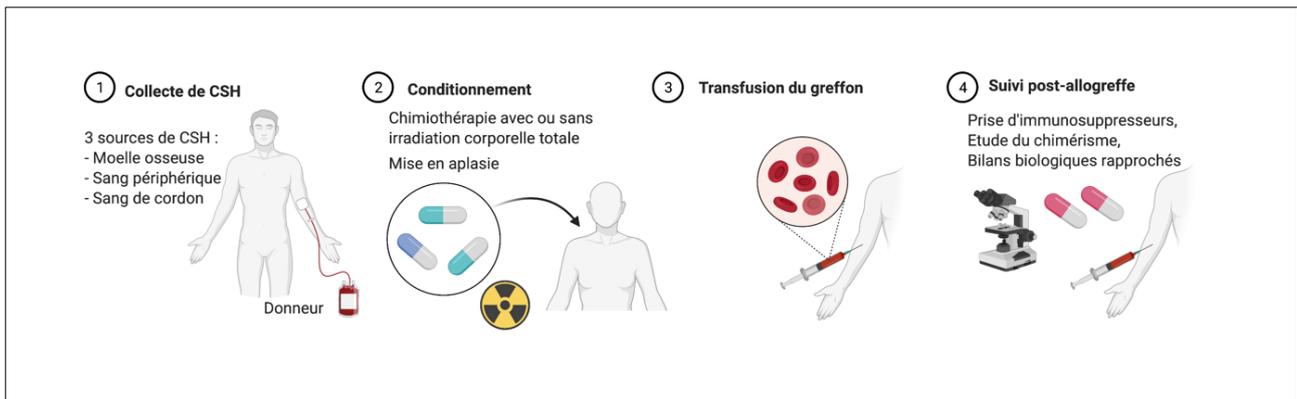


Figure 3 – Déroulement de l'allogreffe (Biorender.com).

#### Collecte des CSH

Un greffon permettant une allogreffe de CSH peut provenir de trois sources : la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon ombilical [6].

La moelle osseuse est la source historique des CSH à visée de greffe. Son prélèvement se fait généralement sous anesthésie générale, en conditions opératoires, par insertion d'un trocart au niveau des crêtes iliaques postérieures.

Au niveau périphérique, les populations de CSH sont largement minoritaires. Cette proportion extrêmement faible rend impossible leur collecte par simple prélèvement sanguin. Une étape de mobilisation par facteurs de croissance (par exemple : G-CSF) est nécessaire au préalable : les CSH sont mobilisées de la moelle osseuse vers le sang périphérique. La concentration de CSH au niveau périphérique augmente et leur collecte peut s'effectuer par cytophérèse.

Le sang placentaire prélevé au niveau du cordon ombilical dans les suites de l'accouchement constitue la dernière source de CSH. Le nombre de cellules nucléées est plus faible dans le sang placentaire que dans un greffon médullaire. De ce fait, son utilisation reste

limitée par le poids du receveur et c'est pour cette raison que les greffes de sang placentaire sont essentiellement réalisées chez l'enfant. L'immaturation immunologique des cellules issues du sang de cordon permet une diminution du risque de survenue de GVHD et de son intensité. En contrepartie, la reconstitution immune sera beaucoup plus longue.

### *Le conditionnement*

Le traitement de conditionnement correspond aux traitements préparant le patient à recevoir une greffe. Il s'agit de traitements de chimiothérapie et/ou de radiothérapie à forte intensité destinés à éliminer les cellules tumorales et à induire une immunosuppression.

En pratique, le conditionnement induit une phase d'aplasie médullaire dite « thérapeutique », accompagnée d'une anémie (diminution du taux d'hémoglobine) ainsi que d'une thrombopénie avec un risque hémorragique et d'une leucopénie avec un risque infectieux [2]. C'est pourquoi un patient qui bénéficie de ce type de traitement est hospitalisé en chambre stérile à flux laminaire. En plus de l'aplasie, le conditionnement peut causer une toxicité muqueuse (mucite, inflammation des muqueuses, diarrhées) et parfois une toxicité d'organe sensible comme le foie.

Il existe deux types de protocoles de conditionnement : myéloablatif et non myéloablatif.

Le conditionnement de greffe myéloablatif obéit à deux objectifs : la mise en place d'une immunosuppression de l'hôte permettant la prise du greffon et évitant un éventuel rejet de greffe, et l'élimination des cellules tumorales. Ce traitement est donc immunosuppresseur et myélotoxique [6, 7]. Selon les indications de la greffe et le degré de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur, la soumission de ces deux impératifs (destruction de la moelle et des cellules anormales et immunosuppression) n'aura pas la même importance. Pour répondre à ces différents objectifs, le traitement de conditionnement associera un ou plusieurs agents de chimiothérapie à une irradiation corporelle totale (ICT) ou à du busulfan. L'administration de sérum anti-lymphocytaire (SAL<sup>1</sup>) peut être réalisée en

---

<sup>1</sup> Le SAL contient de nombreux anticorps ciblant différentes populations cellulaires, dont les LT CD4+. Généralement, il est utilisé en phase initiale d'une transplantation d'organe en traitement d'induction.

complément lorsque le greffon de CSH n'est pas géno-identique. Il résulte de ces traitements une toxicité importante qui nécessite une sélection en amont des patients : jeunes et sans comorbidité. Chez le patient âgé et/ou chez le patient présentant des comorbidités, l'utilisation d'un conditionnement atténué ou non myéloablatif sera mieux tolérée [6]. L'objectif de ce régime de conditionnement est de s'affranchir de la myélotoxicité d'un conditionnement myéloablatif tout en conservant l'effet anti-tumoral ou effet GVL. Il comporte le plus souvent du cyclophosphamide ou du busulfan ou une ICT à des doses plus faibles que celles utilisées dans les conditionnements myéloablatifs, associés à des produits immunosuppresseurs tels que la fludarabine ou le SAL.

### *Transfusion du greffon*

La greffe à proprement parler est réalisée 4 à 8 jours après cette phase de conditionnement et consiste généralement en une unique transfusion de cellules. Les CSH injectées sont des cellules souches immatures capables de « *homing* » : elles vont pouvoir se diriger et se loger dans la moelle osseuse du patient receveur. Ces cellules progénitrices produisent au bout de 10 à 20 jours les nouvelles cellules sanguines et sont également capables d'autorenouvellement. Elles permettent ainsi la reconstitution d'un tissu hématopoïétique sain avec la restauration des lignées sanguines (érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire) et la reconstitution d'un système immunitaire.

L'effet GVL est le principal effet attendu au cours d'une allogreffe [1]. Il permet l'élimination des cellules malignes médiée par les LT et les lymphocytes cytotoxiques naturels (*Natural Killer* ou NK) allo-réactifs du greffon.

### *Suite de la greffe*

Dès le conditionnement, le patient est hospitalisé en chambre stérile pour une durée minimale de 6 semaines. Un traitement immunosuppresseur est systématiquement instauré après la greffe afin de prévenir le rejet de greffe et surtout de prévenir voire de traiter la GVHD ou maladie du greffon contre l'hôte, principale complication de la greffe de moelle osseuse allogénique [8]. Les cellules souches du donneur forment un nouveau système immunitaire qui identifiera et détruira les cellules cancéreuses (effet GVL). Il peut également attaquer les cellules saines du receveur qu'il reconnaît comme étant du « non soi » et endommager les

tissus et organes (effet GVH). L'association ciclosporine-méthotrexate est la plus fréquemment prescrite comme traitement immunosuppresseur. D'autres molécules pourront être utilisées : l'acide mycophénolique, le tacrolimus, le cyclophosphamide ainsi que le SAL qui possède une fonction immunosuppressive.

Au cours des deux premiers mois suivant l'allogreffe de CSH, les patients sont suivis deux fois par semaine à l'hôpital ou chez le médecin référent du patient. Le suivi s'espace progressivement selon l'évolution de l'état de santé du patient.

A J60, J90 et J112 après la greffe, s'effectue l'étude du chimérisme dont les résultats attendus dépendront du type de conditionnement reçu. La proportion de cellules du donneur par rapport à celles du receveur à la sortie d'aplasie est évaluée en fonction des cellules CD3<sup>+</sup> du donneur. L'étude du chimérisme indiquera s'il y a eu prise de greffe ou non. Le chimérisme est dit complet lorsque le taux de cellules CD3<sup>+</sup> du donneur est supérieur à 95% ; entre 5 et 94% ce sera un chimérisme mixte et enfin lorsque le taux de cellules CD3<sup>+</sup> du donneur est inférieur à 5% on parlera de non prise de greffe primaire ou de rejet de greffe [9].

## B. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST-GREFFE DE CSH

La reconstitution immunitaire après une allogreffe de CSH est un processus qui se déroule sur plusieurs années. Les premières cellules immunitaires à réapparaître en post-greffe sont celles de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles ou PNN, monocytes et NK) suivies des cellules du système immunitaire adaptatif (Figure 4).

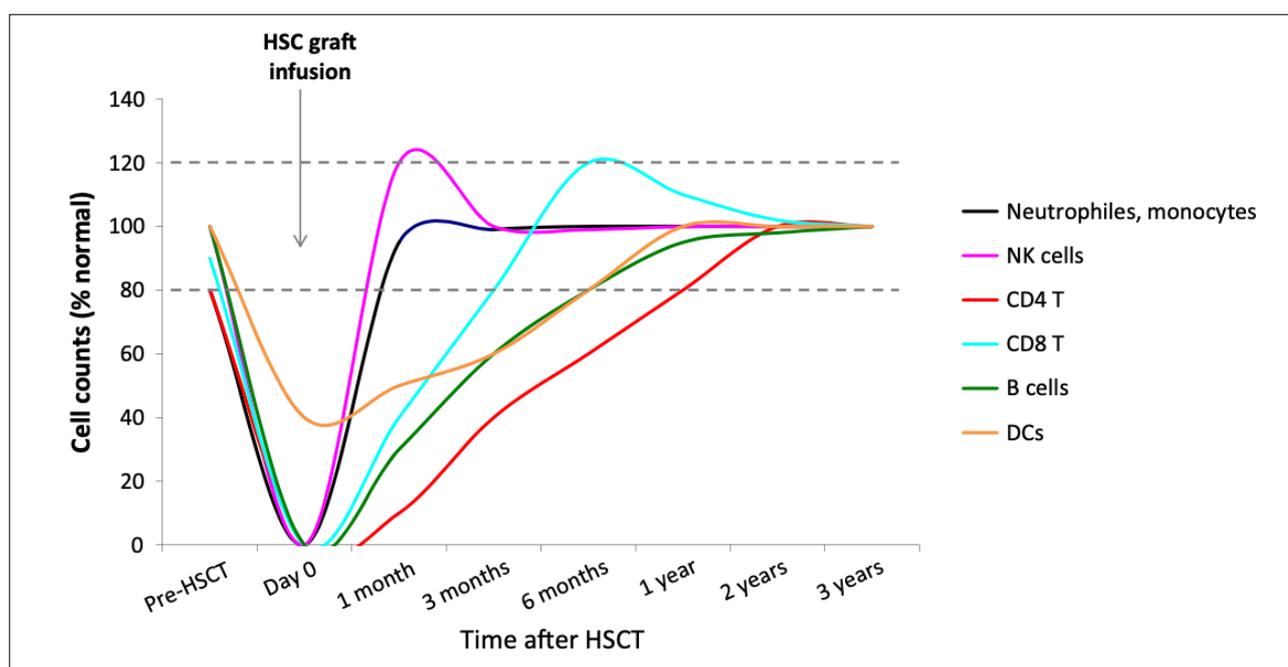


Figure 4 – Évolution dans le temps des taux de cellules immunitaires (exprimés en pourcentage) après une transplantation de CSH [10].

### 1. Reconstitution du système immunitaire inné

#### Barrière cutanéomuqueuse

Après la transplantation, l'immunité innée est la première à être rétablie [10, 11]. Les premières défenses contre les infections sont des barrières physiques, cutanéomuqueuses, telles que la peau et la muqueuse gastro-intestinale. Le traitement de conditionnement ou les lésions cutanéomuqueuses induites par la GVHD augmentent le risque de pénétration d'agents infectieux chez le patient. La restauration des différents épithéliums muqueux intervient progressivement au cours des 6 premiers mois après la greffe avec une cicatrisation de l'épithélium et une reprise de la production des sécrétions protectrices.

### *Les cellules de l'immunité innée*

Le taux de monocytes est le premier à se normaliser, rapidement suivi par les PNN, les plaquettes et les cellules NK. La sortie d'aplasie est définie par la persistance durant au moins 3 jours consécutifs d'un nombre de PNN supérieur à 0,5 G/L [11]. En général, elle survient entre le 10<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour. Leurs fonctions telles que la phagocytose, la production de superoxydes et la destruction bactérienne peuvent être subnormales en période post-greffe immédiate. Le nombre de monocytes se normalise un mois après la greffe [11]. Les macrophages sont relativement résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie. La fonction macrocytaire (présentation d'antigène, production de cytokines telles que l'IL-1...) peut rester subnormale durant la première année suivant la transplantation. Alors que la reconstitution des monocytes et PNN se produit dans les premières semaines après la transplantation, les cellules dendritiques (CD) récupèrent entre 6 et 12 mois après l'allogreffe de CSH [10].

### *Les cellules NK*

Le nombre de cellules NK ainsi que leur fonction cytotoxique sont rétablis au cours des premières semaines après la greffe, entre le 1<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> mois [11]. Le taux de NK est légèrement augmenté pendant un à trois mois après la transplantation. La répartition des sous-populations de cellules NK est différente de celle des individus sains. Il y a une surreprésentation des cellules CD56<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> productrices d'IFN- $\gamma$  et peu cytotoxiques alors que chez l'individu sain, ce sont les cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> cytotoxiques qui représentent la population principale. Cependant, les phénotypes des cellules NK changent rapidement en fonction des cytokines environnantes. Après la transplantation, il existe une forte concentration d'IL-15 circulante qui favorise l'expansion des NK allo-réactifs du donneur. Ces cellules allo-réactives contribuent à l'effet GVL avec un effet anti-leucémique significatif, en particulier contre les LAM. Ces cellules NK allo-réactives peuvent également avoir un effet bénéfique car elles éliminent les CPA du receveur qui sont susceptibles d'amorcer les cellules T allo-réactives et de favoriser la réaction GVH [11].

## 2. Reconstitution du système immunitaire adaptatif

La reconstitution des populations B et T s'étend sur plusieurs mois voire années après la transplantation de CSH. Au cours du premier mois, le nombre de lymphocytes augmente rapidement et la plupart des sous-ensembles lymphocytaires se normalisent. Cependant, la fréquence des infections reste extrêmement élevée. La restauration du système immunitaire adaptatif ne peut être établie simplement par le nombre de LB et LT régénérés. En effet, la mémoire lymphocytaire est effacée au cours du processus d'allogreffe ne permettant pas au système immunitaire de répondre de manière optimale face à une agression. La reconstitution précoce des LT après la greffe de CSH dépend de la persistance des cellules T transférées avec le greffon [10, 11].

### *Les lymphocytes T*

Alors que la reconstitution de la population de cellules NK se produit dans les premières semaines après l'allogreffe de CSH, les LT restent quantitativement et qualitativement déficients pendant les 6 premiers mois post-transplantation [10]. Le défaut quantitatif lymphocytaire concerne principalement les LT naïfs et LT CD4<sup>+</sup> avec une inversion prolongée du rapport CD4/CD8. En effet, les LT CD8<sup>+</sup> récupèrent dans les 3 à 6 premiers mois.

La restauration des populations des LT s'effectue selon 2 voies : une première voie thymo-indépendante et une seconde voie thymique [11]. Au cours des premières semaines, la voie non-thymique entraîne un essor rapide des LT. L'expansion des LT est généralement oligoclonale et la diversité du répertoire est faible réduisant ainsi la capacité du système immunitaire à combattre les infections. La seconde voie de restauration de la population lymphocytaire T est la voie thymique, elle est plus tardive et aboutit progressivement à la production d'un répertoire lymphocytaire T diversifié avec une proportion importante de LT naïfs. Ces cellules naïves garantissent alors aux patients une meilleure protection anti-infectieuse et une réponse immune mémoire efficace.

### *Les lymphocytes B*

Les LB sont peu nombreux voire indétectables pendant les deux premiers mois après la greffe de CSH [11]. Leur taux augmente par la suite jusqu'à devenir supranormal pendant

un à deux ans après la greffe. Cependant, la répartition des sous-populations naïve et mémoire reste déséquilibrée au cours de la première année : les LB mémoires sont rares, la plupart des LB sont naïfs et produisent des IgM plutôt que des IgG ou des IgA. La maturation des LB est impactée par l'absence de sous-populations T CD4<sup>+</sup> ce qui conduit à un défaut de coopération T-B et donc à un défaut de switch isotypique, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion d'immunoglobulines et par conséquent une majoration du risque infectieux.

Les réponses immunitaires des LT et LB seront incomplètes pendant une longue période post-greffe. La restauration du compartiment des cellules T est une condition préalable à la récupération immunitaire fonctionnelle.

## C. COMPLICATIONS DE L'ALLOGREFFE

Aujourd'hui encore, l'allogreffe de CSH est une procédure lourde à risque de complications non négligeables qui reste associée à une morbidité et une mortalité importantes et qui nécessite une médecine hautement spécialisée et coûteuse. Les effets indésirables pouvant survenir après une allogreffe de CSH sont : la rechute de la maladie primaire liée à un effet GVL insuffisant, les infections favorisées par un défaut de reconstitution immunitaire, la toxicité directe du conditionnement et des traitements immunosuppresseurs sur les organes et les conflits immunologiques entre les cellules immunocompétentes du greffon et les cellules saines du receveur.

### 1. Complications infectieuses, hémorragiques et anémiques

De manière systématique, chez le patient ayant subi une allogreffe de CSH, une immunodéficience sévère s'installe, le plus souvent pour une durée comprise entre 20 et 40 jours et peut persister jusqu'à des mois après la procédure. L'étendue de cette immunodéficience et la cinétique de reconstitution immunitaire dépendent de nombreuses variables dont les caractéristiques du donneur et du receveur, la source du greffon, la disparité HLA, la manipulation du greffon et le développement d'une réaction GVH. Cette immunodéficience est causée par la très forte myélotoxicité des protocoles de conditionnement et des traitements immunosuppresseurs.

Il en résulte une aplasie médullaire et des complications dont l'intensité et la fréquence sont directement liées à l'effet dose du régime de conditionnement [6]. Le patient est ainsi exposé à des risques infectieux, hémorragiques et anémiques [2]. Outre les thrombopénies et anémies profondes, qui pourront être corrigées par un support transfusionnel, l'infection continue d'être une cause majeure de morbidité et de mortalité après une greffe allogénique.

Dans la première année suivant la greffe, une infection survient en effet chez 70% des patients, dont 33% pour lesquels le pronostic vital est engagé [6, 7]. Ces infections sont liées à la reconstitution immunologique qui peut être retardée et qui expose aux infections opportunistes et aux réactivations virales pendant plusieurs mois.

Les infections survenant très précocement sont essentiellement des infections bactériennes [6]. Les agents infectieux bactériens les plus fréquemment en cause sont les entérobactéries, les streptocoques, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridioides difficile* et *Staphylococcus aureus*. Dans la plupart des cas, ces infections sont dues à des translocations provenant des microbiotes digestifs (oro-pharynx et intestin) du patient. Pour les prévenir, avant la greffe, il sera nécessaire d'éradiquer les foyers infectieux dépistés. Les infections liées à l'environnement sont en grande partie prévenues par l'isolement protecteur : chambre à flux laminaire, habillement stérile du personnel soignant et des visiteurs... Toute fièvre pendant l'aplasie imposera un traitement anti-infectieux probabiliste à large spectre prenant en compte les antécédents infectieux du patient et l'épidémiologie hospitalière locale.

Les autres complications infectieuses, survenant plus tardivement, comprennent les infections fongiques (candidose, aspergillose, pneumocystose, mucormycose...), virales (herpèsvirus, adénovirus, influenza virus...) ou parasitaire (toxoplasmose) [6].

## **2. Complications métaboliques**

Des complications métaboliques peuvent également survenir en raison d'une dénutrition liée à la toxicité de la chimiothérapie sur les muqueuses digestives (mucites, diarrhées). Elles doivent être prévenues par une nutrition parentérale.

Une néphropathie de type tubulopathie peut également apparaître. Elle peut être liée au traitement de conditionnement (chimiothérapie) ou bien être secondaire à un traitement antibiotique ou antifongique [12]. L'insuffisance rénale chronique affecte 15% des patients après une transplantation de CSH. Elle est causée par les traitements immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de calcineurine ou par l'ICT.

D'autres complications organiques peuvent se manifester telles qu'une toxicité cardiaque avec des troubles du rythme ou des péricardites, une toxicité pulmonaire avec des pneumopathies interstitielles ou immunoallergiques causées par le méthotrexate notamment, une toxicité cutanée, une toxicité gonadique... Les patients ont également un risque d'apparition de cancers secondaires [9].

### 3. Rejet du greffon

Concernant les complications propres au conflit immunologique donneur-receveur, peuvent survenir la GVHD, traitée dans le paragraphe suivant, ainsi que le rejet du greffon. Ce dernier survient dans 1% des allogreffes et notamment lorsque les greffons sont de faible volume ou bien si le conditionnement est non myéloablatif [2, 9]. La non prise de greffe primaire correspond à l'absence de prise initiale des CSH du donneur, traduite par une absence de sortie d'aplasie chez le receveur. La non prise de greffe secondaire correspond à la perte du greffon : le patient sort d'aplasie avec un chiffre de PNN supérieur ou égal à 0,5G/L pendant plus de 3 jours consécutifs avant un retour en aplasie.

### 4. GVHD chez le patient allogreffé

L'allogreffe de CSH est une procédure de « sauvetage » largement utilisée en hématologie. Cependant, son succès est compromis par le développement de la maladie du greffon contre l'hôte ou GVHD après la transplantation en raison de l'histo-incompatibilité entre le donneur et le receveur.

#### *Généralités*

La GVHD est une complication grave pouvant survenir dans 30% à 35% des greffes de CSH. Elle correspond à la réaction immunologique des cellules issues du donneur contre les tissus sains du receveur [1, 2, 13]. Tous les organes peuvent être atteints de façon aiguë ou chronique, avec une intensité modérée à sévère parfois pouvant même aller jusqu'au décès de l'individu. Trois organes sont principalement touchés : la peau avec des éruptions cutanées, une dermatite ; le foie avec une apparition d'hépatite ou d'ictère ; et le tractus gastro-intestinal avec des douleurs abdominales, une diarrhée. Le diagnostic de la GVHD est clinique. Des biopsies peuvent être réalisées afin de distinguer la réaction GVH des autres affections ayant une symptomatologie similaire (hépatite virale, colite, éruption cutanée d'origine médicamenteuse).

Historiquement, deux formes de GVHD étaient distinguées selon le délai d'apparition des signes cliniques : la forme aiguë (GVHa) et la forme chronique (GVHc) qui surviennent

respectivement avant ou après le 100<sup>e</sup> jour post-greffe [14]. Cependant, il a été mis en évidence des GVHa d'apparition tardive et de possibles chevauchements entre la forme aiguë et la forme chronique. La compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'allogreffe de CSH ont permis de mieux expliquer la différence entre GVHa et GVHc et en particulier les lésions tissulaires qui en résultent : lésions inflammatoires au cours d'une GVHa et lésions fibrosantes au cours d'une GVHc.

### *Facteurs de risque de survenue d'une GVHD*

L'incidence de survenue de la GVHD est directement liée à la disparité HLA [15]. Avec plus de mésappariements HLA la probabilité de développer une GVHD augmente. Malgré une histocompatibilité de 10/10, l'incidence de la GVHD varie de 26 à 32% pour les greffes géno-identiques et de 42 à 52% pour les greffes phéno-identiques 10/10. Ceci suggère que l'incidence est probablement liée à des différences génétiques situées en dehors de la région HLA.

En plus de ces facteurs génétiques, d'autres facteurs de risque (âge du donneur et du receveur, sévérité de l'affection maligne lors de la transplantation, type de donneur, source de CSH, prophylaxie anti-GVHD utilisée, modalités du conditionnement...) ont été associés au développement de cette GVHD. En ce qui concerne l'influence de la source de CSH, il est à souligner qu'une méta-analyse a démontré que la survenue de GVHD était plus fréquente après une greffe de CSH obtenues par cytophérèse (modalité de prélèvement devenue prépondérante au cours de ces dernières années) qu'au décours d'une greffe de moelle osseuse en conditions opératoires [15, 16]. Il est à noter que dans cette même étude, il a été montré qu'en cas de greffes de sang de cordon ombilical pour des patients n'ayant pas de donneur HLA compatible, l'incidence et la sévérité des GVHD étaient plus faibles qu'après une greffe de moelle osseuse HLA compatible.

Le diagnostic de GVHD repose essentiellement sur des critères cliniques pouvant être confirmés par l'analyse de biopsies. En complément, peuvent être réalisés des examens biologiques ainsi que de l'imagerie. Actuellement, aucun marqueur biologique ne permet de prédire ou de dépister de manière fiable la maladie avant son apparition.

## La GVHD aiguë

### Aspects cliniques et diagnostiques

La GVHa est classée selon 4 grades de gravité en fonction de l'étendue de chacun des trois principaux organes cibles (peau, foie et tube digestif) [17]. Le dernier grade engage le pronostic vital.

La peau est généralement le premier organe et le plus fréquemment touché avec une éruption érythémateuse maculopapuleuse souvent prurigineuse voire un syndrome de Lyell [18]. Dans les formes graves, la peau peut se boursoufler et s'ulcérer. Histologiquement, on retrouvera une apoptose à la base des crêtes épidermiques, signe pathognomonique.

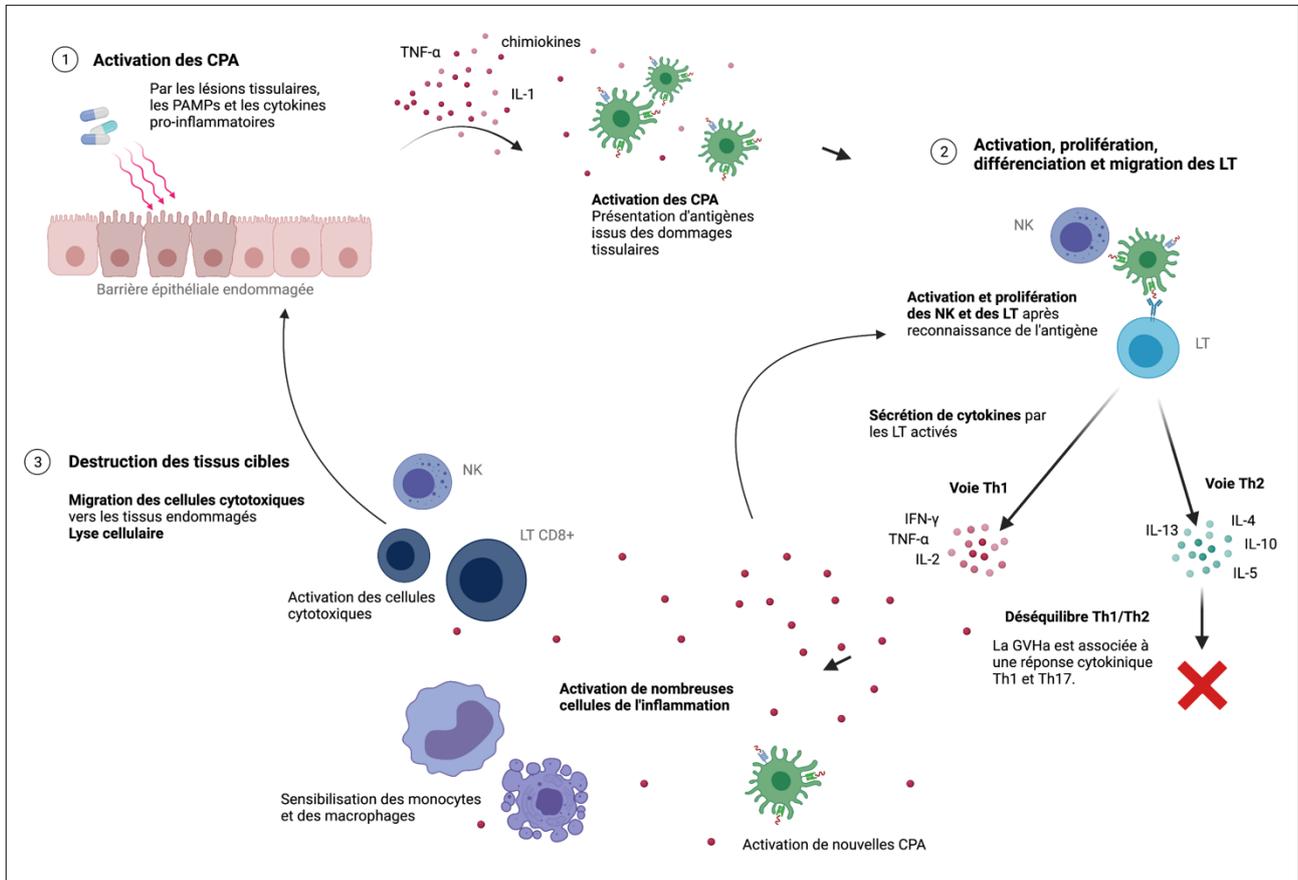
Le diagnostic de GVHa hépatique est quant à lui souvent difficile en raison de l'existence d'autres causes possibles de dysfonctionnement hépatique post-allogreffe (toxicité médicamenteuse, infections opportunistes...). L'atteinte hépatique se caractérise par une cholestase ictérique (augmentation de la bilirubine et des phosphatases alcalines) et une hépatomégalie. Une biopsie hépatique est nécessaire pour établir le diagnostic mais est parfois non réalisable du fait du risque accru de saignement associé à la thrombopénie, notamment durant la période de post-transplantation immédiate. De ce fait, la GVHa hépatique est le plus souvent un diagnostic clinique d'exclusion.

