

BIOLOGIE MÉDICALE INTÉGRATIVE

Guide pratique des examens
de diagnostic et suivi médical
& des bilans biologiques de terrain

DEUXIEME ÉDITION

JACQUES BENJAMIN BOISLEVE
PATRICK COHEN

HOLOSYS ÉDITIONS
Synthèse pédagogique

VII – MICROBIOLOGIE	193
A - MICROBES ET MALADIES INFECTIEUSES	193
1. Notions importantes sur les maladies infectieuses.....	193
2. Flore usuelle et maladies infectieuses	195
3. Réponse Immunitaire	196
4. L'épidémiologie et la prévention.....	197
B - MICRO-ORGANISMES IMPLIQUÉS EN PATHOLOGIE HUMAINE	198
1. LES VIRUS.....	198
2. LES BACTÉRIES	200
3. LES CHAMPIGNONS	203
4. LES PARASITES	204
D - LES MALADIES INFECTIEUSES.....	205
1. MALADIES VIRALES.....	205
2. LES INFECTIONS BACTÉRIENNES.....	205
3. LES MYCOSES.....	207
4. LES PARASIToses.....	207
E - DIAGNOSTICS BIOLOGIQUES DIRECTS UTILISES EN MICROBIOLOGIE	209
Comparatif des méthodes utilisées pour le diagnostic microbiologique direct.....	210
1. Les virus	211
2. Les bactéries.....	212
3. Les champignons	216
4. Les parasites	217
F - DIAGNOSTIC INDIRECT : TESTS SÉROLOGIQUES (SÉRODIAGNOSTICS)	219
1. Rappel immunologique	219
2. Principes généraux de la sérologie.....	220
3. Limites de la sérologie.....	220
4. Exemples	220
▣ RÉCAPITULATIF DES DIAGNOSTICS SELON L'AGENT INFECTIEUX	230
G - PRINCIPAUX EXAMENS PRATIQUES EN MICROBIOLOGIE	231
1. Examen cyto-bactériologique des urines (ECBU)	231
2. Prélèvement de gorge	234
3. Examen bactério-virologique de selles (coproculture).....	235
4. Examen parasitologique des selles.....	235
5. Prélèvement cervico-vaginal (PV)	236
6. Prélèvement Urétral (PU) chez l'homme	237
Récapitulation des infections génitales.....	237
7. Autres prélèvements.....	238
H - ANALYSE DES MICROBIOTES	239
1. Physiologie des microbiotes.....	239
2. Microbiote cutané.....	241
3. Microbiote ORL	242
4. Microbiote respiratoire	242
5. Microbiote urinaire	242
6. Microbiote vaginal.....	243
7. Microbiote digestif	245

7.4. Flore intestinale

C'est la star des microbiotes, faisant l'objet de multiples recherches qui ne cessent de confirmer son rôle majeur dans la santé digestive et globale. La mise au point d'une détermination par biologie moléculaire, dans un contexte de popularité croissante, a conduit à la prolifération de tests de dépistage, tandis que le développement de prébiotiques et de probiotiques, ainsi que la transplantation fécale, proposent des traitements.

Toutefois, la grande complexité de ce microbiote et de ses implications sur la physiopathologie ne permet qu'une connaissance partielle de situations spécifiques. Elle ne permet actuellement qu'une approche qui s'appuie sur des liens globalement confus entre la qualité de la flore et les états de santé. Les possibilités thérapeutiques, en dehors de quelques situations bien définies avec des protocoles validés pour leur efficacité, ne sont que des promesses.

○ ORIGINE ET EVOLUTION

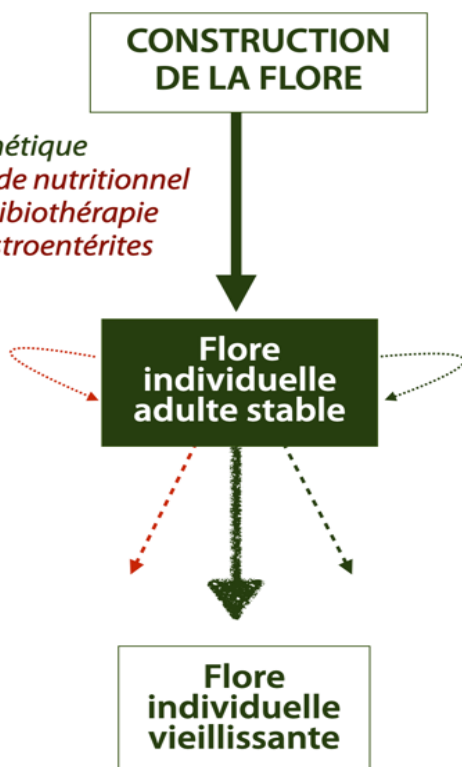
L'apparition et le développement au cours de la vie se fait en cinq phases :

