



HAL
open science

Étude de l'impact d'un pesticide, le chlorpyriphos, sur
un composant aérobie du microbiote intestinal,
l'escherichia coli, à l'aide d'un intestin artificiel, le
SHIME®

Anaïs Brasseur

► To cite this version:

Anaïs Brasseur. Étude de l'impact d'un pesticide, le chlorpyriphos, sur un composant aérobie du microbiote intestinal, l'escherichia coli, à l'aide d'un intestin artificiel, le SHIME®. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03075333

HAL Id: dumas-03075333

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03075333>

Submitted on 16 Dec 2020

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.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

UFR DE PHARMACIE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 17 septembre 2019

Par Anaïs BRASSEUR

Née le 15/10/1995 à Arras (62)

Etude de l'impact d'un pesticide, le chlorpyrifos, sur un composant aérobie du microbiote intestinal, l'*Escherichia coli*, à l'aide d'un intestin artificiel, le SHIME[®]

EQUIPE D'ACCUEIL : Laboratoire Péritox (Professeur Véronique Bach)

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE

Membres : Madame le Docteur Farida HAMDAD (Directeur de Thèse)

Madame le Docteur Hafida KHORSI-CAUET (Directeur de Thèse)

Remerciements

A mon président de thèse, **Monsieur Gilles Duverlie**, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Directeur de l'Unité de Virologie Clinique et Fondamentale (UVCF EA4294), Chef de service de virologie du CHU Amiens-Picardie et ex-Doyen de la faculté de pharmacie d'Amiens.

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Vous avez suscité ma curiosité au sujet du microbiote lors de votre enseignement sur ce sujet. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A mes directrices de thèse, **Madame Hafida Khorsi-Cauet**, Maitre de conférence et Docteur de Sciences au Laboratoire PERITOX de l'Université de Picardie Jules Verne, et **Madame Farida Hamdad**, Praticien Hospitalier au laboratoire de Bactériologie du CHU Amiens-Picardie, Pharmacien Biologiste et Docteur de Sciences de l'UPJV.

Grâce à vous j'ai découvert le monde de la recherche. Pour m'avoir encadrée durant ce travail et pour votre implication, le temps et l'énergie que vous m'avez accordés, veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A l'ensemble de l'équipe du **Laboratoire PERITOX** (Unité mixte INERIS Périnatalité et Risques Toxiques) de l'Université de Picardie Jules Verne et en particulier à sa directrice, **le Professeur Véronique Bach**.

Pour m'avoir accueillie et permis d'effectuer mes recherches théoriques et expérimentales durant ces 12 mois passés au sein du Laboratoire. Je souhaite une bonne continuation à tous les membres de l'équipe.

Mes remerciements s'adressent également :

A l'ensemble des enseignants de la **Faculté de Pharmacie de l'Université Picardie Jules Verne**, pour les enseignements théoriques et pratiques nécessaires à la réussite de mes études.

A mes encadrants de stages, pour votre accueil dans votre officine et vos services, je vous remercie. Vous avez participé à un moment ou à un autre de mes études à mon orientation professionnelle.

A mes anciennes collègues, **Anne, Aurélia, Corine, Elisabeth, Elodie, Maïté, Manon, Marie-France**, pour m'avoir permis de m'intégrer, pour votre sympathie et votre soutien durant ces 6 mois de stage. Une équipe formidable !

A **Madame Domitille Chevalier**, titulaire de la Pharmacie de Doullens, pour votre accueil au sein de votre équipe officinale.

A **Madame Evelyne Courselle**, pour vos précieux conseils.

Je dédie cette thèse :

A **mes parents**, pour m'avoir constamment soutenue et encouragée tout au long de ces études et pour les relectures et corrections de ce mémoire. A nos conversations téléphoniques de chaque soir. Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises.

A ma sœur, **Audrey**, pour ton soutien, ton écoute, tes conseils, ta relecture et ta correction.

A **Rémi**, pour ton soutien durant ces années d'études, ton écoute, ta bonne humeur, aux moments passés ensemble, à l'avenir que nous construisons chaque jour. Pour ta relecture et ta correction.

A ma marraine, **Claudine**, pour ta relecture et ton intérêt pour ce sujet.

A **Marie**, ma belle-sœur, pour ta correction.

A **Patricia**, ma belle-mère, pour ton aide apportée.

A ma famille et belle-famille, pour votre encouragement et votre reconnaissance.

A mes amies de la fac, **Myriam, Christiane, Tiphaine, Marion, Lyna** et **Sarah**, pour les moments passés durant ces années d'études, pour les travaux en groupe, les révisions.

A mes amies de longue date, **Jeanne, Marie, Marie** et **Sophie**, pour notre fidèle amitié, c'est toujours un bonheur de se retrouver toutes ensemble.

Et enfin, j'ai une pensée tout particulière pour mes proches absents en ces jours si particuliers mais bel et bien présents dans nos cœurs et nos pensées...

Sommaire

Introduction	
I. Généralités.....	
1. Présentation du microbiote intestinal	12
1.1. Définition du microbiote intestinal	12
1.2. Composition du microbiote intestinal	12
1.3. Répartition de la flore bactérienne intestinale.....	13
1.4. Symbiose	15
1.5. Les rôles du microbiote intestinal	15
2. Modélisation du microbiote à l'aide du SHIME®	17
3. Dysbiose	21
3.1 Définition de la dysbiose.....	21
3.2 Antibiorésistance.....	21
4. Facteurs influençant la composition du microbiote.....	23
4.1 Acquisition du microbiote intestinal	23
4.2 Les facteurs d'influence	23
4.3 Les pesticides	24
4.4 Un pesticide, le chlorpyrifos (CPF).....	25
II. Matériels et méthodes	
1. Modélisation de l'écosystème intestinal humain : le SHIME®	28
2. Analyse bactériologique	28
3. Identification précise par spectrométrie de masse	29
4. Test de sensibilité aux antibiotiques d' <i>E. coli</i>	31
5. Analyse génotypique des <i>E. coli</i>	32
6. Statistiques.....	34
III. Résultats.....	
1. Résultats des caractéristiques bactériologiques	36
1.1. Identifications phénotypiques des colonies sur les différents milieux	36
1.2. Tests d'orientation : recherche des enzymes respiratoires	36
1.3. Identification par spectrométrie de masse	36
1.4. Résultats globaux	36
2. Test de sensibilité aux antibiotiques	37
3. Typage moléculaire	37

4.	Résultats par fermenteur avec ou sans exposition au CPF	40
4.1	Résultats à J0 (sans exposition).....	40
4.2	Impact du CPF à court terme (J15)	42
4.3	Impact du CPF à moyen et long terme (J30).....	44
IV.	Discussion.....	
	Conclusion	
	Perspectives	

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGCC : Acides Gras à Chaine Courte volatils

BLSE : BêtaLactamases à Spectre Elargie

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

ClpB : Caseinolytic peptidase B protein homolog

CPF : Chlorpyriphos

DJA : Dose Journalière Acceptable

DL50 : Dose Létale 50

EBLSE : Entérobactéries productrices de B-lactamases à Spectre Elargi

ERIC-PCR : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FOS : Fructo-OligoSaccharides

GOS : Galacto-OligoSaccharides

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level

LPS : Lipopolysaccharide

MACs : Microbiota-Accessible Carbohydrates

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation Time Of Flight

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

NOAEL : No Observable Adverse Effect Level

SHIME® : Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem.

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

Il est impossible de ne pas se rendre compte aujourd'hui que les comportements alimentaires sont devenus une préoccupation pour la société. L'une des raisons de ces inquiétudes est la présence avérée de pesticides dans l'alimentation. Les pesticides sont utilisés largement en agriculture, industrie et chez les particuliers. L'environnement et les organismes vivants sont impactés. Parmi leurs effets, certains restent méconnus ou inexpliqués. Ces faits imposent à la société d'établir des actions pour lutter contre les effets de l'exposition aux toxiques. Citons le développement d'applications telles que « YUKA » aidant les consommateurs à repérer la présence d'additifs controversés, la multiplication des magasins et des labels bio, le projet gouvernemental de transition écologique de l'agriculture (Loi Agriculture et Alimentation du 1^{er} novembre 2018), le concept « One Health » reposant sur la sécurité sanitaire des aliments, la lutte contre l'antibiorésistance,... (1–3).

L'étude présentée dans cette thèse se concentre sur un pesticide en particulier : le Chlorpyrifos (O, O-diéthyle, O- (3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate) (CPF). Cet organophosphoré est retrouvé dans les sols, l'eau et l'alimentation. C'est l'un des pesticides les plus utilisés en Picardie. Une étude du laboratoire Pérیتox (Cohorte Méco Expo, 2014) a détecté la présence du CPF et de ses métabolites au sein même du méconium des nouveau-nés (4) ! Il existe un lien entre l'exposition au CPF et l'apparition d'un syndrome métabolique associant obésité, hyperlipidémie et diabète, observations préoccupantes (4–6).

Le corps humain a ses propres moyens de lutte contre les perturbateurs présents dans l'environnement. Il est composé de communautés complexes de micro-organismes vivants (bactéries, virus, levures, champignons), nommés microbiotes, regroupés en différents écosystèmes qu'offre l'anatomie humaine : microbiote cutané, microbiote respiratoire, microbiote génital et microbiote intestinal (7–10).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au microbiote intestinal. Il intervient dans la régulation de bons nombres de fonctions du corps humain : système immunitaire, métabolisme énergétique, système nerveux,... Il est un premier contact avec l'alimentation qui le module.

Dans cette thèse, nous définirons le microbiote de par son rôle, son importance physiologique chez l'être humain, ainsi que les facteurs le déséquilibrant et entraînant des pathologies.

Cette thèse permet d'appréhender les impacts du CPF sur la répartition, la résistance aux antibiotiques et les génotypes d'*E. coli*, composant de la flore aérobie du microbiote intestinal.

I. Généralités

1. Présentation du microbiote intestinal

1.1. Définition du microbiote intestinal

Le microbiote, ou flore intestinale, est composé de 10^{13} à 10^{14} de bactéries appartenant à des milliers d'espèces. Les bactéries qui survivent à l'acidité de l'estomac, au péristaltisme, au système immunitaire, aux enzymes digestives, colonisent le tube digestif sur une surface de plus de 4500 m^2 (9–11).

1.2. Composition du microbiote intestinal

Quatre *phyla* majeurs représentent 95% des bactéries composant le microbiote intestinal (Fig. 1), classés par ordre d'importance :

- Les Firmicutes : genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Faecalibacterium*. Ce sont des bactéries à Gram positif, les plus représentées dans le tractus intestinal ;
- Les Bacteroidetes : genres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* ;
- Les Actinobacteria (< 1% des bactéries séquencées) contient notamment le genre *Bifidobacteria* (famille des Bifidobacteriaceae). Il s'agit de bactéries à Gram positif anaérobies strictes qui se retrouvent essentiellement au niveau du côlon ;
- Les Proteobacteria dont font partie les *Enterobacteria*, bactéries à Gram négatif aérobies-anaérobies facultatives (exemple : *Escherichia coli* qui représente 80% de la flore aérobie, *Proteus sp*, *Klebsiella pneumoniae*,...) (10, 12).

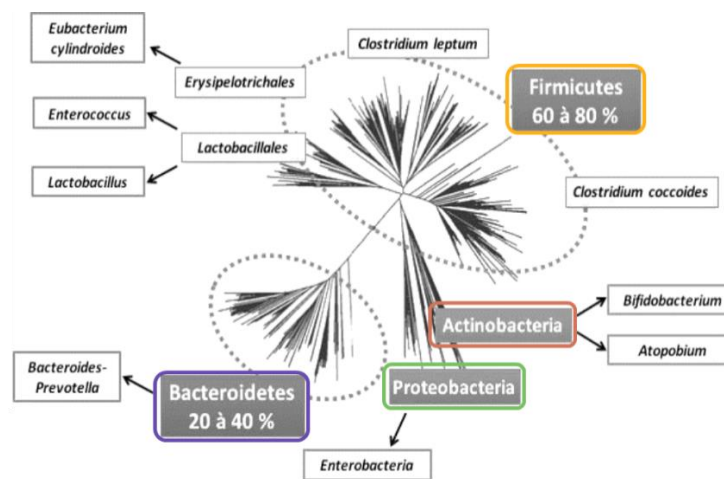


Figure 1 : Les phyla du microbiote intestinal (13)

L'ensemble de la flore est répartie en 2 groupes :

- La flore dominante représente 10^9 à 10^{10} UFC /g. Ce sont des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* ;
- La flore sous-dominante (10^6 à 10^8 UFC /g) rassemble des bactéries aéro-anaérobies facultatives dont la famille des Enterobacteriaceae. En cas de prolifération de la flore sous-dominante, cela peut déclencher un phénomène pathologique (5) .

Chaque individu possède son propre microbiote. Trois grands types de microbiote ont été répertoriés, appelés entérotypes, différenciables par leur composition quantitative et qualitative en certaines bactéries (12):

- L'entérotype 1 est abondant en *Bacteroides* ;
- L'entérotype 2 en *Prevotella* ;
- L'entérotype 3 en *Ruminococcus*.

1.3. Répartition de la flore bactérienne intestinale

La colonisation par les micro-organismes se répartit dans le tractus digestif différemment selon les conditions du milieu (9, 10) (Fig. 2).

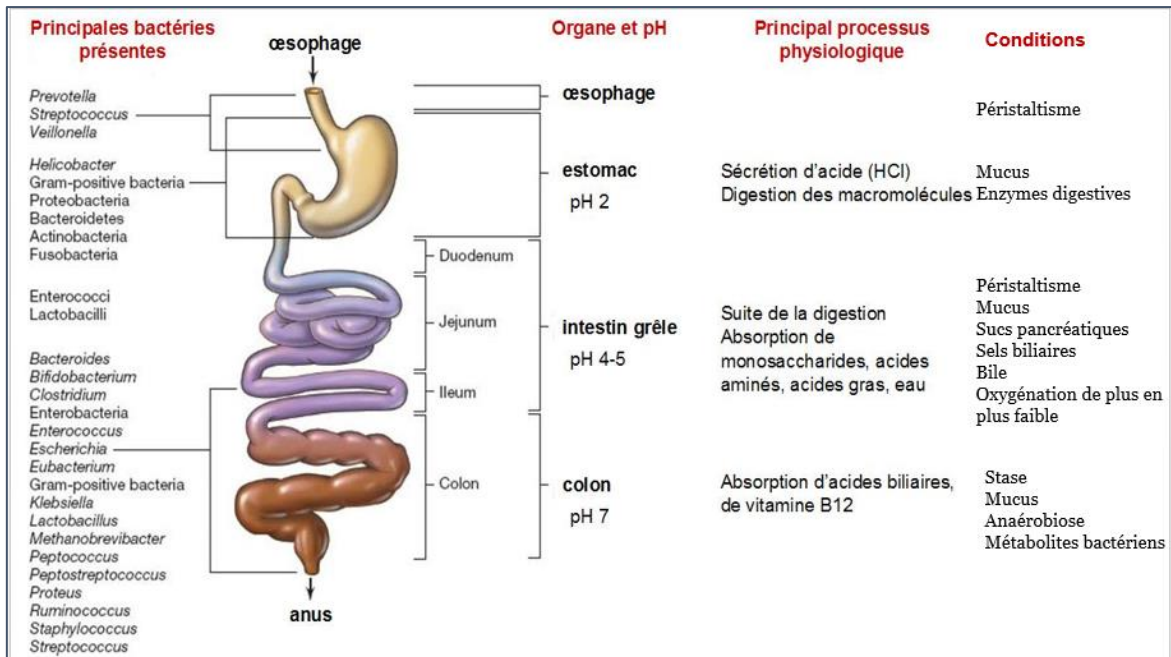


Figure 2: Le tractus digestif humain. Distribution des micro-organismes non-pathogènes fréquemment rencontrés chez l'adulte. Modifié d'après Biology of microorganisms, Brock, Pearson Eds (12ème édition, 2009), pp 817.

La composition du microbiote varie selon la localisation dans l'ensemble du tube digestif. Le nombre de bactéries et d'espèces augmentent du duodénum au rectum (8).

La bouche présente essentiellement des micro-organismes provenant de l'alimentation (10^8 - 10^{10} UFC/g de salive). L'œsophage, qui n'est qu'un lieu de passage entre la bouche et l'estomac, renferme des *Streptococcus* (Phylum des Firmicutes), *Prevotella* (Phylum des Bacteroidetes) et *Veillonella*. L'estomac, proposant une forte acidité, ne possède qu'un faible nombre de micro-organismes (10^3 UFC / mL de contenu stomacal) dont les Proteobactéries avec le genre *Helicobacter pylori* et également *E. coli*. Ce sont, pour la plupart, des bacilles acido-tolérants présents entre les repas et augmentant le pH.

