

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2017

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 08/06/2017 à POITIERS
par Monsieur CHANE YACK FA Guillaume
23/10/1988

Microbiote intestinal
et diabète

Composition du jury :

Président : Monsieur FAUCONNEAU Bernard, Professeur de Toxicologie

Membre : Monsieur ENG Pascal, Pharmacien

Directeur de thèse : Madame CHARVET Caroline, Maître de conférences en Physiologie



PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, pharmacie clinique PU-PH
- MARCHAND Sandrine, pharmacocinétique PU-PH

- CARATO Pascal, chimie thérapeutique PR
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie PR
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie PR
- IMBERT Christine, parasitologie PR
- OLIVIER Jean Christophe, galénique PR
- PAGE Guylène, biologie cellulaire PR
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique PR
- SARROUILHE Denis, physiologie PR
- SEGUIN François, biophysique, biomathématiques PR

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, immunologie-hématologie MCU-PH
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique MCU-PH
- RAGOT Stéphanie, santé publique MCU-PH
- THEVENOT Sarah, hygiène et santé publique MCU-PH

- BARRIER Laurence, biochimie MCF
- BODET Charles, bactériologie MCF
- BON Delphine, biophysique MCF
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie MCF
- BUYCK Julien, microbiologie, MCF
- CHARVET Caroline, physiologie MCF
- DEBORDE-DELAGE Marie, sciences physico-chimiques MCF
- DEJEAN Catherine, pharmacologie MCF
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique MCF
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire MCF
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie, MCF

- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie MCF
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique MCF
- INGRAND Sabrina, toxicologie MCF
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile pharmacochimie MCF
- PAIN Stéphanie, toxicologie MCF
- RIOUX BILAN Agnès, biochimie MCF
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacochimie MCF
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire MCF
- WAHL Anne, chimie analytique MCF

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Attaché Temporaire d'Enseignement et de recherche (ATER)

FERRU-CLEMENT Romain, biochimie et biologie moléculaire

Professeur 2nd degré - anglais

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - anglais

- DHAR Pujasree

Contractuel enseignant - anglais

- ELLIOTT Margaret

Remerciements

Au jury de ma thèse :

A ma directrice de thèse, Mme Caroline Charvet, merci d'avoir été un professeur intéressant et sympathique pendant mes années d'études. Merci de m'avoir aidé à trouver mon sujet et merci d'avoir suivi et corrigé ma thèse.

A Monsieur Fauconneau, merci d'avoir accepté de présider mon jury.

A Pascal, merci d'avoir été un ami fidèle et d'avoir accepté d'être dans mon jury.

A ma famille :

A mes parents, merci de m'avoir soutenu et donné les moyens de réussir. Dans les bons et les mauvais moments, j'ai toujours pu compter sur vous.

A ma sœur Stéphanie et mon frère Nicolas, merci pour votre soutien et pour les moments partagés ensemble.

A mes grands parents.

A tous mes oncles et toutes tantes, en particulier à Michel et Micheline, merci d'avoir été là durant toutes mes années d'études.

A tous mes cousins et toutes mes cousines, pour les bons moments passés.

A mes amis :

Téhan, Antoine T, Antoine H, Antoine G, Fred, Fx, Manu, Etienne, Edouard, Vincent, Loucif, Bertrand, Jean, Stef, Steeve, Simon désolé j'en oublie sûrement beaucoup. On a réviser ,bosser et souffert ensemble mais on a surtout rigoler ensemble et sans vous j'en serais probablement pas là aujourd'hui.

Jp, Carole, Domi, Alex, Manon, Loic, Kevin, Arnaud, May, Maria, Yass, Youss et tous les autres...

Table des matières

Abréviations.....	6
Index des illustrations.....	8
Introduction.....	9
Chapitre I Le microbiote intestinal.....	10
A composition.....	11
A.1 Les eucaryotes et les virus.....	12
A.2 Les archées.....	12
A.3 Les bactéries.....	13
B régulation de la composition du microbiote.....	16
B.1 Facteurs influençant la mise en place du microbiote au cours de l'enfance.....	16
B.2 Diversification alimentaire.....	17
B.3 Evolution de la flore au cours de la vie.....	17
C Fonctions.....	18
C.1 Fonctions métaboliques du microbiote intestinal	18
a Métabolisme des glucides par le microbiote intestinal	19
b Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal	23
c Métabolisme des lipides par le microbiote intestinal	25
d Synthèse de vitamines	26
C.2 interactions avec le système immunitaire.....	26
Chapitre II Le diabète.....	31
A Épidémiologie	31
A.1 Prévalence.....	31
A.2 Incidence.....	33
B Physiopathologie.....	34
B.1 diabète de type 1.....	35
B.2 diabète de type 2.....	36
C Complications.....	37
Chapitre III Microbiote et diabète.....	38
A Rôle du microbiote dans le diabète de type 2.....	38
A.1 Composition	38
A.2 Réactions inflammatoires et insulinoresistance.....	40
a Endotoxémie métabolique	41
b LPS et inflammation.....	44
B Rôle du microbiote intestinale dans le diabète de type 1.....	47
B.1 Composition.....	49
B.2 Mécanisme moléculaires du diabète de type 1.....	49
Chapitre IV Perspectives thérapeutiques.....	52
A le microbiote comme marqueur prédictif du diabète.....	52
A.1 Examen bactériologique.....	53
A.2 Examen métabolique de la microflore.....	54
B Le microbiote comme cible de traitement	56
B.1 probiotiques et prébiotiques.....	56
B.2 les antibiotiques.....	59
B.3 Les peptides antimicrobiens.....	60
a les defensines.....	61
b les cathélicidines.....	62
c les lectines de type C REG3 β et REG3 γ	64