1. Première colonisation par des bactéries aéro-anaérobies qui consomment l'oxygène de la lumière intestinale. La naissance par voie haute ou basse modifie les conditions de départ, mais peu le devenir, puisque les enfants nés par césarienne retrouvent un peu plus tard un microbiote peu différent de ceux qui sont nés par voie basse. Le *seeding* (ensemencement par la flore vaginale) après césarienne, est toutefois pratiqué dans certaines maternités.

2. Arrivées des bactéries anaérobies strictes (essentiellement des bifidobactéries) qui colonisent le tube digestif jusqu'à 10^9 UFC/g dans les 10 premiers jours de la vie.

L'allaitement favorise la prédominance de bifidobactéries, alors que la nourriture aux laits maternisés conduit à une diversité plus précoce de la flore anaérobie.

3. Avec la diversification alimentaire, la flore anaérobie se diversifie aussi. Pendant toute cette période, l'alimentation et les traitements antibiotiques ont un impact fort sur la nature du microbiote qui se met en place.



4. Vers la deuxième année, les grandes lignes de la flore adulte sont dessinées. Elle va ensuite maintenir sa base qui peut cependant évoluer avec le mode de vie, notamment alimentaire, et les éventuelles gastro-entérites.

Le contexte va favoriser une accélération ou un ralentissement, voire une récupération de la perte de diversité qui se produit naturellement avec le vieillissement.

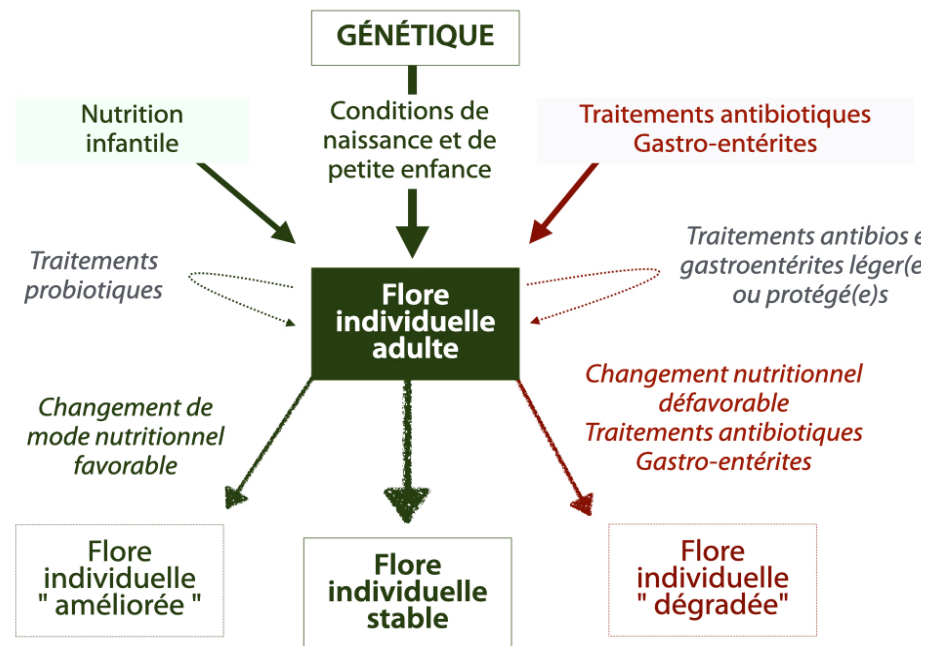
5. Après 60 ans : diminution de la diversité et perte de stabilité avec une plus grande sensibilité aux facteurs extérieurs.

Certaines **situations physiologiques, pathologiques ou thérapeutiques** ont un impact sur la composition du microbiote. Dans les situations aiguës (gastro-entérites, traitement courts), il y a généralement un retour vers un état proche de la situation antérieure. Dans les situations chroniques qui durent, les nouvelles bases du microbiote se stabilisent et deviennent la norme individuelle, difficile à faire évoluer ensuite.