Le ralentissement du péristaltisme entraîne une diminution de l'oxygénation jusqu'au point d'atteindre un état d'anaérobiose au niveau de l'iléon et du côlon. Au fur et à mesure de cette décroissance, la richesse d'implantation augmente : 10^4 bactéries / mL dans le duodénum (surtout des bacilles et cocci à Gram positif) à 10^9 dans l'iléon (flore anaérobie stricte dont *Bacteroides* et anaérobie facultative dont *E. coli*) et de 10^{10} à 10^{12} UFC /g dans le côlon. Dans le jéjunum, on retrouve 10^6 UFC/g de contenu intestinal, des espèces aéro-anaérobies facultatives appartenant à la flore transitoire (Entérocoques et

Lactobacilles). La partie la plus riche est le côlon, représentant, ainsi, 70% des micro-organismes (plus de 3000 espèces, 100 fois plus de bactéries anaérobies que de bactéries aérobies). Il regroupe les phylums Firmicutes, *Bacteroides*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. L'importance de la flore anaérobie au niveau colique s'explique par la diminution du péristaltisme, un potentiel d'oxydo-réduction bas et une teneur en oxygène réduite (12).

1.4. Symbiose

Le microbiote est reconnu comme un organe essentiel pour la santé de l'hôte. Le microbiote et l'Homme vivent en symbiose. La symbiose est une relation mutualiste obligatoire avec des bénéfices réciproques essentiels à la survie. Les micro-organismes reçoivent les ressources vitales et une niche biologique. En échange, ils interviennent dans diverses fonctions vitales. Le microbiote et le corps humain dialoguent constamment par le biais d'hormones ou de neuromédiateurs (9, 11, 14).

1.5. Les rôles du microbiote intestinal

Le microbiote est constitué d'une flore commensale assurant de nombreuses fonctions bénéfiques, sans facteurs de pathogénicité. Ces rôles sont homéostatiques, structuraux et protecteurs (5).

1.5.1. Rôle homéostatique

Le microbiote intervient dans la synthèse de nombreuses vitamines (K, B2, B6, B8, B9, B12), nécessaires à la coagulation, aux métabolismes glucidique, lipidique et protéique, à la synthèse de neuromédiateurs, d'hormones et d'ADN,... (11, 12, 16).

Le métabolisme des glucides fermentescibles (amidon, glycanes, mucines, glycoprotéines) par des bactéries fibrolytiques (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*) produit du méthane et des acides gras à chaînes courtes (AGCC) tels que acétate, butyrate et propionate (5, 9–11).

- L'acétate est utile aux réserves énergétiques;
- Le butyrate est utilisé comme source d'énergie par les colonocytes;
- Le propionate permet la néoglucogenèse hépatique.

Les bactéries protéolytiques (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*) dégradent les protéines et produisent des AGCC, de l'azote, des hydrates de carbone et des acides aminés essentiels (10).

Les lipases bactériennes agissent sur le métabolisme des lipides, tels que le cholestérol qui est transformé en coprostanol non absorbé et éliminé dans les fèces (12).

Le microbiote métabolise les xénobiotiques. Les micro-organismes sécrètent des enzymes (azoréductase, nitroréductase, β glucuronidase, sulfatase, β lyase) intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques (17). Par exemple, *Enterococcus faecalis* métabolise la L-dopa, apportée par les médicaments, diminuant son efficacité (18). Des effets indésirables de médicaments comme l'irinotécan, anticancéreux, peuvent apparaître par réaction de déconjugaison. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques issus de la combustion de carburant, bois, tabac sont bio-activés en composés oestrogéniques par les micro-organismes du côlon (19).

La flore intestinale régule l'appétit par la production de médiateurs agissant sur le cerveau comme la protéine ClpB (Caseinolytic peptidase B protein homolog) mimant la mélanotropine, hormone de satiété (20).

Les AGCC stimulent la motricité intestinale (21).

1.5.2. Rôle structural

Le microbiote interagit avec son environnement et le module (5, 12) :

- Interaction avec l'épithélium intestinal (croissance des cellules et des cryptes intestinales, régulation de la longueur des villosités) grâce aux AGCC ;
- Régulation du pH par les bactéries lactiques sécrétrices de lactate ;
- Production du mucus digestif stimulée par les LPS (Lipopolysaccharide) bactériens. Le mucus est une source de nutriments pour les bactéries qui le dégradent (7) ;
- Stimulation de l'angiogenèse ;
- Restauration des jonctions serrées et perméabilité intestinale liée à la libération de butyrate.

Ces caractéristiques interviennent dans l'absorption des nutriments et la protection de la paroi digestive.

1.5.3. Rôle protecteur

Le microbiote intestinal protège l'organisme contre la translocation bactérienne (5, 22).

Grâce à l'effet barrière de la flore commensale, l'implantation et la prolifération des bactéries exogènes potentiellement pathogènes sont rendues difficiles (5, 12).

La synthèse de substances actives comme l'acide lactique, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (peptides bactéricides et bactériostatiques thermostables et pH-tolérants) permet de lutter contre le développement d'agents pathogènes (12, 23–26).

Le lien entre microbiote et l'immunité permet l'acquisition de la tolérance orale aux aliments et de l'immunocompétence (5, 22).

2. Modélisation du microbiote à l'aide du SHIME®

L'écosystème intestinal humain peut être modélisé à l'aide du SHIME® (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem®). Le SHIME® est un modèle dynamique automatisé scientifiquement validé du tractus digestif développé en 1993 (27).

Ce modèle représente les principaux compartiments du tractus digestif, en l'absence de la bouche et de l'œsophage (Fig. 3 et Tableau 1). Son usage nécessite un contrôle rigoureux des facteurs environnementaux internes au tube digestif influant sur le microbiote (pH, température, luminosité, agitation, acides biliaires, enzymes pancréatiques, anaérobie, vitesse de transit, disponibilité des substrats alimentaires...). Ces facteurs diffèrent selon le segment digestif et le moment par rapport au repas (5, 27, 28).

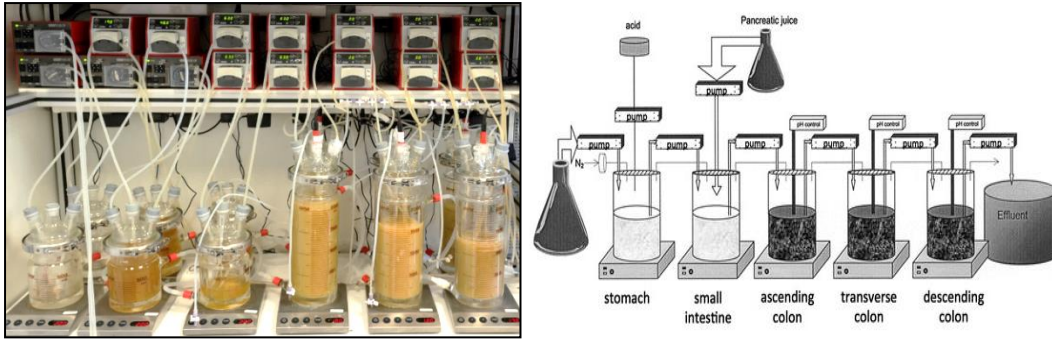


Figure 3 : Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem® (SHIME®) (29)

Fermenteurs	Partie du tractus digestif	Volumes (mL)	Temps de résidence (h)	pH
F1	Estomac	200	3	2
F2	Duodénum / Jéjunum	300	3	7
F3	Iléon / Caecum	300	4	7
F4	Colon ascendant	1000	20	5,5-6
F5	Colon transversal	1600	32	6-6,4
F6	Colon descendant	1200	24	6,4-6,8

Tableau 1 : « Dénominations, volumes et temps de résidence des fermenteurs »

Le SHIME® est alimenté à l'aide de différentes solutions :

L'alimentation primaire permet la croissance des micro-organismes et mime les conditions environnementales de l'intestin humain pour que la flore étudiée se rapproche le plus possible du microbiote digestif. L'alimentation primaire se compose de sources carbonées, azotées et énergétiques. Le pH est réglé à 2. L'alimentation primaire est introduite dans l'estomac (F1) à raison de 200mL. Le contenu est transféré trois heures après, grâce à un système de pompe, dans le duodénum/jéjunum (F2) où 90 millilitres de sucs pancréatiques sont ajoutés. L'inoculation est répétée jusqu'à obtention du volume utile dans chaque compartiment (tableau 1).

Le jus pancréatique artificiel est un mélange basique de bile bovine, bicarbonate de sodium et pancréatine dans de l'eau distillée stérile. Son pH est ajusté à 8-8,5 pour réduire l'acidité de l'alimentation primaire.

L'alimentation secondaire représente l'alimentation habituelle d'un individu. Il s'agit d'une solution de 300mL d'eau distillée et 70g de produits alimentaires (glucides, protéines, lipides). Elle apporte aussi les micro-organismes habituellement présents dans l'alimentation. Après 10 jours, 10 mL sont administrés chaque jour dans F1 à raison de 3 fois par jour à intervalles réguliers de 8 heures.

Le SHIME[®] est unique car (29) :

- Il représente le tractus gastro-intestinal dans son ensemble ;
- Il donne des informations mécanistiques détaillées selon chaque région du tractus ;
- Des expériences à long terme sont possibles grâce à la stabilisation pérenne du microbiote ;
- La possibilité d'échantillonnage de chaque zone du côlon permet d'effectuer des analyses parallèles sans impacter la communauté microbienne résidente ;
- La reproductibilité importante grâce à la standardisation du système et de ses paramètres, permet d'effectuer des analyses comparables de l'action de diverses expositions ;
- La possibilité de simuler aussi bien le microbiote des adultes, des nourrissons, des personnes en bonne santé ou malades, humain ou animal grâce à la flexibilité du système (65) ;
- Le SHIME[®] permet l'analyse des activités enzymatiques, notamment des réactions catalytiques des glucides, protéines, lipides, acides biliaires, xénobiotiques ou encore la production de vitamines au sein du tube digestif ;
- Des similitudes existent entre le microbiote humain et le SHIME[®]. Elles sont à prendre en compte lors de l'extrapolation des observations effectuées :
 - Les pH des différents compartiments du SHIME[®] respectent ceux du tractus digestif (Tableau 2) ;

	Tractus digestif	SHIME®
<i>Estomac</i>	1,5-5	2
<i>Duodénum / Jéjunum</i>	5-7	7
<i>Iléon / Caecum</i>	7-8	7
<i>Côlon ascendant</i>	4,5-7,5	5,5-6
<i>Côlon transversal</i>		6-6,4
<i>Côlon descendant</i>		6,4-6,8

Tableau 2 : Comparatif entre pH digestif et pH du SHIME® (29)

- L'agitation magnétique et les pompes, comparables au péristaltisme digestif, permettent le brassage et le transit du bol alimentaire ;
- L'anaérobiose, la température interne, les temps de résidence, les apports en bile et sucs pancréatiques sont aussi respectés ;
- L'alimentation triquotidienne est représentative. Elle est constituée de glucides, protéines et lipides, nutriments essentiels à l'Homme ;
- Chez l'Homme l'acquisition d'un microbiote mature est longue. Elle dure 2 ans. Le SHIME® permet une implantation et une stabilisation de la flore en 15 jours.

Certaines limites du SHIME® existent :

- Le tube digestif humain interagit avec l'immunité, le système nerveux, le métabolisme énergétique, le génome humain et le système endocrinien grâce à des neuromédiateurs ou des hormones. Ces interactions ne sont pas possibles dans le SHIME® qui est un système isolé ;
- L'une des différences majeures et limitantes est le caractère des parois digestives qui donne une grande surface d'échanges entre tubes digestifs et tissus grâce à l'irrigation sanguine et lymphatique, aux cellules épithéliales, aux jonctions serrées, aux villosités et au mucus, absents dans le SHIME®. Par conséquent, la perméabilité intestinale (propriété de la paroi intestinale qui permet l'échange de molécules entre la lumière intestinale et les tissus) et la translocation bactérienne (passage de micro-organismes ou de

fragments microbiens au travers d'une barrière intestinale intacte vers des organes normalement stériles) ne peuvent pas être étudiées.

Le SHIME® ne permet pas l'étude de la translocation bactérienne. Celle-ci est possible grâce à des lignées cellulaires cancéreuses humaines d'origine intestinale Caco-2 / TC7 (30). Ce système représente l'épithélium intestinal. Les cellules sont polarisées (pôle apical vers le haut et pôle basal vers le bas). Elles recouvrent une membrane poreuse en couche unique fixée sur collagène ou matrigel.

3. Dysbiose

3.1 Définition de la dysbiose

La dysbiose est un déséquilibre de l'écosystème bactérien. Une diversité bactérienne ou une fonction endommagée constitue une niche pour les pathobiontes et les souches pathogènes opportunistes (5, 26). La dysbiose induit un appauvrissement du microbiote, un stress oxydatif, une inflammation et une augmentation de la perméabilité intestinale (32).

Les pathobiontes sont des bactéries pouvant potentiellement générer une inflammation intestinale mais non pathogènes (protéobactéries, entérobactéries). Elles sont en nombres croissants lors de la dysbiose, alors que les bactéries protectrices immunorégulatrices (Firmicutes, *Faecalibacterium prausnitzii*) diminuent (33).

Les pathobiontes peuvent être à l'origine de désordres pour l'hôte. En effet, en cas de translocation bactérienne, ces espèces sont susceptibles de provoquer un choc septique ou d'infecter des organes vitaux normalement stériles. Par l'acquisition de facteurs de pathogénicité, ils peuvent devenir agressifs. Localement ils peuvent induire des réactions inflammatoires délétères pour l'intestin (14).

3.2 Antibiorésistance

L'usage des antibiotiques altère la diversité du microbiote intestinal (12). Les espèces sensibles sont tuées ou inhibées et subsistent les bactéries résistantes dont la densité augmente. Ce déséquilibre diminue l'effet barrière du microbiote (8,22,34).

Chez le nourrisson, l'administration d'antibiotiques ralentit la colonisation par les *Bifidobacterium* et favorise la dysbiose en faveur d'infections néonatales (5).

L'usage excessif d'antibiotiques favorise l'essor de pathologies dysimmunitaires, allergiques et auto-immunes. Le microbiote déséquilibré n'est plus à même de moduler l'immunité (15).

L'un des inconvénients de l'usage des antibiotiques est l'apparition et la diffusion de nombreux mécanismes de résistance (8).

L'antibiorésistance est la capacité bactérienne à survivre en présence d'un antibiotique. Plus le niveau de résistance est élevé, plus il est nécessaire d'augmenter la durée et/ou la concentration d'exposition (35). Il existe deux types de résistance : la résistance naturelle et la résistance acquise. Cette dernière est exprimée par certaines souches d'une espèce devenant ainsi résistantes aux antibiotiques après transfert d'éléments génétiques mobiles ou mutation chromosomique (36).

Le microbiote peut représenter un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques. La proximité entre ces bactéries et celles du microbiote favorise le transfert de gènes (8).

Le résistome intestinal est l'ensemble des gènes de résistance présents au sein du microbiote intestinal. On y retrouve le résistome endogène ou « résident » et le résistome exogène ou variable. Le résistome endogène représente souvent une résistance chromosomique non associée à des structures mobiles. Le résistome exogène est, quant à lui, généralement lié à des structures mobiles (plasmides ou transposons) pouvant être échangées avec les bactéries résidentes de l'hôte (8). Le résistome est dynamique et en pleine expansion (37).

Différents mécanismes de résistance existent (34,38) :

- Sécrétions d'enzymes (pénicillinases, céphalosporinases, carbapénèmases) ;
- Imperméabilité de la paroi bactérienne par réduction de l'expression ou l'inactivation du gène codant les porines ;
- Mutation de gènes codant la topoisomérase IV ;
- Acquisition ou surexpression de pompe à efflux ;
- Modification des protéines liant la pénicilline.

Les bactéries peuvent être classées selon leur niveau de résistance. C'est le cas des entérobactéries (39, 40) :

- Groupe 0 (sensible à l'ensemble des β -lactamines) ;
- Groupe 1 (céphalosporinase constitutive de très bas niveau, possédant un gène ampC) ;
- Groupe 2 (pénicillinase chromosomique de bas niveau) ;
- Groupe 3 (céphalosporinase inductible) ;
- Groupe 4 (pénicillinase et céphalosporinase inductible et enzyme sensible aux inhibiteurs) ;
- Groupe 5 (BLSE (bêta-lactamases à spectre étendu) chromosomique, céfotaximase inductible) ;
- Groupe 6 (BLSE de bas niveau / BLSE inductible).