Au niveau du tractus gastro-intestinal, la GVHa peut se manifester par une atteinte digestive avec des symptômes peu spécifiques de type nausées, vomissements, anorexie, diarrhées, douleurs abdominales... Ces signes digestifs sont causés par des lésions focales (perte ou aplatissement de la surface de l'épithélium, ulcération inégale de corps apoptotiques à la base des cryptes, abcès cryptiques) d'intensité très variable, présentes tout au long du tractus digestif [15, 18]. Il est à souligner qu'une ulcération des muqueuses est un facteur de mauvais pronostic.

### Physiopathologie de la GVHa

La GVHa est médiée par les lymphocytes du donneur qui rencontrent chez le receveur un environnement étranger avec des tissus endommagés par les effets de la maladie sous-jacente, des infections antérieures et du régime de conditionnement. Il est possible de dissocier trois étapes dans la physiopathologie de la GVHa (Figure 5) : (1) l'activation des CPA

; (2) l'activation, la prolifération, la différenciation et la migration des LT et (3) la destruction des tissus cibles [15].



**Figure 5 – Physiopathologie de la GVHa.** Phase 1, le régime de conditionnement induit des lésions tissulaires et active les tissus de l'hôte. Les cellules hôtes activées sécrètent des cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1). Ces cytokines, les lésions tissulaires et la mise en contact des germes de la lumière avec les cellules immunitaires entraînent l'activation et la maturation des CPA, dont les CD épithéliales. Phase 2, les CD activées vont présenter les antigènes aux LT, ces CD activées libèrent également de nombreuses cytokines inflammatoires contribuant à un déséquilibre entre la voie Th1 et Th2 vers la voie Th1. Les cytokines Th1 produites par les LT activés (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) jouent un rôle important dans l'expansion des LT, dans l'activation d'autres CD épithéliales, dans la sensibilisation des monocytes et macrophages et dans l'activation de cellules cytotoxiques (LT CD8<sup>+</sup> et NK). Phase 3, les cellules cytotoxiques activées migrent au niveau de l'épithélium endommagé et induisent des lésions tissulaires par production de molécules cytotoxiques (Biorender.com).

La première phase de la GVHa consiste en l'activation massive de CPA : CPA du donneur et CPA du receveur [15, 18, 19]. Ces CPA peuvent être activées (a) par les lésions tissulaires et l'inflammation avec la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1) ; (b) par des signaux exogènes ou PAMPs tels que le lipopolysaccharide (LPS) et la flagelline, libérés par les micro-organismes ; (c) par les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par des CPA

préalablement activées. Le contexte pro-inflammatoire entraîne une présentation accrue d'antigènes par les CPA.

La deuxième phase concerne l'activation, la prolifération, la différenciation et la migration des LT du donneur par les CPA activées. La GVHa est associée à une réponse cytokinique Th1 et Th17. En effet, les CPA activées sécrètent des cytokines inflammatoires contribuant au déséquilibre Th1/Th2 vers la voie Th1. Les LT Th1 activés produisent des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2 et le TNF- $\alpha$ . Ces cytokines activent secondairement des cellules effectrices telles que les LT cytotoxiques, les NK et les macrophages [15, 19]. Le TNF- $\alpha$  est un élément essentiel dans la physiopathologie de la GVHa. Déjà impliqué dans l'activation des CPA au cours de la première phase, il va également amplifier l'activation et la prolifération des LT au cours de cette deuxième étape [15]. Une augmentation plasmatique du taux de récepteur TNF- $\alpha$  (marqueur de substitution du TNF- $\alpha$  lui-même) dans les suites d'une allogreffe de CSH est corrélée avec le risque de GVHD [20]. L'IL-2 joue également un rôle important dans la survenue de la GVHD et est d'ailleurs la cible de nombreuses approches thérapeutiques (ciclosporine, tacrolimus, anticorps monoclonaux contre IL-2 et son récepteur...). Dans un contexte de forte activation, les CPA du donneur peuvent présenter les antigènes exprimés par les cellules d'organes sains aux LT [15, 19].

La troisième et dernière étape correspond à la migration des effecteurs cytotoxiques (macrophages, NK, LT CD8<sup>+</sup>) qui amplifient les dommages tissulaires locaux et endommagent directement les cellules cibles, causant ainsi des lésions typiques de la GVHD au sein des organes cibles tels que le foie, la peau et l'intestin [15, 20].

### *La GVHD chronique*

La GVHc est la principale cause de décès tardif sans rechute après une allogreffe de CSH [18]. Elle est associée à une diminution de la qualité de vie ainsi qu'à une altération de l'état général du patient. La GVHc se manifeste généralement au-delà de 3 mois après la greffe, le délai médian de diagnostic étant de 4,5 mois. Le risque de survenue d'une GVHc diffère selon le type de donneur : il est de 30% chez les receveurs de greffes de donneurs (frères ou sœurs) entièrement histocompatibles et de 60 à 70% chez les receveurs de CSH

provenant d'un donneur non apparenté. Il existe d'autres facteurs (antécédents de GVHa, âge élevé du receveur, utilisation de CSH périphériques...) susceptibles d'augmenter le risque de survenue de GVHc [7, 18]...

La physiopathologie de la GVHc est encore aujourd'hui mal comprise, notamment car il existe peu de modèles expérimentaux permettant de mimer la maladie humaine. Des arguments dérivés des essais cliniques suggèrent que la GVHc est une maladie T-médiée de par son incidence moindre en cas d'utilisation de greffons déplétés en LT. Plus récemment, il a également été démontré que les LB intervenaient également dans la physiopathologie de la GVHc à travers la dysrégulation de la coopération T-B [21].

La GVHc peut être diffuse ou localisée selon le nombre d'organes atteints. Les manifestations cliniques sont proches de celles observées dans les maladies auto-immunes. Les manifestations cliniques sont nombreuses et variées. Au moins une manifestation spécifique à la GVHc est nécessaire pour affirmer le diagnostic : lichénoïdes buccaux ou vaginaux, sécheresse oculaire, dépigmentation cutanée, sclérodermie ou bronchiolite oblitérante. Elle peut également se manifester par un durcissement de la peau, une perte de cheveux, une sécheresse buccale, des caries, des douleurs musculaires et d'autres troubles pulmonaires. Il s'agit d'une véritable « seconde maladie » dont la morbi-mortalité est considérable [7, 18, 20]. Du fait de l'absence de tableau clinique caractéristique, le diagnostic de GVHc est un diagnostic d'exclusion.

Encore aujourd'hui, la GVHD, aiguë ou chronique, continue de représenter un obstacle majeur à une transplantation réussie.

## II. LE MICROBIOTE INTESTINAL

Un microbiote correspond à l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique, par exemple le corps humain [22]. Il comprend non seulement des bactéries mais aussi des virus, des champignons et des parasites présents à la surface de la peau et des muqueuses. Selon leur localisation, on peut ainsi définir plusieurs types de microbiotes : le microbiote oral, gastrique ou intestinal, au niveau du tractus digestif, le microbiote respiratoire retrouvé non seulement au niveau des voies aériennes supérieures mais également au niveau pulmonaire, le microbiote cutané et le microbiote vaginal.

Le microbiote intestinal (MI), anciennement appelé flore intestinale, est le microbiote le plus étudié et le plus décrit dans la littérature. Il constitue le plus grand réservoir commensal de l'organisme humain avec une estimation chez l'adulte de  $10^{12}$  à  $10^{14}$  micro-organismes par gramme de selles [23]. C'est un écosystème complexe et organisé ayant un impact sur la santé et le bien-être de son hôte. Il est considéré comme un véritable « organe » du fait de ses nombreuses fonctions.

Depuis ces dernières décennies, un intérêt grandissant s'est développé autour du MI, au sein de la communauté scientifique. En effet, ce dernier a notamment été associé à de nombreuses pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le syndrome du côlon irritable (SCI), les maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète mais aussi à certaines maladies neuro-développementales [24]. Les études menées dans le cadre du projet européen MetaHit (*METAgenomics of the Human Intestinal Tract*) ainsi que plusieurs autres études ont démontré l'influence significative du MI sur la physiologie et la nutrition humaines.

Afin de comprendre et appréhender l'impact de ce microbiote sur l'organisme, il est important d'étudier le processus de colonisation du tractus digestif par les micro-organismes et d'explorer les compositions saines et altérées de celui-ci.

## A. COLONISATION ET COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL

Concernant l'implantation et la composition du MI, il a été mis en évidence l'importance des « *mille premiers jours* » débutant au moment de la conception jusqu'aux deux premières années de vie, période cruciale dans le développement de l'enfant [23]. Durant cette période, l'enfant se trouve dans une fenêtre d'hypersensibilité vis-à-vis de son environnement, quel qu'il soit (nutritionnel, écologique, socio-économique, mode de vie...) qui impactera son développement et sa santé tout au long de sa vie.

Ainsi, la compréhension et la connaissance des différents facteurs de colonisation et de composition du MI pourraient nous permettre d'interpréter les relations entre les différentes populations bactériennes à un moment donné et le développement de certaines maladies.

### 1. Implantation du microbiote intestinal

Jusqu'à récemment, nous pensions que la colonisation intestinale commençait au moment de la naissance, dès la rupture des membranes précédant l'accouchement. Cependant, plusieurs travaux ont démontré l'existence d'un microbiote placentaire : l'utérus ne serait *a priori* pas un environnement stérile [25, 26]. La présence de bactéries en faible quantité a été mise en évidence dans le placenta, le cordon ombilical et le liquide amniotique dans les grossesses menées à terme en bonne santé. Ce microbiote présenterait notamment une similitude de composition avec le microbiote buccal de la mère et sa composition pourrait avoir un impact sur le développement *in utero* du fœtus. Bien qu'encore contestée, la théorie d'un microbiote *in utero* restreint semble de plus en plus évidente même si la colonisation massive de l'ensemble des microbiotes de l'enfant se déroule au moment de la naissance. En effet, le tube digestif de l'enfant est à ce moment-là un environnement très permissif permettant une colonisation rapide à partir des nombreux micro-organismes avec lesquels le nouveau-né est en contact. En 24 à 48h, après élimination du méconium, le nombre de bactéries par gramme de selles avoisine les  $10^{11}$ .

L'implantation et le développement du MI constituent des processus dynamiques soumis à de nombreuses conditions périnatales et influencés par divers facteurs (Figure 6).

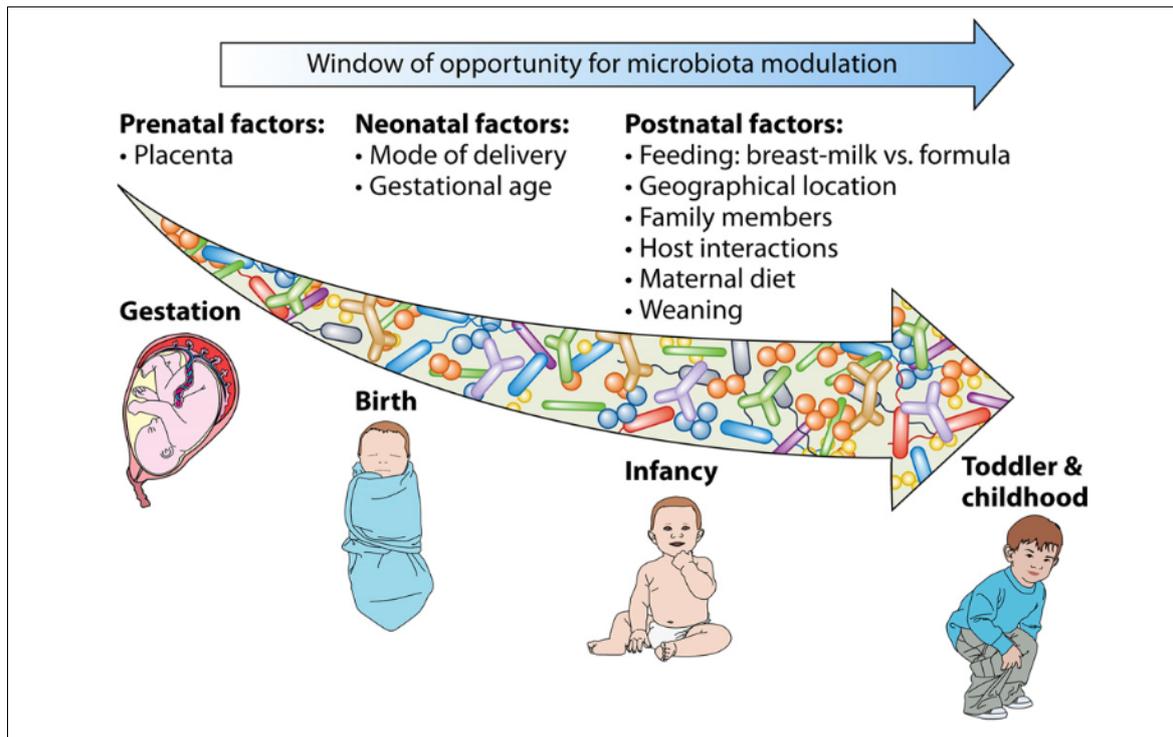


Figure 6 – Différents facteurs permettant la modulation du microbiote de la gestation à l'enfance [25]. Cette représentation schématique montre une liste de facteurs prénatals, néonataux et post-natals contribuant à la composition bactérienne intestinale chez le nourrisson.

### Impact du mode d'accouchement sur l'implantation et la composition du microbiote intestinal

L'un des premiers facteurs influençant le MI néonatal repose sur le mode d'accouchement [25]. Chez les nourrissons nés à terme, ce dernier est reconnu comme étant un facteur essentiel de la composition précoce du MI. Les nourrissons mis au monde par voie basse entrent en contact avec les microbiotes vaginaux et fécaux maternels. En revanche, les nourrissons nés par césarienne ne sont pas directement exposés à ces microbiotes et sont donc plus susceptibles d'être colonisés par des micro-organismes provenant du microbiote cutané de la mère, du personnel hospitalier ou de l'environnement hospitalier. Par ailleurs, la naissance par césarienne conduit le plus souvent à un retard de colonisation du système muqueux ainsi qu'à une complexité moindre du MI, par comparaison à une naissance par voie basse [27]. Ces nourrissons seraient moins souvent colonisés par les micro-organismes commensaux bénéfiques tels que les bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides*, tout en étant plus fréquemment colonisés par des membres des *Clostridium sensu stricto* et de *C. difficile* [23, 26, 28]. Les différences observées entre les MI des nouveau-

nés nés par voie vaginale et ceux nés par césarienne ont été associées à un effet protecteur de l'accouchement naturel [25]. Il semblerait même qu'un accouchement par césarienne soit lié à un risque accru de troubles immunitaires tels que l'asthme, l'allergie ou le diabète de type 1 et à une incidence plus élevée d'obésité. Ces découvertes et hypothèses suggèrent ainsi que le développement précoce du MI, même aux premiers instants de vie, influe sur l'état de santé tout au long de la vie.

Bien que les profils bactériens tendent avec le temps vers un microbiote similaire (Figure 7) quel que soit le mode de délivrance de l'enfant, certaines disparités de composition peuvent persister tout au long de la vie [29, 30].

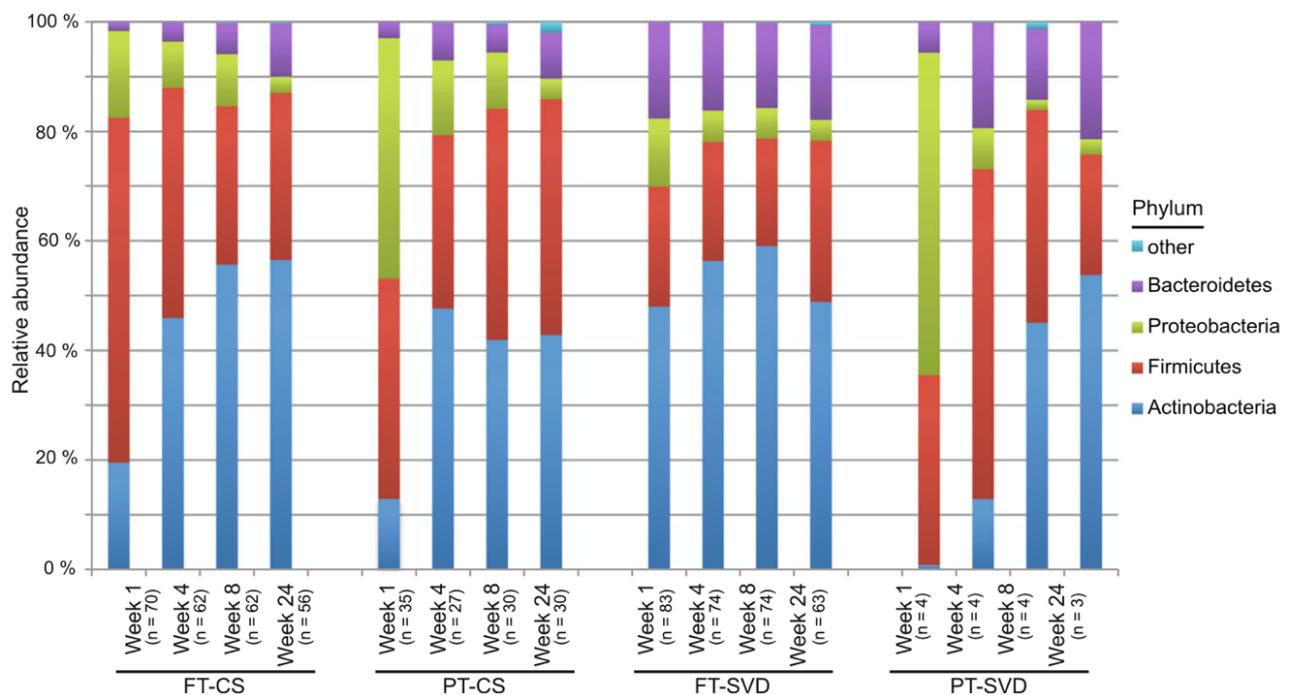


Figure 7 – Abondances relatives des phylum Bacteroidetes (en violet), Proteobacteria (en vert), Firmicutes (en rouge) et Actinobacteria (en bleu) chez les nourrissons en fonction du mode d'accouchement (CS = césarienne ; SVD = accouchement par voie basse) et de l'âge gestationnel (FT = né à terme ; PT = prématuré) [28].

### Impact de l'âge gestationnel sur l'implantation et la composition du microbiote intestinal

L'âge gestationnel est un autre facteur important dans la constitution du MI du nourrisson [28]. Selon le degré de prématurité, les nourrissons prématurés peuvent avoir à surmonter de graves problèmes de santé : ils présentent souvent un intestin immature ainsi que des problèmes immunitaires, respiratoires et neurologiques. L'exposition à des

traitements et notamment à des antibiotiques est massive chez ces jeunes patients. Leur séjour à l'hôpital peut parfois être long dans un environnement « stérile » au sein d'unités de soins intensifs avec une mise fréquente sous respirateur et sous nutrition artificielle ou parentérale contrôlée. Tous ces différents facteurs sont susceptibles d'interférer avec le développement du microbiote et la maturation du système immunitaire.

Plusieurs études ont rapportées des différences du microbiote fécal des nouveau-nés prématurés et des nouveau-nés nés à terme (Figure 7) [25, 28]. En effet, chez les nouveau-nés prématurés, la colonisation intestinale par des micro-organismes anaérobies commensaux bénéfiques, tels que *Bifidobacterium* et *Bacteroides*, est retardée. Chez ces patients, sont retrouvés en plus grande quantité des micro-organismes pathogènes opportunistes tels que les entérobactéries, et certaines bactéries à Gram positif telles que les staphylocoques, les entérocoques et les clostridies qui dominent le MI des nourrissons très prématurés au cours des premiers mois de vie. Chez ces enfants, le MI diffère dans sa composition et sa fonctionnalité avec des modifications concernant les fonctions nutritionnelles et métaboliques [25, 29, 30]. L'interaction entre le MI néonatal prématuré modifié et le système immunitaire immature peut provoquer des réponses inflammatoires et contribuer au développement de maladies auto-immunes, de MICI, d'asthme, d'allergies, d'arthrite et de sclérose en plaques [31]. La différence de composition du MI chez le nouveau-né prématuré a été également corrélée à un risque accru d'entérocologie nécroscante. D'autres voies métaboliques semblent par ailleurs altérées chez le nourrisson prématuré : on note une moindre production des principaux acides gras à chaîne courte (AGCC) et une production plus importante de dérivés d'acides biliaires dû à une modification du métabolisme lipidique [28].

### *Impact de l'alimentation sur l'implantation et la composition du microbiote intestinal*

Le type d'alimentation est un autre facteur déterminant la colonisation du MI chez le nouveau-né. Il a été établi une différence de composition de ce microbiote entre les nouveau-nés allaités et ceux nourris au lait maternisé [25].

L'allaitement maternel est un vecteur de micro-organismes de la mère à l'enfant à la fois lors du contact avec le microbiote cutané de la mère et via le lait maternel lui-même. Ce dernier, même recueilli dans des conditions stériles, contient des bactéries participant à l'établissement des microbiotes de l'enfant. Par ailleurs, le lait maternel fournit un mélange

de nutriments et d'agents soit pro-microbiens, soit anti-microbiens, favorisant le développement d'un microbiote dit « orienté au lait » [25]. Il semble également induire le développement d'un système immunitaire plus tolérogène et contient des éléments oligosaccharidiques pouvant façonner de manière sélective la croissance et les fonctions des micro-organismes commensaux.

Le MI des nourrissons allaités présente une diversité plus faible que celui des nourrissons nourris avec du lait maternisé [23, 25, 32]. L'étude de Bäckhed *et al.* [33] confirme ces observations ainsi que l'importance de l'allaitement dans la formation et la succession des communautés microbiennes intestinales au cours de la première année de vie. Le MI des enfants n'étant plus allaités s'enrichit en espèces appartenant au groupe bactérien *Clostridia*. En revanche, les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* dominent toujours le MI des nourrissons du même âge allaités jusqu'à 12 mois. Lors du sevrage de l'allaitement, la diversité microbienne se trouve modifiée : les *Proteobacteria* et *Actinobacteria* sont remplacées par les *Firmicutes* et *Bacteroidetes* qui deviennent alors les membres majeurs du MI.

L'arrêt de l'allaitement en lui-même et le passage vers une alimentation solide plus variée influencent fortement la composition et la maturation du MI. Cinq jours après l'arrêt d'une alimentation par lait maternel, s'ensuit une augmentation des abondances relatives des bactéries appartenant aux genres *Blautia* et *Ruminococcus* ainsi qu'une diminution des abondances relatives des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* [34]. L'augmentation de cette diversité bactérienne contribue à des changements fonctionnels : augmentation des taux d'AGCC (en particulier le butyrate, principale source d'énergie pour les colonocytes), de l'amidon et des xénobiotiques ainsi que dans la production de vitamines.

Il est également intéressant de noter que l'alimentation maternelle au cours de la grossesse va impacter l'implantation et la composition du MI. Afin d'étudier cela, Chu *et al.* [35] ont analysé les microbiotes intestinaux de nourrissons au moment de l'accouchement (méconium) et jusqu'à 6 semaines de vie (selles). Les mères ont dû se soumettre à un questionnaire sur leurs habitudes alimentaires. A partir de ce questionnaire, la fréquence de consommation au cours du dernier mois d'aliments et de boissons a pu être établie permettant d'estimer l'apport alimentaire quotidien en sucres ajoutés, en graisses et en fibres. Deux groupes ont pu être définis : un groupe dont le régime maternel était riche en graisses et l'autre pour lequel le régime maternel était pauvre en graisses. Entre ces deux

groupes, il n'y avait aucune différence significative entre l'apport en sucres ajoutés, en fibres, l'IMC (indice de masse corporelle) avant la grossesse, le mode d'accouchement et le type d'alimentation des nourrissons à la naissance. Les résultats ont montré qu'au moment de la naissance, l'exposition à un régime maternel riche en graisses était significativement associée à un enrichissement en *Enterococcus* et à un épuisement relatif des *Bacteroides* qui sont des symbiotes connus aidant à la maturation de l'immunité muqueuse. Ces altérations spécifiques pouvaient persister au moins jusqu'à 6 semaines [35].

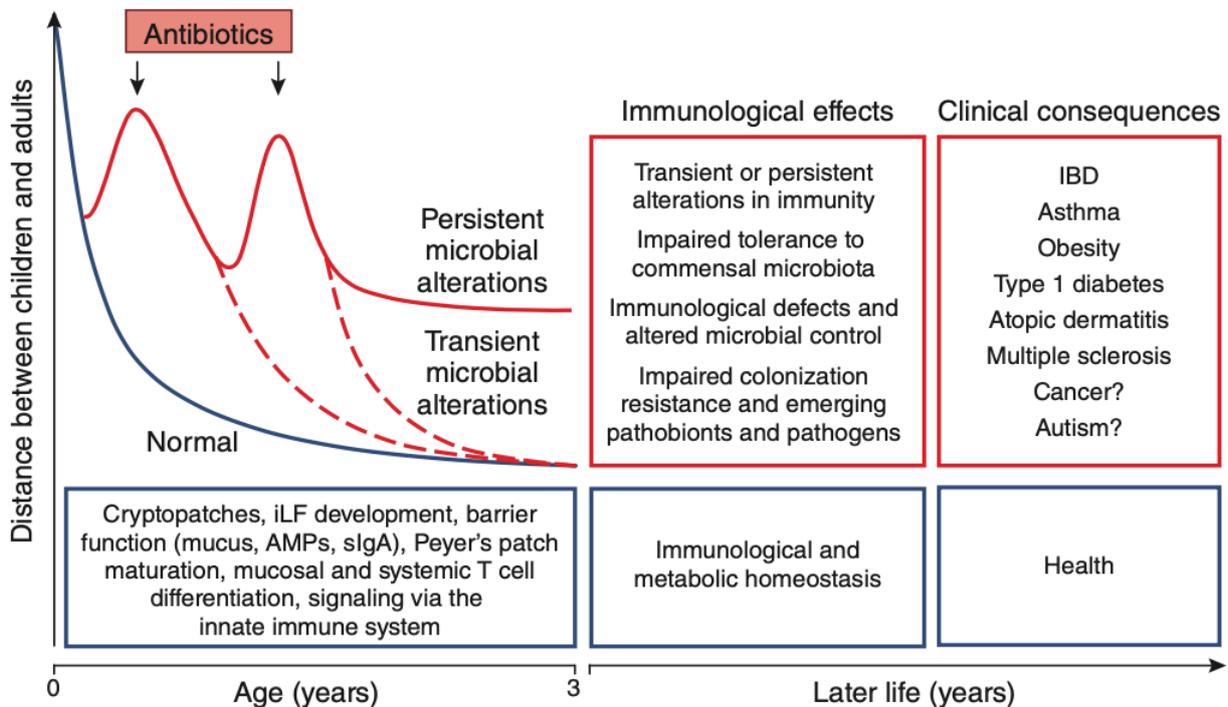
Par ailleurs, l'IMC ainsi que la prise de poids de la mère au cours de sa grossesse semblent être deux facteurs maternels qui influenceraient la composition première du MI infantile. En effet, il a été montré chez des enfants dont les mères sont en surpoids au moment de la grossesse que le MI des 6 premiers mois de vie était plus riche en staphylocoques [25].

#### *Impact des antibiotiques sur l'implantation et la composition du microbiote intestinal*

Concernant l'antibiothérapie chez le fœtus et/ou le nouveau-né, un traitement antibiotique même de courte durée comme celui mis en place lors d'une rupture prématurée des membranes, peut affecter de manière significative l'implantation et la composition du MI [36]. En effet, le schéma de colonisation des bifidobactéries semble être particulièrement perturbé jusqu'à 8 semaines après le traitement alors que les *Proteobacteria* sont retrouvées à des taux plus importants.