Le microbiote intestinal est un ensemble complexe très spécifique, qui contient certaines espèces en quantité variable tandis que d'autres sont absentes.

Chaque microbiote est **unique** et propre à chacun, c'est une véritable carte d'identité.

Sur une base stable, il évolue transitoirement selon les contextes et durablement sous l'effet du vieillissement, de pathologies chroniques, ou de changements durables de mode de vie.



○ COMPOSITION ET ORGANISATION

Il y a quatre niveaux d'observation de la flore intestinale : la flore résidente dominante, la flore sous dominante, la flore résiduelle qui est seulement en transit, et flore fécale qui est éliminée.

TYPE	DENSITÉ	PRINCIPAUX GENRES	COMMENTAIRE
Flore dominante	$> 10^9$ UFC/g	<i>Bacteroides, Eubacterium, Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridium, Propionibacterium</i>	Exclusivement anaérobie
Flore sous-dominante	10^6 à 10^8 UFC/g	Enterobacteriaceae (surtout <i>E. coli</i>) <i>Streptococcus, Enterococcus,</i> <i>Lactobacillus, Fusobacterium, Desulfovibrio, Methanobrevibacter,</i>	Aérobies facultatifs ----- Anaérobies
Flore résiduelle	$< 10^6$ UFC/g		Bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente
Flore fécale			Bactéries « mortes » ou rejetées par l'écosystème

La flore fécale est la plus facilement accessible à l'analyse. Elle n'est cependant pas représentative de la flore résidente (dominante/sous-dominante). Elle est en revanche tout à fait adéquate pour rechercher et d'identifier les espèces pathogènes.

L'analyse génomique a identifié des groupes d'espèces regroupées en fonction de leurs filiations évolutives. On parle de phylas génétiques.

Quatre principaux phylas constituent les grandes familles bactériennes du microbiote intestinal :

FAMILLE	%	PRINCIPAUX GENRES	FONCTIONS CONNUES
Firmicutes	15-30 %	<i>Ruminococcus, Clostridium, Lactobacillus, Eubacterium, Faecalibacterium, Roseburia, Butyrivibrio, Streptococcus</i>	Ils produisent, par fermentation, des acides organiques assimilables et des acides gras à courte chaîne (SCFA). Leur présence protège vis-à-vis de l'implantation de germes pathogènes.
Bacteroidetes	10-40 %	<i>Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas, Xylanibacter</i>	Ils fermentent une grande variété de polymères glucidiques non digestes. Ils favorisent l'absorption des nutriments, le maintien et la maturation de cellules épithéliales digestives.
Actinobacteria	1- 12%	<i>Bifidobacterium, groupe Atopobium-Collinsella</i>	Fermentation hétérolactique (production d'acide lactique et d'acétate), sans dégagement gazeux. Leur présence protège vis-à-vis de l'implantation de germes pathogènes.
Proteobacteria	< 5 %	Entérobactéries (<i>E. Coli</i>) <i>Desulfovibrio</i>	Réduction du soufre.

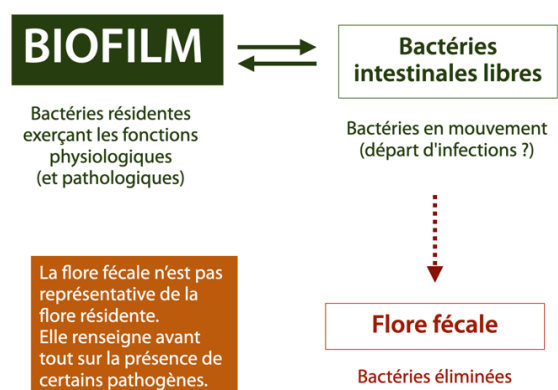
D'autres espèces de micro-organismes n'appartenant pas à ces phylas ont également été identifiées. Elles jouent parfois un rôle physiologique ou pathologique, plus ou moins remarquables.