d Les peptides à activité enzymatique.....	64
C Transplantation de flore intestinale.....	65
D Discussion.....	66
Conclusion.....	67
Bibliographie.....	68

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AGCC: acide gras à chaîne courte

AMPK : adenosin monophosphate kinase

ANSM : Autorité Nationale de Sécurité du Médicament

ARN : acide ribonucléique

CD14 : cluster of differentiation 14

CRAMP : cathelin-related antimicrobial peptide

FFAR=GPR43

Foxp3 : Forkhead Box P3

GLP-1 : glucagon like peptide-1

GPR41 : G-protein coupled receptor 41

GPR43=FFAR G-protein coupled receptor 43

HBT : hydrogen breath test

HLA : human leukocyte antigen

Ig : immunoglobuline

IKB : Inhibiteur de NF-κB

IL8 : interleukin-8

IL12 : interleukin-12

IMC : indice de masse corporel

InVS : institut de veille sanitaire

LPS : lipopolysaccharide

MD2 : Corécepteur membranaire associé à TLR4

Myd88 : myeloid differentiation primary response gene 88

NF-κB : nuclear factor-κB

NGS : new generation sequencing

NOD1 : nuclear oligomerization domain-1

NOD2 : nuclear oligomerization domain-2

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PBA : phenyl butyrate acid

PCR : poly chain replication

PCR-DGGE : poly chain replication denaturing gradient gel electrophoresis

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PMMV : pepper mild mottle virus
PPAR : peroxisome proliferator activated receptor
PYY : peptide YY
SIBO : small intestinal bacterial overgrowth (prolifération bactérienne de l'intestin grêle)
SigA : secretory immunoglobulin A
STZ : streptozotocine
TIR : Toll interleukin receptor
TLR : Toll like receptor
TNF- α : tumor necrosis factor- α
Treg : lymphocyte T régulateur
TRIF : TIR domain containing adapter inducing interferon- β
UFC : unité formant colonie
ZO-1 : zonula occludens-1

Index des illustrations

Liste des figures

figure 1: Arbre phylogénique de la vie.	11
figure 2: Schéma représentant la variation qualitative et quantitative bactérienne le long du tractus gastro-intestinal.....	14
figure 3: Diversité bactérienne dans l'intestin distal de souris C57BL6.	15
figure 4: évolution de la flore bactérienne fécale (10x UFC par gramme de selle) au cours de la vie.	18
figure 5: Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par la microflore colique.....	20
figure 6 Principales voies du métabolisme des protéines dans le côlon.....	24
figure 7: Production d'IgA par le système immunitaire.	29
figure 8: Modulation de la réponse immunitaire par le microbiote intestinal.	30
figure 9: Evolution de la prévalence du diabète traité pharmacologiquement de 2006 à 2013, France.	32
figure 10 : corrélation entre l'indice de masse corporel(BMI) ou le glucose plasmatique après test de tolérance oral au glucose (OGTT) et la composition bactérienne intestinale.	40
figure 11: flore intestinale: un facteur de risque des maladies métaboliques.	41
figure 12: structure d'un lipopolysaccharide	43
figure 13: Rôle du microbiote dans le développement de maladies métaboliques liées à l'obésité.	46
figure 14 Voies de signalisation des récepteurs TLR (Toll Like Receptor).	48
figure 15: Mécanismes associés au microbiote et à l'alimentation dans le développement de l'autoimmunité et du diabète de type 1.	51
figure 16 : la métagénomique quantitative pour caractériser le microbiome intestinal humain....	54
figure 17: Schéma de l'hydrogen breath test.	55
figure 18 : impact des altérations du microbiote induit par les prébiotiques.	58
figure 19: Mécanismes associés à CRAMP dans l'immunité. SCFA=short chain fatty acid.....	63

Index des tableaux

Tableau 1: Les différents "hydrogen breath test" et leur utilités cliniques.	55
---	----

Introduction

La prévalence de l'obésité et du diabète ne cesse d'augmenter dans les pays développés. Ces maladies représentent de réels problèmes de santé publique, amenant à une recherche intensive sur leurs causes et les possibilités d'intervention. Ces dernières années, la flore intestinale est devenue l'un des éléments phare de cette recherche, dont le développement a été jusque-là limité par les technologies disponibles.