Les perturbations causées par l'antibiothérapie sont en grande partie transitoires et sont suivies d'un retour à l'état de pré-traitement. Malgré la résilience bien documentée du MI, le traitement par antibiotique peut être associé à des modifications persistantes de la composition microbienne et à des conséquences potentielles à long terme pour l'immunité de l'hôte [31]. La colonisation par les commensaux est associée au développement et à la maturation du système immunitaire ce qui conduit à l'homéostasie immunologique et métabolique de l'hôte. Les influences des micro-organismes sur l'immunité sont confinées à des fenêtres d'opportunité. La présence ou l'absence de certaines bactéries au cours de ces fenêtres d'opportunité aura des effets persistants et durables (Figure 8). Une antibiothérapie est associée à des altérations du MI, qui même transitoires, pourront avoir des conséquences sur le développement immunitaire de l'hôte si elles surviennent pendant de telles fenêtres d'opportunité. De tels événements peuvent affecter la susceptibilité de l'hôte aux maladies

atopiques, à médiation immunitaire, métaboliques et potentiellement néoplasiques ainsi qu'aux troubles neuropsychiatriques [31].



**Figure 8 - Colonisation microbienne, développement du système immunitaire et perturbation du MI par traitement antibiotique au début de la vie [31].** La colonisation microbienne au cours du développement post-natal est un processus dynamique qui évolue vers une configuration de type adulte vers l'âge de 3 ans (courbe bleue). La colonisation par des commensaux participe au développement et à la maturation du système immunitaire ce qui conduit à une homéostasie immunologique et métabolique (encadrés bleus). L'altération du MI causée par l'antibiothérapie au cours de fenêtres d'opportunité (courbes rouges) aura des conséquences sur le développement immunitaire de l'hôte et sur le risque de survenue de certaines pathologies (encadrés rouges).

### Autres facteurs impactant l'implantation et la composition du microbiote intestinal

Les données pertinentes concernant l'effet de la génétique sur l'implantation et la composition du MI proviennent d'études sur les jumeaux et les liens familiaux. Récemment, l'analyse d'une grande cohorte a établi une association claire entre le génotype de l'hôte et les abondances relatives des différents taxons bactériens à l'âge adulte. Dans cette étude, Bonder *et al.* [37] ont découvert que les polymorphismes nucléotidiques simples ou SNP situés dans le locus LCT, responsable de la production de lactase humaine, étaient liés à une abondance variable de *Bifidobacterium*.

La composition familiale a également été décrite comme facteur environnemental pertinent pouvant influencer le modèle de colonisation du MI chez le nourrisson. Le rang de naissance de l'enfant aurait un impact sur la colonisation [36]. En effet, les nourrissons avec des frères et sœurs plus âgés ont montré un taux plus élevé de *Bifidobacterium*. Tandis que les nourrissons sans frère ou sœur plus âgé présenteraient des proportions accrues d'entérobactéries ainsi que des clostridies et un rapport anaérobies stricts/anaérobies facultatifs plus faible. Ces données concernant un éventuel « effet frère » restent controversées et d'autres études dans ce domaine semblent nécessaires.

La situation géographique impacte également l'implantation et la composition du MI [25]. Il a été rapporté la notion d'un « gradient géographique » concernant le microbiote infantile européen : les nourrissons des régions du Nord ont des niveaux plus élevés de *Bifidobacterium* spp. et de certains *Clostridium* spp. (*Clostridium perfringens* et *C. difficile*), et d'*Atopobium* spp. ; tandis que les nourrissons du Sud présenteraient une plus grande abondance d'*Eubacterium*, de *Lactobacillus* et de *Bacteroides*. Néanmoins, il existe de nombreuses différences dans les caractéristiques d'alimentation et de mode de vie à travers l'Europe. Par exemple, en Ecosse, les taux d'allaitement sont plus faibles et de nombreux nourrissons sont sevrés avant 3 mois. En revanche, dans les pays scandinaves, les taux d'allaitement sont élevés et les nourrissons sevrés plus tard [38]. A l'échelle mondiale, il est bien établi que dans les pays industrialisés occidentaux, les procédures d'hygiène de routine visant à réduire la propagation des bactéries dans les services de maternité et de néonatalogie ont fortement influencé le schéma de colonisation des nouveau-nés, alors que les nourrissons nés dans les pays en voie de développement sont exposés à une charge bactérienne plus importante.

De plus, il semblerait le cadre familial et le contexte socio-économique influencent la colonisation du MI après la naissance. Les données concernant l'impact de l'environnement socio-économique sont encore éparpillées et nécessitent d'être confortées par des études futures [25].

## 2. Composition du microbiote intestinal

Les premiers micro-organismes colonisateurs sont des bactéries anaérobies facultatives telles que les entérobactéries ou les staphylocoques [39] (Figure 9). En quelques jours, l'intestin devient un environnement anaérobie par épuisement de l'oxygène initial, ce qui favorise le développement de bactéries anaérobies strictes telles que *Bifidobacterium*, *Clostridium* ou encore *Bacteroides* qui seront des éléments majeurs du MI.

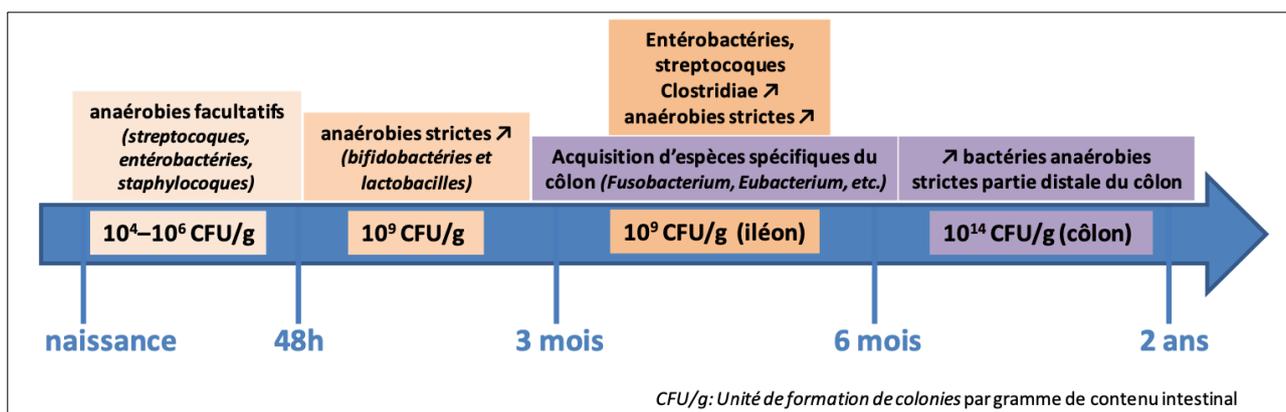


Figure 9 - Schéma d'acquisition des populations bactériennes intestinales chez l'enfant [39].

Chez les nouveau-nés, des communautés microbiennes complexes sont présentes dans l'intestin au cours de la première semaine de vie avec des fluctuations dynamiques de cette composition bactérienne jusqu'à ce qu'un équilibre et une relative maturité soient atteints vers l'âge de 2-3 ans [26]. Cependant, cette composition peut évoluer tout au long de la vie. Il est donc difficile de décrire simplement la composition du MI car celle-ci va non seulement varier profondément d'un individu à un autre mais également chez un même individu.

### Différences de composition du microbiote intestinal intra-individuelles

Au sein d'un même hôte, le MI présente des différences qualitatives et quantitatives selon le site anatomique (Figure 10) [40].

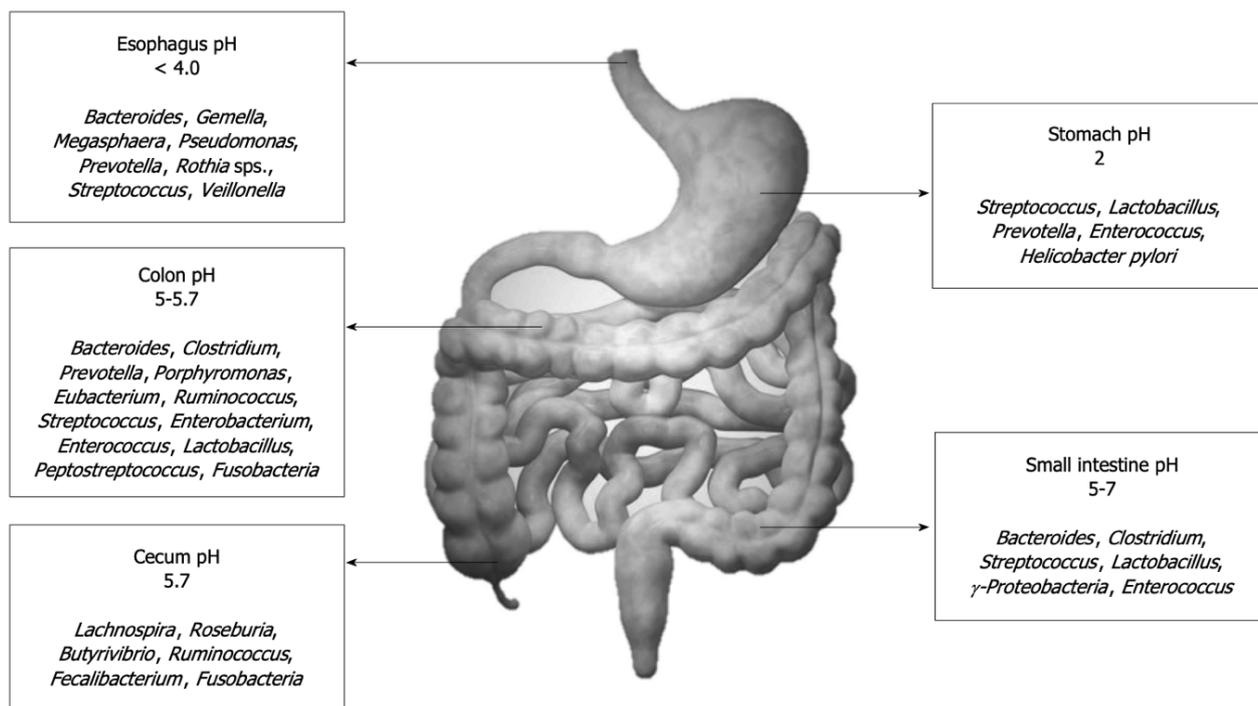


Figure 10 – Distribution longitudinale des différents grands genres bactériens au sein du tractus digestif [40].

Le microbiote colique représente plus de 70% de l'ensemble des microbiotes du corps humain. Au sein de ce microbiote, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* constituent les deux phyla largement prédominants et représentent à eux seuls plus de 90% des micro-organismes (60 à 75% de *Firmicutes* et 30 à 40% de *Bacteroidetes*) dont près de 99% bactéries anaérobies strictes [40]. Chez un individu sain, le phylum *Proteobacteria*, comprenant notamment les entérobactéries, n'est présent qu'en faible abondance dans le microbiote colique.

Il existe également une différence axiale de composition. Les taxons prédominants au niveau de la lumière intestinale, identifiable par étude des selles du patient, sont les suivants : *Bacteroides, Bifidobacterium, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Enterococcus, Clostridium, Lactobacillus* et *Ruminococcus*. Les taxons liés à la muqueuse intestinale correspondent aux genres *Clostridium, Lactobacillus, Enterococcus* et *Akkermansia* [40].

#### Différences de composition du microbiote intestinal inter-individuelles

Lorsque l'on s'intéresse aux grands groupes bactériens, notamment aux phyla, la composition du MI est stable entre les individus avec quatre phyla bactériens prépondérants : les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria*. Cependant, lorsque

l'on s'intéresse aux taxons de rang inférieur, notamment aux espèces bactériennes, la variabilité inter-individuelle est très importante et chaque individu possède un MI qui lui est propre et spécifique : c'est son empreinte fécale.

En 2011 [41], pour obtenir un aperçu de la variation des espèces au sein du MI, une analyse métagénomique d'échantillons fécaux provenant de trois pays (Danemark, Espagne et États-Unis) a été effectuée à l'aide de trois technologies de séquençage (Illumina, pyroséquençage 454 et Sanger) mettant en évidence l'existence de trois entérotypes distincts. Ces entérotypes étaient indépendants de l'âge, du sexe, de l'origine culturelle et de la géographie. Chacun de ces trois entérotypes était identifiable par la prépondérance de l'un des trois genres *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus* (Figure 11). Chaque entérotipe possédait un réseau de micro-organismes co-occurents centrés autour d'un taxon indicateur soit le taxon le mieux corrélé à l'entérotipe donné. L'entérotipe 1 ou ET B présentait *Bacteroides* comme indicateur, l'entérotipe 2 ou ET P, était représenté par *Prevotella*, un genre dont l'abondance était inversement corrélée à celle de *Bacteroides*, et l'entérotipe 3 ou ET F, se distinguait par une surreprésentation de *Firmicutes*, principalement par *Ruminococcus*. L'établissement d'une structure de type entérotipe se produirait entre 9 et 36 mois de vie et semble majoritairement influencé par le type d'alimentation.

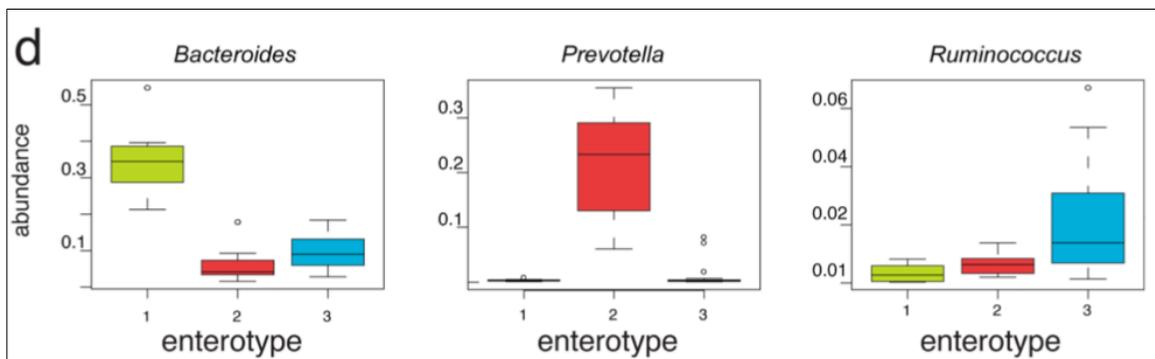


Figure 11 - **Différences phylogénétiques entre les entérotypes [41].** Abondances des principaux contributeurs de chaque entérotipe, en vert : le genre *Bacteroides* ; en rouge : le genre *Prevotella* et en bleu : le genre *Ruminococcus*.

Le modèle de composition basé sur les entérotypes est imparfait. Des études ultérieures ont démontré l'existence d'un nombre de regroupements plus élevés que trois entérotypes, et d'autres ont signalé n'avoir trouvé aucune structure. Cependant la classification sous forme d'entérotypes permet d'établir des regroupements entre la grande

majorité des échantillons et de diminuer la complexité de définitions des catégories de microbiotes intestinaux.

D'autres modèles de composition ont été étudiés, notamment par Holmes *et al.* [42] qui proposent une approche alternative pour identifier la structure du MI. Ces auteurs ont suggéré l'existence de quatre processus génératifs appelés « grappes ». Deux de ces grappes ressemblent à ET B et ET P, tandis que la troisième présente une prévalence accrue de *Ruminococcus* et d'autres *Firmicutes* qui sont en général peu abondants dans le MI. La dernière grappe comporte une fraction élevée de taxons non identifiés.

Une autre étude portée par Ding et Schloss [43] a porté sur l'analyse de l'ensemble des données de séquences d'ADNr 16S d'une cohorte saine de 300 individus. Les échantillons ont également été regroupés en quatre types de communautés distincts (Figure 12). Dans ce modèle, ce n'est pas simplement la population bactérienne la plus abondante qui différencie les types de regroupement comme c'est le cas dans la définition des entérotypes. Les types de communautés ont été identifiés sur la base de configurations complexes de nombreux taxons.

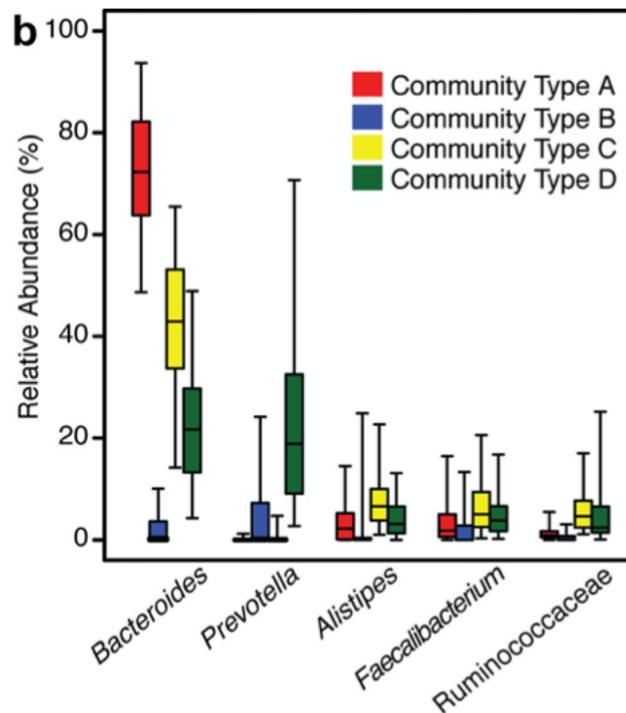


Figure 12 – **Abondances relatives des genres les plus abondants dans les échantillons attribués à chacune des communautés [43].** Les rectangles représentent l'intervalle interquartile et les barres représentent l'intervalle de confiance à 95%.

Dans cette étude, La communauté de type A avait les niveaux les plus élevés de *Bacteroides* mais manquait de *Prevotella* et de *Ruminococcaceae*. Semblable à la communauté de type A, la communauté de type C manquait également de *Prevotella*, mais avait une abondance relative inférieure de *Bacteroides* et des niveaux plus élevés d'*Alistipes*, de *Faecalibacterium* et de *Ruminococcaceae*. La communauté de type D avait moins de *Bacteroides* que les communautés de types A et C, mais avait des niveaux plus élevés de *Prevotella*. Enfin, la communauté de type B avait le moins de *Bacteroides* et était dominée par une variété de populations affiliées au sein des *Firmicutes*. De plus, la diversité des échantillons attribués à chacun des types de communauté indiquait que le type A avait une diversité significativement plus faible que les trois autres types ( $p < 0,001$ ). Les types communautaires A, C et D ressemblaient respectivement aux entérotypes *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Prevotella* précédemment identifiés.

Il faut noter que la majorité des données comparées dans de nombreuses études sur le MI montre une surreprésentation de sujets originaires de pays occidentaux. Ce biais reconnu sous-entend que des variations observables dans d'autres populations sont omises et non étudiées.

Malgré cette différence de composition interindividuelle, le MI de chaque individu effectuera les mêmes fonctions. C'est à la fois lié à la présence chez l'ensemble des individus d'une soixantaine d'espèces bactériennes, aussi nommé *core microbiome*, possédant des propriétés spécifiques. C'est également lié aux fonctions généralistes partagées par les espèces des grands groupes bactériens. Des gènes différents d'une bactérie à l'autre auront la même finalité permettant ainsi au MI de conserver son rôle malgré une variation de composition.

## B. FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL :

Le MI maintient une relation symbiotique avec l'ensemble du tractus gastro-intestinal et confère des fonctions métaboliques, immunologiques et protectrices (Figure 13), ce qui explique pourquoi son homéostasie est si importante.

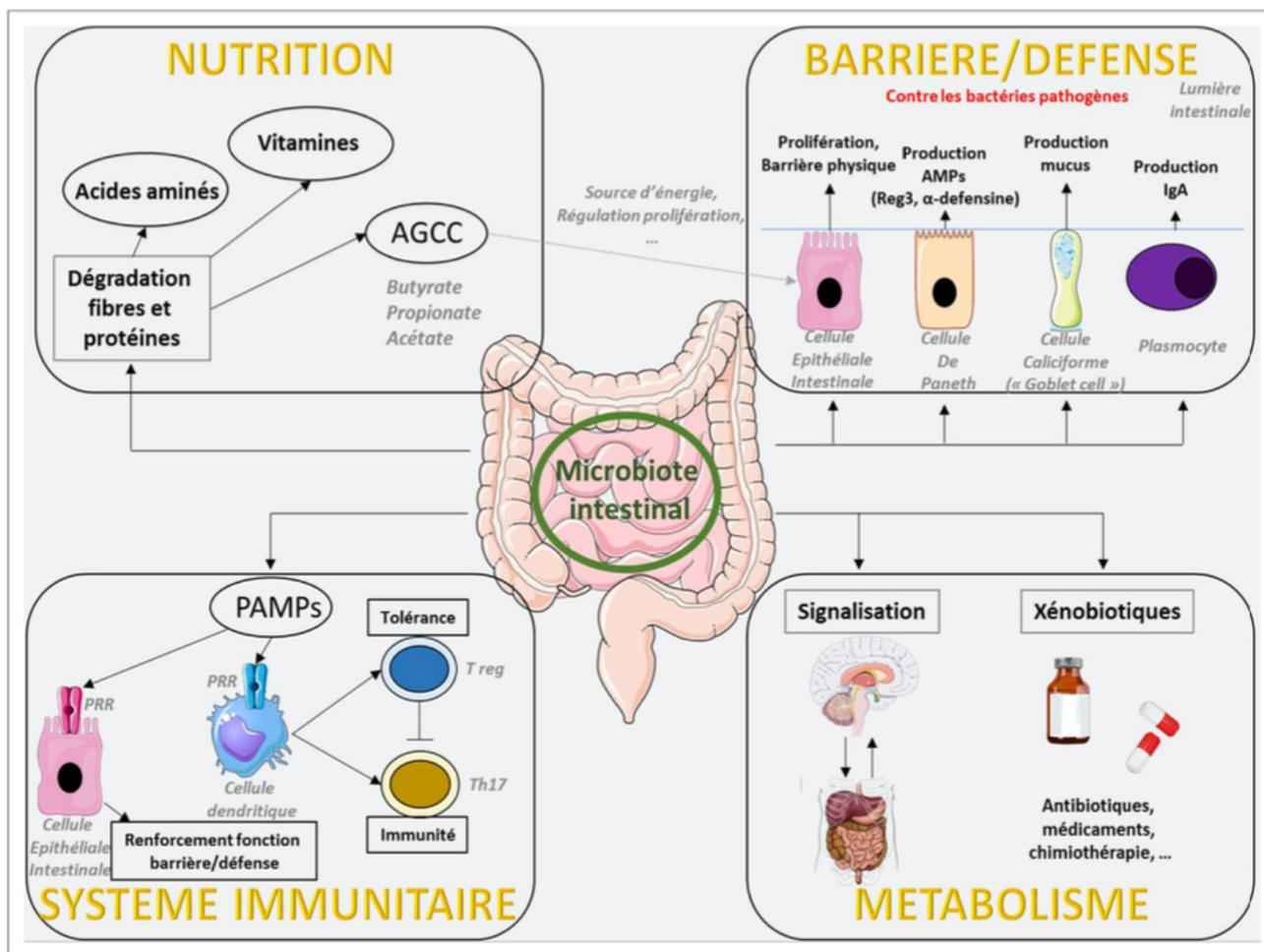


Figure 13 – Schéma simplifié des principales fonction du MI [44].

### 1. Fonctions métaboliques

Le MI est un organe à part entière doté d'une capacité métabolique étendue. Les principales sources d'énergie du MI sont les glucides et les protéines contenues dans les fibres alimentaires non digérées par l'hôte dans le tube digestif supérieur et qui arrivent jusqu'au niveau du côlon. La biotransformation de ces différents substrats permet aux bactéries

d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et génère d'autre part la production de métabolites qui seront absorbés et utilisés par l'hôte.

### *Métabolisme glucidique*

Les AGCC sont les principaux produits finaux du métabolisme bactérien dans le côlon humain. Ils sont formés principalement à partir de précurseurs polysaccharidiques, oligosaccharidiques, protéiques, peptidiques et glycoprotéiques par des micro-organismes anaérobies. Les glucides complexes ayant échappé à la digestion proximale sont les plus importantes sources d'AGCC. Selon les individus et leur régime alimentaire, 10 à 60g de glucides fermentescibles parviennent au niveau du côlon. Certaines bactéries forment une chaîne trophique de dégradation anaérobie des polymères glucidiques en métabolites fermentaires (Figure 14).

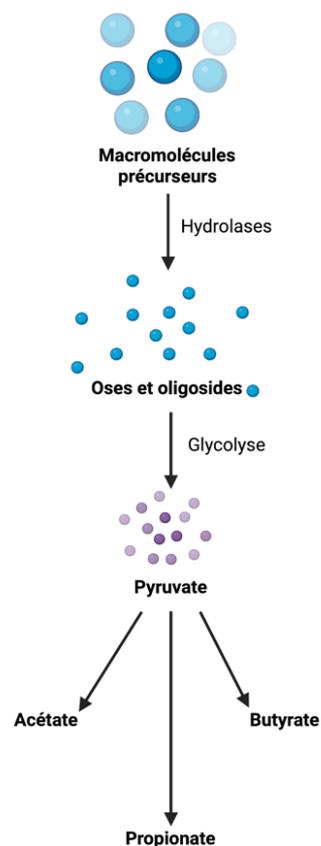


Figure 14 – Schéma de la fermentation des glucides en AGCC (Biorender.com)

Dans un premier temps, des enzymes hydrolytiques bactériennes telles que des polysaccharidases ou des glycosidases, dépolymérisent ces macromolécules en de plus petits fragments : oligosides ou oses. Ces enzymes sont produites par des bactéries fibrinolytiques du microbiote colique appartenant aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. Ces oses sont alors dégradés en pyruvate par la voie de la glycolyse. Le pyruvate est ensuite transformé selon différentes voies métaboliques en AGCC [45]. Les principaux AGCC résultant de la fermentation des glucides et des acides aminés sont l'acétate, le propionate et le butyrate. L'acétate est produit par la majorité des espèces prédominantes du côlon soit *Bacteroides* et *Clostridium* ; le propionate est principalement synthétisé par les espèces du genre *Bacteroides* mais aussi par des *Propionibacterium* et des *Veillonella* ; et enfin, le butyrate est produit par les espèces du genre *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Blautia* et *Faecalibacterium*. Le lactate, l'éthanol et le succinate sont des produits de fermentation intermédiaires qui ne s'accumulent pas de manière substantielle dans l'intestin [45].

Les AGCC sont essentiels [40] : ils sont la principale source d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon. Ils jouent un rôle dans la diminution des dommages causés à l'ADN, dans la régulation de la prolifération bactérienne, dans le maintien de la fonction de barrière et dans l'effet suppresseur de tumeur. Ils ont également un rôle majeur pour les cellules du système immunitaire par induction de l'apoptose, majoration de la phagocytose, modulation du recrutement immunitaire et production de cytokines.

### *Métabolisme lipidique*

Le MI a démontré également son importance dans l'absorption des lipides [46]. La lipase pancréatique est une enzyme produite par les cellules acineuses exocrines du pancréas et par l'épithélium intestinal au niveau des cryptes iléales. Cette enzyme hydrolyse les triglycérides émulsionnés du duodénum en présence de sels biliaires et de colipase, coenzyme essentielle. Cette colipase est sécrétée par le pancréas sous forme inactive en pro-colipase et est activée dans la lumière intestinale par la trypsine. *Bacteroides thetaiotaomicron* augmente l'efficacité de l'hydrolyse des lipides en multipliant par 10 l'expression de la colipase.

### *Métabolisme protéique*

Le MI joue également un rôle important dans le métabolisme protéique [40]. En effet, il produit des protéinases microbiennes qui agissent en synergie avec les protéinases humaines. Au niveau de la surface bactérienne, plusieurs transporteurs d'acides aminés permettent leur entrée dans la bactérie. Dans le cytoplasme bactérien, se trouvent des enzymes permettant la conversion de ces acides aminés en petites molécules de signalisation et en peptides antimicrobiens ou bactériocines. La biodégradation des protéines est fondamentale pour le MI lui-même car les protéines représentent la principale source azotée des bactéries coliques.

### *Autres fonctions métaboliques*

Parmi ses nombreuses autres fonctions métaboliques, le MI semble impliqué dans la synthèse de la vitamine K et de certains composants de la vitamine B. Certains représentants du genre *Bacteroides* sont capables de synthétiser l'acide linoléique conjugué, acide gras polyinsaturé connu pour ses propriétés anti-diabétogène, anti-cancérogène, anti-athérogène, anti-obésogène, hypolipidémique et immunomodulatrices [47]. Des bactéries productrices d'acides biliaires secondaires ont été isolées des matières fécales humaines [48]. Parmi ces bactéries, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides fragilis* et *Escherichia coli* possèdent des capacités de conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires (désoxycholique et lithocholique) au niveau du côlon humain. Le MI est également impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques tels que les pesticides et les médicaments, notamment certains antibiotiques. Dernièrement, des études ont démontrés l'implication du MI dans la réponse aux traitements par chimiothérapies et d'immunothérapie [44].