- Les **archées** sont dans l'évolution une branche différente de celle des bactéries. Elles sont présentes par un genre (*Methanobrevibacter*), et sont impliquées dans la production de méthane.
- Les **Verrucomicrobia**, avec le genre *Akkermansia* (découvert en 2004) dégradent la mucine au niveau de la muqueuse intestinale et exercent divers effets bénéfiques : modulation de la perméabilité intestinale, diminution de l'inflammation au niveau du tube digestif et amélioration du métabolisme glucidique et lipidique. Sa présence est liée à une moindre incidence des maladies métaboliques, de l'obésité, des pathologies inflammatoires intestinales ou hépatiques, ainsi que du psoriasis. Elle est associée à une plus grande longévité.
- Plusieurs types de **champignons** peuvent être retrouvés : *Candida, Saccharomyces, Aspergillus*, et *Penicillium*. On ne leur connaît pas de fonction physiologique. En revanche, leur prolifération favorise certains processus pathologiques.

Finalement, le microbiote intestinal contient une **très grande diversité** dans laquelle on distingue :

- Des familles dont la présence est constante avec une répartition globale qui varient selon les sujets.
- Des espèces bénéfiques aux propriétés spécifiques dont la quantité est associée à des avantages santé.
- Des espèces pathogènes ou pathogènes opportunistes.

C'est à partir de ces trois critères que vont se développer les diverses techniques d'exploration, limitées par le fait que la flore résidente qui a le rôle physiopathologique le plus important est intriquée dans un **biofilm** non accessible au prélèvement, alors que la flore fécale qui peut facilement être analysée est composée en grande partie de la flore résiduelle.



○ FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

Les fonctions connues du microbiote intestinal concernent quatre domaines :

• Effets digestifs, nutritionnels et métaboliques

- Fermentation de polysaccharides en excès ou non digestibles avec production de gaz et d'acides organiques à courte chaîne (SCFA).
- Complément de digestion des lipides et protéines.
- Production de vitamines (B2, B5, B6, B8, B12, K) le plus souvent pour une consommation locale car elle se produit au-delà de la zone d'assimilation. B8 et K semblent en partie assimilées.
- Transformations métaboliques de principes actifs pouvant être des activations (isoflavones de soja) ou des inactivations (digoxine). Parfois, formation de métabolites néfastes comme les nitrosamines ou des dérivés du chou (agent facteur de diarrhée, goitrine perturbateur de la glande thyroïde).

• Protection vis-à-vis des pathogènes

- Effet barrière qui empêche la fixation de bactéries en transit dans le bol alimentaire et protège contre les gastroentérites, avec élimination totale de la souche (effet drastique), ou maintien en sou-dominance (effet permissif).
- Production de bactériocines inactivant certaines espèces exogènes.
- Limitation de la prolifération de *Candida albicans*.

• Développement et maturation du système immunitaire

- Microbiote intestinal indispensable au développement et au maintien du GALT (*gut associated lymphoïde tissue*), le tissu lymphoïde associé au tube digestif, déterminant pour le bon fonctionnement du système immunitaire.
- Intervention directe sur le développement de la fonction immunitaire, avec discernement des antigènes hostiles nécessitant une réaction, de ceux qui sont bénéfiques ou neutres, et doivent être tolérés (aliments, flore commensale).

Un dysfonctionnement à ce niveau favorise les pathologies immunitaires : allergies, certaines intolérances alimentaires, certaines maladies auto-immunes...

• Santé de la muqueuse intestinale

- La qualité de la flore influe directement sur l'intégrité et la fonctionnalité des muqueuses digestives.
- Les acides gras à courte chaîne (SCFA) produits par certaines espèces bactériennes résidentes sont des nutriments indispensables aux cellules du colon (colonocytes).
- Le microbiote influe sur la morphologie et le taux de renouvellement des entérocytes. C'est un facteur essentiel de protection vis-à-vis de l'atrophie intestinale.

○ DYSBIOSE

Le terme eubiose qualifie un état physiologique, optimal pour la santé.

La dysbiose est étymologiquement une déviation, un déséquilibre de la flore.

Il y a unanimité sur cette définition de départ. C'est ensuite que les choses se compliquent avec une diversité de points de vue sur la nature des déviations.

Cette hétérogénéité de théories et d'hypothèses est favorisée par le fait qu'il n'y a aucune norme collective définissant une « eubiose » de référence !

Chaque concept de santé voit la dysbiose dans un sens qu'il a approfondi : prolifération microbienne dans l'intestin grêle (SIBO), manque de diversité, candidose, déficit de bactéries "amies" ou surplus de bactérie "ennemies" etc.