4. Facteurs influençant la composition du microbiote

4.1 Acquisition du microbiote intestinal

L'acquisition de la flore est très complexe. Le fœtus réside dans un environnement stérile. L'implantation a lieu à la naissance. Lors de l'expulsion, l'enfant passe au contact du microbiote vaginal, cutané et intestinal de la mère. Les micro-organismes de l'environnement sont aussi candidats à la colonisation. La composition de base du microbiote dépend de divers facteurs tels que le mode d'accouchement, le terme de la grossesse, la charge bactérienne environnante à la naissance, l'allaitement, la génétique,... Toutefois, des bactéries ont été retrouvées dans le sang du cordon ombilical (*Enterococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*). Cela montre la possible existence d'un passage in utero de bactéries de la mère à l'enfant. L'implantation du microbiote suit une chronologie particulière. Le tractus digestif est, d'abord, composé de micro-organismes aérobies et anaérobies facultatives (streptocoques, entérocoques et entérobactéries). Par consommation d'oxygène, ces bactéries vont créer un environnement anaérobie. Une semaine après la naissance, les bactéries anaérobies s'implantent au sein du microbiote (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*) (5, 12).

4.2 Les facteurs d'influence

La composition du microbiote n'est pas statique et s'adapte durant toute la vie de l'hôte. Cette dynamique est liée à de nombreux facteurs :

- Transmission par contacts directs (9, 10) ;
- Régimes alimentaires, MICI (Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin), traitements médicamenteux (antibiotiques), cycles hormonaux, mode de vie, sexe, ethnie...(5) ;
- Vieillessement : Le ratio Firmicutes / Bacteroidetes augmente, à l'âge adulte. Chez les sujets âgés de plus de 65 ans, une proportion plus élevée de *Bacteroidetes* est retrouvée par rapport au phylum Firmicutes (41).

4.3 Les pesticides

Le terme pesticide vient de l'anglais « pest », nuisible, et du latin « -cide », tuer. C'est une substance phytopharmaceutique utilisée contre les organismes jugés nuisibles. Les domaines d'utilisation sont variés : agriculture, espaces verts, routes, aéroports, voies ferrées, réseaux électriques, jardins, domiciles particuliers, hygiène publique, santé publique, santé vétérinaire,... Les pesticides sont omniprésents dans l'environnement et dans l'alimentation. Ce sont plus de 1000 substances regroupées en 150 familles chimiques (5, 22, 36).

Différentes classifications existent selon :

- La cible : insecticides, fongicides, herbicides, parasitocides ;
- La structure chimique : organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse, organoazotés, urées substituées, sulfonylurées, dicarboximides.

Le rôle majeur d'un pesticide est d'avoir des effets toxiques contre des organismes cibles. Toutefois, ils touchent aussi des organismes non cibles et l'environnement. La rétention des métabolites toxiques entraîne la dégradation des constituants du sol (42).

Les effets sanitaires se divisent en deux types d'exposition :

- Les effets aigus (accidentels ou volontaires) à doses importantes, sont estimés par la Dose Létale 50 (DL50), dose-seuil entraînant 50% de mortalité dans une population donnée. Les individus les plus touchés sont les agriculteurs, leurs familles et proches (5, 22) ;

- Les effets chroniques à faibles doses, sur une durée importante, sont d'ordres digestif, comportemental, hormonal, cancérigène et métabolique. Ces effets sont déterminés par le NOAEL (No Observable Adverse Effect Level), le LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect Level) et la Dose Journalière Acceptable (DJA).

4.4 Un pesticide, le chlorpyrifos (CPF)

Le CPF est un insecticide utilisé contre les chenilles, les pucerons et les mouches des semis. Il se présente sous deux formes : éthyl et méthyl. La forme éthyl est celle utilisée, elle rentre dans la composition du Pyristar[®]. Il fait partie des organophosphorés dont la structure lipophile est composée d'un phosphore lié à une molécule carbonée. Son mode d'action repose sur un blocage irréversible de l'acétylcholinestérase au niveau des terminaisons nerveuses induisant une augmentation du taux d'acétylcholine (43).

Le CPF et ses métabolites (Diéthylphosphate, Diéthylthiophosphate et 3,5,6-trichloropyridinol) sont retrouvés dans les fruits, les légumes, les céréales, la viande, l'eau potable, les vignobles, les sols et l'air. Depuis 2006, il appartient à la liste des substances prioritaires à surveiller en raison de sa forte toxicité (6). Son utilisation est réservée à la culture d'épinard.

Les seuils toxicologiques du CPF sont (44) :

- DL₅₀ chez le rat (VO) = 66-223 mg/kg ;
- NOAEL chez le rat (VO) = 0,1 mg/kg/j ;
- NOAEL reprotoxicité = 5mg/kg/j ;
- NOAEL neutotoxicité = 10mg/kg/j ;
- LOAEL = 2mg/kg/j ;
- DJA = 0,001 mg/kg/j.

Les symptômes d'une intoxication au CPF sont hypersudation, hypersalivation, bronchoconstriction, myosis, nausées, vomissements, diarrhées, tremblements, troubles musculaires, incontinence, bradycardie, hypertension, insuffisance respiratoire, confusions, maux de tête, agitations, insomnies et anxiété. L'exposition chronique au CPF entraîne des troubles cérébraux (hyperactivité, troubles de l'attention, troubles de la mémoire), génétiques, cancérigène (leucémies), métaboliques (obésité), cardiaques, hépatiques, hormonaux (activité anti-androgénique), reprotoxiques (altération de la spermatogénèse) et

foetotoxiques (avortement, prématurité, malformations, retard de croissance, petit poids de naissance) (6, 43, 45). En 2012, une étude scientifique a montré que l'exposition au CPF lors de la grossesse entraîne des anomalies du développement du cerveau des enfants (46).

Ce travail de thèse s'est intéressé à l'impact de cet insecticide sur un composant aérobie du microbiote intestinal, *E. coli*.

II. Matériels et méthodes

1. Modélisation de l'écosystème intestinal humain : le SHIME®

Un inoculum issu de 3 échantillons de selle de donneurs anonymes adultes en bonne santé n'ayant pas consommé d'antibiotiques durant les 6 derniers mois a été utilisé pour cette étude.

Le pool est mis en solution dans 300mL de sérum physiologique (pour 50g de selles pesées). Après centrifugation à 1200 tours /min pendant 10 minutes, le surnageant est prélevé et inoculé dans les 3 derniers fermenteurs représentant le côlon (F4, F5 et F6).

L'expérience est divisée en 2 phases:

- La stabilisation pendant 15 jours permet l'implantation de la microflore. Elle se mesure par le maintien du pH adéquat dans chacun des compartiments. A l'issue de la stabilisation, un prélèvement est effectué à trois reprises sur 3 jours. Le but de ces premiers prélèvements est de s'assurer que les éventuels effets observés sont liés à l'exposition aux pesticides ;
- L'expérimentation dure 30 jours, pendant lesquels 10 mL de solution de CPF (3,5mg/10mL, pureté : 99,8%) est administrée quotidiennement dans l'estomac (F1). Cette solution est une dilution d'une solution mère de CPF (10mg/mL) dont le solvant est de l'huile végétale. La solution est conservée à 4°C. Trois prélèvements de 5 mL sont effectués au niveau de l'iléon/caecum (F3) et des segments du colon (F4, F5 et F6) après 15 jours (effet du CPF à court terme) et 30 jours d'exposition (effet du CPF à moyen et long termes).

Les prélèvements sont effectués de manière aseptique pour empêcher toute souillure (bactéries provenant de l'extérieur) de s'introduire par gravité dans les produits manipulés.

2. Analyse bactériologique

L'objectif est de comparer les résultats et d'étudier d'éventuels impacts du CPF sur le microbiote intestinal et particulièrement l'*E. coli*.

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés (géloses ordinaires, sélectives et d'identification) :

- BEA (Bile Esculine Azide) (aérobie) : utilisé pour l'identification des entérocoques ;
- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) : permet la culture et le dénombrement de la flore lactique ;
- MSA (Mannitol Salt Agar) : permet la culture de bactéries halophiles comme les staphylocoques ;
- COL (Columbia agar) : utilisé pour la culture de la flore totale ;
- BCP (BromoCresol Pourpre) : permet la culture des bactéries non exigeantes, milieu fermentescible contenant du lactose avec un indicateur de coloration le pourpre de bromocrésol ;
- CPS (Chromogenic Peptide Substrates) : gélose chromogène qui contient des substrats absorbés par des espèces de bactérie (*E. coli*, Entérocoques, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*), ce qui produit une substance colorée (métabolite) caractéristique.

L'ensemencement a été réalisé, à l'aide d'une öse qualibrée (10 µL), à partir des 3 prélèvements.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, différents types de colonies ont été repérés selon la morphologie (taille, relief, surface, pigmentation,...).

Des tests biochimiques d'orientation ont été utilisés (catalase et oxydase).

Une espèce a été retenue pour notre travail : *E. coli*, bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobie facultative, prototrophe (non-exigent), oxydase négatif.

3. Identification précise par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse basée sur la mesure de la masse de molécules ou d'atomes d'un échantillon permettant de détecter et d'identifier des micro-organismes. C'est une méthode précise à moindre coût. La méthode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation Time Of Flight) repose sur l'ionisation en phase gazeuse de contenus protéiques de l'échantillon. Les ions formés sont dérivés par un champ électrique et/ou magnétique. Les trajectoires sont proportionnelles au rapport masse/charge (m/z).

Le spectromètre (Fig. 4) est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur séparant les ions en fonction de m/z , d'un détecteur et d'un système informatique pour la visualisation des spectres.



Figure 4 : Spectromètre de masse MALDI TOF, Bruker®

La colonie bactérienne et une matrice sont déposées sur une cible inox. Le dépôt est cristallisé par séchage (Fig 5).

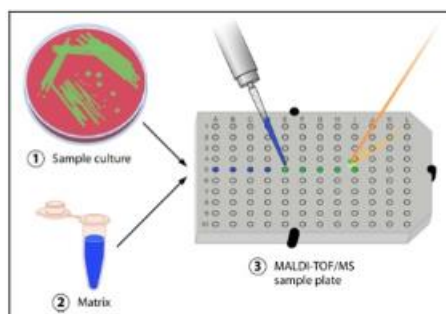


Figure 5 : Etapes préalables à l'identification de micro-organismes par MALDI-TOF MS Clarck et al, 2013

Dans le spectromètre Bruker®, le dépôt est irradié par rayon laser à azote de longueur d'onde 337nm, ce qui induit une sublimation de la matrice (désorption et ionisation). L'ionisation est maximisée par la multiplication du nombre de tirs laser. Lors de la désorption (passage en phase gazeuse), un transfert d'ions se fait entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon pour former des ions principalement monochargés

(Fig. 6). Selon la structure peptidique, les protéines se chargent négativement ou positivement.

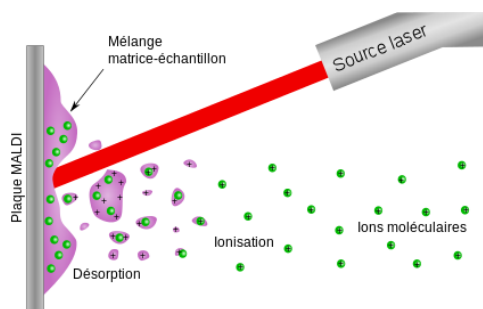


Figure 6 : Etape de l'identification par spectromètre de masse Bruker®

Les fragments protéiques ionisés se déplacent selon leur rapport m/z vers le détecteur.

Chaque fragment protéique est caractérisé sur un spectre selon les caractéristiques temps et intensité. Le spectre est comparé à une base de données standardisée Bruker®. Un score de confiance est donné selon la concordance entre le spectre obtenu et le spectre de référence. Lorsque le score est supérieur à 2, l'identification au genre et à l'espèce est sécurisée. Lorsque le score est inférieur à 1,7, le degré de confiance est insuffisant pour l'identification.

4. Test de sensibilité aux antibiotiques d'*E. coli*

La sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques se mesure par la concentration minimale inhibitrice. C'est la concentration minimale capable d'inhiber la croissance bactérienne.

L'antibiogramme par méthode de diffusion sur gélose est réalisé pour chaque morphotype d'*E. coli* selon les recommandations de la CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (ANNEXE 1).

Après mesure des diamètres d'inhibition, les catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* à chacun des antibiotiques : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

- Les souches S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans les Résumés de Caractéristiques de Produit ;
- Les souches R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée ;
- Les souches I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible.

Chaque espèce bactérienne possède sa propre grille de correspondance diamètre-sensibilité (ANNEXE 1).

La résistance naturelle est caractéristique d'une espèce bactérienne donnée. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification.

Les phénotypes de résistance ont été déterminés afin d'analyser l'impact des pesticides sur l'antibiorésistance au sein du microbiote.

Nous observons des phénotypes de résistance liés aux bêta-lactamines, c'est-à-dire aux pénicillines et céphalosporines. Quatre phénotypes ont été déterminés :

- Le phénotype sauvage (aucune résistance vis-à-vis des antibiotiques) ;
- Le phénotype dit « pénicillinase de bas niveau » se distingue par une résistance à l'Amoxicilline, Ticarcilline et Pipéracilline ;
- Le phénotype dit « pénicillinase de haut niveau » est défini par une résistance à l'Amoxicilline, Ticarcilline et Pipéracilline, ainsi qu'à la Céfalotine et à l'Augmentin® ;
- Les BLSE (résistance étendue aux céphalosporines de troisième génération) se distinguent sur l'antibiogramme par l'apparition d'un « bouchon de champagne » représentant la synergie entre une céphalosporine de 3^e génération (céfotaxime, ceftazidime, céfépime) et l'acide clavulanique.

5. Analyse génotypique des *E. coli*

L'ERIC-PCR (Polymerase Chain Reaction) permet de typer plusieurs espèces bactériennes dont l'*E. coli*. L'ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) correspond à des séquences d'ADN répétées non codantes, longues de plusieurs dizaines de paires de bases, dispersées sur le génome. Cette technique rapide permet de différencier

les polymorphismes bactériens identiques ayant des caractéristiques différentes liées à des génomes différents.

L'analyse du typage moléculaire s'intéresse à la bactérie d'un point de vue génétique.

Pour la manipulation, trois zones isolées sont dédiées à chaque étape de la PCR :

- Extraction ;
- Préparation du mélange réactionnel de PCR (pré-PCR) ;
- Révélation après amplification (post-PCR).

Une extraction mécanique et thermique a été utilisée. Chaque colonie fraîche, prélevée à l'aide d'une öse de 1µL, a été déchargée dans 300µL d'eau distillée stérile. L'extraction de l'ADN a été obtenue par passage dans un bloc chauffant à 95°C pendant 10 minutes puis dans un bain d'ultrasons durant 15 minutes et 10 minutes en centrifugeuse 13500XG. Ces lysats ont été congelés.

Lors des différentes étapes, des embouts stériles avec filtre ont été utilisés.

Le mélange réactionnel a été préparé en hotte à flux laminaire, il est constitué :

- Eau stérile ultra pure (9,5µL) ;
- Master Mix (12,5µL): il contient de la Taq polymérase pour la synthèse du brin complémentaire d'ADN.;
- Une amorce (0,5µL) utilisée pour l'amplification :
5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'.

Dans la pièce d'extraction, chaque lysat (2,5µL) a ensuite été incorporé dans les microtubes.

Le protocole d'amplification est le suivant :

- Dénaturation thermique à 94°C pour casser le double brin d'ADN en simple brin ;
- Hybridation des amorces sur le simple brin d'ADN à 45°C ;

- Extension des amorces à 72°C pour produire le brin complémentaire grâce à la Taq polymérase.

Le programme s'effectue sur 45 cycles et s'étend sur environ 3 heures, à l'aide du thermocycler.

L'ADN amplifié (10 µL) a été séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 2%, composé d'agarose dissous dans du tampon TBE 1X et de BET, dans un champ électrique pendant 2 heures. L'électrophorèse est effectuée dans une cuve comptant du tampon TBE 1X. Les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille.

Deux marqueurs de poids moléculaire, composés de 5 µL d'ADN step, 5 µL d'eau stérile et 3 µL de colorant orange, sont déposés dans les puits (6µL) aux extrémités (ils servent à déterminer le poids moléculaire du fragment d'ADN amplifié).

La révélation des bandes d'ADN s'est faite par la coloration au Bromure d'Ethidium (BET). Les profils obtenus ont été visualisés sous UV sur un transilluminateur avec le lecteur Biorad®. L'ADN amplifié est visualisé grâce au logiciel « Quantity One ».

6. Statistiques

Les variables sont qualitatives nominales et les groupes sont indépendants. Les tableaux de contingence et les calculs statistiques ont été effectués sur un tableur Excel. Les données ont été analysées par un test du Chi². Un $p < 0.005$ a été retenu comme significatif.

III. Résultats

Différentes problématiques ont été explorées durant l'étude *in vitro* dans le SHIME®. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'espèce *E. coli*. Il s'agit d'une bactérie représentant 80% des souches aéro-anaérobie facultative.

Les morphotypes d'*E. coli* retrouvés sont classés selon la cinétique (J0, J15 ou J30) et selon les fermenteurs (de F3 à F6). Les fermenteurs de l'estomac (F1) et du duodénum-jéjunum (F2) n'ont pas été étudiés car la population de micro-organismes y est moins dense. Les morphotypes (grosse/moyenne/petite, lactose +/-, plate, muqueuse,...) ont été notés, ainsi que les informations issues des antibiogrammes (diamètre d'inhibition, mécanisme de résistance, phénotype).