## **2. Fonctions protectrices**

Le tractus digestif est un lieu de passage pour la grande majorité des éléments de l'environnement avec lesquels l'être humain interagit. Il est donc souvent le site primaire des infections. Un équilibre délicat existe entre le MI et le système immunitaire : ce dernier doit être capable d'éliminer les agents pathogènes tout en maintenant une tolérance face aux

micro-organismes commensaux. Le MI contribue en retour à la régulation de l'homéostasie immunitaire.

Les mécanismes immunitaires situés au niveau de l'intestin sont en grande partie des mécanismes régulateurs, non inflammatoires permettant de ne pas engendrer une réaction systémique. En effet, les IgA de type sécrétoires (IgAs) n'activent pas le complément, les principales cytokines de la muqueuse sont immunosuppressives (TGF- $\beta$ , IL-10) et les cellules dendritiques situées à l'interface digestive favorisent les réponses tolérogènes [40].

### *Fonction de barrière*

Au niveau intestinal, les cellules épithéliales forment une barrière muqueuse. Les entérocytes possèdent des jonctions serrées avec les cellules avoisinantes afin d'éviter la pénétration et la colonisation microbienne. Les entérocytes sont essentiels dans la réponse immunitaire innée et adaptative via l'expression de récepteurs de reconnaissance des structures de surface microbienne (TLR, NLR...), la synthèse de cytokines, de chémokines et de peptides antimicrobiens [40]. Le MI est étroitement associé à cette barrière physique muqueuse.

Le mucus représente le principal bouclier limitant le contact entre le MI et le tissu hôte et empêchant la translocation bactérienne. C'est un gel visqueux recouvrant la surface des cellules épithéliales intestinales, produit par les cellules caliciformes (*goblet cells*) intestinales. Il assure une fonction de barrière physique, car sa composition le rend plus ou moins perméable, mais également de barrière chimique, car il contient des molécules antimicrobiennes sécrétées par les cellules épithéliales. Il est formé de deux couches : une fine monocouche dynamique, tapissant la surface épithéliale et colonisée par la flore microbienne dont certaines espèces mucinolytiques participent à son renouvellement ; une couche interne très dense et ne contenant aucun micro-organisme. Cette compartimentalisation participe à la protection de l'épithélium en minimisant le contact avec le MI [40, 49].

### *Protéines antimicrobiennes*

En plus de la production de mucus par les cellules caliciformes, toutes les lignées cellulaires épithéliales intestinales peuvent produire des peptides antimicrobiens (AMP) qui

jouent un rôle important dans la limitation de la pénétration des micro-organismes dans la muqueuse intestinale.

Les cellules de Paneth, autres cellules épithéliales retrouvées à la surface intestinale, moins abondantes, limitent la pénétration microbienne. Ce sont des cellules sécrétoires situées au fond des cryptes spécifiques de la muqueuse intestinales, les cryptes de Lieberkühn. Elles sont limitées à l'intestin grêle et sont absentes dans le côlon : cette distribution sera responsable d'un gradient de densité et de diversité bactérienne tout le long du tractus digestif [50, 51]. La principale fonction de ces cellules consiste en la sécrétion d'AMP tels que les cathélicidines, les lectines de type C et les défensines (Figure 15). Le MI induit leur synthèse via un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor ou PRR) présent à la surface des cellules de Paneth. Les PRR sont activés par des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes (PAMPs) tels que le peptidoglycane et le LPS, la flagelline, les mannanes fongiques, les acides nucléiques microbiens, le mannose... La liaison PRR-PAMP entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation essentielles à la fonction de barrière muqueuse et à la production d'AMP, de mucines et d'IgA.

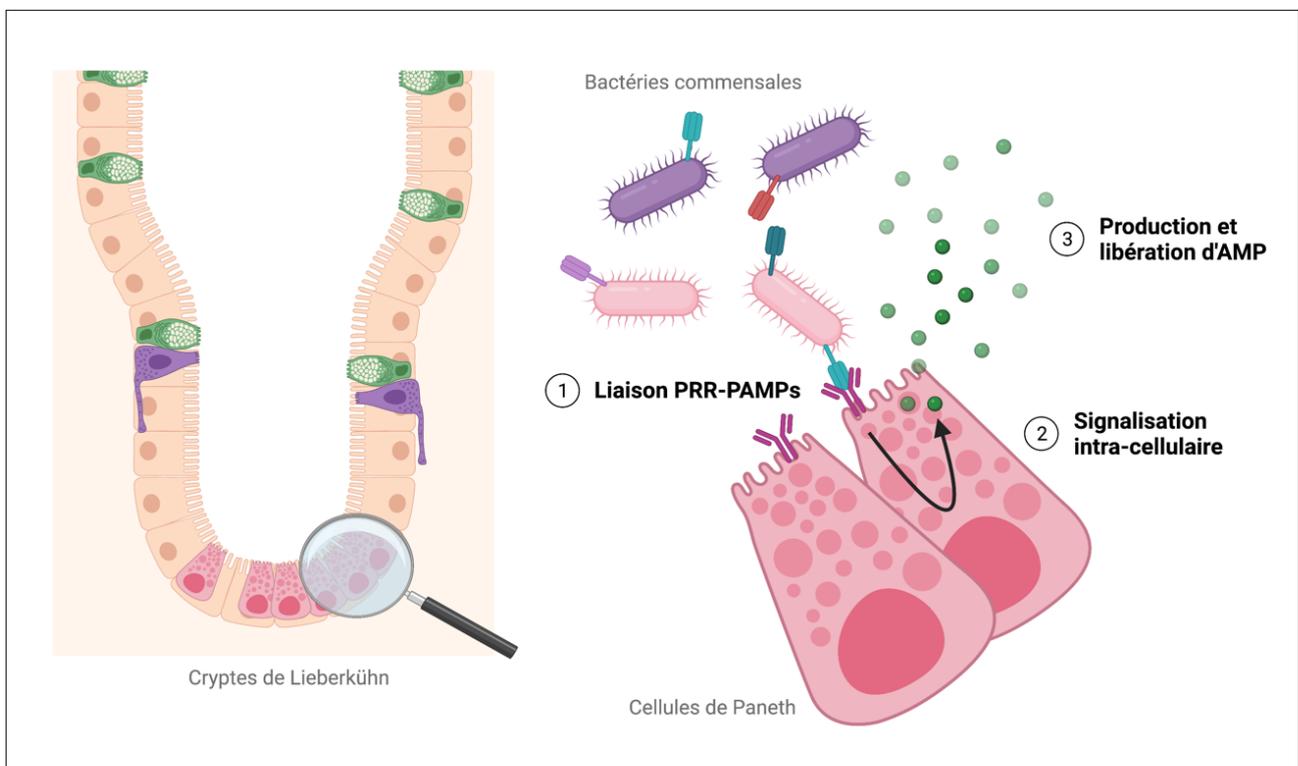


Figure 15 – **Production et sécrétion d'AMP par les cellules de Paneth situées au fond des cryptes de Lieberkühn.** L'interaction entre les micro-organismes commensaux du tractus digestif et les cellules de Paneth entraîne l'activation de voies de signalisation permettant la production et la sécrétion d'AMP (Biorender.com).

Les souris déficientes en protéines impliquées dans la reconnaissance microbienne, telles que Nod2 et l'adaptateur de signalisation TLR MyD88, ont une production altérée d'AMP, en particulier par les cellules de Paneth de l'intestin grêle [52]. Par conséquent, ces souris déficientes ont des charges bactériennes plus importantes au sein de leur tractus digestif ainsi que des bactéries en contact direct avec l'épithélium intestinal. La fonction de barrière épithéliale est altérée et ces souris ont un risque plus élevé de translocation bactérienne.

Chez les mammifères, les défensines constituent un groupe d'AMP majeur. Trois groupes de défensines sont différenciés : les  $\alpha$ -défensines, les  $\beta$ -défensines et les  $\theta$ -défensines [53]. Les  $\alpha$ -défensines sont fortement exprimées et cantonnées au niveau de l'intestin grêle et les  $\beta$ -défensines peuvent être exprimées au niveau de plusieurs sites : leur expression est inductible au niveau des sites d'infection ou d'inflammation. Les défensines sont bactéricides. Certaines possèdent également une activité antifongique, antivirale et antiparasitaire. Concernant l'activité antibactérienne de ces défensines, elles semblent entraîner la perturbation de l'intégrité de la membrane bactérienne par interaction avec des groupes phospholipidiques chargés négativement au niveau de la membrane externe des bactéries. Cette interaction affaiblit la membrane et provoque sa désintégration en de nombreuses vésicules.

### *Immunomodulation*

Le MI joue un rôle dans l'immunomodulation intestinale en coalition avec les systèmes immunitaires inné et adaptatif [54]. Au niveau du système immunitaire, les éléments participant au processus d'immunomodulation comprennent notamment les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), les LT effecteurs et régulateurs et les plasmocytes producteurs d'IgAs. Le MALT correspond à l'ensemble des tissus lymphoïdes non encapsulés dans des organes et associés aux muqueuses. Ce système est considéré comme étant un organe lymphoïde secondaire permettant la protection des muqueuses, sites critiques pour l'entrée des pathogènes dans l'organisme. Au niveau intestinal, il est également nommé GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) et se divise en plusieurs parties : des sites effecteurs disséminés au sein de l'épithélium et de la *lamina propria* constitués par des

lymphocytes et des tissus organisés responsables de la phase d'induction de la réponse immunitaire, les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques. Les plaques de Peyer, situées essentiellement au niveau de l'iléum, sont constituées de grands follicules de cellules B et de zones de cellules T intermédiaires. Ces zones lymphoïdes sont séparées de la lumière intestinale par une couche unique de cellules épithéliales : l'épithélium associé au follicule (EAF). Cet EAF possède une bordure en brosse moins prononcée et est infiltré par de nombreux LB, LT, macrophages et CD. Il possède des cellules M (cellules Microfolds), entérocytes spécialisés capables de transférer les pathogènes et antigènes présents dans la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde sous-épithélial. Les cellules M sont des acteurs essentiels de l'immunité innée, elles sont le principal moyen par lequel les antigènes complexes peuvent accéder au système immunitaire intestinal (Figure 16). Elles transmettent l'antigène intact aux CPA présentes au niveau de l'épithélium ou dans la région sous-épithéliale. Ces dernières, principalement les CD épithéliales, se déplacent vers les zones des LB et LT naïfs au niveau des plaques de Peyer. Les LB subissent un changement de classe d'immunoglobulines : de l'expression des IgM aux IgA sous l'influence de plusieurs facteurs locaux. Les LB activés migrent vers les ganglions pour une étape de différenciation et s'accumulent ensuite au niveau de la muqueuse intestinale [54].

A la naissance, les muqueuses intestinales sont quasiment vides d'un point de vue microbiologique et immunologique [50]. Il existe peu de cellules immunitaires présentes à la surface intestinale, quelques LB et LT inducteurs sont situés au niveau de sites prédéterminés à l'origine des plaques de Peyer. Les ganglions mésentériques sont de petite taille, non activés. Les bactéries commensales colonisant le tractus digestif vont coopérer avec le système immunitaire dès la naissance et tout au long de la vie. Dans un premier temps, cette symbiose va permettre la mise en place des structures immunitaires puis elle permettra le maintien de cet équilibre. A la suite de contacts antigéniques, la taille des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques va progressivement augmenter. Les antigènes, appartenant essentiellement aux micro-organismes colonisant les muqueuses intestinales, favorisent des réponses immunitaires tolérogènes ou inflammatoires rapidement régulées permettant ainsi la limitation du développement bactérien.

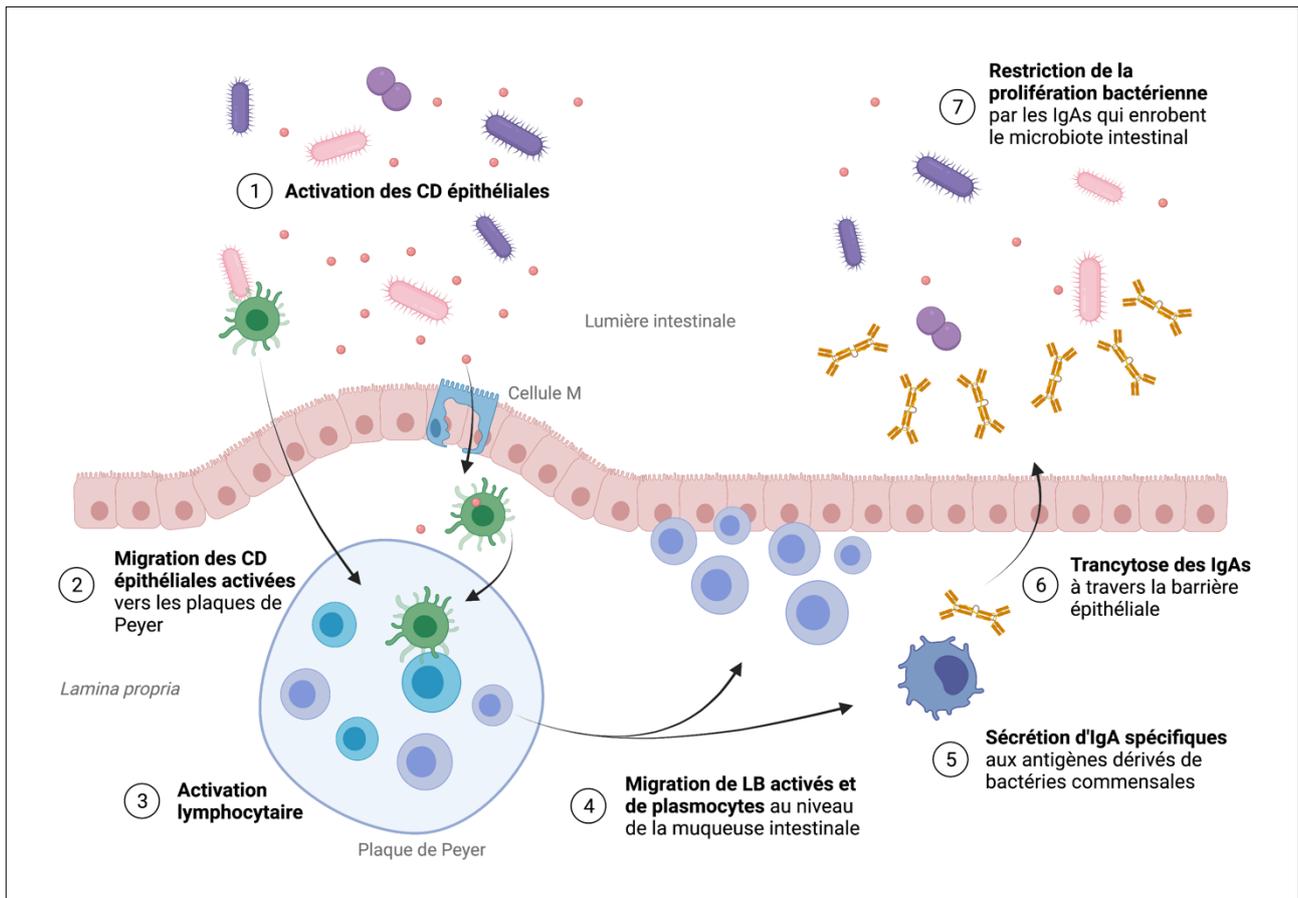


Figure 16 – Rôle immunomodulateur du MI (Biorender.com, inspirée de [54]). Les CD épithéliales sont activées par interaction avec le MI. Elles migrent ensuite vers les plaques de Peyer où elles permettent l'activation des LT et LB naïfs présents. Les LB activées et les plasmocytes migrent et s'accumulent au niveau de l'épithélium intestinal. Les plasmocytes sécrètent alors des IgA spécifiques aux antigènes présentés par les CD. Ces IgAs sont ensuite transcytosées au niveau de la lumière intestinal et enrobent le MI, empêchant ainsi la translocation de micro-organismes vers la circulation sanguine.

La compartimentalisation des bactéries intestinales dépend également des IgAs [40, 55]. Les bactéries du MI, en particulier les bactéries à Gram négatif comme les *Bacteroides*, vont activer les CD épithéliales qui vont ensuite interagir avec les LT et LB des plaques de Peyer (Figure 16). Les plasmocytes qui découlent de l'activation lymphocytaire migrent vers la lamina propria intestinale et sécrètent des IgAs qui seront transcytosées à travers les cellules épithéliales. Ces IgAs enrobent ensuite le MI. Les IgAs jouent un rôle sur l'expression des gènes commensaux et empêchent l'adhésion des bactéries commensales aux surfaces épithéliales. Elles restreignent ainsi la translocation du MI vers la circulation sanguine.

Les bactéries commensales qui arrivent à traverser la barrière cellulaire épithéliale peuvent rapidement être phagocytées et éliminées par les macrophages présents au niveau

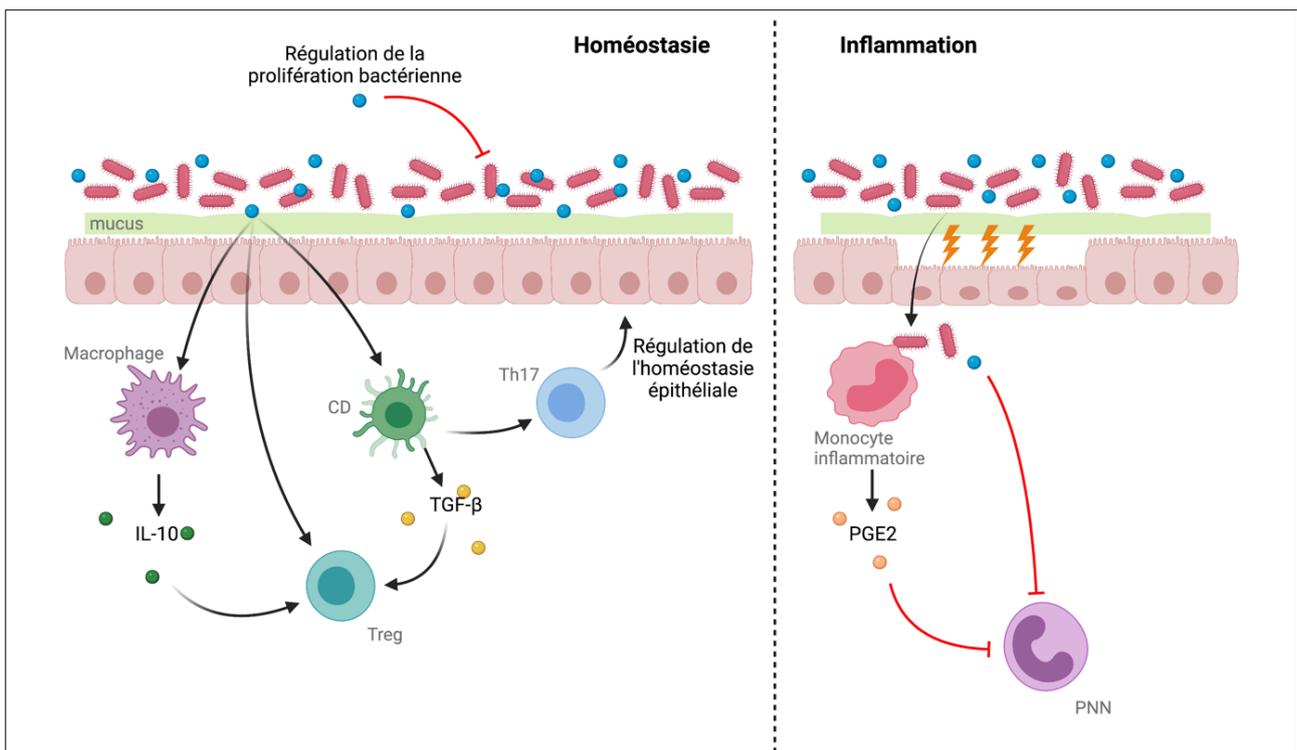
de la *lamina propria* ; ou transportées vivantes par les CD vers les ganglions mésentériques intestinaux via les ganglions lymphatiques intestinaux. Cette mise en contact directe avec les cellules immunitaires adaptatives va permettre une réponse d'IgA compartimentée muqueuse [55]. Cette réponse IgA, sans mémoire classique, est capable de répondre au flux de la composition du MI. Il existe une adaptation du système immunitaire permettant de mieux répondre à un microbiote en constante évolution.

Les LT régulateurs (Treg) occupent une place centrale dans le maintien de l'homéostasie à l'interface entre le MI et l'épithélium. Ces cellules se différencient dans le thymus. Une perturbation des Treg différenciés Foxp3+ entraîne une perte de la tolérance immunitaire et le développement de réponses effectrices aberrantes au niveau de l'intestin. L'environnement du tractus gastro-intestinal est un site privilégié pour l'induction des Treg en réponse aux antigènes oraux [55]. La relation entre le système immunitaire et le MI a longtemps été étudiée. Ces études ont montré des activités immunomodulatrices directes ou indirectes du microbiote et de leurs métabolites.

Plusieurs groupes de bactéries ont été identifiés dans l'étude de Reading et Kasper en 2011 [56] comme ayant un impact immunomodulateur sur leur hôte. *Bacteroides* est un genre bactérien capable de produire de multiples polysaccharides capsulaires, importants pour la colonisation commensale de l'intestin. *B. fragilis* en produit huit dont le polysaccharide A (PSA) qui possède des propriétés immunomodulatrices et est impliqué dans le commensalisme. Il a été démontré que la colonisation par *B. fragilis* d'une souris axénique favorise l'expansion des LT CD4+, corrige l'épuisement des zones lymphocytaires spléniques et corrige les déséquilibres Th1/Th2 en réduisant la production d'IL-4 et en augmentant la production d'IFN- $\gamma$ . Cette dernière propriété est attribuée directement au PSA, puisqu'une colonisation par un *B. fragilis* ne produisant pas de PSA ne permet pas la correction du déséquilibre Th1/Th2. Cette bactérie est également capable de promouvoir la fonction et l'induction des Treg via l'engagement du PSA avec le TLR exprimé par les LT [55]. L'induction des cellules Treg n'est pas limitée à *B. fragilis*, les bactéries du genre *Clostridium* et apparentées favorisent également l'accumulation de Treg par leur capacité à créer un environnement riche en TGF- $\beta$  et par leur production en butyrate qui régule le réseau des Treg en favorisant leur induction [55]. Le MI est ainsi un acteur majeur dans la formation du répertoire, du nombre et de l'activation des Treg résidents dans les tissus. La pression de l'abondance bactérienne

intestinale conduit au maintien d'un pool de cellules Treg activées qui contribueraient au maintien d'une relation mutualiste avec le microbiote et au contrôle systémique des réponses immunitaires [55].

Les micro-organismes commensaux possèdent un rôle protecteur. L'activation des TLR par le MI est nécessaire pour favoriser la réparation des tissus lors d'une blessure aigüe. Le MI permet la régulation de la réponse immunitaire dans un contexte d'inflammation (Figure 17). Au cours de l'inflammation de la muqueuse, les monocytes inflammatoires rencontrent le MI du tractus digestif ce qui favorise la production de prostaglandine E2 (PGE2). Ce médiateur lipidique limite le niveau d'activation des PNN endommageant les tissus. Les métabolites issus des bactéries agissent directement ou indirectement en contrôlant la fonction des cellules inflammatoires. En effet, la reconnaissance des AGCC par les cellules immunitaires innées est essentielle dans la régulation de cette inflammation.



**Figure 17 – Régulation immunitaire par le MI en état d'équilibre et au cours d'une inflammation** (Biorender.com, inspirée de [55]).

A gauche, en situation d'équilibre, les commensaux favorisent l'induction de Treg et de cellules Th17 qui régulent à leur tour la fonction et l'homéostasie des cellules épithéliales. Ces Treg peuvent être directement activés par le MI ou bien par le biais de macrophages ou de CD. Les métabolites dérivés du MI régulent directement la prolifération bactérienne.

A droite, en contexte d'inflammation, l'interaction du MI avec les monocytes inflammatoires entraînent la production de PGE2 (prostaglandine E2) qui limite l'activation des PNN. Ces PNN sont également directement régulés par le MI.

*Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont fréquemment retrouvés dans la composition de probiotiques. Ces genres bactériens possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Au niveau de la muqueuse intestinale, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent supprimer la transcription et/ou la traduction de certains facteurs inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , le NF- $\kappa$ B et l'IL-6. En parallèle, elles induisent la production de Treg [56, 57].

La grande majorité des données sur les relations entre le MI et le système immunitaire provient de l'étude de la composante bactérienne de cette flore. D'autres micro-organismes tels que les champignons et les virus sont également susceptibles d'impacter les réactions immunitaires.

#### Contrôle des agents pathogènes par le microbiote intestinal par des interactions directes

Les agents pathogènes et les bactéries commensales nécessitent des niches écologiques similaires afin de coloniser et proliférer dans l'intestin. Des mécanismes de compétition entre les différentes espèces vont donc se mettre en place dans un processus appelé « résistance à la colonisation » [55]. Les membres du MI, déjà sur place, occupent l'espace et les récepteurs, limitant l'accès aux espèces environnementales apportées notamment par l'alimentation. Une forme de défense du microbiote face aux germes potentiellement pathogènes consiste en la consommation préférentielle des nutriments nécessaires pour la croissance de bactéries pathogènes concurrentes. Ainsi un *E. coli* commensal sera en compétition avec un *E. coli* entérohémorragique (EHEC) pour les acides organiques, les acides aminés et d'autres nutriments. En consommant préférentiellement ces ressources disponibles en quantité limitée dans l'intestin, le MI provoque la « famine » de l'espèce concurrente potentiellement pathogène. L'oxygène ambiant est requis pour la sécrétion du facteur de virulence par *Shigella* spp. La consommation d'oxygène résiduel par les anaérobies facultatifs commensaux, tels que les entérobactéries, peut conduire à une expression incomplète de ce facteur de virulence dans la lumière intestinale.

Par la production de métabolites, les bactéries commensales peuvent également affecter la virulence des agents pathogènes en modifiant les conditions environnementales de l'hôte comme le pH, ce qui bloque la colonisation par des agents pathogènes [52]. Par exemple, le genre *Bifidobacterium* contient la propagation de certains pathogènes intestinaux

par acidification de l'environnement. D'autre part, les AGCC générés par le MI sont impliqués dans le processus de « résistance à la colonisation ». Le butyrate possède une action directe sur les agents pathogènes en permettant la régulation à la baisse de leurs gènes de virulence. Les AGCC permettent également l'altération du pH local et inhibent ainsi la croissance de certains germes pathogènes. Certaines bactéries commensales produisent des AMP qui affectent la croissance ou la survie des agents pathogènes, telles que les bactériocines permettant l'inhibition spécifique de la croissance des membres d'espèces bactériennes identiques ou similaires. C'est le cas pour *E. coli* qui produit une bactériocine inhibant directement la croissance des EHEC. *Staphylococcus epidermidis* produit plusieurs protéines et protéases antimicrobiennes limitant la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus*. Le fucose, dérivé de la mucine de l'hôte et généré par des bactéries exprimant une fucosidase comme *B. thetaiotaomicron*, module l'expression du facteur de virulence Ler, important régulateur du locus d'attachement-effacement des entérocytes chez EHEC [52, 55].

#### Contrôle des agents pathogènes par le microbiote intestinal par stimulation du système immunitaire

Comme vu précédemment, les commensaux jouent un rôle fondamental dans la stimulation du système immunitaire et dans sa régulation. Effectivement, le MI est capable de conditionner les cellules immunitaires pour répondre à une menace d'infection. Le MI contrôle par exemple la production d'IL-1 $\beta$ , cytokine impliquée dans la défense de l'hôte. Il permet la production homéostatique de pro-IL-1 $\beta$  par les macrophages résidents intestinaux préparant ainsi les cellules à répondre rapidement aux infections entériques par conversion de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  active mature [58].

Les commensaux et les micro-organismes pathogènes interagissent avec le système immunitaire de l'hôte par le biais de ligands conservés qui sont des caractéristiques immuables des micro-organismes. Bon nombre de ces ligands émettent des signaux via les familles de TLR et NLR. Par exemple, la flagelline, une protéine structurale qui forme la partie principale des flagelles, favorise la chimiotaxie bactérienne, l'adhésion et l'invasion du tissu hôte par des bactéries pathogènes. La flagelline est exprimée par un grand nombre de bactéries commensales. L'interaction de cette flagelline commensale avec le récepteur TLR-5, en particulier dans un contexte de brèche de la barrière, joue un rôle important dans la promotion de l'immunité muqueuse. En effet, les CD de la *lamina propria* de l'intestin sont

prêtes à répondre à cette flagelline par expression rapide de chimiokines, d'AMP ainsi que de cytokines impliquées dans l'initiation des réponses immunitaires.