• SIBO (*small intestinal bacterial overgrowth*)

La prolifération bactérienne dans l'intestin grêle, selon certains auteurs¹, est la principale cause des troubles fonctionnels intestinaux. Le SIBO est diagnostiqué par un test respiratoire (analogue à celui utilisé pour rechercher les intolérances aux glucides). Il est traité par des adaptations nutritionnelles et parfois par des produits de santé naturels (aromathérapie).

• Manque de diversité bactérienne

Il a été observé que la diversité dans le microbiote diminue lors du vieillissement, ainsi que dans diverses situations pathologiques et dans la prise de poids. Indépendamment de la nature des espèces présentes (qui est une caractéristique individuelle), la diversité est un facteur de santé.

Elle est évaluée par les analyses génomiques. La courbe présentée par le *Biocodex Microbiota Institute* montre le grand écart des variations individuelles quand on analyse leur diversité microbienne par nombre de gènes différents dans leur microbiote intestinal.

La faiblesse de cette diversité microbienne, qui s'installe progressivement avec le vieillissement et parfois plus rapidement dans les situations de surpoids ou de pathologies, est associé à un affaiblissement du potentiel santé.

Indépendamment de la composition et de la répartition des espèces, très variable d'un individu à l'autre et difficile à interpréter, la diversité bactérienne semble être un facteur majeur qui accroît le potentiel bénéfique du microbiote intestinal.

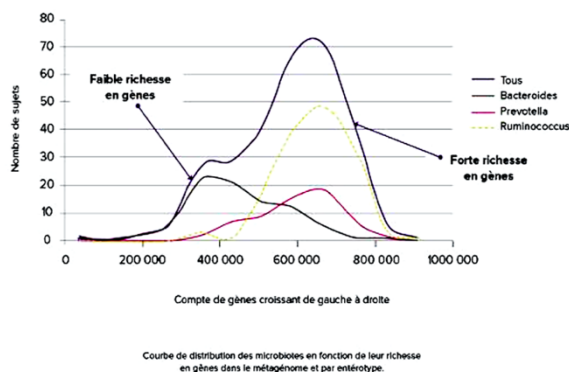
• Candidose digestive

Elle sera développée à la fin de ce chapitre.

• Déficit ou excès de bactéries spécifiques

La prolifération de *Clostridium difficile* favorisée principalement par la prise d'antibiotiques et d'IPP, ainsi que par l'immunodépression et par l'avancement de l'âge, peut conduire à une pathologie sévère : la colite pseudo-membraneuse.

À un niveau moindre, il se pourrait que dans l'avenir que l'excès d'espèces supposées néfastes ou le déficit en celles considérées comme bénéfiques (comme *Akkermansia muciniphila*), soient considérés comme des formes de dysbioses.



○ IMPLICATION DE LA DYSBIOSE DANS LES PATHOLOGIES

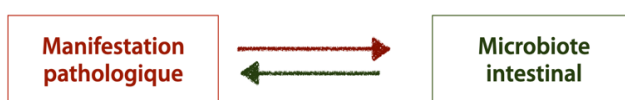
Diverses maladies sont associées à la dégradation de la muqueuse intestinale (atrophie) à laquelle contribue la dysbiose ainsi que d'autres facteurs, sans qu'il soit possible de savoir le rôle réel de cette atrophie dans la physiopathologie.

Plus spécifiquement, la dysbiose intestinale est associée à des pathologies spécifiques.

Il est souvent difficile de savoir si cela est une cause ou une conséquence.

Cependant, l'expérience montre parfois qu'intervenir sur la flore agit aussi sur les manifestations pathologiques.

Par exemple, une complémentation probiotique apportant une quantité suffisante de *Lactobacillus gasseri* a un effet favorable sur le surpoids.



¹ Dans le monde francophone, cette approche est mise en avant par BRUNO DONATINI

Quelques maladies et désordres associés à des modifications du microbiote intestinal, dans une liste non exhaustive :

• Troubles fonctionnels intestinaux

Lors des douleurs abdominales et des troubles de transit, plusieurs facteurs sont connus : constitutionnels, psychiques et alimentaires. La qualité de la flore, notamment la fermentation qu'elle produit, y contribue également.