1. Résultats des caractéristiques bactériologiques

1.1. Identifications phénotypiques des colonies sur les différents milieux

La lecture des différents milieux est la première étape de l'identification des colonies d'*E. coli*.

Le milieu BCP permet une identification présomptive des *E. coli* (colonies lactose positives) qui apparaissent pigmentées en jaune (fermentation du lactose et virage de l'indicateur de coloration du pourpre au jaune).

Sur milieu COL, les colonies d'*E. coli* sont arrondies, lisses, à bords réguliers.

Sur milieu CPS, les colonies d'*E. coli* sont de couleur rose caractéristique.

A l'issue de la lecture des milieux, les colonies ayant des caractéristiques d'*E. coli* ont été sélectionnées pour l'identification précise par spectrométrie de masse.

1.2. Tests d'orientation : recherche des enzymes respiratoires

Les *E. coli* sont oxydase négative et catalase positive.

1.3. Identification par spectrométrie de masse

Nous avons obtenu pour chaque morphotype étudié un score supérieur à 2.

1.4. Résultats globaux

Au total 62 morphotypes différents d'*E. coli* ont été identifiées et isolées :

- 9 morphotypes (15%) dans l'iléon et le caecum (F3) ;
- 16 morphotypes (26%) dans le colon ascendant (F4) ;
- 16 morphotypes (26%) dans le colon transverse (F5) ;
- 21 morphotypes (34%) dans le colon descendant (F6).

2. Test de sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques a relevé 41 morphotypes sensibles aux β -lactamines (phénotypes sauvages) (66%), 7 morphotypes pénicillinases (11%) et 14 morphotypes BLSE (23%). Ces morphotypes se répartissent dans les différents fermenteurs comme suit (Fig. 7) :

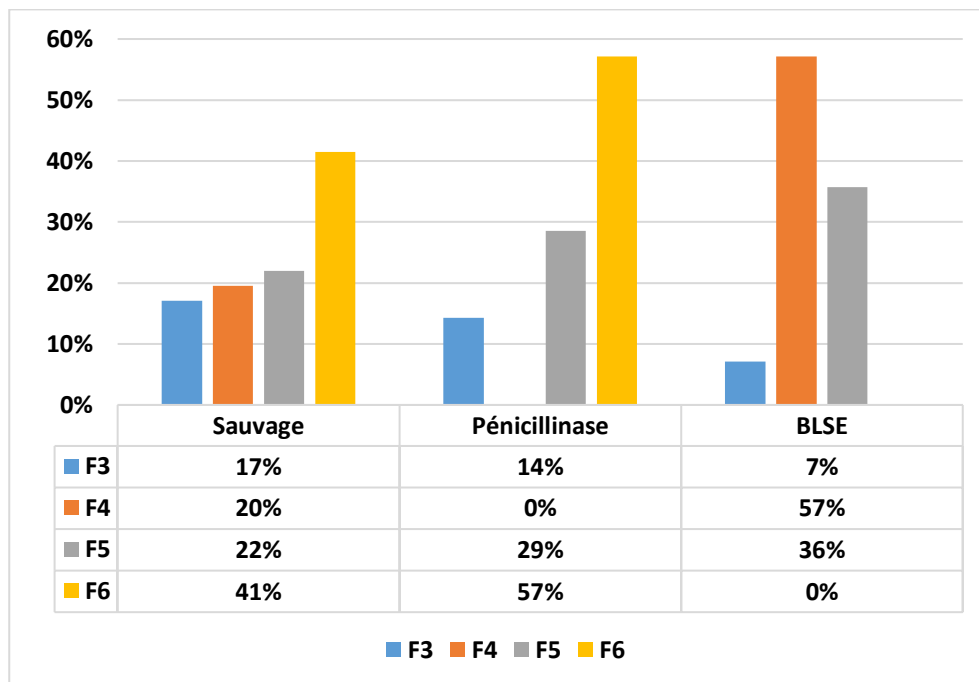


Figure 7 : Distribution des mécanismes d'antibiorésistance au sein du SHIME® (en pourcentage)

3. Typage moléculaire

Onze génotypes différents ont été retrouvés parmi les 62 morphotypes d'*E. coli*. Ils se répartissent de la manière suivante (tableau 3):

- 5 génotypes (45%) dans l'iléon/caecum (F3) ;
- 4 génotypes (36%) dans le colon ascendant (F4) ;
- 8 génotypes (73%) dans le colon transverse (F5) ;
- 6 génotypes (54%) dans le colon descendant (F6).

	F3	F4	F5	F6	Total
<i>Génotype 1</i>	1		2	6	9
<i>Génotype 2</i>	5	5	4	7	21
<i>Génotype 3</i>	1				1
<i>Génotype 4</i>				1	1
<i>Génotype 5</i>		2		2	4
<i>Génotype 6</i>		1	1	1	3
<i>Génotype 7</i>			1		1
<i>Génotype 8</i>			1		1
<i>Génotype 9</i>	1		1		2
<i>Génotype 10</i>			1	4	5
<i>Génotype 11</i>	1	8	5		14

Tableau 3 : Répartition des génotypes au sein des fermenteurs à J0, J15 et J30 (Nombre absolu)

L'ERIC-PCR a été utilisée pour étudier le trajet des souches et de comparer les souches à morphotype équivalent du point de vue génotypique (Fig. 8).

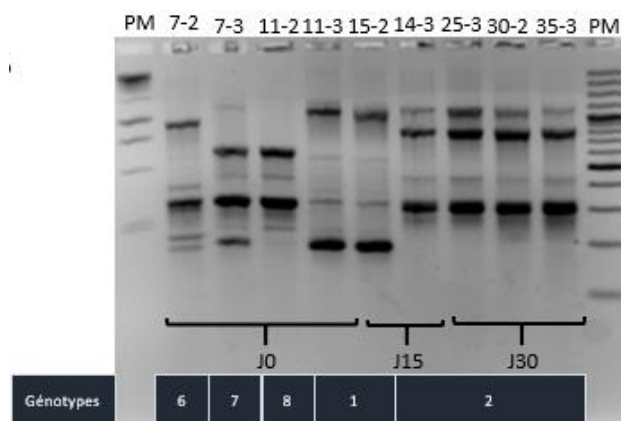


Figure 8 : Typage moléculaire des morphotypes d'*E. coli*

Les 41 morphotypes sauvages forment 8 génotypes (de 1 à 8) (Fig.9).

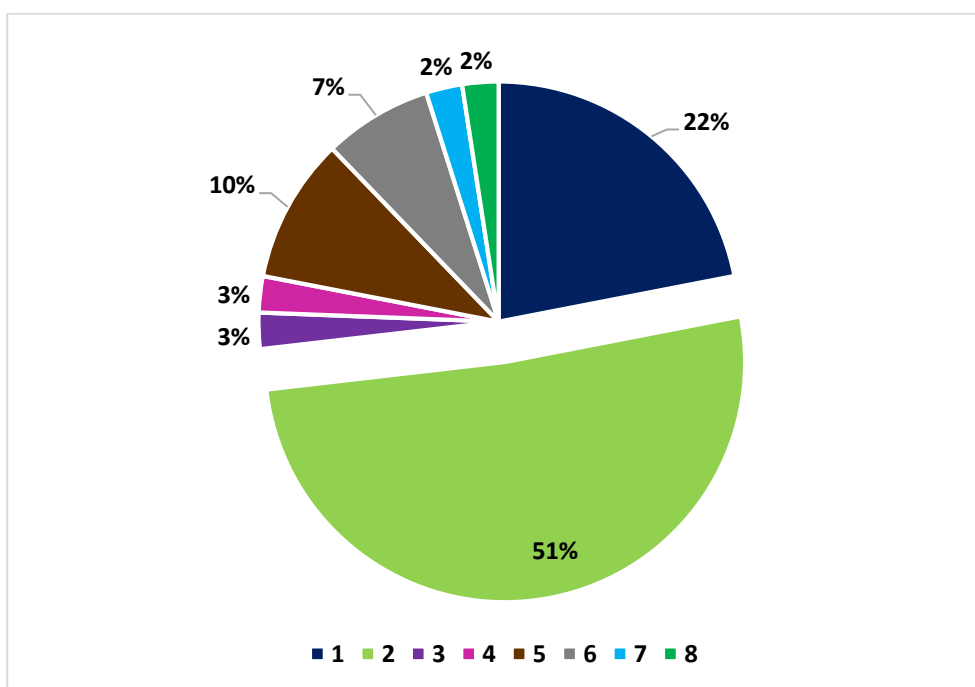


Figure 9 : Répartition des différents génotypes au sein des morphotypes sauvages

Nous avons observé une différence de répartition au sein des fermenteurs en fonction des génotypes (Fig. 10). Les génotypes 3 et 4 sont retrouvés respectivement dans l'iléon/caecum (F3) et dans le colon descendant (F6). Les génotypes 7 et 8 sont retrouvés exclusivement dans le colon transverse (F5). Le génotype 2 est le plus représenté dans l'iléon / caecum (F3 : 5/9). Les génotypes 2 et 11 sont les génotypes majoritaires dans les colons ascendant (F4 : 13/16) et transverse (F5 : 9/16). Au sein du colon descendant (F6), les génotypes 1 et 2 représentent plus de la moitié des souches (13/20).

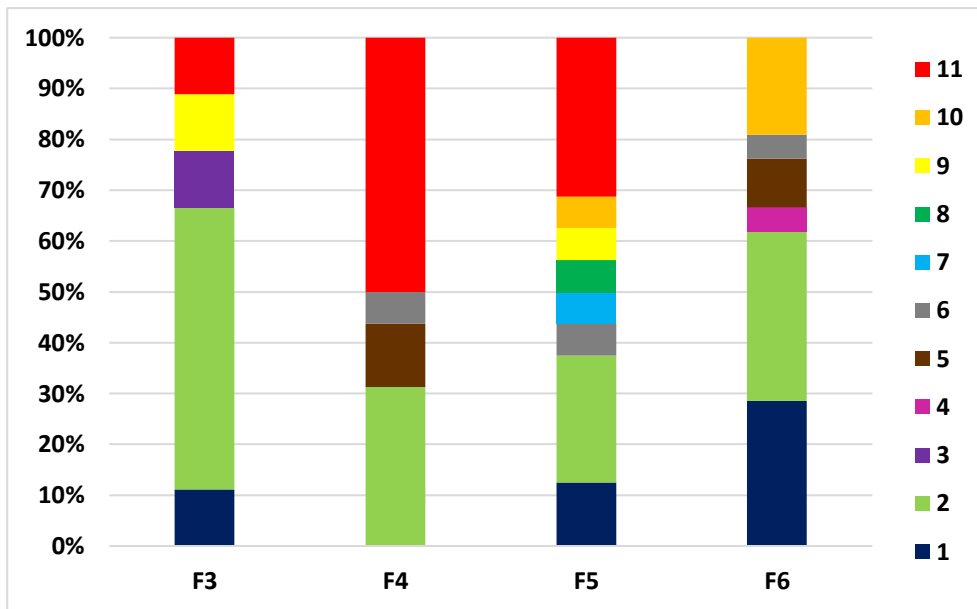


Figure 10 : Répartition des génotypes selon les segments parmi les 62 morphotypes

4. Résultats par fermenteur avec ou sans exposition au CPF

4.1 Résultats à J0 (sans exposition)

4.1.1 Répartition des morphotypes prélevés à J0 (sans exposition)

A J0, les *E. coli* sont plus fréquents au sein du colon transverse (F5 : 47%) puis au sein du colon descendant (F6 : 26%). En moindre mesure nous retrouvons ces bactéries au niveau du colon ascendant (F4 : 16%) et au niveau de l'iléon et du caecum (F3 : 11%) (Fig. 11).

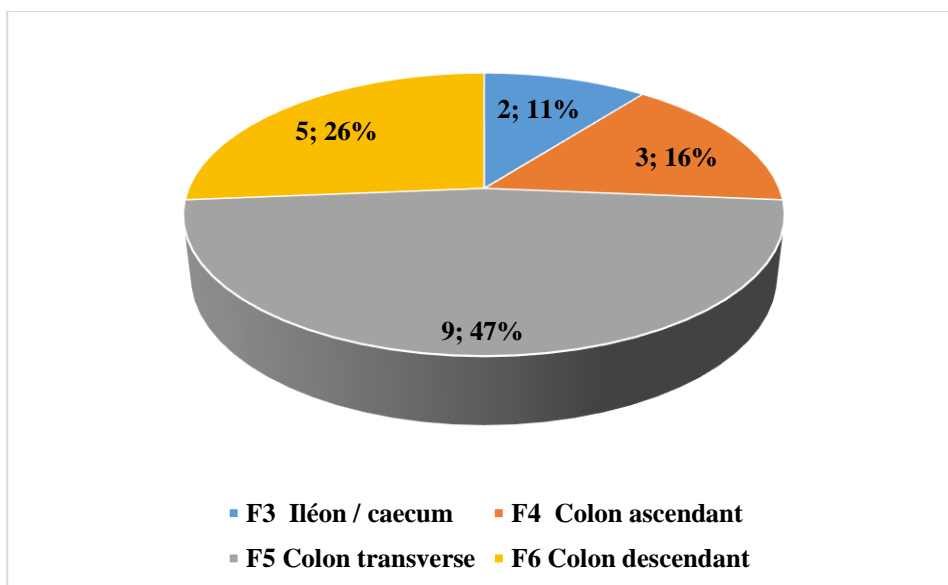


Figure 11 : Nombre de morphotypes par fermenteur à J0

4.1.2 Répartition des phénotypes de résistance des morphotypes prélevés à J0

La répartition des morphotypes sauvages est croissante de l'iléon au colon descendant (F3 : 1/2 à F6 : 5/5). Les morphotypes pénicillinases se situent dans l'iléon/caecum (F3 : 1/2) et dans le colon transverse (F5 : 2/9). Les E-BLSE sont absentes du colon descendant (F6) (Fig. 12). Les fréquences de répartition des mécanismes de résistance sont statistiquement significatives ($p < 0.005$).

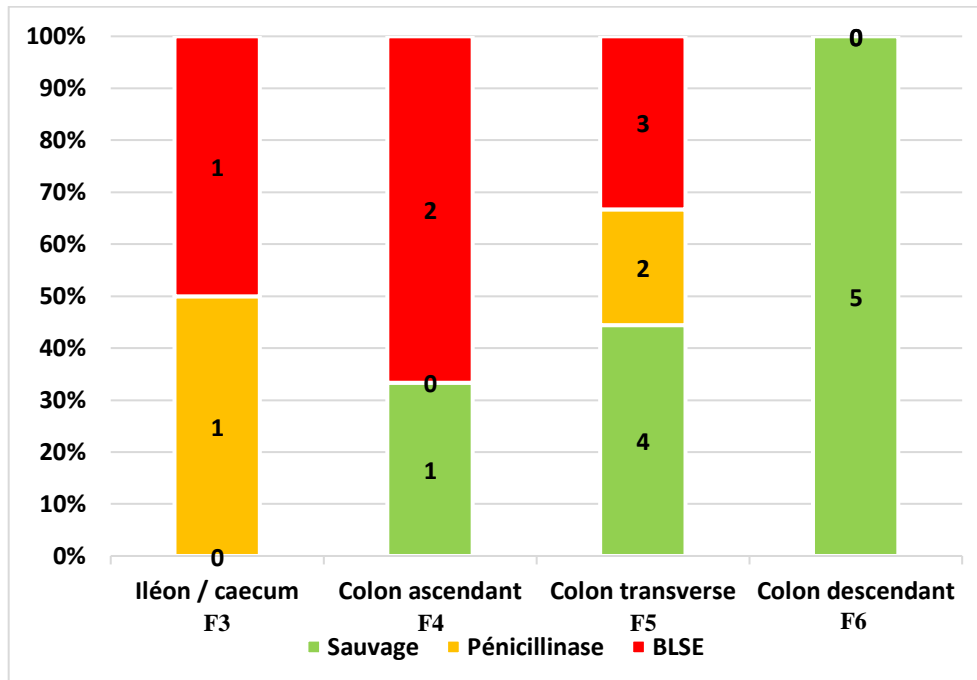


Figure 12 : Phénotypes de résistance par fermenteur à J0

4.1.3 Répartition des génotypes des morphotypes prélevés à J0

La diversité des génotypes est plus importante dans les colons transverse (F5 : 7 génotypes) et descendant (F6 : 4 génotypes). Le génotype 1 se situe au niveau des colons descendant (F6 : 1/5) et transverse (F5 : 1/9). Les génotypes 2 et 5 sont observés uniquement dans le colon descendant (F6, respectivement 2/5 et 1/5). Le génotype 6 se répartit dans les différents segments du colon (F4 : 1/3, F5 : 1/9 et F6 : 1/5). Les génotypes 7, 8 et 10 sont retrouvés uniquement dans le colon transverse (F5, 1/9). Le génotype 9 est observé dans l'iléon/caecum (F3 : 1/2) et le colon transverse (F5 : 1/9). Le génotype 11 est représenté au sein de l'iléon/caecum (F3 : 1/2), du colon ascendant (F4 : 2/3) et du colon transverse (F4 : 3/9) (Fig. 13). Les génotypes 3 et 4 sont absents à J0. Les différences entre les différents compartiments sont statistiquement significatives ($p < 0.005$).