Le MI est un organe capable d'induire une immunité adaptative. Cette affirmation a pu être établie dès les premières études sur l'effet du MI sur le système immunitaire qui ont montré une altération significative des réponses immunitaires de l'hôte aux agents pathogènes chez des souris traitées avec des antibiotiques ou bien élevées en conditions axéniques [59, 60]. En 2008, Hall et son équipe [60] ont mis en évidence que les réponses protectrices Th1 et Th17 étaient affectées voire inexistantes contre une infection parasitaire chez les souris axéniques. L'équipe d'Ivanov [61], un an plus tard, a montré que les réponses immunitaires étaient compromises sans micro-organismes commensaux : les réponses protectrices Th17 ne se développaient pas suite à une infection bactérienne.

Parmi les micro-organismes influençant le développement et le fonctionnement du système immunitaire, les bactéries filamenteuses segmentées (SFB) font partie des « espèces clés » [60]. Ces bactéries anaérobies à Gram positif colonisent l'iléon terminal et sont des modulateurs majeurs des réponses immunitaires : elles induisent l'expression de gènes pro-inflammatoires ainsi que la production de sérum amyloïde A (SAA). SAA agit sur les CD de la *lamina propria* qui induisent la différenciation des cellules Th17. Ces espèces bactériennes adhèrent étroitement à l'épithélium intestinal. Leur abondance est corrélée à une colonisation et à une croissance réduites des bactéries pathogènes, ce qui suggère que les microbes commensaux dont les SFB contribuent à la protection des muqueuses intestinales à médiation cellulaire Th17. Dans des conditions d'équilibre, ces « espèces clés » permettent de contrôler les microbes invasifs et/ou pro-inflammatoires, pouvant avoir des conséquences pathologiques locales et systémiques.

Le MI est un composite hautement dynamique et complexe de micro-organismes exprimant un grand nombre de ligands et de métabolites potentiels. Des signaux inflammatoires et régulateurs sont constamment présents au sein du tractus digestif. C'est la somme de ces signaux et la composition du MI qui conduit à l'établissement d'une inflammation contrôlée compatible avec l'immunité tissulaire physiologique locale.

Si un état de normobiose, c'est-à-dire d'équilibre du MI, est indispensable au bon déroulement de l'ensemble des métabolismes de l'hôte, de nombreux facteurs peuvent avoir un impact sur l'écosystème intestinal et entraîner un déséquilibre que l'on appelle dysbiose.

## C. DYSBIOSE INTESTINALE

Certains facteurs liés à l'hôte ou à son environnement tels que l'âge, les facteurs génétiques, la prise de médicaments (en particulier les antibiotiques) ou encore le régime alimentaire peuvent modifier l'environnement digestif et impacter directement ou indirectement la composition du MI [62]. Ces variations peuvent être physiologiques et sans impact pour la santé de l'hôte. Cependant, certains changements dans la composition microbienne conduisent à une perturbation de l'homéostasie commensale entre l'hôte et le MI (dysbiose intestinale). Bien qu'un phénomène de résilience du MI, c'est-à-dire de retour à l'équilibre après un événement perturbateur, soit clairement reconnu, celui-ci n'est pas systématique ni forcément complet [63].

### 1. Principales causes de dysbiose intestinale

La dysbiose fait suite à un événement perturbateur venant rompre l'équilibre microbiote-hôte. Cette altération de composition peut être provoquée par divers facteurs endogènes, liés à l'hôte tels que le temps de transit, le pH intestinal, le terrain génétique, l'état de stress, l'état de santé..., ou des facteurs environnementaux, exogènes comme des changements de régime alimentaire ou la prise de médicaments dont les antibiotiques [63, 64].

#### *Les changements de régime alimentaire*

Les facteurs environnementaux y compris le régime alimentaire, peuvent façonner la composition de la communauté microbienne intestinale. Plusieurs études ont démontré le lien entre la composition du MI, la dysbiose et le régime alimentaire [65, 66]. La plupart des modifications alimentaires liées aux événements de la vie de chaque individu ne s'accompagnent pas de modifications pathologiques de composition. Une dysbiose apparaîtra lors de changements extrêmes de régime tels que le jeûne ou l'adoption d'un régime alimentaire dépourvu de fibres et/ou très riche en graisse. Les espèces bactériennes majoritaires seront les espèces capables de métaboliser le mieux les substrats alimentaires mis à disposition par l'hôte. Un régime riche en protéines augmente la diversité bactérienne

du MI, un régime pauvre en graisse favorise le développement de bactéries du genre *Bifidobacterium*, un régime riche en acides gras saturés augmente l'abondance relative de *Faecalibacterium prausnitzii* et diminue celle des bactéries du genre *Bacteroides* [67]. Concernant les effets des régimes végétariens ou végétaliens sur le MI, bien qu'ils soient encore aujourd'hui incertains, il a été montré que la diversité bactérienne était diminuée. De même, les régimes sans gluten qui semblent induire une diminution des abondances relatives de bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* au détriment de bactéries potentiellement pathogènes telles que *E. coli* ou d'autres entérobactéries pro-inflammatoires. Les apports nutritionnels sont également déterminants dans la composition et la maturation du MI. La malnutrition aiguë sévère conduit à un appauvrissement de l'ensemble des bactéries et plus particulièrement des bactéries anaérobies ainsi qu'à un risque d'infections entériques et systémiques accru [68].

Le MI jouant un rôle essentiel dans l'absorption des glucides et des lipides ainsi que dans la régulation du stockage des graisses, son implication dans l'obésité a largement été démontré [63] et certaines études seront détaillées dans le paragraphe suivant. Étant donné l'importance des comorbidités associées à l'obésité (diabète, pathologies cardiovasculaires...), le MI représente donc actuellement une nouvelle cible thérapeutique très clairement pertinente.

### *Les traitements médicamenteux, les antibiotiques*

Les médicaments ciblant l'intestin comme ceux jouant sur le transit vont avoir des répercussions sur la composition du MI. Les médicaments les plus impactant sont les antibiotiques qui, en fonction de leur spectre, vont avoir une action plus ou moins néfaste sur l'ensemble des microbiotes de l'hôte. Le MI est particulièrement touché puisqu'il abrite à lui seul une grande majorité des micro-organismes et que les antibiotiques, majoritairement administrés par voie orale, sont souvent en contact direct avec le tractus digestif. L'effet sur le MI et la persistance de cet effet dans le temps vont être plus ou moins importants en fonction de la molécule et de son spectre. Par exemple, une étude menée par Rashid *et al.* [69] a montré que l'exposition à la ciprofloxacine ou à la clindamycine a un impact important sur la diversité du MI et que les changements dans la composition microbienne persistaient au moins 12 mois. Pour les deux antibiotiques, une diminution des bifidobactéries a été

rapidement observée, ce qui est problématique car ces bactéries jouent un rôle important, notamment dans la prévention de l'infection à *C. difficile*. Au cours d'une antibiothérapie, il y a une réduction significative des bactéries au sein du MI ainsi que des modifications quantitatives et qualitatives de la diversité bactérienne. La colite à *C. difficile* est un exemple emblématique du rôle des traitements médicamenteux et notamment des traitements antibiotiques dans la perturbation du MI [70, 71]. Cette bactérie est un modèle de bactérie commensale pouvant devenir pathogène à l'occasion d'une dysbiose secondaire à la prise d'antibiotiques.

### *Les pathologies digestives*

Les infections gastro-intestinales bactériennes ou virales peuvent également engendrer une modification de composition du MI [72]. En effet, l'implantation et la multiplication d'un agent pathogène dans le tractus digestif provoque un rapport de force entre les micro-organismes commensaux et cet agent pathogène : certaines espèces bénéfiques diminuent au profit de l'agent infectieux, également appelé pathobionte. La plupart des infections gastro-intestinales n'induisent que transitoirement cette dysbiose : après élimination du pathogène par le système immunitaire, le MI retourne spontanément à un état d'équilibre.

Par ailleurs, les maladies inflammatoires du système digestif, telles que les MICI, sont également associées à une dysbiose intestinale mais de plus en plus de données, qui seront présentées dans un paragraphe ultérieur, montrent que cette dysbiose serait à la fois une cause de la pathologie observée mais aussi une conséquence de l'inflammation intestinale. Des travaux de transfert de flore par coprophagie ont ainsi montré dans un modèle murin de rectocolite hémorragique (RCH) que le phénotype colitogène était transférable à des souris sauvages élevées dans la même cage par le biais du MI (Figure 18 – A) [63].

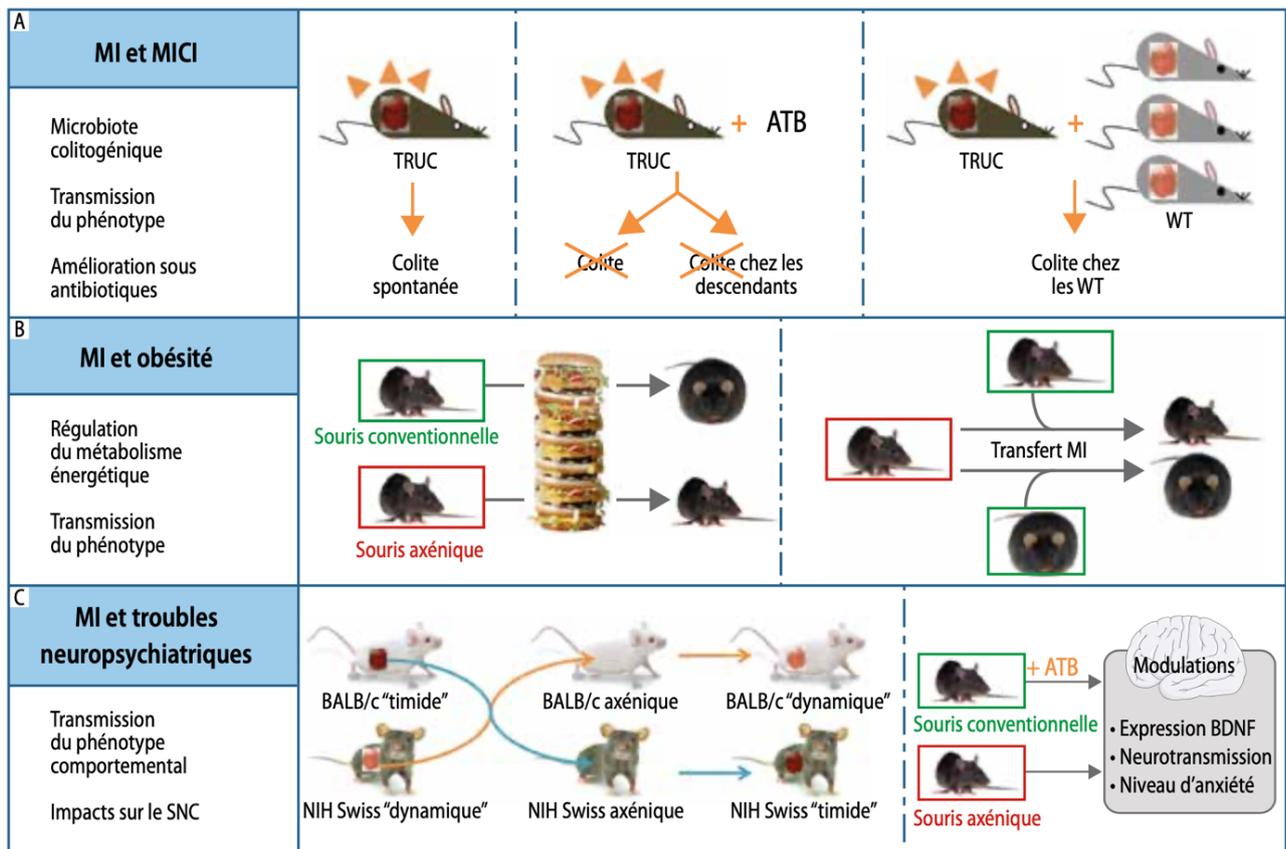


Figure 18 – **Observations initiales reliant le MI et les MICI (A), l’obésité (B) et les troubles neuropsychiatriques (C) [63].** A : Utilisation d’un modèle murin de RCH (souris TRUC : T-bet  $-/-$  RAG2  $-/-$  Ulcerative Colitis). B : Absence d’augmentation du poids chez des souris axéniques en comparaison à des souris conventionnelles. Transfert de phénotype obèse/non obèse à des souris axéniques par le biais du MI. C : Transfert de phénotype comportemental de 2 souches de souris (BALB/c et NIH Swiss) par le biais du MI. Perturbations des taux de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) cérébral et augmentation de l’anxiété chez des souris axéniques ou des souris conventionnelles traitées par antibiotiques (ATB).

## 2. Conséquences de la dysbiose intestinale

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont exploré la composition du MI de patients atteints de diverses pathologies afin d’identifier des espèces ou des groupes bactériens dont l’abondance relative serait liée à la pathologie étudiée. Le MI joue un rôle essentiel dans le développement et/ou l’aggravation de certaines pathologies digestives ou non digestives [73]. Dans certaines pathologies, ce rôle a clairement été établi alors que dans d’autres, il est encore trop tôt pour dire si la dysbiose observée est une des causes ou une des conséquences de la pathologie étudiée. De nombreuses études restent à venir pour pouvoir répondre au mieux à ces interrogations.

### *Les maladies intestinales*

L'instabilité du MI semble être un facteur prédisposant au développement de nombreuses pathologies digestives dont les MICI, le SCI, les allergies alimentaires, le cancer colorectal, les maladies métaboliques...

Les MICI sont un ensemble de pathologies caractérisées par une inflammation chronique du tractus digestif et plus particulièrement du côlon. Les deux principales affections sont la maladie de Crohn (MC) et la RCH. L'apparition d'une MICI est un processus complexe résultant de la combinaison de nombreux facteurs génétiques et environnementaux dont le MI. Chez les patients souffrant d'une MICI, il a été observé un MI altéré avec une réduction de la diversité bactérienne. Dans la MC, le MI est caractérisé par une augmentation des abondances relatives des protéobactéries, *E. coli* entéroinvasifs et *Campylobacter concisus* entre autres, et une diminution des *Firmicutes* et notamment de *F. prausnitzii*. Cette espèce possède certaines propriétés bénéfiques au sein du MI dont la capacité de synthétiser de grandes quantités de butyrate ainsi que des effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs. Bien que ces changements peuvent être le résultat de l'augmentation de l'inflammation, ils peuvent également en être la cause et être impliqués en amont dans la pathogénèse de la maladie [66, 74].

Le SCI est un trouble gastro-intestinal chronique. L'origine de ce trouble est la conséquence de la combinaison de plusieurs facteurs. La dysbiose intestinale semble jouer un rôle dans l'inflammation de bas grade caractéristique du SCI [66]. De plus, des altérations du MI sont en lien avec le changement d'expression de gènes de l'hôte impliqués dans la synthèse des acides aminés, l'intégrité des jonctions intercellulaires et la réponse inflammatoire suggérant ainsi que la dysbiose intestinale induit une altération de la fonction barrière de l'épithélium digestif.

### *Les maladies extra-intestinales*

L'obésité et les comorbidités associées telles que le diabète, le syndrome métabolique et les maladies cardio-vasculaires, ont un effet néfaste sur la santé et la qualité de vie de nombreuses personnes. Il est important de comprendre les facteurs prédisposant ces pathologies afin de les prévenir.

L'obésité est fréquemment associée à une diminution de la diversité microbienne avec une diminution des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* au détriment des micro-organismes pathogènes [33]. Bäckhed *et al.* [33] ont montré qu'en transférant les MI de souris obèses à des souris axéniques, l'extraction énergétique des aliments ingérés était nettement supérieure à celle induite par le transfert des MI de souris minces (Figure 18 – B). Les hypothèses mécanistiques expliquant ce phénomène sont diverses, parmi lesquelles i) une dysbiose liée à une alimentation trop riche favorisant certains *Firmicutes* spécialisés dans le stockage des graisses, ii) une inhibition de l'expression de la protéine FAF (*Fasting induced Adipocyte Factor*) qui a notamment pour fonction d'inhiber la lipoprotéine lipase, conduisant à une augmentation du stockage des triglycérides dans les adipocytes, iii) une induction de la lipogénèse hépatique via une surexpression des enzymes lipogéniques ou iv) l'augmentation de la perméabilité intestinale en lien avec une alimentation trop riche (diminution de l'expression des occludines) et menant à une endotoxémie [63]. Le LPS circulant serait impliqué dans un phénomène d'inflammation chronique systémique à bas bruit perturbant l'absorption des lipides et favorisant l'insulino-résistance, ainsi que dans une dérégulation de l'adipogénèse par la voie des endocannabinoïdes.

Le diabète de type II (DT2) est également un problème de santé majeur résultant notamment de la résistance à l'insuline liée à l'obésité. Un certain nombre d'études montre que le MI est altéré chez les patients atteints de DT2 [63]. Les proportions de *Firmicutes* et en particuliers des espèces appartenant au genre *Clostridium* sont significativement réduites chez ces individus [66]. Tout comme pour l'obésité ou les MICI, il n'est pas clairement établi si ces changements de composition peuvent à la fois être une cause ou une simple conséquence de la pathologie.

D'autre part, le MI peut être impliqué dans le développement d'autres pathologies non digestives telles que les troubles neuropsychiatriques, l'asthme et les allergies. De façon intéressante, la dépression et l'anxiété sont courantes dans les MICI et sont associées à une évolution plus active de la maladie intestinale. Jusqu'à 50 à 90% des patients atteints du SCI présentent une comorbidité psychiatrique. La question se pose de savoir si les changements de comportement sont secondaires au handicap imposé par les symptômes gastro-intestinaux chroniques ou s'ils sont une manifestation directe de la physiopathologie sous-jacente qui inclut les altérations du MI.

Dans une étude pionnière, Bercik *et al.* [75] ont montré que les souris BALB/c, présentant un tempérament timide et anxieux, et les souris NIH Swiss présentant un tempérament explorateur et dynamique, possédaient des MI différents. Ce comportement était, par ailleurs, transférable par transplantation de MI (Figure 18 – C) [75, 76]. Le MI a en effet un impact sur le système nerveux et notamment sur le comportement par modulation de l'expression de certains gènes au niveau cérébral [75]. Une dysbiose post-antibiothérapie est associée à une altération de l'expression du neuromédiateur BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) entraînant des perturbations comportementales, phénomène également observé chez les souris dépourvues de microbiote. De façon intéressante, ces modifications étaient réversibles à l'arrêt du traitement antibiotique ou lors d'une recolonisation précoce chez l'animal axénique. Le MI influence également le développement de la réponse hypothalamo-hypophysaire liée au stress. Selon les populations murines étudiées : l'absence de micro-organismes au niveau du tractus digestif accentue ou diminue la réponse des souris face à un stress aigu. En effet, l'absence de MI est associée à une diminution du comportement anxieux chez les souris NMRI et Swiss Webster, des lignées peu sensibles au stress ; contrairement aux souris BALB/c pour lesquelles l'absence de MI entraîne une augmentation de comportement de type anxieux [75, 77–79]. Il faut également noter que l'utilisation de probiotiques a permis une amélioration des troubles anxieux et dépressifs.

La dysbiose intestinale a par ailleurs été largement étudiée dans le cadre des troubles du spectre autistique [76]. Ce trouble s'accompagne le plus souvent de troubles digestifs. Chez les enfants souffrant d'autisme, le MI serait composé de 10 fois plus de bactéries de type *Clostridium* comparé à une population saine. De plus, chez ces patients, il y aurait une augmentation de certains *Bacteroidetes* et des *Desulfovibrio* ainsi qu'une diminution des *Firmicutes* et des *Bifidobacterium*. Le métabolisme bactérien semble impliqué dans la pathogénèse de nombreuses affections neurologiques. L'implication du MI pourrait s'expliquer notamment par la sécrétion de métabolites bactériens neuro-actifs et par l'installation d'une inflammation chronique de bas grade. Les bactéries appartenant au genre *Desulfovibrio* sont connues pour être des bactéries sulfatoréductrices, or l'H<sub>2</sub>S est une molécule pro-inflammatoire et cytotoxique [76]. Par ailleurs, des taux élevés de propionate, produit par certaines espèces bactériennes entériques telles que les genres *Clostridium*, *Desulfovibrio* et certains *Bacteroidetes*, ont été retrouvés chez les enfants atteints de troubles

autistiques. Cet AGCC pourrait avoir, de façon concentration-dépendante, une action potentiellement néfastes sur le système nerveux central. En effet, il serait impliqué dans la régulation de la synthèse et du relargage de certains neurotransmetteurs, le maintien du pH intracellulaire, la régulation des flux calciques, le fonctionnement mitochondrial, l'activation immunitaire liée à neuro-inflammation et la régulation de l'expression de certains gènes [76].

L'ensemble de ces données montre clairement que le MI exerce de multiples effets pouvant entraîner une tolérance spécifique aux bactéries commensales chez les individus sains, alors qu'une perte de diversité microbienne est associée à un certain nombre de pathologies inflammatoires. Plusieurs études ont suggéré que le MI jouait un rôle dans l'apparition de la GVHD. Chez les patients recevant une allogreffe de CSH, l'apparition d'une dysbiose intestinale semble être étroitement associée avec le risque de survenue de complications et la survie post-transplantation.

Ces patients présentent d'emblée un risque élevé de complications infectieuses, inflammatoires et immunitaires en raison de leur pathologie sous-jacente et d'un dérèglement immunitaire. De plus, ils sont exposés à différents agents thérapeutiques (antibiotiques, chimiothérapie anti-cancéreuses) pouvant entraîner des changements majeurs au sein du MI. De nombreuses études ont montré qu'il existait des interactions complexes entre l'inflammation, le microbiote du tractus gastro-intestinal et la réactivité immunitaire de l'intestin après une greffe de CSH. Une compréhension de ces interactions et de leurs rôles dans la survenue de complications post-greffe est cruciale.

### III. MICROBIOTE INTESTINAL, DYSBIOSE ET ALLOGREFFE DE CSH

#### A. CONSÉQUENCES DE L'ALLOGREFFE DE CSH SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL

Chez les patients allogreffés, une altération de la composition du MI a été décrite dans les suites du conditionnement et de l'utilisation des antibiotiques à large spectre. Cette dysbiose intestinale est représentée par une diminution de la diversité bactérienne avec la perte de bactéries protectrices et l'émergence d'espèces pathobiontes, pro-inflammatoires.

La diversité microbienne post-transplantation dans le tractus gastro-intestinal est étroitement associée aux résultats cliniques après une allogreffe de CSH. Il a été démontré que le MI des patients allogreffés impactait le risque de survenue des complications de l'allogreffe et notamment de survenue de GVHa.

##### 1. Perte de la diversité bactérienne

Avant transplantation, les patients ont une distribution microbienne intestinale comparable à celle de la population générale. Bien que certains individus recevant une allogreffe de CSH semblent conserver un MI relativement diversifié, la plupart des patients présentent une dysbiose intestinale pouvant être sévère. L'ensemble des articles publiés sur le sujet au cours des dernières années ont tous montré que le MI des patients allogreffés présentait une perte de sa diversité au cours de l'allogreffe de CSH [80–82]. Dès leur admission à l'hôpital, des changements majeurs de composition du MI se produisent, influencés entre autre par le traitement de conditionnement, les traitements antibiotiques et potentiellement le stress engendré par la greffe. Les traitements de conditionnement à hautes doses ont une influence directe sur le MI compte tenu de leurs nombreux effets indésirables et effets toxiques, mais aussi indirecte puisqu'ils induisent notamment une perte d'appétit et des diarrhées. Durant la période neutropénique, l'utilisation d'antibiotiques à visée prophylactique ou thérapeutique aura également une incidence néfaste sur la composition et

la diversité du MI des patients [80]. D'autres facteurs peuvent également être impliqués dans la modification du MI : la survenue d'une GVHD digestive, le niveau de stress, l'altération de l'état nutritionnel du patient, la reconstitution immunitaire... La diversité du MI de ces patients diminue significativement en quelques jours et cette dysbiose peut être observée tout au long du processus d'allogreffe de CSH, celle-ci étant amplifiée au cours de la période d'aplasie [80–82].

En 2012, Taur *et al.* [81], ont montré qu'il existait une différence significative entre les valeurs de l'indice de diversité de Shannon chez les patients allogreffés avant et après la transplantation. L'indice de Shannon est un indice évaluant la diversité spécifique d'un milieu c'est-à-dire la répartition du nombre d'espèces de ce milieu (richesse spécifique) et la répartition des individus au sein de ces espèces (équitabilité spécifique). Au cours de la période pré-transplantation, l'indice de diversité de Shannon moyen variait entre 3 et 4, et était similaire aux valeurs observées pour des volontaires sains (Figure 19). Cependant, au cours de l'allogreffe, l'indice de diversité moyen diminuait autour de 2 et restait faible jusqu'à la fin de la période d'observation de cette étude (35 jours après la greffe). Les patients atteints de leucémie et ceux recevant des antibiotiques à large spectre tel que le métronidazole ou les  $\beta$ -lactamines ont présenté des diminutions plus importantes de cet indice de diversité [81].

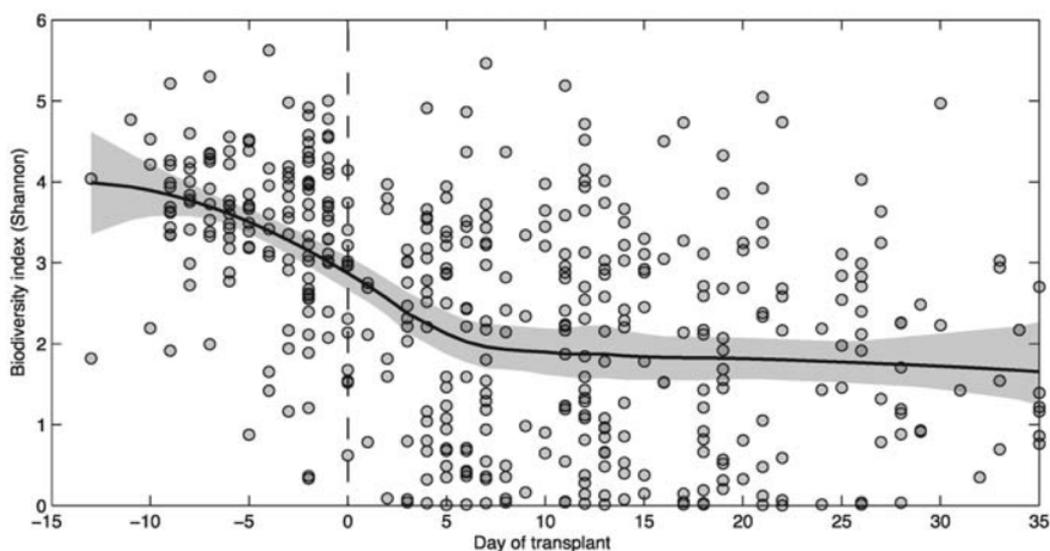


Figure 19 – **Modifications de la diversité bactérienne dans le tractus intestinal lors d'une allogreffe de CSH** [81]. La diversité microbienne quantifiée par l'indice de diversité de Shannon, a été calculée pour chaque échantillon fécal de chaque patient (cercle). La ligne noire continue représente la tendance de diversité.

## 2. Développement d'une domination bactérienne au sein du microbiote intestinal

La perte de cette diversité bactérienne est généralement associée à la perte d'espèces commensales protectrices et à l'expansion de pathobiontes. L'analyse des sous-populations bactériennes a montré une expansion des bactéries appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* et des *Enterobacteriales* avec une perte importante des bactéries appartenant à la classe *Clostridia* et notamment du genre *Blautia* [80, 82].

Dans l'étude de Peled *et al.* de 2020 [83], la composition de plusieurs échantillons de selles de patients allogreffés a été analysée. La majorité des échantillons de composition de faible diversité bactérienne était caractérisée par la domination d'un seul taxon bactérien et notamment par des bactéries appartenant aux genres *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus*. *Enterococcus* est le genre dominant rencontré le plus fréquemment chez les patients ayant une diversité microbienne faible. La plupart des patients dont le MI était dominé par le genre *Enterococcus* avaient une expression détectable du gène *vanA* suggérant ainsi la présence d'entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG). *Streptococcus* est le deuxième genre dominant le plus fréquent suivi du phylum *Proteobacteria* comprenant la famille *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* et *Klebsiella*) et d'autres bactéries à Gram négatif. Cette domination par un genre bactérien peut survenir à divers moments par rapport à la transplantation [81, 83].

L'équipe de Taur [81] a tenté de mettre en évidence plusieurs facteurs cliniques influençant l'apparition d'une dominance bactérienne par le genre *Enterococcus*, *Streptococcus* ou par le phylum *Proteobacteria* (Tableau 1). Les facteurs étudiés dans cette étude étaient : l'âge, le sexe, la pathologie sous-jacente, la prise d'antibiotiques dans les 14 jours précédant la période d'observation, le régime de conditionnement, un greffon appauvri en LT, la source de CSH, l'apparition de fièvre et la prise d'antibiotiques au cours de la période d'observation. Parmi les antibiotiques étudiés au cours de la période d'observation, sont retrouvés la vancomycine, le métronidazole, les fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine) et les  $\beta$ -lactamines (céphalosporines,  $\beta$ -lactamines associées à un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases et carbapénèmes)

Tableau 1 – Facteurs cliniques prédictifs de domination bactérienne intestinale [81].