• Surpoids

Certaines caractéristiques du microbiote intestinal sont liées au surpoids. Chez les obèses, on observe une plus faible diversité microbienne. On observe également une modification notable du microbiote après des actes de chirurgies bariatriques. Certaines souches bactériennes (*Lactobacillus gasseri*, *Akkermansia muciniphila*) semblent protectrices vis-à-vis de la prise de poids.

• Troubles neuro-psychiques

Le lien entre cerveau et intestin est connu depuis longtemps. Le lien entre certaines caractéristiques du microbiote et certains états psychiques est désormais reconnu (via la perméabilité intestinale et directement par voie endocrinienne ou nerveuse, influençant l'équilibre des neuromédiateurs).

Les troubles anxio-dépressifs, le syndrome autistique, et peut-être aussi à des maladies mentales plus sévères (schizophrénie, psychose maniaco-dépressive) sont concernées.

• Pathologies immunitaires

– La nature du microbiote digestif du jeune enfant influe sur l'installation ou non d'un terrain atopique, favorisant les allergies. Chez l'adulte, le lien entre la nature de la flore intestinale et les manifestations allergiques est suspecté. Par exemple, *Flavonifractor plautii*, une bactérie stimulée par les apports de polyphénols, réprime la réponse immunitaire de type Th2 chez les souris. On suppose donc que sa présence notable dans les intestins serait favorable aux personnes allergiques.

– Dans un autre domaine de l'immunité : la situation de la tolérance immunitaire et le niveau perméabilité intestinale, toutes deux liées à l'activité du microbiote intestinal, influent sur le développement des processus auto-immuns.

• Infections urinaires et vaginales

Le lien direct de contamination entre la flore digestive et les voies génito-urinaires n'est pas suffisant pour expliquer les infections uro-génitales. L'état du microbiote vaginal, et peut-être urinaire, est probablement une première clef. Celui du microbiote intestinal pourrait être une seconde.

○ ANALYSE DU MICROBIOTE

Il y a quatre voies pour analyser le microbiote intestinal :

– Dosage dans les urines des métabolites bactériens

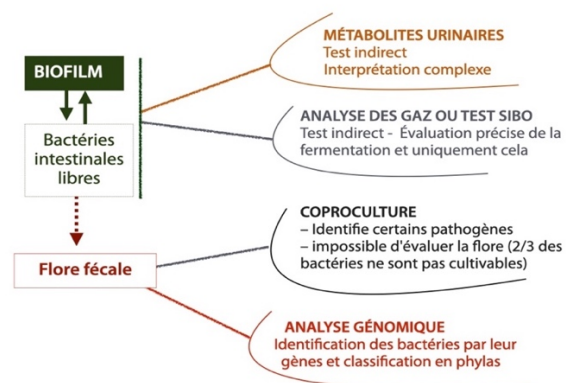
– Analyse des gaz (test SIBO)

Ces deux méthodes explorent les productions de la flore en activité, donc de la flore résidente.

– Coproculture

– Analyse génomique

Ces deux méthodes se font sur un prélèvement de selles et analysent donc la flore fécale.



1. Dosage urinaire des métabolites bactériens

Par leur métabolisme, les bactéries du microbiote intestinal produisent des composés organiques dont une partie passe dans le sang et s'élimine par les urines. Le dosage de ces métabolites reflète donc le microbiote et permet en principe de l'analyser. Il y a cependant des limites :

– Les métabolites ne sont généralement pas spécifiques d'une espèce. En se focalisant sur une espèce recherchée, on lui attribue volontiers toute la production, ce qui n'est qu'une supposition, avec un risque réel de faux positif.

– De même, une étude globale du métabolome intestinal, comme peut le faire la résonance magnétique nucléaire quantitative ou la spectrométrie de masse, pose des difficultés de traitement des résultats, dans la mesure où des espèces différentes produisent les mêmes métabolites.

– Le passage des métabolites dans le sang se fait en fonction de la production et de la perméabilité intestinale à chacun d'entre eux, qui constitue un facteur individuel non connu.

Cette méthode pratiquée en recherche n'est pas reconnue comme moyen de diagnostic. Elle est néanmoins utilisée pour évaluer les dysbioses, et notamment identifier une prolifération de *Candida albicans* en objectivant l'augmentation de plusieurs de ses métabolites connus.