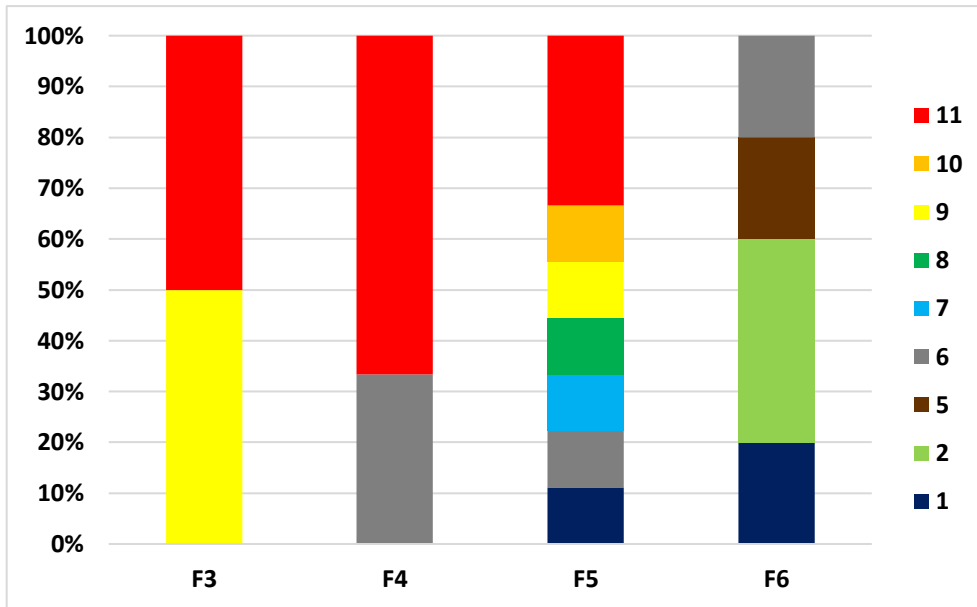


Figure 13 : Répartition des génotypes dans chaque fermenteur à J0

4.2 Impact du CPF à court terme (J15)

4.2.1 Répartition des morphotypes prélevés à J15

Lors d'exposition à court terme (J15), les morphotypes *E. coli* sont plus fréquents dans le colon ascendant (F4 : 44%) puis dans le colon descendant (F6 : 26%). Au niveau du colon ascendant (F4), le nombre d'*E. coli* augmente de +175% à J15 (Fig. 14). Les différences entre J0 et J15 sont statistiquement significatives ($p < 0.005$).

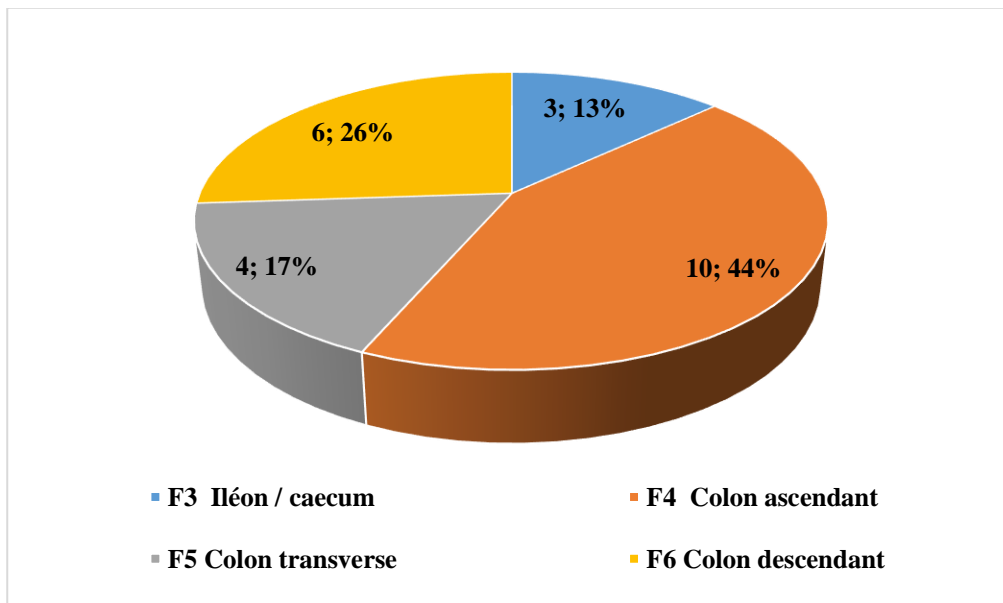


Figure 14 : Nombre de morphotypes par fermenteur à J15

4.2.2 Répartition des phénotypes de résistance des morphotypes à J15

Les morphotypes pénicillinases diminuent de – 66% à J15. Elles se situent uniquement au niveau du colon descendant (F6 : 1/6). Les E-BLSE relevées augmentent de +33% lors d'une exposition à court terme et se concentrent au niveau des colons ascendant (F4 : 6/10) et transverse (F5 : 2/4) (Fig. 15). Les évolutions ne sont pas statistiquement significatives.

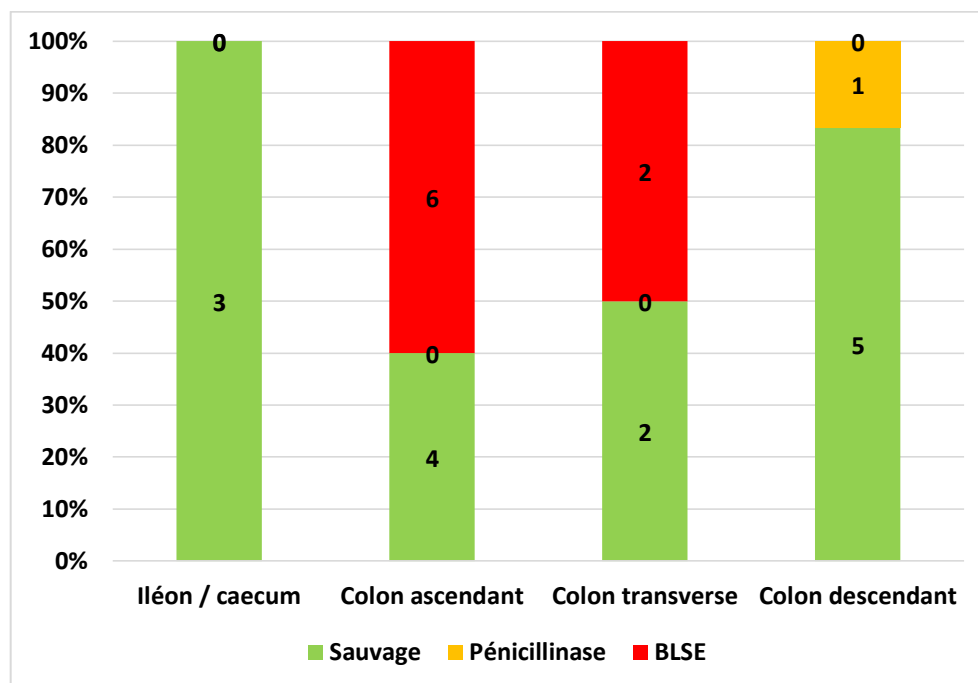


Figure 15 : Phénotypes de résistance par fermenteur à J15

4.2.3 Répartition des génotypes des morphotypes prélevées à J15

A J15, la diversité des génotypes est plus importante dans le colon descendant (F6), représenté par 5 génotypes. Les génotypes 6, 7, 8 et 9 disparaissent à J15. Les génotypes 3 et 4 apparaissent. Le génotype 1 est situé au sein de l'iléon/caecum (F3 : 1/3) et des colons transverse (F5 : 1/4) et descendant (F6 : 1/7). Le génotype 2 se répartit tout au long du tractus digestif. Le génotype 3 est retrouvé uniquement dans l'iléon/caecum (F3 : 1/3). Les génotypes 4 et 10 sont observés dans le colon descendant (F6 : 1/7). Le génotype 5 se répartit dans les colons ascendant et descendant (F4 : 2/10, F6 : 1/7). Le génotype 11 est retrouvé dans les colons ascendant et transverse (F4 : 6/10, F5 : 2/4) (Fig. 16). La différence entre les compartiments est statistiquement significative ($p < 0.005$).

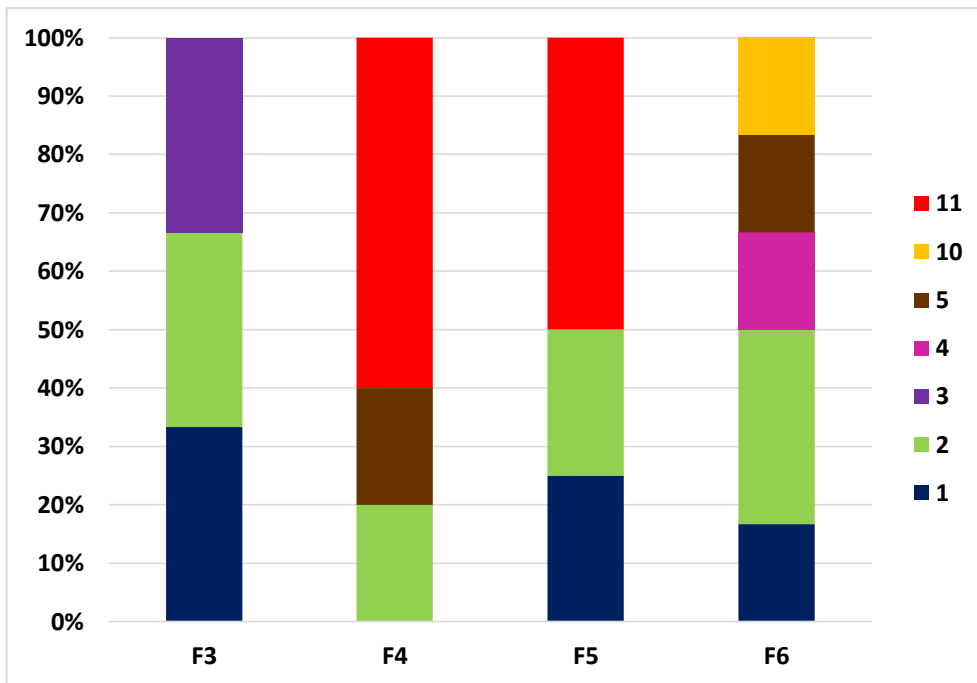


Figure 16 : Répartition des génotypes dans chaque fermenteur à J15

4.3 Impact du CPF à moyen et long terme (J30)

4.3.1 Répartition des morphotypes prélevées à J30

Lors d'une exposition à moyen et long termes (J30), les *E. coli* sont principalement retrouvés au sein du colon descendant (F6 : 50%) (Fig. 17).

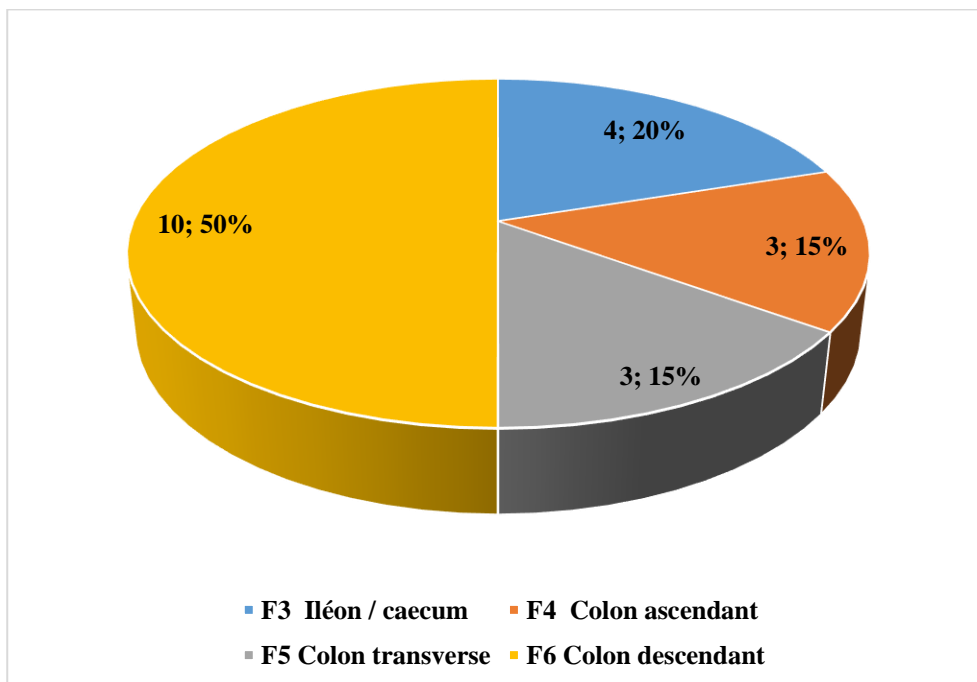


Figure 17 : Nombre de morphotypes par fermenteur à J30

4.3.2 Comparaison de la répartition des morphotypes sans et avec exposition

Le nombre de morphotypes diffère significativement ($p < 0,005$) lors de l'exposition au CPF (tableau 4). A J0, les morphotypes sont majoritaires dans le colon transverse (F5 : 47%). Après exposition, les morphotypes sont plus nombreux au sein des colons ascendant (F4 : 30%) et descendant (F6 : 37%).

	Sans exposition (J0)	Avec exposition (J15 - J30)
F3	2 (11%)	7 (16%)
F4	3 (16%)	13 (30%)
F5	9 (47%)	7 (16%)
F6	5 (26%)	16 (37%)

Tableau 4 : Comparaison de la répartition des morphotypes entre J0 (sans exposition) et J15-J30 (avec exposition)

4.3.3 Répartition des phénotypes de résistance des morphotypes à J30

Le nombre de morphotypes de souches sauvages augmente de +70% sous exposition au CPF à long terme, mais cette différence n'est pas, statistiquement, significative. Les souches pénicillinases sont retrouvées au sein du colon descendant (F6 : 3/10). Les E-BLSE disparaissent après une exposition au long court (Fig. 18).

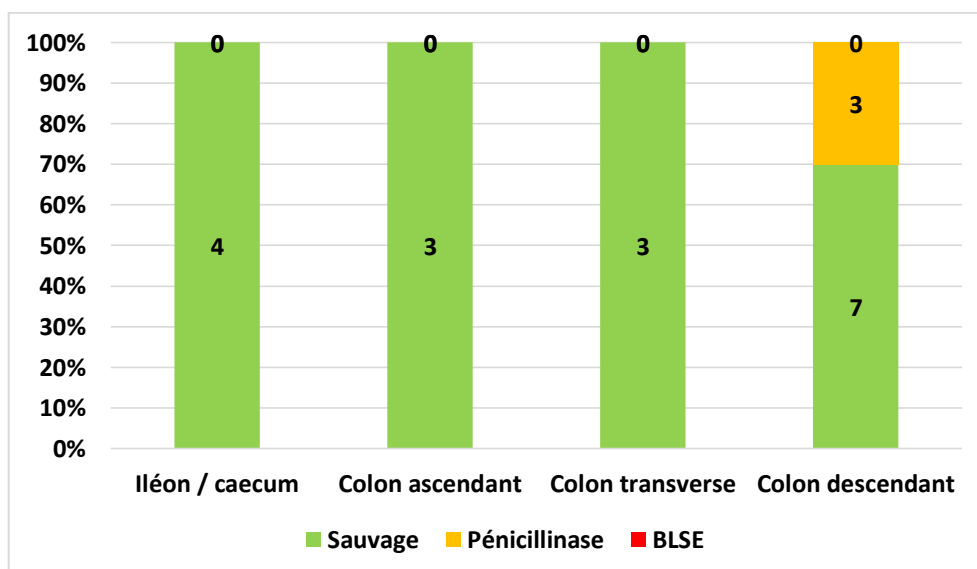


Figure 18 : Phénotypes de résistance par fermenteur à J30

4.3.4 Répartition des génotypes des morphotypes prélevés à J30

A J30, la diversité des génotypes est moindre. Les génotypes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 11 disparaissent. Les génotypes retrouvés sont les génotypes 1, 2 (phénotypes sauvages) et 10 (pénicillinases). Le génotype 2 est majoritaire et se répartit dans tous les segments digestifs. Les génotypes 1 et 10 se concentrent dans le colon descendant (F6, respectivement 4/10 et 3/10) (Fig. 19).