Predictor	<i>Enterococcus</i> Domination		<i>Streptococcus</i> Domination		Proteobacteria Domination	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age, years	1.00 (.98–1.04)	.790	0.99 (.97–1.03)	.681	1.00 (.95–1.05)	.978
Female sex	0.84 (.42–1.64)	.611	1.07 (.50–2.27)	.852	1.12 (.33–3.78)	.854
Underlying diagnosis (leukemia vs other)	3.22 (1.60–6.94)	.001	0.71 (.32–1.51)	.375	0.66 (.18–2.19)	.498
Prior antibiotics (14 days) <sup>a</sup>	1.49 (.77–2.94)	.237	1.03 (.48–2.17)	.945	1.31 (.39–4.44)	.651
Conditioning regimen (myeloablative or reduced intensity vs non-myeloablative)	1.01 (.44–2.84)	.977	0.61 (.25–1.75)	.329	0.98 (.22–9.25)	.983
T-cell depleted graft	0.81 (.40–1.61)	.551	0.91 (.39–2.00)	.812	1.07 (.29–3.62)	.910
Stem cell source (cord vs other)	1.22 (.55–2.52)	.607	0.54 (.19–1.34)	.196	1.36 (.36–4.69)	.633
Fever <sup>b</sup>	1.68 (.78–3.74)	.182	0.90 (.36–2.39)	.826	1.28 (.30–6.34)	.747
Antibiotics <sup>b</sup>						
Vancomycin	2.12 (.67–10.21)	.222	0.95 (.33–3.77)	.938	5.17 (.52–707.15)	.192
Metronidazole	3.38 (1.65–6.73)	.001	1.94 (.81–4.30)	.131	1.73 (.41–6.03)	.426
Fluoroquinolones <sup>c</sup>	1.09 (.49–2.24)	.832	1.19 (.51–2.60)	.677	0.09 (.00–.75)	.020
Beta-lactam <sup>d</sup>	1.64 (.74–3.99)	.232	1.69 (.62–5.64)	.319	1.23 (.27–7.50)	.800

Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio.

<sup>a</sup> Defined as administration of any antibacterial drug within 14 days prior to observation period.

<sup>b</sup> Analyzed as a time-varying predictor.

<sup>c</sup> Fluoroquinolones consist of ciprofloxacin and levofloxacin.

<sup>d</sup> Beta-lactams include cephalosporins, beta-lactam–beta-lactamase combinations, and carbapenems.

L'âge, le sexe et l'intensité du régime de conditionnement ainsi que la source de CSH n'étaient pas associés à la domination intestinale des micro-organismes étudiés (*Enterococcus*, *Streptococcus* et *Proteobacteria*) [81]. En revanche, les patients diagnostiqués pour une leucémie aiguë avaient un risque plus élevé de domination par le genre *Enterococcus*. La raison de cette association n'est pas encore clairement établie mais est probablement multifactorielle : les patients atteints de leucémie aiguë ont tendance à recevoir un traitement de conditionnement plus intense et à être soumis à une plus grande exposition pré-transplantation aux antibiotiques [80, 81]. L'utilisation d'une antibiothérapie à divers moments de la greffe pour diverses indications (en prophylaxie ou comme traitement empirique puis orienté) était associée à une domination ultérieure par les entérocoques. En complément, d'autres études ont permis de montrer que le type de traitement antibiotique déterminait également l'étendue de la perturbation microbienne. La propagation d'entérocoques est d'autant plus importante que les doses d'antibiotiques reçues sont à visée curative. L'exposition au métronidazole semble associée à une augmentation du risque de domination par les entérocoques d'un facteur 3 ; ce qui confirmerait le fait que les bactéries anaérobies contribuent à la résistance à la colonisation. En revanche, l'utilisation de vancomycine, de fluoroquinolones et de  $\beta$ -lactamines ne semble pas augmenter le risque de

domination par le genre *Enterococcus*. L'utilisation des fluoroquinolones semble davantage associée à un risque de domination par le phylum *Proteobacteria* [80–82]. Le moment du traitement antibiotique semble également influencer la composition microbienne : les patients ayant commencé une antibiothérapie avant le jour de la greffe présenteraient une perturbation du MI plus importante que ceux ayant commencé leur antibiothérapie le jour J, après la greffe ou bien que ceux n'ayant jamais reçu d'antibiotiques [81].

Bien que l'utilisation des antibiotiques à large spectre ait conduit à une amélioration de la mortalité liée au traitement avec une diminution du risque infectieux, ces dernières études suggèrent un impact défavorable des antibiotiques sur la composition microbienne du tractus digestif. L'utilisation de ces médicaments doit être étudiée au cas par cas afin d'évaluer les risques à court terme d'infections bactériennes durant la période neutropénique et des risques à long terme avec le risque de survenue de GVHD, la qualité de la reconstitution immunitaire et l'apparition de résistances microbiennes [84].

### **3. Altérations des fonctions du microbiote intestinal**

La dysbiose intestinale observée chez les patients allogreffés entraîne une altération des fonctions du microbiote.

La perte de la diversité intestinale est généralement associée à une altération des fonctions métaboliques avec une perte d'espèces bactériennes clés, impliquées dans le métabolisme glucidique, lipidique ou protéique du MI [13]. La perte des bactéries appartenant à la classe *Clostridia* ou au genre *Bacteroides* et impliquées dans la production des AGCC à partir des fibres alimentaires induit une diminution de la quantité d'AGCC dans la lumière intestinale [82]. Or, ces AGCC sont la principale source d'énergie des cellules épithéliales. L'appauvrissement en AGCC aura des conséquences sur le maintien et le renouvellement de l'épithélium, ainsi que sur la correction des dommages liés à l'ADN et sur la régulation de la prolifération bactérienne. La perte de bactéries commensales entraîne également des altérations dans la production protéique et notamment celle de peptides antimicrobiens (AMP) également impliqués dans la régulation immunitaire locale [80].

Indirectement, la perte des fonctions métaboliques du MI aura un retentissement sur la fonction immunitaire de celui-ci. Les bactéries commensales intestinales et les signaux qui en dérivent contribuent aux fonctions immunitaires de l'hôte : la présence d'un MI amorce la myélopoïèse et réduit la susceptibilité aux infections [80, 82]. Il a été établi que l'épuisement du MI après une allogreffe réduisait la mobilisation des CSH dans un modèle expérimental murin [85]. Étant donné que les rechutes et la mortalité liée à la transplantation sont des conséquences inversement corrélées à une reconstitution immunitaire robuste, un MI intact semble favoriser la reconstitution immunitaire après une allogreffe de CSH.

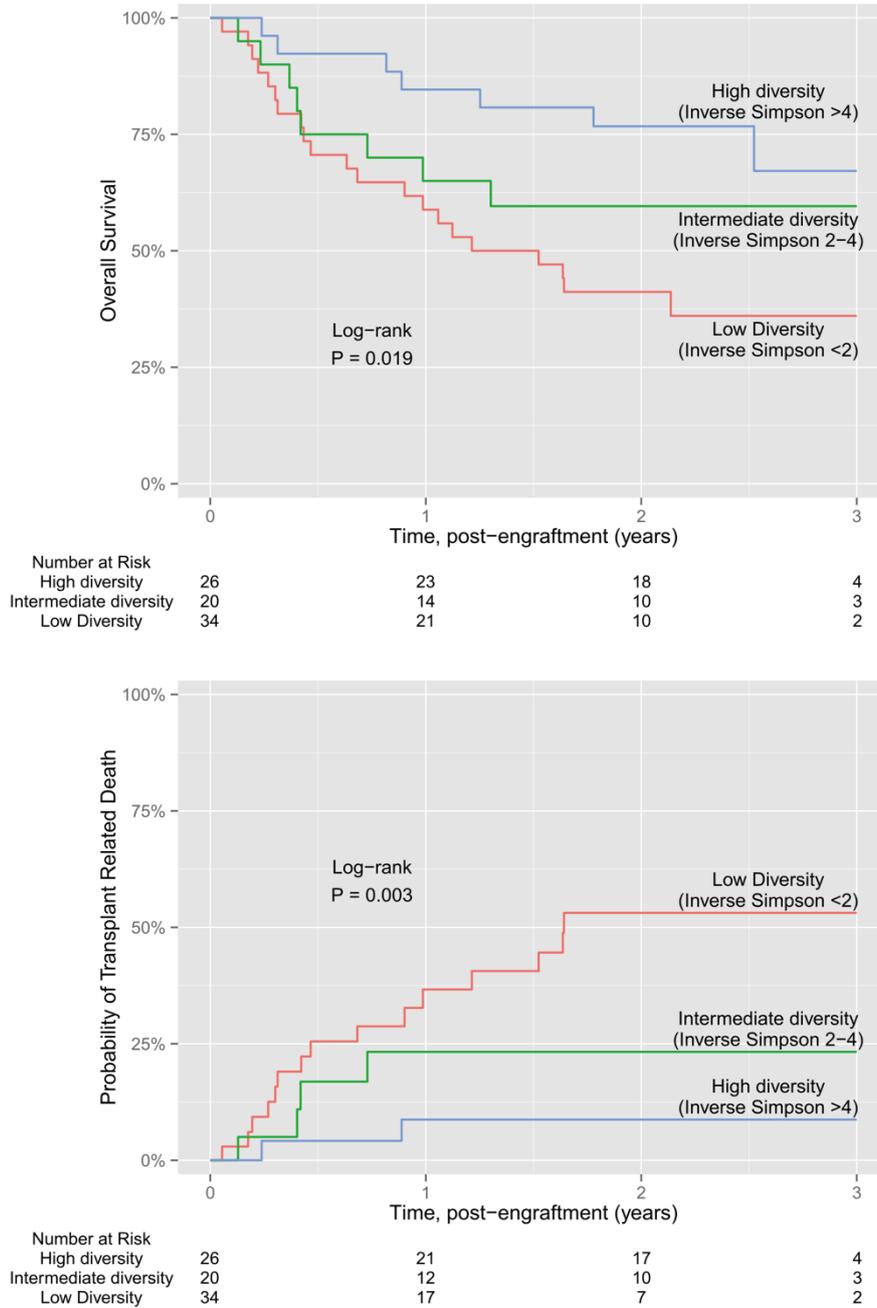
Chez la souris, l'utilisation d'une antibiothérapie réduit la diversité bactérienne intestinale et induit une lymphopénie secondaire. Dans un modèle murin étudié par Staffas *et al.* [86], les souris ont été infectées par une souche de *Listeria monocytogenes* 21 jours après une allogreffe de CSH. Chez les souris ayant été préalablement traitées par des antibiotiques, la charge bactérienne dans la rate était significativement plus élevée trois jours après l'infection par rapport aux souris témoin non traitées indiquant un déficit immunitaire fonctionnel chez les souris avec un MI épuisé par l'antibiothérapie.

## B. CONSÉQUENCES DE LA DYSBIOSE INTESTINALE CHEZ LE PATIENT ALLOGREFFÉ

La dysbiose intestinale retrouvée chez les patients recevant une allogreffe de CSH va être associée à de possibles complications tout au long du processus de greffe.

### 1. Mortalité accrue

La perte de diversité du MI est étroitement corrélée à une augmentation de la mortalité globale après la transplantation. Une faible diversité microbienne avant l'instauration du traitement de conditionnement et au moment de la greffe de CSH est associée à une mortalité accrue [80, 82, 87]. En 2014, Taur *et al.* [88] ont suivi une cohorte de 80 patients après une allogreffe de CSH. Dans cette étude, les individus ont été classés en trois groupes en fonction de la diversité bactérienne globale de leur MI, par utilisation de l'indice de Simpson inverse (estimation écologique d'une diversité basée sur la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce). Les résultats (Figure 20) montrent qu'une diversité élevée est associée à une meilleure survie et à une moindre probabilité de décès en lien avec la greffe. La survie globale était significativement différente entre les 3 groupes de diversité (diversité microbienne élevée : n=26 patients ; diversité intermédiaire : n=20 patients ; faible diversité : n=34 patients). La survie globale estimée à 3 ans pour le groupe à forte diversité était de 67% ; de 60% pour le groupe à diversité intermédiaire et de 36% pour le groupe à faible diversité. Des différences similaires ont été trouvées pour la mortalité liée à la transplantation : la mortalité liée à la transplantation à 3 ans était de 9% pour le groupe à diversité élevée, de 23% pour le groupe à diversité intermédiaire et de 53% pour le groupe à faible diversité [88]. Par ailleurs, la diversité microbienne semble être un marqueur prédictif indépendant de la mortalité liée à la transplantation. Dans cette étude, sur les 36 décès, 21 (58%) étaient liés à la transplantation, 15 (42%) étaient dus à une rechute ou à une progression de la maladie. Les décès liés à la transplantation étaient essentiellement dus à la GVHD ou à une infection et étaient plus fréquents chez les patients ayant une faible diversité de leur MI [88].



**Figure 20 – Diagramme de Kaplan Meier de la diversité et de la survie globale et de la mortalité liée à la transplantation [88].** Le diagramme du haut représente la survie globale des patients allogreffés en fonction de leur diversité microbienne intestinale tandis que le diagramme du bas correspond à la mortalité liée à la transplantation des patients allogreffés en fonction de leur diversité microbienne intestinale. La ligne rouge représente les patients ayant une faible diversité bactérienne, en vert une diversité intermédiaire et en bleu une forte diversité bactérienne.

Cette conjecture est également établie dans une étude multicentrique menée en 2020 par Peled *et al.* [83]. Ces auteurs ont analysé 8767 échantillons de selles de 1362 patients allogreffés au cours de la période péri-greffe (jours 7 à 21 après allogreffe). L'association entre la diversité et la survie globale a également été évaluée. Une plus grande diversité du MI était

associée à un risque de décès plus faible que chez les patients ayant une diversité microbienne plus faible. De même que dans l'étude de Taur *et al.* en 2014, cette étude a démontré qu'une diversité intestinale plus élevée était associée à un risque plus faible de décès liés ou non à la transplantation qu'une diversité plus faible [83, 88].

Parallèlement, la composition du MI des patients décédés ou survivants a été comparée. Le microbiote post-greffe des sujets décédés différait significativement du microbiote des patients survivants avec une plus grande abondance du phylum *Proteobacteria* comprenant les entérobactéries (Figure 21) [88]. Une grande diversité bactérienne était associée à un résultat clinique plus favorable puisqu'observée dans le MI des personnes restées en vie durant la période de suivi. Le MI était alors composé d'une plus grande abondance des bactéries appartenant aux familles *Lachnospiraceae*, *Blautia* et *Actinomycetaceae*.

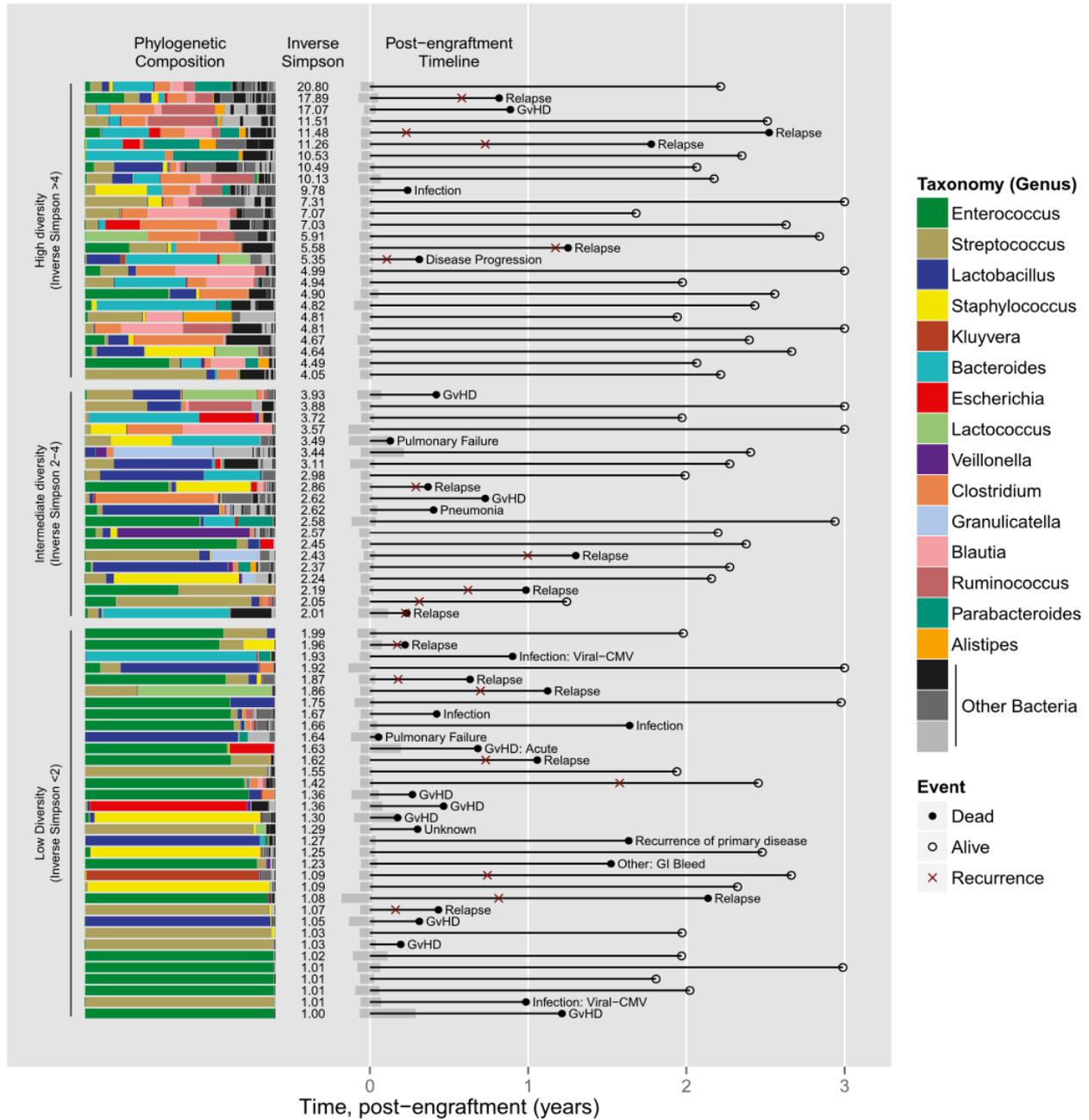


Figure 21 – **Diversité bactérienne du MI des patients au moment de la prise de greffe et leur devenir après la transplantation [88].** Chaque ligne représente un patient. A gauche, sont représentées les compositions phylogénétiques de chaque patient au moment de la greffe de CSH. Les différentes couleurs correspondent à un genre bactérien (légende de droite). La diversité microbienne, mesurée par l'indice de Simpson inverse, est indiquée dans la colonne suivante. Les tracés de la chronologie sont affichés à droite : les lignes noires représentent le temps de survie, les cercles fermés représentent le décès du patient (la cause du décès est indiquée), les cercles ouverts représentent la censure. Une croix rouge indique une rechute ou la progression de la maladie sous-jacente.

## 2. Risque d'infections

Le régime de conditionnement ainsi que l'utilisation d'une antibiothérapie prophylactique ou à visée thérapeutique dans le cadre d'une neutropénie fébrile entraînent une altération du MI dans sa diversité et sa composition. Cette altération augmente la susceptibilité aux infections [82]. Alors qu'un individu sain abrite un MI très diversifié, l'utilisation de ces traitements au cours de l'allogreffe entraîne une perte globale de cette diversité et l'apparition d'une mono-dominance du MI par une seule espèce, le plus souvent appartenant aux *Proteobacteria*, *Enterococcus* ou *Streptococcus*. Ces pathobiontes augmentent considérablement le risque d'infection chez ces patients fragiles, particulièrement s'ils sont porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques. La domination intestinale semble être un facteur prédictif d'infection sanguine par le germe dominant. Cette mono-dominance précède et augmente considérablement le risque de bactériémie à ce pathogène. En effet, les patients dont le genre dominant est *Enterococcus* présenteraient un risque 9 fois plus élevé de bactériémie à ERG d'après l'étude de Taur *et al.* en 2012 [81]. Et inversement, une domination intestinale par les *Proteobacteria* augmente le risque de bactériémie à bacille Gram négatif d'un facteur 5. Le délai médian entre la domination bactérienne du MI et l'apparition d'une bactériémie serait de 7 jours [81].

Une altération du MI n'est cependant pas le seul facteur prédisposant au risque infectieux. D'autres composantes entrent en jeu dans le risque de survenue d'infections. En effet, la survenue d'une infection après la transplantation découle d'un processus multifactoriel. Les lésions intestinales causées par le régime de conditionnement entraînent une augmentation de la perméabilité intestinale favorisant la translocation des bactéries intestinales vers le compartiment sanguin. L'hyperstimulation du système immunitaire à partir d'une large gamme de pathogènes et de PAMPs tels que le LPS et le peptidoglycane de bactéries non commensales renforce la réponse cytokinique inflammatoire ce qui contribue ensuite à l'allo-activation et l'amorçage des LT et induit de ce fait une inflammation chronique prédisposant aux infections [13]. D'autre part, le traitement antibiotique augmente également la susceptibilité aux infections à *C. difficile*, en particulier dans le cadre de l'allogreffe au cours de laquelle des facteurs de risque majeurs d'infection à *C. difficile*

(suppression immunitaire, chimiothérapie et irradiation) existent. Il a été démontré qu'une infection à *C. difficile* précoce après la transplantation de CSH était positivement corrélée avec la chimiothérapie à haute intensité [89].

### 3. Reconstitution immunitaire, GVHD et microbiote intestinal

Depuis quelques années, il existe un nombre important de preuves établissant un lien entre la composition microbienne intestinale et le développement immunitaire ainsi que son maintien. L'implication du MI dans les différentes complications post-transplantation et dans la reconstitution immunitaire a pendant longtemps été ignorée ou du moins sous-estimée. Une reconstitution immunitaire appropriée est essentielle à la réussite de l'allogreffe de CSH. L'altération de la reconstitution immunitaire est une cause importante de morbidité et de mortalité et a été impliquée dans un risque accru d'infections, de rechute maligne et de développement de tumeurs malignes secondaires [90].

Les premières études portant sur la relation entre le MI et l'allogreffe de CSH, dans les années 1970, ont démontré que des souris subissant une allogreffe de CSH dans des conditions axéniques présentaient moins de risque de GVHD et avaient une survie améliorée [84]. Cette observation a conduit à des tentatives de reproduction de ces conditions chez les patients subissant une transplantation de CSH avec l'utilisation de chambres d'isolement, de régimes « stériles », de décontamination intestinale avec l'administration d'antibiotiques oraux non absorbables et de nettoyage de la peau [84]. Plus tard, de nombreuses études [40, 52, 55] ont montré l'importance du MI dans le développement et le maintien du système immunitaire. Il est donc raisonnable de supposer que le MI joue un rôle direct dans la récupération immunitaire post-transplantation et pourrait être ciblé comme stratégie afin d'augmenter l'immunité post-greffe. L'influence du MI sur les résultats cliniques de l'allogreffe de CSH a surtout été observée dans les modèles murins. Cependant, peu de liens directs ont pu être établis entre le MI et la reconstitution immunitaire post-transplantation chez la souris. Les travaux de Staffas *et al.* [86] ont démontré que les souris traitées par antibiotiques présentaient une diminution de la récupération des lymphocytes et des granulocytes après allogreffe. L'épuisement du MI au cours du processus de greffe a conduit à une profonde réduction du nombre de lymphocytes, une réduction du nombre de neutrophiles et une

altération de la capacité à éliminer le risque d'infection systémique après transplantation. En revanche, le *homing* initial des CSH, l'expansion du compartiment des cellules souches progénitrices ainsi que la différenciation des érythrocytes n'étaient pas affectés par la présence d'un MI intact.

D'un autre côté, les bactéries intestinales commensales semblent favoriser la différenciation myéloïde et permettent une amélioration de l'élimination des agents pathogènes. A la suite d'une antibiothérapie, l'absorption calorique de l'alimentation favorisée par la présence de bactéries commensales a été réduite [86]. Cette restriction calorique entraîne une lymphopénie à la fois dans le modèle murin comme dans le modèle humain. Cette lymphopénie peut être corrigée par ajout de saccharose dans l'eau des souris. La supplémentation de ce sucre simple a permis l'augmentation du nombre de lymphocytes périphériques, thymiques et présents dans la moelle osseuse chez les souris traitées par antibiotiques en post-transplantation. En revanche, le nombre réduit de neutrophiles et de cellules myéloïdes n'a pu être que partiellement normalisé par cette supplémentation : l'hypothèse principalement retenue serait que la présence de PAMPs apportés par le MI est nécessaire au maintien des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse ou intestinales et à la régulation de la population de neutrophiles [91, 92].

Dans l'étude de Peled *et al.* [83], l'effet de la diversité microbienne des selles sur la survie globale n'a été observé que dans le sous-ensemble de patients ayant reçu des greffes complètes de LT, ce qui suggère une interaction entre la reconstitution immunitaire des LT et le MI. Dans une autre étude menée sur une cohorte pédiatrique, Ingham *et al.* [87] ont étudié les paramètres de la récupération immunitaire, les marqueurs de l'inflammation et la composition du MI chez 37 sujets. Une évaluation des abondances relatives des huit familles taxonomiques les plus représentées au sein du MI de ces individus a été effectuée (Figure 22). Au cours du processus d'allogreffe, il a été observé une diminution des abondances de *Lachnospiraceae* et des *Ruminococcus* immédiatement après la transplantation. En revanche, l'abondance relative du genre *Enterococcus* est passée de 17,4% avant transplantation à 30,2% une semaine après la greffe. Ces observations étaient similaires aux études antérieures.

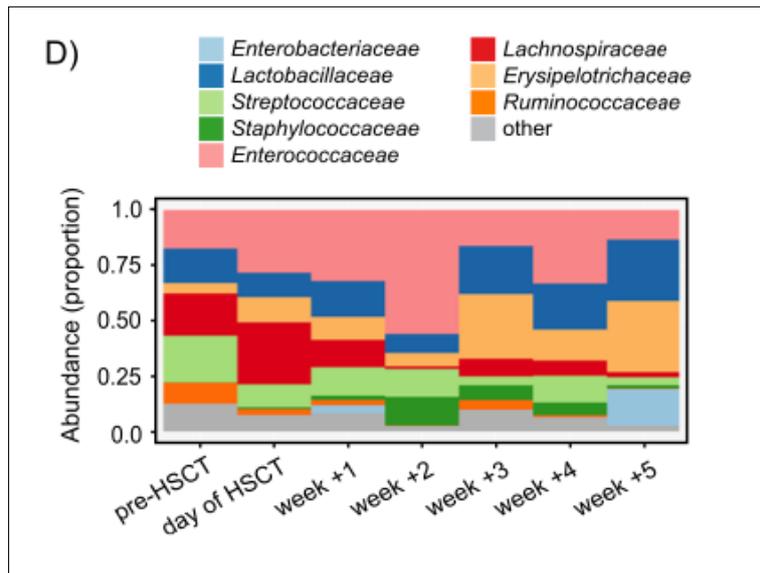


Figure 22 – **Abondances relatives dans le temps des 8 familles taxonomiques les plus abondantes dans le MI de 37 individus allogreffés de CSH.** Au total, 98 échantillons fécaux ont été analysés. [87].

Après la transplantation, et notamment chez les patients ayant développés une GVHa de grade II à IV et/ou chez les patients décédés, la prédominance de *Clostridiales* dont les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* ne semblait pas persister au sein de leur MI. Les membres des *Clostridiales* sont des colonisateurs courants de l'intestin distal sain et leur perte était associée à une perturbation de la communauté microbienne, à une diversité réduite et à la survenue de GVHD. Une inflammation élevée, indiquée par des niveaux élevés de CRP, était observée chez les patients présentant une abondance importante de bactéries anaérobies facultatives telles que les entérobactéries [87].