2. Dosage des gaz de fermentation dans l'air expiré

Certains gaz que l'on retrouve dans l'air expiré (hydrogène, méthane, méthyl acétate, hydrogène sulfuré) ont pour origine la fermentation digestive. L'hydrogène notamment est produit lors de la métabolisation des glucides par les bactéries, et sa mesure après ingestion d'un sucre spécifique diagnostique les intolérances aux Fodmaps.

Mesurés à jeun, les gaz de fermentation sont avant tout le fait d'une activité basale, et l'excès de certains par rapport aux valeurs de référence oriente vers l'excès d'activité des bactéries qui les produisent par leur métabolisme. C'est ainsi que se diagnostique un SIBO.

3. Coproculture

Elle est adaptée à la recherche de bactéries pathogènes éliminées par les selles, qui se développent en aérobiose et pour lesquels il existe des milieux de culture appropriés. Elle est complétée désormais par la recherche directe par PCR des principaux pathogènes intestinaux.

La coproculture est en revanche inadaptée à l'exploration du microbiote, parce qu'il y a trop de diversité, que la culture en anaérobiose est difficile à mettre en œuvre, et qu'un nombre important d'espèces ne sont pas cultivables. C'est la raison pour laquelle le microbiote a été peu étudié avant l'apparition des techniques de biologie moléculaire.

4. Analyse génomique

La biologie moléculaire, comme dans de nombreux autres secteurs, a révolutionné les méthodes analytiques destinées à explorer le microbiote intestinal.

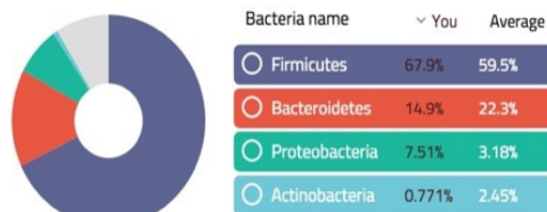
Les techniques de séquençage peuvent analyser le microbiote comme une entité, et déterminer les gènes présents afin d'identifier les espèces bactériennes qui les portent.

La détermination des séquences d'ARN ribosomique 16S, avec divers niveaux de précisions qualitatives et quantitatives, peuvent identifier dans les cas les plus simples les grandes familles (phyla), et dans les technologies plus précises les genres et les espèces.

L'analyse du **métagénome** fécal est une détermination complète de la composition du microbiote. C'est une méthode longue, au coût de revient très élevé, utilisable seulement en recherche. Le projet MEtaHit en Europe est une grande étude destinée à mieux connaître le microbiote intestinal et établir des liens entre certaines configurations et des situations pathologiques. C'est ainsi qu'un lien a pu être établi entre le surpoids et une diminution de la diversité bactérienne.

La détermination du **microbiome** est une analyse partielle, beaucoup plus rapide, réalisé par diverses sociétés pour un coût accessible (environ 300 € en 2020). Elle identifie les grands groupes de bactéries et analysent divers paramètres :

- Évaluation de la richesse et de la diversité de la flore.
- Calcul du rapport bacteroidetes/firmicutes, ou plus précisément le % des principaux phylas.
- Évaluation de la capacité de production de butyrate.
- Identification de quelques "amis" et "ennemis",



Les résultats sont accompagnés de divers commentaires, parfois de recommandations alimentaires ou complémentations en prébiotiques ou probiotiques.

Compte tenu des promesses de la bactérie *Akkermansia muciniphila*, certains laboratoires proposent sa recherche directe par un test PCR.

○ INTERET DES ANALYSES GENOMIQUES DU MICROBIOTE

Les multiples offres qui se développent pour une analyse du microbiome s'adressent directement au grand public, parce que l'examen n'est aujourd'hui pas validé par le consensus médical et de ce fait, non pris en charge par l'assurance maladie.

Les différents tests proposés² sont le résultat de développements privés, indépendants et non standardisés. Ils ont une valeur indicative, aucun intérêt diagnostique.

Les liens entre certaines configurations de microbiote et des situations pathologiques sont seulement hypothétiques. Les analyses génomiques du microbiote intestinal peuvent induire de la confusion en signalant d'éventuelles anomalies, pour lesquelles il sera impossible d'avoir des précisions et des solutions thérapeutiques validées.

La société nationale française de gastro-entérologie (SNFGE) recommande aux médecins de ne pas prescrire ces tests.

² Juvenalis, Nahibu, Luxia (France), Biopredix (Belgique), GutMicrobiota/ESNM (Autriche)...