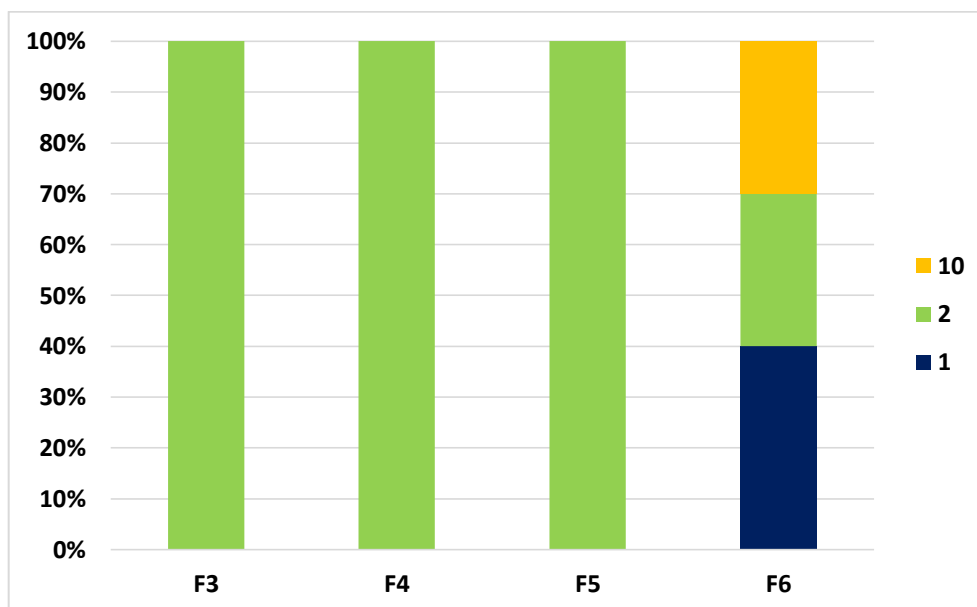


Figure 19 : Répartition des génotypes dans chaque fermenteur à J30

IV. Discussion

Ce travail de thèse a étudié un pesticide, le CPF. Le CPF-éthyl, organophosphoré, compose le Pyristar[®] utilisé largement en agriculture contre les insectes nuisibles. Le CPF est ingéré quotidiennement par chaque individu (oranges, pommes, laitue,...). La Dose Journalière Admissible est de 0,001 mg/kg/j (43, 44, 47).

Commercialisé depuis 1965, son usage est un fait d'actualité (48–50). Les effets du CPF sont préoccupants. Son exposition a de lourdes conséquences sur la santé et sur l'environnement. Pendant 30 ans, 249 cas d'empoisonnement ont eu lieu (51). Le CPF est un neurotoxique responsable d'autisme, de diminution du QI (Quotient Intellectuel), d'une perte des capacités de mémorisation, de trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (45).

Les caractéristiques physico-chimiques du CPF expliquent sa présence et sa rémanence dans les sols et les eaux. En 2004, 60 litres de CPF ont été perdus dans l'Etang de Bages-Sigean, dans l'Aude, catastrophe pour l'ensemble de l'écosystème.

En France, l'usage est interdit hormis pour la culture des épinards (50). Dans l'Union Européenne, son utilisation est encore autorisée dans 20 pays (52). Aux USA, l'insecticide est autorisé (49). Les produits importés sont sources d'exposition au CPF.

Il est donc essentiel de souligner l'impact du CPF sur la santé et l'environnement pour provoquer la prise de décisions concernant son utilisation. Ce travail de thèse s'est concentré sur l'effet de l'insecticide sur le microbiote intestinal.

Le modèle le plus souvent utilisé pour l'étude du microbiote est le rat Wistar, albinos et non consanguin, en raison de sa taille, de sa docilité, de sa physiologie et de son microbiote proche de celui de l'Homme (5, 53). C'est un modèle à reproduction rapide, manipulation et entretien facile. Il présente des inconvénients, à commencer par le coût et la main-d'œuvre nécessaire (30). La problématique majeure reste le manque d'éthique qui peut être contourné par divers systèmes *in vitro*.

L'un des exemples est le SHIME[®]. Son contrôle strict réalisé lors de l'étude permet l'obtention de communautés microbiennes complexes et stables *in vitro* (54). La présence de différents fermenteurs permet un rapprochement à la physiologie humaine (55).

Ce modèle présente quelques inconvénients. En effet, le SHIME® ne permet pas l'étude de l'adhésion bactérienne à l'épithélium intestinal et la communication microbiote-hôte. Il n'y a pas de système de régulation homéostatique retrouvée *in vivo*. C'est un système « mécanistique » (5, 38).

Bien que présentant des limites, dans le cadre de l'étude de l'impact du CPF sur le microbiote intestinal, le SHIME® permet d'élucider une problématique liée à l'inaccessibilité des différentes parties du tube digestif chez l'Homme. Le SHIME® permet l'analyse du microbiote de chacun des compartiments digestifs, difficilement applicable chez l'Homme.

En raison de l'inaccessibilité de la région du côlon humain, le microbiote fécal est choisi comme inoculum dans les compartiments du côlon du réacteur SHIME®. C'est l'environnement contrôlé dans chacun des fermenteurs qui permet l'adaptation de la flore à chaque compartiment.

Le microbiote fécal est significativement différent en termes de métabolisme et de composition du microbiote du côlon. Le microbiote fécal est un microbiote du côlon ayant subi une évolution durant le passage du côlon proximal au rectum quant à sa richesse, sa diversité, sa population bactérienne, son antibiorésistance et son génome. La flore fécale n'est pas toujours indicative. Les fécès sont un mélange de produits de dégradation des aliments, de micro-organismes en transit et de micro-organismes commensaux ayant perdu leur habitat par compétition ou détruits par la digestion ou des toxiques. Quarante pourcents de la masse des fécès est microbienne (56).

Les études où seules les matières fécales sont échantillonnées ne peuvent toutefois pas révéler la composition et la localisation des communautés bactériennes. Des techniques existent pour représenter le microbiote intestinal : biopsie, canules utilisées chez les ruminants et équidés, prélèvements chez des individus décédés à la suite d'accidents, sondage nasodigestif chez l'Homme, capsules ingérées par des volontaires et collectées par voies naturelles,... Ces méthodes manquent d'éthique. Les capsules, techniques non invasives, n'offrent qu'une faible surface d'absorption aux bactéries (57).

Le SHIME® est une solution à fort potentiel d'exploitation.

Le SHIME® permet l'étude du microbiote intestinal et de chacun de ses composants. Lors de notre étude nous avons choisi d'analyser l'*E. coli*. Peu d'informations sont données dans la littérature, concernant les caractéristiques de ces souches, pourtant élément aérobie majeur du microbiote intestinal.

Dans notre étude les donneurs anonymes étaient porteurs de souches résistantes et n'ont pas été exposés aux antibiotiques dans les 6 mois précédents. L'acquisition de ces souches résistantes pourrait reposer sur l'alimentation et l'eau contaminée, possibles sources d'antibiorésistance (8).

La diversité de morphotype et de génotype des souches diminue avec l'augmentation de la résistance. L'usage des antibiotiques induit l'apparition de résistance (8). L'antibiorésistance est liée à la répartition et à la diversité des *E. coli*. Ce lien remet en exergue le déséquilibre causé par les antibiotiques sur le microbiote souligné par Frayssinhes (12).

Nous avons observé, *in vitro*, que les *E. coli* sont davantage présents à J0 (sans exposition au CPF) au sein du colon transverse (F5) (47%). Cette observation est en accord avec les résultats de l'étude *in vivo* réalisée par Gordon *et al.* (2015). A partir de biopsies prélevées dans l'iléon terminal, le colon ascendant, transverse et descendant et le rectum de 69 individus, les auteurs ont souligné que la richesse des *E. coli* est plus importante dans le colon transverse et le rectum (58).

La différence de répartition au sein du SHIME® des *E. coli* intéresse les phénotypes de résistance aux antibiotiques et les génotypes.

Il existe une préférence significative d'implantation au sein des différents fermenteurs pour chaque phénotype de résistance aux antibiotiques. Dans le colon descendant (F6), nous avons observé uniquement des morphotypes sauvages, 67% des morphotypes pénicillinases sont dans le colon transverse (F5) et 33 % dans l'iléon / caecum (F3), les morphotypes BLSE se situent dans l'iléon / caecum (F3 : 50%), dans le colon ascendant (F4 : 67%) et dans le colon transverse (F5 : 33%). L'iléon / caecum et le colon transverse pourraient représenter une niche pour les bactéries multi-résistantes. Les morphotypes pénicillinases sont absentes des colons ascendant et descendant (F4 et F6) et les morphotypes BLSE sont absentes du colon descendant (F6). Cette observation souligne

une limite du dépistage de BMR par écouvillonnage rectal. Il est, donc, possible d'obtenir un faux-négatif. Les bactéries recherchées pouvant être localisées dans les segments supérieurs du tube digestif. Le risque est l'apparition ultérieure d'infections graves à BMR à point de départ digestif.

Le génotype 2 est retrouvé dans tous les fermenteurs. Les génotypes 3 et 4 sont retrouvés respectivement dans l'iléon/caecum et dans le colon descendant. Les génotypes 7, 8 et 10 sont retrouvés dans le colon transverse (F5).

Ce travail de thèse souligne l'existence de niches écologiques propres à une espèce (*E. coli*) et plus précisément à un génotype. La symbiose repose sur l'existence de ces sites où se répartissent les micro-organismes selon leur morphologie, leur physiologie et leur métabolisme. Les bactéries s'adaptent en fonction des conditions environnementales (nutriments et facteurs abiotiques) qu'offre leur écosystème. Dans l'ensemble, peu de niches ont été définies (56, 57, 59). Le SHIME® représente une aide à la détermination d'une cartographie des différentes niches des micro-organismes pour améliorer les connaissances sur le microbiote intestinal et sur les impacts sur la santé.

Nous avons choisi d'étudier l'impact sur les souches *E. coli* d'un des pesticides les plus utilisés, le CPF. Toutefois, l'organisme humain est exposé quotidiennement à une multitude de pesticides. Un effet cocktail, résultante de l'association de plusieurs composés, peut se produire soit par addition des doses, soit par interaction entre les pesticides (synergie, potentialisation ou antagonisme) (60).

La dose quotidienne de 3,5 mg de CPF correspond à une dose toxique supérieure. D'autres études utilisent des doses comprises entre 0,8 mg/kg et 3 mg/kg (61, 62).

Notre étude a souligné plusieurs impacts du CPF sur *E. coli* :

- Modification de la répartition des *E. coli* : Les souches sont plus fréquentes dans le colon ascendant (F4 : 44%) après exposition à court terme (J15) et dans le colon descendant (F6 : 50%) après exposition à moyen et long termes (J30). La distribution dans chacun des fermenteurs diffère selon l'exposition. Le CPF influence la répartition des niches écologiques des différents phénotypes et génotypes d'*E. coli*. Il y a une interaction forte entre les constats et les compartiments étudiés.

- Diminution de la diversité des *E. coli* par le CPF, avec un nombre de génotypes diminuant de -22% après exposition à court terme. Ce déclin est de -66% après exposition à long terme.
- Disparition des souches BLSE : plusieurs pistes subsistent : interaction par transplantation fécale entre les 3 selles ou libération, dégradation de plasmides de résistance, mort bactérienne naturelle.

Les *E. coli* ont la capacité de dégrader le CPF par une enzyme, l'organophosphorus phosphatase. Cette notion pourrait être mise en parallèle avec l'augmentation de l'abondance des *E. coli* qui utilise le pesticide comme source de nutriments, permettant à la bactérie de se développer (63). L'étude des caractéristiques spécifiques des souches pourront aider à mieux comprendre l'impact du CPF sur le microbiote intestinal.

Une étude a souligné l'apparition de dysbiose après exposition quotidienne à 0.8mg/kg de CPF avec notamment une augmentation de l'abondance en *E. coli*, effet dépendant de l'individu (âge, régime alimentaire,...) (61).

Les résultats de ce travail de thèse complètent les études préliminaires effectuées dans le Laboratoire Pérیتox (5, 6, 22, 28, 32, 53). L'équipe du laboratoire Pérیتox s'est intéressée à l'ensemble du microbiote. Elle a décrit l'apparition d'une dysbiose sous exposition au CPF avec une augmentation du taux de pathobiontes (Enterobactéries dont *E. coli*, *Staphylococcus spp*, *Bacteroides spp* et *Clostridium spp*) (53). La population en Bifidobactéries et *Lactobacillus*, flore bénéfique, a diminué, ce qui a engendré une augmentation du pH intestinal et une diminution de production métabolique d'acétate et de butyrate (28). La dysbiose a un impact sur les fonctions du microbiote (homéostatiques, structurales et protectrices). L'augmentation de la quantité de pathobiontes entraîne un risque plus important d'inflammation à bas bruit. Cela fait partie du mécanisme d'induction de pathologies comme l'obésité (64), le diabète et l'intolérance au glucose (65), l'hyperuricémie (66), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (67), le cancer (68), la maladie d'Alzheimer (69), les allergies (70), le stress et la dépression (71–73), la maladie de Parkinson (74, 75).

Nos observations corroborent avec la nécessité de réduire l'usage des pesticides, important problème pour la santé publique. Cette problématique est d'autant plus importante qu'une

dysbiose induite par des pesticides pourrait avoir un effet de façon indirecte sur l'efficacité des médicaments indiqués dans ces pathologies.

Conclusion

L'étude bactériologique et génotypique, réalisée au sein du laboratoire Péritox, a permis l'utilisation d'un système *in vitro* digestif artificiel modélisant l'écosystème intestinal humain adulte: le SHIME®.

Le SHIME® est un système dynamique, polyvalent et utile à l'étude de l'influence d'autres xénobiotiques d'usages multiples : médicaments humains, médicaments vétérinaires, pesticides, aliments, boissons... Le SHIME® est un modèle d'analyse plus éthique qu'une méthode *in vivo*. Bien qu'il ne représente pas la communication microbiote-hôte, le SHIME® a l'avantage de modéliser les différents segments digestifs et de faciliter les prélèvements dans chacun d'entre eux et d'en étudier les caractéristiques propres. Cela nous a permis d'étudier précisément la répartition des morphotypes et des génotypes.

L'analyse des résultats a mis en évidence des effets liés à l'exposition au CPF, organophosphoré, sur le microbiote intestinal, premier organe en contact avec les aliments contenant des traces de pesticides s'étendant de la bouche au rectum. La quantité d'*E. coli*, principale bactérie aérobie du microbiote, est augmentée après exposition au CPF, leur diversité a diminué et leur répartition dans le tube digestif est modifiée.

Ces résultats ont fait l'objet en 2018 et 2019 de présentations affichées lors des congrès de la JFHOD (Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive), du colloque Adebitech, de la SFM (Société Française de Microbiologie) ainsi que d'une présentation orale lors du congrès de la JARS (Journée Amiénoise de Recherche en Santé, 2019) (ANNEXE 2).

Perspectives

Des études complémentaires sur les caractéristiques des souches sont nécessaires pour comprendre, les mécanismes mis en jeu dans l'apparition de la dysbiose, la résistance des génotypes 1, 2 et 10 face au CPF ou la disparition des souches BLSE.

L'hypothèse d'interaction entre les trois selles par transplantation fécale pourrait expliquer la perte d'antibiorésistance. L'hypothèse doit être affirmée grâce à des expérimentations à l'aide du SHIME®.

Une étude a souligné que le CPF augmente la virulence des souches *E. coli* sauvages analysées dans ce travail de thèse (K. Soudier, Master I UPJV, juin 2019). Les résultats obtenus sont très prometteurs. Ces observations seront complétées par d'autres analyses sur les souches résistantes.

D'autres études *in vitro* et *in vivo* sont réalisées au sein du laboratoire Pérیتox sur l'impact du CPF sur le microbiote intestinal : le CPF augmente le risque de dysbiose et de translocation bactérienne (Réquillé M. et al (2018)). Par la suite, l'impact du CPF sur la translocation des souches *E. coli* étudiées précisera les observations de ce travail de thèse.

La société accuse des problèmes de santé publique par l'exposition aux pesticides et l'augmentation de l'incidence de l'obésité en lien avec une alimentation déséquilibrée et un excès calorique. Djekkoun N. et al. (Thèse de science (en cours)) ont observé, *in vivo*, que lorsque le CPF est associé à un régime obésogène, les effets néfastes des 2 expositions sont accentués.

La recherche de moyen préventif et thérapeutique face aux effets du CPF et d'un régime obésogène est importante. Une piste repose sur l'administration de prébiotiques, substrats de micro-organismes bénéfiques pour la santé globale de l'hôte (Organisation Mondiale de la Santé). Ce sont des fibres alimentaires non digestibles stimulant le développement de bactéries bénéfiques dans l'intestin (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*,...) grâce à leur fermentation en AGCC. Trois prébiotiques sont reconnus : l'inuline, les FOS (fructo-oligosaccharides) et le GOS (galacto-oligosaccharides) (76–78). Des études effectuées dans le laboratoire Pérیتox ont démontré que l'inuline permet de diminuer le risque de dysbiose et de translocation bactérienne.