Une récupération rapide des cellules NK et B est également associée à une meilleure survie chez les patients allogreffés. En effet, les NK jouent un rôle important dans l'effet GVL et il a été décrit que la survie globale était significativement réduite chez les patients ayant un faible taux de NK après allogreffe. Les travaux de Rubio *et al* [90, 93] ont montré que le risque de GVHa était moindre en cas de bonne reconstitution en LT Natural Killer invariants (iNKT) à partir de J15 post-greffe ainsi que chez les patients ayant reçu un greffon riche en iNKT CD4<sup>-</sup> et ayant une bonne capacité d'expansion *ex vivo* à partir des cellules du greffon. Cette équipe avait tout d'abord analysé de multiples sous-types cellulaires contenus dans le greffon incluant les Tregs et les LT invariants associés aux muqueuses. En analyse multivariée, les

lymphocytes iNKT étaient le seul sous-type cellulaire du greffon à présenter des corrélations avec le risque de GVHa [90]. La même équipe a ensuite montré dans un modèle de xéno-GVHD que les iNKT CD4<sup>+</sup> humains pouvaient contrôler la GVHD en inhibant l'activation, la maturation et la survie des CD permettant de réduire l'activation et l'orientation Th1 et Th17 des LT allo-réactifs [93]. Les lymphocytes iNKT sont caractérisés par l'expression d'un TCR invariant reconnaissant des glycolipides présentés par les CPA via la molécule CD1d. Des travaux ont montré que des modulations de l'activation des iNKT étaient corrélées à la présence dans le MI de certains taxons bactériens possédant des sphingolipides dans leur paroi tels que les *Sphingomonas* spp. et apparentés ou certains *Bacteroides*, membres majeurs du MI [94–96].

Le MI semble donc jouer un rôle contributif dans la reconstitution immunitaire. Chez des patients pour lesquels une abondance importante de bactéries anaérobies strictes telles que les *Ruminococcaceae* était observée au niveau de leur tractus digestif, une reconstitution rapide des cellules NK et des LB a été mise en évidence [87, 97]. Des superantigènes produits par ces espèces bactériennes permettent de stimuler l'expansion des LB. Outre le fait que cette population de patients n'a, par ailleurs, pas développé de GVHa, ou bien seulement une GVHa légère, la mortalité dans ce groupe était faible. La récupération précoce des LB naïfs peut être associée au développement d'une GVHD moins sévère. Par ailleurs, la diminution de l'abondance des *Clostridiales* de la famille *Ruminococcaceae*, observée chez les patients présentant une GVHa, est associée à une perturbation microbienne globale et à une diminution de la diversité contribuant à une survie plus faible [83]. Les membres de l'ordre des *Clostridiales* semblent pouvoir réguler à la baisse l'inflammation et pourraient ainsi prévenir l'apparition de la GVHD. Les composants anti-inflammatoires sécrétés par cette branche bactérienne sont, entre autres, le 3-indoxyl-sulfate et le butyrate [83, 87]. Le 3-indoxyl-sulfate urinaire a été proposé comme marqueur biologique permettant de prédire la survenue de la GVHD. Il provient de la dégradation de l'indole, produit à partir du tryptophane par des bactéries commensales. L'indole joue le rôle de signal intercellulaire important au sein d'une communauté microbienne et module la fonction de barrière muqueuse et l'expression des gènes pro- et anti-inflammatoires par les cellules épithéliales intestinales. Une diminution de l'excrétion urinaire du 3-indoxyl-sulfate semble être un marqueur de la perturbation du MI et d'un risque accru de développer une GVHD digestive [98].

Contrairement au groupe de patients avec une forte abondance de bactéries anaérobies strictes (*Ruminococcaceae* ou *Lachnospiraceae* par exemple), les patients ayant une forte abondance de bactéries anaérobies facultatives telles que les *Enterobacteriaceae*, les *Staphylococcus* ou les *Streptococcus*, ont montré une lente reconstitution des NK et LB [87].

## IV. ETUDE PARI-DYS

### A. PRESENTATION DE L'ETUDE

#### 1. Description générale de l'étude

L'étude PARI-DYS est une étude menée actuellement au sein du CHRU de Nancy. Cette étude est portée par le Docteur Corentine Alauzet et l'investigateur principal est le Professeur Marie-Thérèse Rubio. Elle a pour objectif principal d'identifier parmi les caractéristiques de la dysbiose intestinale celles qui impactent la qualité de la reconstitution immunitaire en iNKT chez les patients allogreffés de CSH.

Cette étude est notamment destinée à évaluer si la modification significative des proportions de certains taxons bactériens est prédictive de la qualité de la reconstitution immunitaire à J30. Cette modification serait corrélée au niveau d'activation et/ou au type d'orientation de la réponse lymphocytaire T précoce après la greffe ainsi qu'aux proportions en cellules pouvant réguler l'activation lymphocytaire T chez les patients recevant une allogreffe de CSH. Compte tenu de la forte corrélation observée par les travaux antérieurs du Pr Rubio entre la reconstitution immunitaire en cellules iNKT et l'apparition d'une GVHa d'une part, et du rôle possible du MI sur la survie et l'activation des iNKT d'autre part, PARI-DYS a comme hypothèse principale qu'il puisse exister une corrélation entre la dysbiose observée entre J0 et J15 post-greffe et la reconstitution en iNKT à J30 *in vivo* chez les patients allogreffés.

Afin de démontrer le rôle de certains taxons bactériens sur la reconstitution immunitaire, la composition du MI et la cinétique de reconstitution immunitaire seront analysées chez les patients recevant une allogreffe de CSH au sein du CHRU de Nancy.

Étant donné que la dysbiose observée dans les conditions de greffe pourrait être corrélée à la cinétique et au niveau d'activation des LT conventionnels de manière précoce après la greffe (J15 à J90), ainsi qu'à l'activation et l'expansion en périphérie d'autres cellules régulatrices, l'analyse de la reconstitution immunitaire chez les patients inclus s'intéressera à différents types de cellules. Enfin, cette dysbiose pouvant être accentuée par l'antibiothérapie et le niveau de stress du patient, l'influence de ces deux facteurs sera également analysée.

Ces analyses permettront ensuite de mettre en corrélation les données biologiques aux données cliniques. L'analyse du MI chez ces patients est effectuée au sein de l'équipe SIMPA de l'Université de Lorraine. La reconstitution immunitaire est quant à elle évaluée par l'équipe 6 IMoPa du Biopole de l'Université de Lorraine. Afin d'évaluer les liens entre la dysbiose et le niveau de stress, les patients remplissent tout au long du processus d'allogreffe, deux questionnaires permettant d'établir un score de stress et d'anxiété : les questionnaires de Cohen et Spielberger (Annexes 1 et 2).

## 2. Déroulement de l'étude

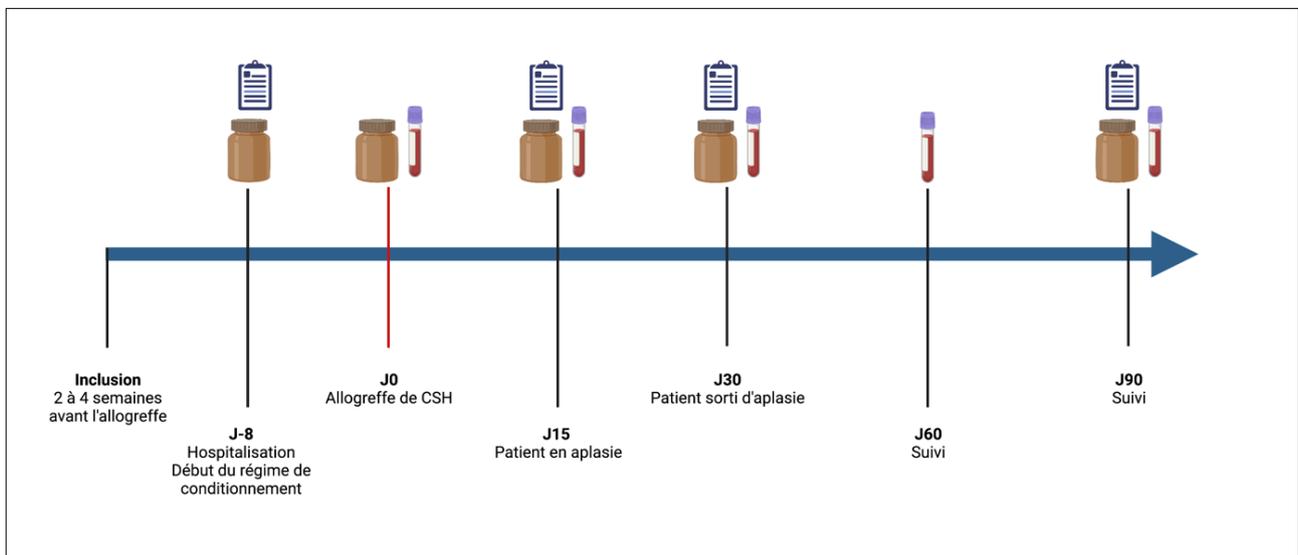


Figure 23 - Déroulement de l'étude PARI-DYS (Biorender.com)

Au cours de la visite d'inclusion qui se déroule 2 à 4 semaines avant l'allogreffe de CSH, l'investigateur informe le patient et recueille son consentement libre, éclairé et écrit. Le patient est ensuite hospitalisé à J-8 de la greffe afin de débuter le régime de conditionnement (Figure 23). A cette date, un prélèvement de selles sera réalisé. Ce prélèvement établira le MI de base du patient puisque prélevé avant tout traitement de conditionnement. Le patient complètera les 2 formulaires d'évaluation du niveau de stress. Le jour de la greffe (J0), seront réalisés un prélèvement de sang périphérique analysé extemporanément ainsi qu'une collecte de selles pour analyse du microbiote. En période post-transplantation, le patient est revu à J15, J30, J60 et J90 de l'allogreffe de CSH. Au cours de chacune de ces visites seront effectués

un prélèvement de sang et un prélèvement de selles. Le patient doit également remplir les 2 questionnaires d'évaluation du niveau de stress. Seul un prélèvement sanguin sera effectué au cours de la visite à J60 pour le suivi de la reconstitution immunitaire.

Les selles sont récupérées dans des tubes collecteurs contenant du RNeasy afin de les préserver de la température ambiante sans altération des acides nucléiques. Ces tubes sont ensuite envoyés au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHRU de Nancy pour être congelés à -80°C après pré-traitement permettant l'élimination du RNeasy (Figure 24). Les selles sont ensuite récupérées pour être extraites au laboratoire SIMPA selon le protocole de Godon *et al.* [99] qui est celui recommandé pour réaliser les études de composition du microbiote fécal chez l'humain.

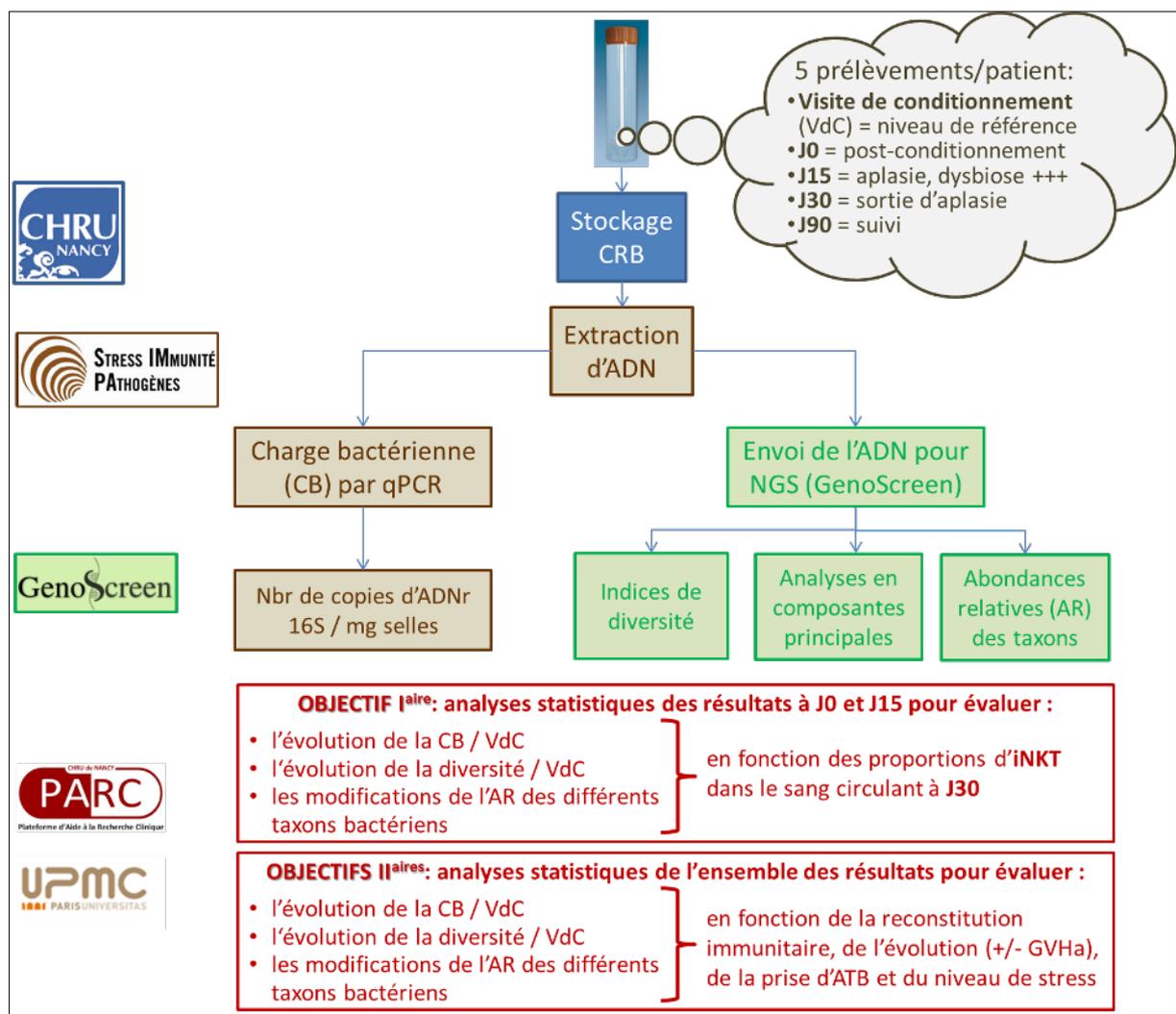


Figure 24 - Représentation schématique des étapes de l'analyse du MI et de la caractérisation de la dysbiose.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai participé à l'extraction de l'ADN bactérien des selles de 22 patients (n=110 échantillons). Ce protocole comprend de nombreuses étapes (Annexe 3) dont une étape de broyage par des billes qui restreint l'extraction à 24 échantillons simultanément. Afin de limiter les biais, il a été choisi d'extraire dans la même série l'ensemble des prélèvements d'un même patient (n=5). Nous avons donc réalisé des séries d'extractions de 4 patients, chaque série durant 1.5 jours de manipulations. Cet ADN extrait servira dans un second temps d'une part à l'analyse de la charge bactérienne, c'est-à-dire à l'évaluation du nombre de copies d'ADNr 16S par milligrammes de selles, et d'autre part il sera envoyé à la société Genoscreen pour analyse du MI en séquençage haut débit (technologie Illumina) afin d'évaluer les abondances relatives de l'ensemble des taxons du MI de tous les patients inclus, aux différents temps pré- et post-greffe, ainsi que les différents indices de diversité.

## B. POINT SUR LE DEROULEMENT DE L'ETUDE

### 1. Objectif initial d'inclusion

Le nombre de patients nécessaires pour une analyse statistiquement rigoureuse des données a été estimé par l'épidémiologiste en charge de l'étude à 70. Il a été convenu que pour atteindre cet objectif de 70 patients « analysables », au moins 80 patients devaient être inclus dans le protocole PARI-DYS sur les deux années prévues. Au CHRU de Nancy, environ 50 patients sont allogreffés de CSH chaque année. Il a été estimé que 20% d'entre eux ne pourraient pas être éligibles à cette étude et que 10% des patients ne pourraient finalement pas être analysables.

### 2. Inclusion des patients au cours du temps

Les inclusions de patients ont commencé en Décembre 2018 avec deux patients (Figure 25). Au cours de l'année 2019, 20 patients ont été inclus alors que 40 inclusions étaient attendues. En 2020, 15 patients ont été inclus. Suite à ces difficultés d'inclusion, une réunion de suivi regroupant les principaux acteurs et à laquelle j'ai participé s'est tenue en novembre 2020. Il a été discuté de l'impact de la crise sanitaire causée par SARS-CoV2 à partir de mars

2020 qui a entraîné une baisse des consultations et des hospitalisations. Comme pour l'ensemble des études en cours à ce moment-là, les inclusions ont été stoppées jusqu'au 18 mai 2020.

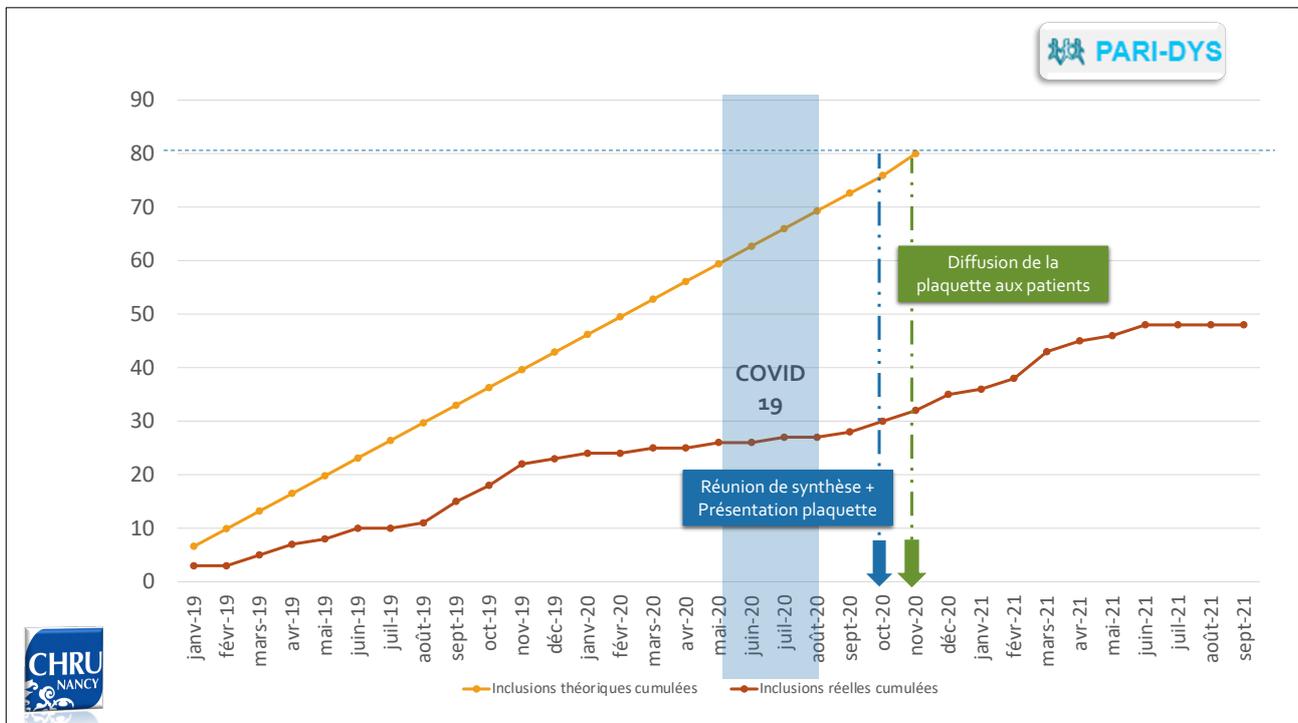


Figure 25 - Courbes d'inclusion des patients dans l'étude PARI-DYS (diapositive de la Délégation à la Recherche Clinique et à l'innovation du CHRU de Nancy).

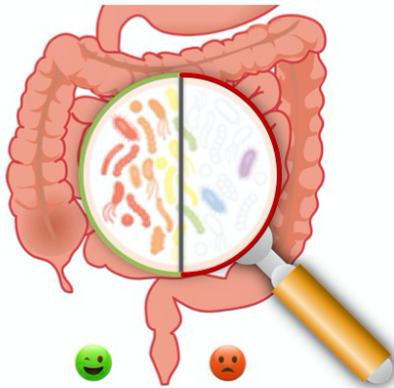
Cependant, les inclusions n'ont pas redémarré et le retour des cliniciens suggérait que le prélèvement de selles pouvait avoir un effet rebutant pour les patients. Il m'a donc été demandé de réaliser une plaquette pédagogique explicative du protocole, plus accessible que les documents réglementaires donnés au patient lors de la visite de conditionnement (Figure 26). Suite à la mise en place de cette plaquette, nous avons observé une augmentation des inclusions. Au cours du premier semestre 2021, 15 patients supplémentaires ont été inclus. Un total de 52 patients a été inclus de Décembre 2018 à Juin 2021. Une demande de prolongation de l'étude de 2 ans a été réalisée et acceptée.

# PROTOCOLE « PARI-DYS »

Dysbiose intestinale et reconstitution immunitaire chez le patient allogreffé

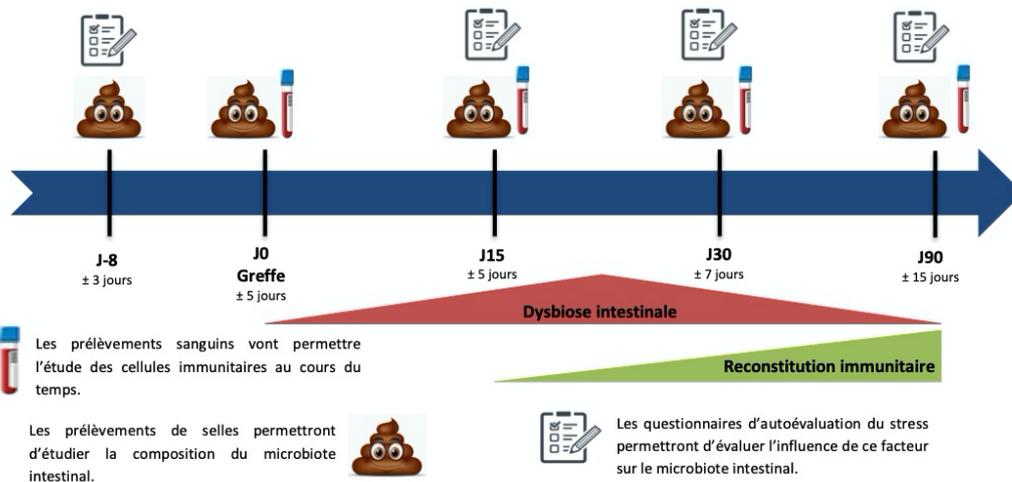
EQUILIBRE

DYSBIOSE



- Le **microbiote intestinal** représente l'ensemble des microorganismes de notre tube digestif. Son équilibre est impliqué dans le bien-être et la santé de chacun.
- Sa composition, c'est-à-dire le nombre et le type de microorganismes, peut varier après une modification d'habitude alimentaire, après la prise d'antibiotiques, sous l'effet d'un stress, ou bien au cours de votre prise en charge concernant votre greffe de cellules souches hématopoïétiques. Une modification importante du microbiote est appelée **dysbiose**.
- L'état de votre microbiote intestinal est susceptible d'influencer votre rétablissement post-greffe et notamment la capacité du greffon à fabriquer de nouvelles cellules immunitaires (**reconstitution immunitaire**).

Le but de l'étude PARI-DYS est de **mettre en évidence les relations entre certaines populations bactériennes présentes dans le microbiote intestinal et la reconstitution immunitaire post-greffe**. Pour cela des prélèvements de sang, de selles et des questionnaires permettant l'auto-évaluation du stress, sont nécessaires à différents instants afin d'étudier l'évolution de composition microbienne.



Cette étude présente un **intérêt collectif**, elle permettra la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'**améliorer** la qualité de prise en charge des patients allogreffés.



Pour un bon prélèvement de selles reportez-vous à la **notice** fournie par votre médecin.

Vous pourrez envoyer votre prélèvement par **voie postale** ou bien l'amener à votre **prochaine visite**.



Figure 26 – Plaquette pédagogique explicative destinée au patient.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'allogreffe de CSH est une stratégie thérapeutique potentielle pour de nombreuses maladies hématologiques. Cependant, cette procédure est toujours associée à une morbidité et à une mortalité importantes. Les infections et la GVHD représentent deux des principales complications liées à la greffe. Parmi les nombreux facteurs connus pour être impliqués dans le développement de ces complications, le MI du patient receveur apparaît comme un facteur clé.

Au cours des dernières années, le séquençage à haut débit a permis de caractériser les différentes communautés bactériennes et une meilleure compréhension des rôles du MI sur la santé et le bien-être de son hôte. Ce dernier est essentiel à de nombreuses fonctions telles que la dégradation des fibres, la stimulation du système immunitaire et la prévention de la colonisation par les agents pathogènes. Sa composition est dynamique tout au long de la vie de son hôte mais des altérations pathologiques peuvent survenir. L'allogreffe de CSH ainsi que les thérapeutiques associées (régime de conditionnement, antibiothérapie) représentent une combinaison d'éléments qui vont engendrer une perturbation de la composition du MI : une dysbiose intestinale. Cette dysbiose est caractérisée par une diminution de la diversité bactérienne ainsi que par l'apparition d'une monodominance bactérienne. Elle est corrélée à l'apparition de complications chez les patients allogreffés : augmentation du risque d'infections bactériennes, notamment de bactériémies, augmentation de la mortalité, augmentation du risque de survenue de GVHD.

Cette connaissance croissante du rôle du MI dans la physiopathologie des principales complications de l'allogreffe de CSH a conduit aux développements d'hypothèses thérapeutiques afin de prévenir les dommages causés par la dysbiose ou bien restaurer l'intégrité du MI. Parmi ces idées, la transplantation de microbiote fécal (TMF) semble être une stratégie thérapeutique intéressante [100]. La TMF consiste en l'infusion de matières fécales d'un donneur sain dans le tractus gastro-intestinal d'un receveur hébergeant un MI dysbiotique. Cette procédure modifie directement la composition du MI de l'hôte afin de tenter de restaurer la diversité et l'homéostasie intestinales. Cette stratégie thérapeutique a déjà montré ses preuves concernant le traitement d'infections récurrentes à *C. difficile*. Il existe un intérêt croissant pour la TMF dans l'allogreffe de CSH en tant que stratégie

préventive ou thérapeutique potentielle, principalement en ce qui concerne la GVHa et les infections. Pour cela, une caractérisation de la composition du MI chez le patient allogreffé permettra d'identifier les espèces bactériennes bénéfiques ou néfastes pour l'avenir du patient : c'est un des objectifs de l'étude PARI-DYS actuellement en cours au CHRU de Nancy. L'interprétation des résultats concernant la charge bactérienne et la composition du MI en abondances relatives des différentes espèces bactériennes dans les fécès des patients tout au long du processus d'allogreffe, vous sera présenté l'année prochaine lors de mon mémoire de DES de Biologie Médicale.