Bibliographie

1. Rallot C. L'appli Yuka analyse les étiquettes alimentaires. *Le Monde*. 2 avr 2018;
2. #EGalim : tout savoir sur la loi Agriculture et Alimentation [Internet]. Alim'agri. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/egalim-tout-savoir-sur-la-loi-agriculture-et-alimentation>
3. OMS | L'approche multisectorielle de l'OMS «Un monde, une santé». WHO. 2017.
4. Tourneux P, Mayhoub F, Haraux E, Deguines C, Berton T, Lestremau F, et al. Cohorte MecoExpo : utilisation du méconium pour estimer l'exposition in utero aux pesticides des nouveau-nés en Picardie. *Revue de médecine périnatale*. 2014;6:122-33.
5. Joly Condette C. Impact d'une exposition chronique au chlorpyrifos sur le développement, la maturation de l'intestin et le microbiote : approches in vivo (rat) et in vitro (SHIME®) [Thèse]. [Amiens]: UPJV; 2014.
6. Reygnier J. Impact d'une exposition chronique au Chlorpyrifos, associé ou non à l'inuline, sur le microbiote intestinal et ses conséquences sur le profil métabolique: approches in vitro (SHIME®) et in vivo (rat) [Thèse]. [Amiens]: UPJV; 2016.
7. Cassard A-M, Thomas M. Les microbiotes humains : des alliés pour notre santé. In: *Encyclopédie de l'environnement*. 2018.
8. Ruppé É, Andremont A. Le microbiote intestinal est l'avenir de la multirésistance bactérienne. *J Anti-Infect*. 1 déc 2013;15(4):166-77.
9. Bourlioux P. Actualité du microbiote intestinal. *Ann Pharm Fr*. janv 2014;72(1):15-21.
10. Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *Rev Médecine Interne*. 1 juin 2016;37(6):418-23.
11. Lachaine R. *Anatomie et physiologie humaines*. Canada: ERPI; 2005. 1288 p.
12. Frayssinhes L. Implication du microbiote intestinal dans la santé et enjeux thérapeutiques [Thèse]. [Toulouse]: Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2017.
13. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*. 17 oct 2007;449:811-8.
14. Bambou J-C, Giraud A, Gaboriau V, Taddei F, Cerf-Bensussan N. La Flore intestinale commensale : la balance sans le glaive ? *J Société Biol*. 2006;200(2):113-20.
15. Debré P. *L'HOMME MICROBIOTIQUE*. Paris: Odile Jacob; 2015.
16. El Kaoutari A, Armougom F, Raoult D, Henrissat B. Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *Med Sci (Paris)*. mars 2014;30(3):259-65.

17. Lukowicz C. Rôle dimorphique du récepteur nucléaire CAR dans la régulation énergétique et des perturbations métaboliques induites par un mélange de pesticides [Thèse]. [Toulouse]: Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2018.
18. Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 23 2017;356(6344).
19. Engel E, Meurillon M, Planche C, Peyret P. Devenir des contaminants toxiques des aliments dans l'environnement digestif. *Innovations Agronomiques*. 2014;36:135-49.
20. Kaldy P. La flore intestinale influence notre appétit. *Sciences et Avenir*. 2015.
21. Arora T, Sharma R, Frost G. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*. 1 avr 2011;56(2):511-5.
22. Joly Condet C, Elion Dzon B, Hamdad F, Biendo M, Bach V, Khorsi-Cauet H. Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract of chlorpyrifos-exposed rats. *Gut Pathog*. 5 nov 2016;8.
23. Alexey S. Vasilchenko, Eugene A. Rogozhin, Alexander V. Valyshev. Purification of a Novel Bacteriocin-Like Inhibitory Substance produced by *Enterococcus faecium* ICIS 8 and Characterization of Its Mode of Action. *Microbial Drug Resistance*. 2016;00(00).
24. Ana Aguilar-Gualvez, Robin Dubois-Dauphin, Jacqueline Destin, David Campos, Philippe Thonart. Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2012;16(1):67-76.
25. E.D. Simova, D.B. Beshkova, Zh.P. Dimitrov. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 19 janv 2009;106:692-701.
26. Lazreg L. Bactériocines d'entérocoques isolés de lait cru et beurre de l'Ouest algérien [Thèse]. Université d'Oran; 2016.
27. Molly K, Woestyne MV, Smet ID, Verstraete W. Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microb Ecol Health Dis*. 1 janv 1994;7(4):191-200.
28. Joly C, Gay-Quéheillard J, Léké A, Chardon K, Delanaud S, Bach V, et al. Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and in the rat. *Environ Sci Pollut Res Int*. mai 2013;20(5):2726-34.
29. Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, Possemiers S, Marzorati M. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., éditeurs. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer; 2015.

30. Blutt SE, Broughman JR, Zou W, Zeng X-L, Karandikar UC, In J, et al. Gastrointestinal microphysiological systems. *Exp Biol Med.* oct 2017;242(16):1633-42.
31. Lepage P. Le microbiome digestif humain : interactions avec l'hôte et dysfonctions. *Rev Mal Respir.* 1 déc 2017;34(10):1085-90.
32. Réquillé M, González Alvarez DO, Delanaud S, Rhazi L, Bach V, Depeint F, et al. Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. *Environ Sci Pollut Res Int.* août 2018;25(23):22529-40.
33. J. Begon, P. Julierat, J. Cornuz, C. Clair. Tabagisme et système digestif : une relation complexe Partie 2: microbiote intestinal et tabagisme. *Rev Med Suisse.* 2015;11:1304-6.
34. Rakotovoao-Ravahatra ZD, Randriatsarafara FM, Rasoanandrasana S, Raverohanta L, Rakotovoao AL. Phénotypes de résistance des souches d'Escherichia coli responsables d'infection urinaire au laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Befelatanana Antananarivo. 22 mars 2017;
35. Li X, Jiang J, Gu L, Ali SW, He J, Li S. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1 déc 2008;62(4):331-5.
36. Carencio P. Antibiorésistance et biocides. CH Hyères (83): CCLin-Arlin; 2017 juin. (Informations du réseau national de prévention des infections associées aux soins). Report No.: 7.
37. Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol.* oct 2014;21:45-50.
38. Lefebvre A. Etude expérimentale portant sur l'évolution d'une Entérobactéries BLSE et son interaction avec la flore intestinale dans un simulateur de l'écosystème intestinal humain VitroSim." [Mémoire]. [Amiens]: DUT Génie Biologique; 2003.
39. Philippon A, Arlet G. Entérobactéries et bêta-lactamines : phénotypes de résistance naturelle. *Pathol Biol.* 1 avr 2012;60(2):112-26.
40. Robin F, Gibold L. Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Revue Francophone des Laboratoires.* oct 2012;(445):47-58.
41. Gerber GK. The dynamic microbiome. *FEBS Lett.* 17 nov 2014;588(22):4131-9.
42. Rangasamy K, Athiappan M, Devarajan N, Samykannu G, Parray JA, Aruljothi KN, et al. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. *Microb Pathog.* 1 janv 2018;114:304-10.
43. Delaunay A, Mir C, Marty-Chastan C, Rance E, Guériaux D, Tessier R. Utilisation des produits phytopharmaceutiques. 2017 déc.

44. Outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of chlorpyrifos. European Food Safety Authority. 2019.
45. Génon Jensen, Natacha Cingotti. L'Union européenne devrait interdire le chlorpyrifos, dangereux pour le cerveau. Health and Environmental Alliance (HEAL); 2018 sept.
46. Rauh VA, Perera FP, Horton MK, Whyatt RM, Bansal R, Hao X, et al. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc Natl Acad Sci.* 15 mai 2012;109(20):7871-6.
47. CARTE. Le chlorpyrifos-éthyl, pesticide dans le viseur du ministère de l'Agriculture, est-il utilisé près de chez vous ?
48. Qu'est-ce que le chlorpyrifos-éthyl dont Le Foll veut limiter l'usage ? *Les Echos.* 2016.
49. Chlorpyrifos : les dangers ignorés d'un pesticide toxique. *Le Monde.fr.* 17 juin 2019;
50. Le chlorpyrifos, pesticide sur la sellette, a été autorisé sur la foi de recherches biaisées. *Le Monde.fr.* 16 nov 2018;
51. Chlorpyrifos - The Lawsuits.
52. EU Pesticides database - European Commission [Internet]. Disponible sur: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1130>
53. Charron C. Exposition chronique du chlorpyrifos en association à un régime obésogène sur le microbiote intestinal chez le rat. Amiens: Laboratoire PériTox- INERIS; 2016.
54. Prodigest. SHIME® and M-SHIME®. 2016.
55. Miller TL, Wolin MJ. Fermentation by the human large intestine microbial community in an in vitro semicontinuous culture system. *Appl Environ Microbiol.* sept 1981;42(3):400-7.
56. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1 oct 1977;31(1):107-33.
57. Gérard F, Frédérique C-D. *Les écosystèmes digestifs.* Lavoisier; 2007. 335 p.
58. Gordon DM, O'Brien CL, Pavli P. *Escherichia coli* diversity in the lower intestinal tract of humans. *Environ Microbiol Rep.* 2015;7(4):642-8.
59. Savage D. L'écosystème digestif et sa colonisation. *Rev sci tech Off int Epiz.* 1989;8(2):275-90.
60. Gamet-Payraastre L. Impact des mélanges de pesticides. *Innovations Agronomiques.* févr 2019;73:51-9.

61. Jin-Wang L, Bing F, Guo-Fang P, Ming Z, Fa-Zheng R. Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats. *Pestic Biochem Physiol.* 1 sept 2019;159:68-79.
62. Fang B, Li JW, Zhang M, Ren FZ, Pang GF. Chronic chlorpyrifos exposure elicits diet-specific effects on metabolism and the gut microbiome in rats. *Food Chem Toxicol.* 1 janv 2018;111:144-52.
63. Harishankar MK, Sasikala C, Ramya M. Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *3 Biotech. avr 2013;3(2):137-42.*
64. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 21 déc 2006;444(7122):1027-31.
65. Yuan X, Pan Z, Jin C, Ni Y, Fu Z, Jin Y. Gut microbiota: An underestimated and unintended recipient for pesticide-induced toxicity. *Chemosphere.* 1 juill 2019;227:425-34.
66. Hang Korng Ea. Goutte La piste prometteuse du microbiote intestinal... *RHUMATOS.* janv 2018;15(131).
67. Élodie Quévrain, Philippe Seksik, Sylvie Rajca. Rôle du microbiote au cours des maladies inflammatoires intestinales : connaissances actuelles et perspectives. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue.* août 2011;XIV(4).
68. Biragyn A, Ferrucci L. Gut dysbiosis: a potential link between increased cancer risk in ageing and inflammaging. *Lancet Oncol.* juin 2018;19(6):e295-304.
69. Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, et al. Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. *Front Aging Neurosci.* 2016;8:256.
70. Bouchaud G, Castan L, Chesné J, Braza F, Aubert P, Neunlist M, et al. Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy.* janv 2016;71(1):68-76.
71. Fond G, Chevalier G, Eberl G, Leboyer M. Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans les troubles psychiatriques majeurs : mécanismes, données fondamentales, comorbidités gastro-intestinales et options thérapeutiques. *Presse Médicale.* 1 janv 2016;45(1):7-19.
72. Meyrel M, Varin L, Detaint B, Mouaffak F. Le microbiote intestinal : un nouvel acteur de la dépression ? *L'Encéphale.* 1 févr 2018;44(1):67-74.
73. Partrick KA, Chassaing B, Beach LQ, McCann KE, Gewirtz AT, Huhman KL. Acute and repeated exposure to social stress reduces gut microbiota diversity in Syrian hamsters. *Behav Brain Res.* 01 2018;345:39-48.
74. Khenniche Y, Lutete E, Bobé P. Quand les microbes se mêlent de la maladie de Parkinson. *médecine/sciences.* 1 nov 2017;33(11):950-3.

75. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 1 déc 2016;167(6):1469-1480.e12.
76. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. août 2017;14(8):491-502.
77. Meyer D, Stasse-Wolthuis M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr*. nov 2009;63(11):1277-89.
78. Nyman M. Carboxylic acids in the hindgut of rats fed highly soluble inulin and *Bifidobacterium lactis* (Bb-12), *Lactobacillus salivarius* (UCC500) or *Lactobacillus rhamnosus* (GG) AU - Nilsson, Ulf. *Scand J Food Nutr*. 1 mars 2007;51(1):13-21.

Annexes

ANNEXE 1 : Réalisation d'antibiogrammes

Mode opératoire :

- Prélèvement à l'ose d'une colonie
- Réalisation d'une suspension bactérienne à 0,5 McFarland dans un tube d'eau distillée stérile
- Imprégner un écouvillon stérile à partir de cette suspension bactérienne et ensemercer une gélose de Müller Hinton en réalisant des stries très serrées sur la totalité de la gélose, 3 fois de suite, après avoir tourné la gélose de 60°
- Déposer à l'aide d'un distributeur les disques d'antibiotique à la surface de la gélose
- Laisser diffuser pendant 15 minutes à température ambiante
- Incuber 18 heures
- Les catégories cliniques ont été déterminées par lecture des résultats et interprétation des antibiogrammes selon recommandations du Comité de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) / European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

AMX	TIC	PIL	CEF
FOX	CTX	AMC	CAZ
COL		FEP	SXT
OFX	GMN	AKN	IPM

Diamètres critiques pour *Escherichia coli* (CASFM-EUCAST V1.0 2017, pp34-42)

	Familles	Abréviations	Noms des antibiotiques	Diamètre (mm)	Interprétation	
B-lactamines	Pénicillines	AMX	Amoxicilline	<19	Résistant	
				≥19	Sensible	
		TIC	Ticarcilline	<23	Résistant	
				≥23	Sensible	
		PIL	Pipéracilline	<17	Résistant	
				[17 ; 20]	Intermédiaire	
				≥20	Sensible	
		AMC	Amoxicilline + Acide Clavulanique	<19	Résistant	
				≥19	Sensible	
		Céphalosporine	CEF	Céfalotine	<23	Résistant
					[23 ; 26]	Intermédiaire
					≥26	Sensible
	CTX		Céfotaxime	<17	Résistant	
				[17 ; 20]	Intermédiaire	
				≥20	Sensible	
	CAZ		Ceftazidime	<19	Résistant	
				[19 ; 22]	Intermédiaire	
				≥22	Sensible	
	FEP		Céfépime	<21	Résistant	
				[21 ; 27]	Intermédiaire	
				≥27	Sensible	
Céphamycine	FOX		Céfoxitine	<15	Résistant	

				[15 ; 19]	Intermédiaire	
				≥19	Sensible	
		IPM	Imipénème	<16	Résistant	
				[16 ; 22]	Intermédiaire	
				≥22	Sensible	
	Aminosides	GMN	Gentamicine	<14	Résistant	
					[14 ; 17]	Intermédiaire
					≥17	Sensible
		AKN	Amikacine	<13	Résistant	
					[13 ; 16]	Intermédiaire
					≥16	Sensible
	Sulfamide	SXT	Triméthopri- Sulfaméthoxazoles	<11	Résistant	
					[11 ; 14]	Intermédiaire
					≥14	Sensible
	Autres	COL	Colistine	<15	Résistant	
					[15 ; 18]	Intermédiaire
					≥18	Sensible
	Fluoroquinolones	OFX	Ofloxacine	<12	Résistant	
					≥12	Sensible

ANNEXE 2 : Communication poster présenté lors des congrès MBIO 2018 d'Adébiotech, de la JFHOD, de la SFM



Etude de l'impact d'un pesticide, le chlorpyrifos, sur le microbiote intestinal à l'aide d'un intestin artificiel, le Stimulateur de l'Ecosystème

BRASSEUR Anaïs¹, DJEKOUN Narimane^{1,3}, DELANAUD Stéphane¹, REQUILÉ Marina¹, DEPEINT Flore¹, ROUHABAH Léila², BACH Véronique¹, HAMDAD Farida² et KHORSI-CAUJET Hafida¹

1. Laboratoire PERITOX UMR-1101 INERIS ; Université de Picardie Jules Verne ; Amiens
2. Laboratoire de Bactériologie, CHU Amiens-Picardie
3. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire ; Constantine 1 (Algérie)



Introduction

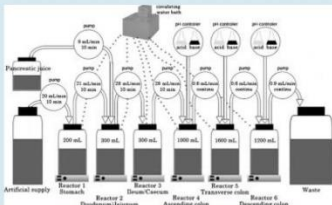
- L'usage intensif de pesticides reste au centre des inquiétudes de nombreux citoyens, professionnels, associations de protection de l'environnement et de la santé et des pouvoirs publics. Retrouvés le plus souvent à l'état de trace dans les aliments, l'eau de boisson et l'environnement de vie, c'est un véritable problème de santé publique. Ce sont des désinfectants, antiseptiques, antiparasitaires, insecticides, herbicides issus de l'industrie ou de l'agriculture. Parmi ces pesticides, le chlorpyrifos (CPF), un organophosphoré, fait partie des insecticides les plus utilisés
- Les pesticides sont des produits cancérigènes, irritants cutanés et des muqueuses, allergisants et perturbateurs endocriniens. Les conséquences peuvent être graves et irréversibles.

Objectif

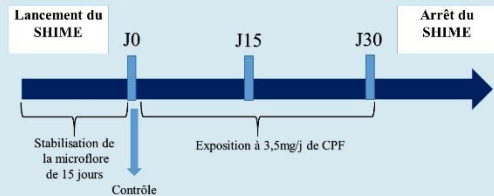
- L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet in vitro du CPF sur le microbiote intestinal, et plus particulièrement sur un pathobionte le constituant en majorité, *Escherichia coli*. Les pathobiontes sont des bactéries non pathogènes pouvant générer une inflammation intestinale lors d'une dysbiose.
- Cette étude est basée sur l'analyse de la dysbiose intestinale, l'antibiorésistance et la translocation bactérienne,

Matériel et méthode

Simulator Of Humain Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)



- Le SHIME® a été exposé à une dose de 3,5 mg/j de CPF.
- Après stabilisation de la microflore, des prélèvements ont été réalisés à J0, J15 et J30.
- Cette étape a permis de comparer la flore microbienne non exposée à celle exposée.
- L'analyse des échantillons prélevés à partir des fermenteurs F3 (Iléon) à F6 (colon) détermine l'équilibre du microbiote.
- Différentes souches d'*E. coli* ont été isolées, identifiées et typées par biologie moléculaire. Un test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé.

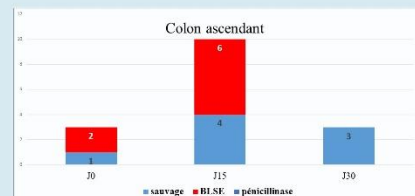
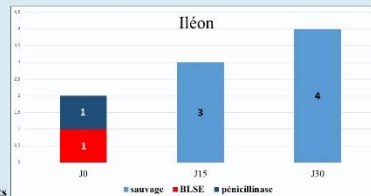


Résultats

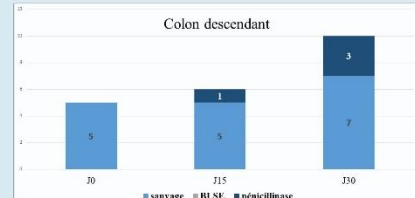
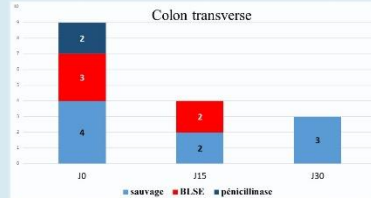
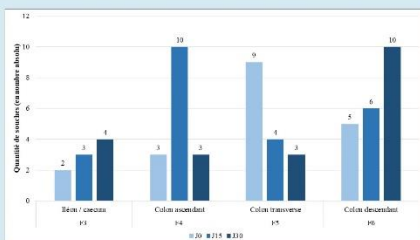


Diminution de la flore bénéfique et augmentation des pathobiontes après exposition au CPF

Evolution dans le temps de la résistance des souches *Escherichia coli* et en fonction des compartiments intestinaux



Répartition des souches *Escherichia coli* en fonction de la cinétique et des compartiments



La sensibilité aux antibiotiques est modifiée sous l'effet du Chlorpyrifos

Apparition d'une dysbiose intestinale sous l'effet du Chlorpyrifos

Conclusion et perspectives

- Le chlorpyrifos induit une dysbiose au sein du microbiote intestinal.
- Ce pesticide a un effet sur l'équilibre de la flore et sur les souches d'*Escherichia coli*, pathobionte majoritaire de la flore intestinale.
- Cela entraîne des effets délétères sur la translocation bactérienne.



Les microbiotes

et la santé humaine, animale et environnementale : Prévention et traitements du futur

10 & 20 JUIN 2018

Biocitech Romainville-Grand Paris

Effet d'un pesticide, le chlorpyrifos, sur le microbiote intestinal à l'aide d'un intestin artificiel, le Stimulateur de l'Ecosystème Intestinal Microbien Humain (SHIME®)

Anaïs BRASSEUR - Laboratoire PERITOX UMR

BRASSEUR Anaïs¹, DJEKOUN Narimane^{1,3}, DELANAUD Stéphane¹, REQUILE Marina¹, DEPEINT Flore¹, ROUHABAH Léila³, BACH Véronique¹, HAMDAD Farida² et KHORSI-CAUET Hafida¹

¹. Laboratoire PERITOX UMR-1101 INERIS ; Université de Picardie Jules Verne ; Amiens

². Laboratoire de Bactériologie, CHU Amiens-Picardie

³. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire ; Constantine 1(Algérie)

Contexte : L'usage intensif de pesticides, retrouvés à l'état de trace dans nos aliments et notre environnement, est un problème de santé publique. Le chlorpyrifos (CPF) est un organophosphoré le plus utilisé. Il agit sur la diversité du microbiote intestinal par sélection de certaines souches, comme les pathobiontes, induisant une dysbiose.

Le but de l'étude est d'évaluer l'effet du CPF sur le microbiote intestinal, précisément sur un pathobionte, l'E. coli. L'analyse est basée sur la dysbiose intestinale, l'antibiorésistance et la

- 39 -

translocation bactérienne.

Matériels : Le SHIME® modélise le microbiote, les situations physiologiques digestives et les principaux compartiments du tractus digestif, de l'estomac au colon, représentés par 6 fermenteurs. Son utilisation permet de comprendre l'écosystème microbien. L'inoculum est issu de 3 échantillons de selle de donneurs sains.

Méthode : Le SHIME® a été exposé à une dose de 3,5 mg/j de CPF. Après stabilisation de la microflore, des prélèvements ont été réalisés à J0, J15 et J30. Cette étape a permis de comparer la flore microbienne non exposée à celle exposée. L'analyse des échantillons prélevés à partir des fermenteurs F3 (iléon) à F6 (colon) détermine l'équilibre du microbiote. Différentes souches d'E. coli ont été isolées, identifiées et typées par biologie moléculaire. Un test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé.

Résultats : Le nombre d'E. coli est plus important lors d'exposition au CPF. Chez les non-exposés 52.6% des souches étaient sensibles aux β -lactamines, 15.8% des souches présentaient une pénicillinase et 31.6% étaient résistantes par sécrétion de β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Chez les exposés 72% des souches étaient sensibles aux β -lactamines, 9.4% avaient une pénicillinase et 18.6% étaient des BLSE.

Conclusion : L'exposition chronique au CPF induit une dysbiose intestinale et permet l'émergence de certains pathobiontes.

Perspectives : L'effet du CPF sur les facteurs de virulence et la translocation bactérienne permettra de compléter l'influence des xénobiotiques sur l'équilibre de la flore.

[Retour au résultats](#)

P.142 - Etude *in vitro* du microbiote intestinal après exposition chronique au pesticide chlorpyrifos

A. Brasseur, N. Djekkoun, F. Depeint, S. Delanaud, L. Rhazi, L. Rouabah, V. Bach, F. Hammad, H. Khorsi-Cauet

Introduction

L'usage intensif de pesticides, retrouvés à l'état de trace dans nos aliments et notre environnement, est un problème de santé publique. Le chlorpyrifos (CPF) est l'insecticide organophosphoré le plus utilisé en France. Après ingestion, il agit notamment sur la diversité du microbiote intestinal par sélection de certaines souches bactériennes, comme les pathobiontes, induisant une dysbiose intestinale [1,2].

Le SHIME® (Stimulateur de l'Ecosystème Intestinal Microbien Humain), est un intestin artificiel modélisant l'environnement physiologique du tractus digestif dans les principaux compartiments allant de l'estomac au colon, représentés par 6 fermenteurs reliés en continu par des pompes péristaltiques et pilotés par informatique. L'utilisation du SHIME® permet de comprendre la complexité de l'écosystème microbien [2]. Il peut également être combiné à des lignées cellulaires intestinales humaines pour étudier la translocation bactérienne [3].

L'objectif de l'étude est d'évaluer *in vitro* l'effet du CPF sur le microbiote intestinal, précisément sur un pathobionte, *E. coli*. L'analyse est basée sur l'étude de la dysbiose intestinale et des phénotypes de résistance aux antibiotiques.

Matériels et méthodes

Un inoculum issu d'un pool de 3 échantillons de selle de donneurs sains a été utilisé. Après une stabilisation de la microflore, le SHIME® a été exposé quotidiennement à une dose de 3,5 mg/j de CPF. Des prélèvements ont été réalisés dans les fermenteurs coliques à J0 (contrôle), J15 et J30 (exposition chronique) afin de mettre en évidence la flore microbienne. Différentes souches d'*E. coli* ont été isolées, identifiées et typées par biologie moléculaire. L'étude des phénotypes de résistance aux antibiotiques a également été réalisée.

Résultats

Les résultats préliminaires montrent d'une part que le CPF induit un déséquilibre de la microflore intestinale, se traduisant par une augmentation de la flore potentiellement pathogène au détriment de la flore bénéfique. En effet, les bactéries lactiques (*Bifidobacterium* or *Lactobacillus*) sont inhibées alors que les pathobiontes tels que *Enterobacterium* ne sont pas affectés significativement. En parallèle, les concentrations d'acide acétique augmentent sans impacter significativement les autres acides gras volatils (acides propioniques et butyriques).

D'autre part, l'étude a montré que le nombre d'*E. coli* isolés est plus important (x2.26) après exposition au CPF. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré que les *E. coli* non-exposées (J0) étaient sensibles aux β -lactamines dans 52.6% des cas, 15.8% des souches présentaient une pénicillinase de haut niveau et 31.6% étaient résistantes par sécrétion de β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Les souches d'*E. coli* exposées au CPF (J15 et J30) étaient dans 72% des cas sensibles aux β -lactamines, 9.4% avaient une pénicillinase de haut niveau et 18.6% étaient des BLSE.



Discussion

Conclusion

L'exposition chronique au chlorpyrifos seul induit une dysbiose intestinale, qui se traduit par l'émergence de certaines souches pathobiontes d'*E. coli*. Les souches exposées semblent cependant plus sensibles aux antibiotiques. Le CPF ne serait donc pas responsable de l'émergence de la résistance aux antibiotiques. L'effet du CPF sur les facteurs de virulence (analyse en cours) permettra de compléter l'influence des xénobiotiques sur l'équilibre de la microflore.

Remerciements

Programme du congrès de la JARS

	Programme 7^{ème} JARS 17 Janvier 2019 - 9h00 à 17h00 Auditorium – CHU Amiens-Picardie (site sud)	
<p>08h30 Café d'accueil 09h00 Discours d'ouverture Mr A. COLLIN (CHU) et Mr M. BENLAHSEN (UPJV)</p> <p>1^{ère} session orale - Modérateurs : Dr Lise Despoix (UPJV) – Dr Gay-Quéheillard (UPJV)</p> <p>09h15 Guillaume DECOCQ Aspects écologiques de la maladie de Lyme : facteurs influençant la prévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. et l'abondance de son vecteur <i>Ixodes ricinus</i> dans les zones rurales d'Europe occidentale 09h30 Azeddine DJEBARA Développement d'un modèle expérimental animal de fente palatine pour la validation de nouveaux substituts osseux cellularisés 09h45 Benjamin BRIGANT La Protéine TRIM 37 dans les chondrocytes : Aspects cellulaires et moléculaires, et implications dans le syndrome MULIBREY 10h00 Maria GRISSI L'insuffisance rénale chronique aggrave la sévérité des accidents vasculaires cérébraux dans un modèle de souris</p> <p>10h15 Pause café et Session poster (salle du conseil de réanimation – 1^{er} étage)</p> <p>11h00 Anais BRASSEUR Etude in vitro du microbiote intestinal après exposition chronique aux pesticides 11h15 Kévin RABIAN Les taux élevés d'estrogènes sont associés à des atteintes de la plasticité synaptique induites par le binge drinking. 11h30 Silviya RADOSLAVOVA Calcium is crucial for activated pancreatic stellate cells and for their interaction with pancreatic cancer cells</p> <p>12h00 Invité : Pr Christophe RAPP : Les maladies infectieuses émergentes : un nouveau défi pour les systèmes de santé</p> <p>13h00 Buffet et session poster (salle du conseil de réa – 1^{er} étage)</p>	<p>2^{ème} session orale – Modérateurs : Pr Ganry (CHU - UPJV) - Pr Slama (CHU - UPJV)</p> <p>14h30 Charles SABBAGH L'ablation pélicope (M) du drainage abdominal après duodéno pancréatectomie céphalique est sûre et utile. Résultats d'un essai clinique randomisé. 14h45 Hajer BEN KHADHRA: Indice de déprivation et prise en charge du cancer de la prostate dans le département de la Somme 15h00 Céline COULANGE : Le taux de (1-3)-β-D-glucan est-il prédictif de la présence de manifestations extradiigestives dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin pédiatriques? 15h15 Nicolas MARTINEZ Optimisation de la localisation de source épileptique en pédiatrie : influences des différents paramètres de modélisation 15h30 Charles MUSZINSKI Association entre l'analyse de l'électrohystérogramme (EHG) et le risque d'accouchement prématuré chez les patientes hospitalisées pour menace d'accouchement prématuré 15h45 Daniela ANDRIUTA Le corrélat anatomique des troubles dysexécutifs dans le TCL et la plainte cognitive subjective : cohorte MEMENTO 16h00 : Solène LAVILLE Le poids des effets indésirables médicamenteux chez les patients atteints de maladie rénale chronique modérée à avancée : une étude CKD-Rein</p> <p>16h15 : Pause café – délibération du Jury</p> <p>16h30 Soraya MOULAI : Présentation du Groupement de Recherche Clinique du Sud des Hauts de France</p> <p>16h45 Remise des prix</p> <p>17h00 Clôture de la journée</p>	

Résumé

L'usage intensif de pesticides, retrouvés à l'état de trace dans les aliments et l'environnement, est un problème de santé publique. Le chlorpyrifos (CPF) est un insecticide organophosphoré le plus utilisé.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet du CPF sur un composant du microbiote intestinal, l'*E. coli*. Pour cela le SHIME® (Stimulateur de l'Ecosystème Intestinal Microbien Humain) a été utilisé. Cet outil permet de mimer des situations physiologiques digestives et les principaux compartiments du tractus digestif allant de l'estomac au colon. L'utilisation du SHIME® permet de comprendre la complexité de l'écosystème microbien. Un inoculum issu d'un pool de 3 échantillons de selle de donneurs sains a été utilisé. Le SHIME® a été exposé quotidiennement à une dose de 3,5 mg/j de CPF. Après une stabilisation de la microflore, des prélèvements ont été réalisés à J0 (contrôle), J15 et J30 (exposition chronique à court, moyen et long terme). Cette étape a permis de comparer la flore microbienne non exposée à celle exposée au CPF. L'analyse des échantillons prélevés à partir des fermenteurs F3 (iléon) à F6 (colon) permet l'étude de l'équilibre du microbiote intestinal. Différentes souches d'*E. coli* ont été isolées, identifiées et caractérisées par analyse phénotypique et génotypique.

Les observations ont souligné que l'exposition chronique au chlorpyrifos seul induit une dysbiose intestinale se traduisant par une diminution de la diversité et une modification de la répartition des *E. coli* dans les différents fermenteurs.

Mots-clés : Microbiote intestinal, Symbiose, Dysbiose, Pathobionte, Antibiorésistance, Pesticides, Chlorpyrifos, SHIME (Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem), *Escherichia coli*

Abstract

Intensive use of pesticides, found in trace amounts in food and the environment, is a public health problem. Chlorpyrifos (CPF) is a most used organophosphorus insecticide.

The aim of the study is to evaluate the effect of CPF on a component of the gut microbiota, *E. coli*. For this, the SHIME® (Stimulator of the Human Microbial Intestinal Ecosystem) was used. This tool allows to mimic digestive physiological situations and the main compartments of the digestive tract from the stomach to the colon. The use of SHIME® makes it possible to understand the complexity of the microbial ecosystem. An inoculum from a pool of 3 healthy donor stool samples was used. SHIME® was exposed daily at a dose of 3.5 mg / day CPF. After stabilization of the microflora, samples were taken on day 0 (control), day 15 and day 30 (chronic exposure in the short, middle and long term). This step made it possible to compare the unexposed microbial flora with that exposed to the CPF. The analysis of the samples taken from fermentors F3 (ileum) to F6 (colon) allows the study of the balance of the gut microbiota. Different strains of *E. coli* were isolated, identified and characterized by phenotypic and genotypic analysis.

Observations pointed out that chronic exposure to chlorpyrifos alone induces intestinal dysbiosis resulting in decreased diversity and altered distribution of *E. coli* in different fermentors.

Keywords : Intestinal microbiota, Symbiosis, Dysbiosis, Pathobiont, Antibiotic resistance, Pesticides, Chlorpyrifos, SHIME (Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem), *Escherichia coli*