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 - ÉVOLUTION DU NOMBRE DE GREFFES DE CSH EN EUROPE .....	7
FIGURE 2 - ORDRE DE CHOIX DE GREFFON .....	8
FIGURE 3 - DEROULEMENT DE L'ALLOGREFFE .....	9
FIGURE 4 - ÉVOLUTION DANS LE TEMPS DES TAUX DE CELLULES IMMUNITAIRES .....	13
FIGURE 5 - PHYSIOPATHOLOGIE DE LA GVHA .....	22
FIGURE 6 - DIFFERENTS FACTEURS PERMETTANT LA MODULATION DU MICROBIOTE DE LA GESTATION A L'ENFANCE .....	27
FIGURE 7 - ABONDANCES RELATIVES DES PHYLUM BACTEROIDETES, PROTEOBACTERIA, FIRMICUTES ET ACTINOBACTERIA CHEZ LES NOURRISSONS EN FONCTION DU MODE D'ACCOUCHEMENT ET DE L'ÂGE GESTATIONNEL .....	28
FIGURE 8 - COLONISATION MICROBIENNE, DEVELOPPEMENT DU SYSTEME IMMUNITAIRE ET PERTURBATION DU MI PAR TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE AU DEBUT DE LA VIE .....	32
FIGURE 9 - SCHEMA D'ACQUISITION DES POPULATIONS BACTERIENNES INTESTINALES CHEZ L'ENFANT .....	34
FIGURE 10 - DISTRIBUTION LONGITUDINALE DES DIFFERENTES GRANDS GENRES BACTERIENS AU SEIN DU TRACTUS DIGESTIF .....	35
FIGURE 11 - DIFFERENCES PHYLOGENETIQUES ENTRE LES ENTEROTYPES .....	36
FIGURE 12 - ABONDANCES RELATIVES DES GENRES LES PLUS ABONDANTS DANS LES ECHANTILLONS ATTRIBUES A CHACUNE DES COMMUNAUTES .....	37
FIGURE 13 - SCHEMA SIMPLIFIE DES PRINCIPALES FONCTION DU MI .....	39
FIGURE 14 - SCHEMA DE LA FERMENTATION DES GLUCIDES EN AGCC .....	40
FIGURE 15 - PRODUCTION ET SECRETION D'AMP PAR LES CELLULES DE PANETH SITUEES AU FOND DES CRYPTES DE LIEBERKÜHN. ..	44
FIGURE 16 - ROLE IMMUNOMODULATEUR DU MI .....	47
FIGURE 17 - REGULATION IMMUNITAIRE PAR LE MI EN ETAT D'EQUILIBRE ET AU COURS D'UNE INFLAMMATION .....	49
FIGURE 18 - OBSERVATIONS INITIALES RELIANT LE MI ET LES MICI, L'OBESITE ET LES TROUBLES NEUROPSYCHIATRIQUES.....	56
FIGURE 19 - MODIFICATIONS DE LA DIVERSITE BACTERIENNE DANS LE TRACTUS INTESTINAL LORS D'UNE ALLOGREFFE DE CSH .....	62
FIGURE 20 - DIAGRAMME DE KAPLAN MEIER DE LA DIVERSITE ET DE LA SURVIE GLOBALE ET DE LA MORTALITE LIEE A LA TRANSPLANTATION .....	68
FIGURE 21 - DIVERSITE BACTERIENNE DU MI DES PATIENTS AU MOMENT DE LA PRISE DE GREFFE ET LEUR DEVENIR APRES LA TRANSPLANTATION .....	70
FIGURE 22 - ABONDANCES RELATIVES DANS LE TEMPS DES 8 FAMILLES TAXONOMIQUES LES PLUS ABONDANTES DANS LE MI DE 37 INDIVIDUS ALLOGREFFES DE CSH .....	74
FIGURE 23 - DEROULEMENT DE L'ETUDE PARI-DYS .....	78
FIGURE 24 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES DE L'ANALYSE DU MI ET DE LA CARACTERISATION DE LA DYSBIOSE. ....	79
FIGURE 25 - COURBES D'INCLUSION DES PATIENTS DANS L'ETUDE PARI-DYS.....	81
FIGURE 26 - PLAQUETTE PEDAGOGIQUE EXPLICATIVE DESTINEE AU PATIENT .....	82

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 – FACTEURS CLINIQUES PREDICTIFS DE DOMINATION BACTERIENNE INTESTINALE .....	66
---	----

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/leucocytes-et-leur-pathologie/23-hematopoiese-cellules-souches-hematopietiques-facteurs-de-croissance>. Web 6 Sept. 2021
- [2] Michallet M. Allogreffes de cellules souches hématopoïétiques. *Transfusion Clinique et Biologique* 2011; 18: 235–245.
- [3] for the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), Passweg JR, Baldomero H, et al. Impact of drug development on the use of stem cell transplantation: a report by the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 2017; 52: 191–196.
- [4] <https://rams.agence-biomedecine.fr/cellules-souches-hematopietiques>. Web 6 Sept. 2021
- [5] Loiseau P. Système HLA – aspects fondamentaux et application à l’allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. 2021; 9.
- [6] Dhédin N, Vernant J. Allogreffes de cellules souches hématopoïétiques dans les hémopathies malignes et les aplasies médullaires : réalisation et complications. 2020; 17.
- [7] Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Res* 2016; 76: 6445–6451.
- [8] Protocole national de diagnostic et de soins - Aplasies médullaires acquises et constitutionnelles - HAS - Version Juillet 2019.
- [9] <https://www.em-consulte.com/article/677760/allogreffe-et-autogreffe-de-cellules-souches-hematopietiques>. Web 6 Sept. 2021
- [10] Rubio MT, Coman T, Rossignol J, et al. Immunology of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, p. B9780128012383000000.
- [11] Storek J, Geddes M, Khan F, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 425–437.
- [12] Cohen EP, Pais P, Moulder JE. Chronic Kidney Disease After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Seminars in Nephrology* 2010; 30: 627–634.
- [13] Staffas A, Burgos da Silva M, van den Brink MRM. The intestinal microbiota in allogeneic hematopoietic cell transplant and graft-versus-host disease. *Blood* 2017; 129: 927–933.
- [14] Vigorito AC, Campregher PV, Storer BE, et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood* 2009; 114: 702–708.
- [15] Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM. Pathogenesis and Management of Graft-versus-Host Disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2010; 30: 75–101.

- [16] Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, et al. Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Peripheral-Blood Stem-Cell and Bone Marrow Transplantation: A Meta-Analysis. *JCO* 2001; 19: 3685–3691.
- [17] Harris AC, Young R, Devine S, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2016; 22: 4–10.
- [18] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 2009; 373: 1550–1561.
- [19] D’Aveni M, Rubio MT. Actualités dans la réaction du greffon contre l’hôte aiguë digestive. 2017; 7.
- [20] Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol* 2003; 21: 149–161.
- [21] Thépot S, Socié G. Maladie chronique du greffon contre l’hôte : physiopathologie et traitements de première ligne – Graft versus host disease: pathophysiology and first line therapy. 2010; 4.
- [22] MetaHIT Consortium, Qin J, Li R, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65.
- [23] Butel M-J, Waligora-Dupriet A-J, Wydau-Dematteis S. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis* 2018; 9: 590–597.
- [24] Sun M-F, Shen Y-Q. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson’s Disease. *Ageing Research Reviews* 2018; 45: 53–61.
- [25] Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81: e00036-17, e00036-17.
- [26] Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* 2014; 6: 237ra65-237ra65.
- [27] Goedert JJ, Hua X, Yu G, et al. Diversity and Composition of the Adult Fecal Microbiome Associated with History of Cesarean Birth or Appendectomy: Analysis of the American Gut Project. *EBioMedicine* 2014; 1: 167–172.
- [28] Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome* 2017; 5: 4.
- [29] Biasucci G, Rubini M, Riboni S, et al. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* 2010; 86: 13–15.
- [30] Martin R, Makino H, Cetinyurek Yavuz A, et al. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS ONE* 2016; 11: e0158498.
- [31] Zeissig S, Blumberg RS. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nat Immunol* 2014; 15: 307–310.

- [32] O’Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. Article Commentary: The Influence of Early Infant-Feeding Practices on the Intestinal Microbiome and Body Composition in Infants. *Nutr Metab Insights* 2015; 8s1: NMI.S29530.
- [33] Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 15718–15723.
- [34] Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108: 4578–4585.
- [35] Chu DM, Antony KM, Ma J, et al. The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet. *Genome Med* 2016; 8: 77.
- [36] Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, et al. High-Throughput Sequencing Reveals the Incomplete, Short-Term Recovery of Infant Gut Microbiota following Parenteral Antibiotic Treatment with Ampicillin and Gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5811–5820.
- [37] Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, et al. The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet* 2016; 48: 1407–1412.
- [38] Fallani M, Young D, Scott J, et al. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2010; 51: 77–84.
- [39] Lécuyer E. Impact du microbiote sur la maturation du système immunitaire de l’hôte: analyse des fortes propriétés immunostimulantes de la bactérie segmentée filamenteuse en souris gnotobiotiques. 232.
- [40] Jandhyala SM. Role of the normal gut microbiota. *WJG* 2015; 21: 8787.
- [41] MetaHIT Consortium (additional members), Arumugam M, Raes J, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174–180.
- [42] Holmes I, Harris K, Quince C. Dirichlet Multinomial Mixtures: Generative Models for Microbial Metagenomics. *PLoS ONE* 2012; 7: e30126.
- [43] Ding T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* 2014; 509: 357–360.
- [44] Dougé A, Bay J-O, Ravinet A, et al. Microbiote intestinal et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Bulletin du Cancer* 2020; 107: 72–83.
- [45] Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 67–72.
- [46] Hooper LV. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* 2001; 291: 881–884.
- [47] Feitoza AB, Pereira AF. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. *Nutr Hosp*; 8.

- [48] Fukiya S, Arata M, Kawashima H, et al. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiology Letters* 2009; 293: 263–270.
- [49] Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *MEDICAL SCIENCES*; 6.
- [50] Kolopp-Sarda M-N. Système immunitaire muqueux et microbiote intestinal : Histoire d'une symbiose. *Revue Francophone des Laboratoires* 2016; 2016: 39–47.
- [51] Schroeder BO, Ehmann D, Precht JC, et al. Paneth cell  $\alpha$ -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol* 2015; 8: 661–671.
- [52] Kamada N, Chen GY, Inohara N, et al. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 2013; 14: 685–690.
- [53] Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology* 2007; 19: 70–83.
- [54] Mowat AMCl. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 331–341.
- [55] Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 2014; 157: 121–141.
- [56] Reading NC, Kasper DL. The Starting Lineup: Key Microbial Players in Intestinal Immunity and Homeostasis. *Front Microbio*; 2. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00148.
- [57] Hoeppli RE, Wu D, Cook L, et al. The Environment of Regulatory T Cell Biology: Cytokines, Metabolites, and the Microbiome. *Front Immunol*; 6. Epub ahead of print 18 February 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00061.
- [58] Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 2012; 13: 325–332.
- [59] Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 69: 1046s–1051s.
- [60] Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, et al. Commensal DNA Limits Regulatory T Cell Conversion and Is a Natural Adjuvant of Intestinal Immune Responses. *Immunity* 2008; 29: 637–649.
- [61] Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 2009; 139: 485–498.
- [62] Kim S, Jazwinski SM. The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 2018; 64: 513–520.
- [63] Alauzet C. Microbiote intestinale, dysbiose et pathologies. 2017; 7.
- [64] Doré J, Corthier G. Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 2010; 34: 7–16.

- [65] Fabbiano S, Suárez-Zamorano N, Chevalier C, et al. Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements. *Cell Metabolism* 2018; 28: 907-921.e7.
- [66] Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, et al. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters* 2014; 588: 4120-4130.
- [67] Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, et al. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe* 2008; 3: 213-223.
- [68] Million M, Diallo A, Raoult D. Gut microbiota and malnutrition. *Microbial Pathogenesis* 2017; 106: 127-138.
- [69] Rashid M-U, Zaura E, Buijs MJ, et al. Determining the Long-term Effect of Antibiotic Administration on the Human Normal Intestinal Microbiota Using Culture and Pyrosequencing Methods. *Clinical Infectious Diseases* 2015; 60: S77-S84.
- [70] Worsley MA. Infection control and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41: 59-66.
- [71] Mullish BH, Williams HR. *Clostridium difficile* infection and antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Med* 2018; 18: 237-241.
- [72] Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, et al. Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or Campylobacter Gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009; 137: 495-501.
- [73] Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne* 2016; 37: 418-423.
- [74] Quévrain E, Maubert MA, Michon C, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 2016; 65: 415-425.
- [75] Bercik P, Verdu EF, Foster JA, et al. Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice. *Gastroenterology* 2010; 139: 2102-2112.e1.
- [76] Fond G, Chevalier G, Eberl G, et al. Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans les troubles psychiatriques majeurs: mécanismes, données fondamentales, comorbidités gastro-intestinales et options thérapeutiques. *La Presse Médicale* 2016; 45: 7-19.
- [77] Goehler LE, Park SM, Opitz N, et al. Campylobacter jejuni infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: Possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. *Brain, Behavior, and Immunity* 2008; 22: 354-366.
- [78] Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, et al. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice: Behavior in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility* 2011; 23: 255-e119.

- [79] Emge JR, Huynh K, Miller EN, et al. Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2016; 310: G989–G998.
- [80] Holler E, Butzhammer P, Schmid K, et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2014; 20: 640–645.
- [81] Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, et al. Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55: 905–914.
- [82] Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2018; 18: 283–295.
- [83] Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2020; 382: 822–834.
- [84] Andermann TM, Peled JU, Ho C, et al. The Microbiome and Hematopoietic Cell Transplantation: Past, Present, and Future. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2018; 24: 1322–1340.
- [85] Velders GA, van Os R, Hagoort H, et al. Reduced stem cell mobilization in mice receiving antibiotic modulation of the intestinal flora: involvement of endotoxins as cofactors in mobilization. *Blood* 2004; 103: 340–346.
- [86] Staffas A, Burgos da Silva M, Slingerland AE, et al. Nutritional Support from the Intestinal Microbiota Improves Hematopoietic Reconstitution after Bone Marrow Transplantation in Mice. *Cell Host & Microbe* 2018; 23: 447-457.e4.
- [87] Ingham AC, Kielsen K, Cilieborg MS, et al. Specific gut microbiome members are associated with distinct immune markers in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Microbiome* 2019; 7: 131.
- [88] Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014; 124: 1174–1182.
- [89] Chakrabarti S, Lees A, Jones S, et al. Clostridium difficile infection in allogeneic stem cell transplant recipients is associated with severe graft-versus-host disease and non-relapse mortality. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 871–876.
- [90] Rubio M-T, Moreira-Teixeira L, Bachy E, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* 2012; 120: 2144–2154.
- [91] Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 2010; 16: 228–231.
- [92] Khosravi A, Yáñez A, Price JG, et al. Gut Microbiota Promote Hematopoiesis to Control Bacterial Infection. *Cell Host & Microbe* 2014; 15: 374–381.

- [93] Rubio M-T, Bouillie M, Bouazza N, et al. Pre-transplant donor CD4- invariant NKT cell expansion capacity predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 2017; 31: 903–912.
- [94] Coman T, Rossignol J, D’Aveni M, et al. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *OncolImmunology* 2018; 7: e1470735.
- [95] Wingender G, Stepniak D, Krebs P, et al. Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice. *Gastroenterology* 2012; 143: 418–428.
- [96] An D, Oh SF, Olszak T, et al. Sphingolipids from a Symbiotic Microbe Regulate Homeostasis of Host Intestinal Natural Killer T Cells. *Cell* 2014; 156: 123–133.
- [97] Associations between the Gut Microbiota, Immune Reconstitution, and Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Immunometabolism*. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.20900/immunometab20210004.
- [98] Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, et al. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood* 2015; 126: 1723–1728.
- [99] Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2802–2813.
- [100] Pession A, Zama D, Muratore E, et al. Fecal Microbiota Transplantation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: A Systematic Review. *JPM* 2021; 11: 100.

## ANNEXES

### Annexe 1

#### Questionnaire d'auto-évaluation de stress perçu de Cohen

Au cours du dernier mois :	Jamais	Presque jamais	Quelques fois	Assez souvent	Très souvent
1. Avez-vous été perturbé(e) par un événement inattendu ?					
2. Vous a-t-il semblé difficile de contrôler les choses importantes de votre vie ?					
3. Vous êtes-vous senti(e) nerveux(se) et stressé(e) ?					
4. Vous êtes-vous senti(e) confiant(e) dans votre capacité à prendre en main vos problèmes ?					
5. Avez-vous senti que les choses allaient comme vous le vouliez ?					
6. Avez-vous pensé que vous ne pouviez pas assumer toutes les choses que vous deviez faire ?					
7. Avez-vous été capable de maîtriser votre énervement ?					
8. Avez-vous senti que vous dominiez la situation ?					
9. Vous êtes-vous senti(e) en colère à cause de choses qui étaient en dehors de votre contrôle ?					
10. Avez-vous senti que les difficultés s'accumulaient à un point tel que vous ne pouviez les surmonter ?					

## Annexe 2

### Questionnaire d'anxiété générale de Spielberger

Ci-après figurent un certain nombre de déclarations que les gens utilisent souvent pour se décrire. Lisez chacun des énoncés et cochez la case appropriée de droite qui convient le mieux à ce que vous ressentez en général. Ne passez pas trop de temps sur chacun des points, et donnez la réponse qui semble décrire le mieux ce que vous ressentez en général.

N°	Questions	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1	Je me sens dans de bonnes dispositions.				
2	Je me sens nerveux et agité.				
3	Je suis content de moi.				
4	Je voudrais être aussi heureux que les autres semblent l'être.				
5	Je me sens raté.				
6	Je me sens paisible.				
7	Je suis calme, détendu, de sang-froid.				
8	J'ai l'impression que les difficultés se multiplient à un tel point que je ne peux plus les surmonter.				
9	Je m'inquiète trop à propos de choses qui n'en valent pas la peine.				
10	Je suis heureux.				
11	J'ai des pensées qui me tourmentent.				
12	Je manque de confiance en moi.				
13	Je suis sûr de moi.				
14	Je prends facilement des décisions.				
15	Je me sens à la hauteur.				
16	Je suis content.				
17	Des pensées sans importances me trottent dans la tête et me tracassent.				
18	Je ressens les contretemps si fortement que je ne peux pas les chasser de mon esprit.				
19	Je suis quelqu'un de calme.				
20	Je suis tendu ou agité dès que je réfléchis à mes soucis et problèmes actuels.				

## Annexe 3

### Protocole d'extraction d'ADN dans les fèces

---

#### EXTRACTION ADN<sub>g</sub> dans les fèces

##### Préparation des solutions

###### GT : Guanidine thiocyanate 4M Tris-HCl pH7.5, 0.1M



- Guanidine thiocyanate (Sigma G9277-100G)  
PM = 118.16 g/mol
- Tris-HCl pH=7.6 1M (Trizma hydrochloride pH=7.6 1M)  
(Sigma T2788-1L)

Peser 11.82 g de Guanidine thiocyanate (**sous hotte**)  
+ 14 mL d'H<sub>2</sub>O distillée autoclavée  
+ 2.5 mL de Tris-HCL

Agiter, flacon fermé, toute la nuit à T° ambiante sous le rocker

Ajuster le volume à 25 mL avec H<sub>2</sub>O distillée autoclavée

Placer 10 minutes à l'étuve à 60-70°C

Filtrer à 0.2 µm avec une seringue

**Conservation à +4°C à l'abri de la lumière**

###### LS-5% TP : N-Laurosyl Sarcosine 5% dans Tampon Phosphate pH8.0 - 0.1M



- N-Laurosyl Sarcosine sodium salt (Sigma L9150-50G)  
PM = 293.38 g/mol
- Sodium phosphate dibasique Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma S3264-250G)  
PM= 141.96 g/mol
- Sodium phosphate monobasique NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma S3139-250G)  
PM= 119.98 g/mol

1) Préparer le tampon Phosphate pH 8 - 0.1M:

- Solution de sodium phosphate dibasique Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M :  
Peser 14.2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
+ 100 mL d'H<sub>2</sub>O distillée autoclavée

- A dissoudre sur agitateur chauffant
- Solution de sodium phosphate monobasique  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1M :  
Peser 12 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
+ 100 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée autoclavée
  - Tampon Phosphate pH8, 0.1M :  
9.32 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M  
+ 0.68 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1M  
+ 90 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée autoclavée
- 2) Préparer le N-Laurosyl Sarcosine 5% dans Tampon Phosphate pH8.0, 0.1M :  
Peser 1 g de N-Laurosyl Sarcosine sodium salt  
+ 20 mL de tampon phosphate pH8, 0.1M

### **LS-10% TP : N-Laurosyl Sarcosine 10% dans Tampon Phosphate pH8.0 - 0.1M**



- N-Laurosyl Sarcosine sodium salt (Sigma L9150-50G)  
PM = 293.38 g/mol

Peser 1g de N-Laurosyl Sarcosine  
+ 8 mL de tampon phosphate pH8, 0.1M  
Après disparition de la mousse,  
ajuster le volume à 10 mL de tampon phosphate pH8, 0.1M

### **Solution de TENP :**



- Tris-HCl pH=7.6 1M (Trizma hydrochloride pH=7.6 1M)  
(Sigma T2788-1L)
- EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma E9884-100g)  
PM = 292.24 g/mol
- NaCl Chlorure de sodium (Sigma S3014-500g)  
PM = 58.44 g/mol

- 1) Préparer les solutions nécessaires :
- EDTA 0.5M  
Peser 7.31 g de EDTA  
+ 50 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée autoclavée
  - NaCl 5M  
Peser 5.84 g de NaCl  
Ajuster à 20 mL avec  $\text{H}_2\text{O}$  distillée autoclavée
- 2) Préparer la solution TENP :
- 1.5 mL de Tris-HCl 1M
  - + 1.2 mL de EDTA 0.5M
  - + 0.6 mL de NaCl 5M
  - + 0.3 g de PVPP
- Ajuster à un volume de 30mL avec  $\text{H}_2\text{O}$  distillée autoclavée

### Acétate de potassium 5M :

- Acétate de potassium (Sigma P1190 -100g)  
PM = 98.14 g/mol

Peser 24.53g d'acétate de potassium  
Ajuster à 50 mL avec H<sub>2</sub>O distillée autoclavée  
Chauffer à T=60°C pendant 10 minutes pour dissoudre

### RNase 10 mg/mL :

- RNase 10 mg/mL (FisherScientific 10753721)  
Aliquoter en 50µL et conservation à -20°C

### Acétate de sodium 3M :

- Acétate de sodium (Sigma S2889-250g)  
PM = 82.03 g/mol

Peser 12.30 g d'acétate de sodium  
Ajuster à 50 mL avec H<sub>2</sub>O distillée autoclavée

### TE 1X :



- Tris-HCl pH=7.6 1M (Trizma hydrochloride pH=7.6 1M)  
(Sigma T2788-1L)
- EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma E9884-100g)  
PM = 292.24 g/mol  
Solution EDTA à 0.5M déjà préparée

200 µL de Tris-HCl 1M pH=8  
+ 40 µL EDTA 0.5M  
Ajuster à 20 mL H<sub>2</sub>O millQ stérile

## Prélèvements

200mg de selles congelée

Peser un tube 2 mL à vis avant et après avoir l'échantillon pour déterminer la masse de l'échantillon

# Jour 1

## **Extraction ADN au FastPrep :**

Sans décongeler l'échantillon de selle, dans un tube de 2 mL à vis (Lysing Matrix E, MP BioMedical)

Ajouter 250 µL de GT

+ 40 µL de LS-10%

Faire un spin

Laisser décongeler 10 min à T° ambiante

Ajouter 500 µL de LS-5% TP

Vortexer pour bien homogénéiser

Incuber au bain-marie à sec à 70°C pendant 1h – 2h

Agiter au FastPrep : vitesse 6.5m/s

3x 30 s

5 minutes dans la glace entre chaque run

Ajouter 15 mg de PolyVinylPolyPyrrolidone (PVPP) à la spatule et vortexer

Centrifuger à 20 000 g pendant 5 minutes

Récupérer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf stérile de 2 mL

Au culot restant, ajouter 500 µL de solution TENP et vortexer

Centrifuger à 20 000 g pendant 5 minutes

Pooler ce surnageant avec le 1<sup>er</sup> surnageant obtenu

Répéter cette opération de lavage du culot encore 2 fois (Total 3 lavages: Volume max= 2 mL)

Centrifuger la totalité du surnageant poolé à 20 000 g pendant 1 minute (pour éliminer les dernières suspensions)

Répartir le surnageant dans 2 tubes Eppendorf stériles de 2 mL

## **Précipitation de l'ADN et des impuretés :**

Ajouter un volume d'isopropanol gardé au congélateur (environ 1 mL) à chaque surnageant

Mélanger doucement par retournements successifs du tube

Laisser 10 minutes à T° ambiante

Centrifuger à 20 000 g pendant 10 minutes

Eliminer le surnageant

Resuspendre les 2 **culots** dans un seul tube Eppendorf de 2 mL stérile  
+ 450  $\mu$ L de Tampon Phosphate pH8, 0.1M  
+ 50  $\mu$ L d'acétate de potassium 5M

Laisser précipiter les impuretés pendant la nuit à T=4°C

## Jour 2

Centrifuger à 20 000g pendant 30 minutes à T°= 4°C  
Récupérer le surnageant qui contient l'ADN purifié dans un tube Eppendorf stérile de 1.5 mL

### **Précipitation de l'ADN purifié :**

Ajouter 2  $\mu$ L de RNase à 10 mg/mL  
Incuber à 37°C pendant 30 minutes

#### **Pour la suite du protocole, travailler à +4°C :**

Ajouter 1 mL d'éthanol absolugardé au congélateur  
+50  $\mu$ L d'acétate de sodium 3M  
Mélanger doucement par retournements successifs du tube

Centrifuger à 20 000g pendant 10 minutes à 4°C  
Jeter le surnageant  
ATTENTION : le culot peut être parfois labile

Ajouter dans le tube, 1 mL d'éthanol à 70% sans reprendre le culot  
Centrifuger à 15 000g pendant 1 minute à 4°C  
Jeter le surnageant par retournement du tube  
Répéter cette opération encore 2 fois (Total 3 lavages)

Sécher le culot d'ADN à T° ambiante sous la hotte environ 10 minutes

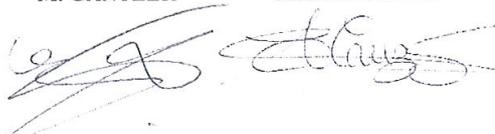
Reprendre le culot dans 150 $\mu$ L de TE 1X, selon la taille du culot  
Laisser une nuit à +4°C (pour faciliter la resuspension)  
Stocker à -20°C

06 OCT. 2021

DEMANDE D'IMPRIMATUR

ARRIVEE

Date de soutenance : 7.10.2021

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Marine FRAYSSINOUX</p> <p><u>Sujet :</u> <b>DYSBIOSE INTESTINALE ET RECONSTITUTION IMMUNITAIRE CHEZ LE PATIENT RECEVANT UNE ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES</b></p> <p><u>Jury :</u></p> <p><b>Président et Co-directeur :</b> M. Christophe GANTZER, Professeur</p> <p><b>Directrice :</b> Mme. Corentine ALAUZET, Maitre de conférences</p> <p><b>Juges :</b> Mme. Geneviève HERY-ARNAUD, Professeur Mme. Marie-Thérèse RUBIO, Professeur M. Alain LOZNIEWSKI, Professeur</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le</p> <p>Le Président du Jury et Co-directeur <b>M. GANTZER</b></p> <p>Directrice de Thèse <b>Mme. ALAUZET</b></p> 
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 21.09.2021</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center"><b>Pr. Raphaël DUVAL</b></p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 30 SEP. 2021</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center"><b>Pierre MUTZENHARDT</b></p> <p>N° d'enregistrement : 11993C</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**DYSBIOSE INTESTINALE ET RECONSTITUTION IMMUNITAIRE CHEZ LE PATIENT RECEVANT  
UNE ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES**

**Thèse soutenue le jeudi 7 octobre 2021**

**Par Marine FRAYSSINOX**

**RESUME :**

Aujourd'hui considéré comme un organe à part entière, le microbiote intestinal (MI) joue un rôle décisif dans notre santé. Autrefois appelé « flore intestinale », le MI est composé de plus de 10 000 milliards de bactéries et autres micro-organismes au sein du tractus digestif. Son équilibre et sa composition sont impactés tout au long de la vie par divers facteurs (âge, infections, hormones, alimentation, prise de médicaments...). Cet équilibre est essentiel aux nombreuses fonctions exercées par les bactéries commensales et sa perturbation, appelée dysbiose, est de plus en plus associée au développement ou à l'aggravation de certaines pathologies. Au cours des dernières années, le développement du séquençage à haut débit a facilité l'analyse de la diversité des écosystèmes microbiens (notamment par le séquençage de l'ADNr 16S bactérien) et a permis d'approfondir les connaissances sur la composition des microbiotes et leur rôle clé dans la santé de leur hôte. La majorité des études suggère l'implication d'une dysbiose intestinale dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), de l'obésité et du cancer colorectal. Mais depuis quelques années, des articles rapportent le rôle crucial du MI dans diverses pathologies non digestives ou dans l'évolution des patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Le MI est en passe de devenir une nouvelle cible thérapeutique dans la prise en charge de ces différents troubles via des stratégies variées visant à restaurer son équilibre.

L'allogreffe de CSH, malgré son risque élevé de mortalité, reste dans certaines situations le seul traitement curatif de certaines hémopathies. Cette stratégie d'immunothérapie cellulaire vise à détruire la moelle osseuse du patient et à réinjecter des CSH d'un donneur sain dans le but de reconstituer une moelle saine et de détruire les cellules tumorales résiduelles grâce aux lymphocytes T (LT) du donneur, c'est l'effet GVL (*Graft versus Leukemia*). Les principales complications de l'allogreffe de CSH sont les infections liées à l'immunodépression et la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD, *Graft versus Host Disease*). Le MI semble jouer un rôle dans l'apparition de ces effets indésirables. L'amélioration des connaissances dans la physiopathologie de ces complications est essentielle pour une prise en charge optimale de ces patients à haut risque.

L'objectif de cette thèse est de mettre en relation entre le MI et la reconstitution immunitaire chez les patients allogreffés à partir des nombreuses données de la littérature. Dans une première partie, les grands principes de l'allogreffe de CSH, de la reconstitution immunitaire et des principales complications après transplantation seront présentés. Dans un deuxième temps, nous définirons ce qu'est un MI sain, son installation et sa composition, puis nous discuterons de ses principales fonctions au sein du tractus digestif. Enfin, nous analyserons les différentes interactions entre le MI et le système immunitaire au cours du processus d'allogreffe, notamment dans le cadre de l'étude PARI-DYS qui se déroule actuellement au CHRU de Nancy.

**MOTS CLES : Dysbiose intestinale, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, reconstitution immunitaire**

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Directrice : <b>Docteur Corentine ALAUZET</b> Co-directeur : <b>Professeur Christophe GANTZER</b>	<b>Laboratoire de Microbiologie, CHRU Nancy</b>	Expérimentale <input type="checkbox"/> <b>Bibliographique</b> <input checked="" type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

<b><u>Thèmes</u></b>	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament <b>5 - Biologie</b>	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
----------------------	---	---