Aujourd'hui, les progrès en biologie moléculaire permettent une approche plus spécifique, avec la mise en place d'une librairie génétique du microbiote intestinal¹. Cette thèse examine les connaissances acquises et les hypothèses concernant le rôle potentiel de la flore intestinale dans le développement du diabète ainsi que les éventuelles perspectives thérapeutiques.

Chapitre I Le microbiote intestinal

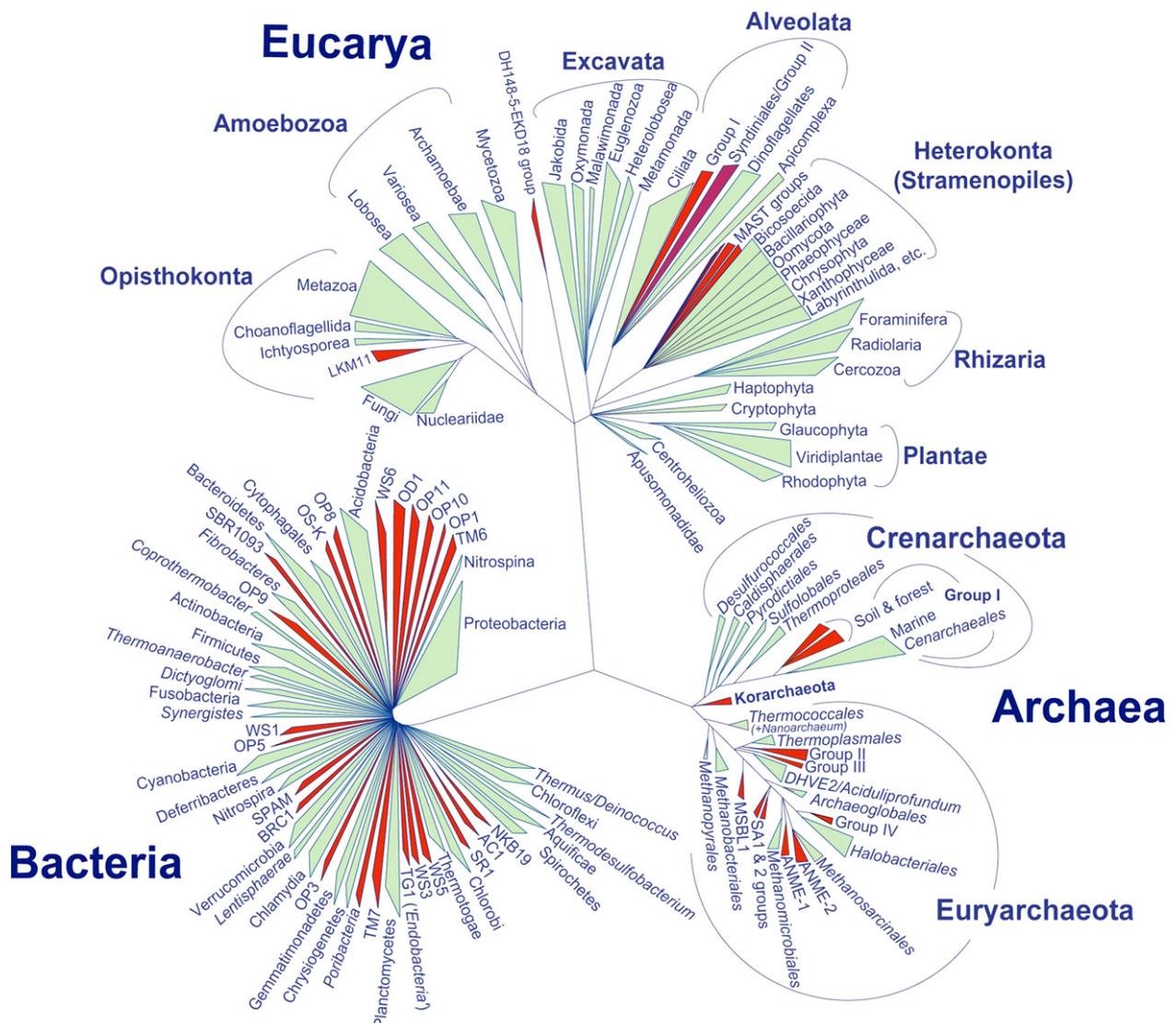
Le microbiote intestinal, aussi appelé flore intestinale, est l'ensemble des micro-organismes (archées, bactéries, protistes) qui se trouvent dans le tube digestif. Il ne s'agit pas uniquement de bactéries intestinales, mais également de celles de l'estomac. Le mot «bactérie» désigne un micro-organisme et son étymologie provient du grec «petit bâton». La flore intestinale est un bon exemple de mutualisme: coopération entre différentes sortes d'organismes impliquant un avantage pour chacun. Le terme flore, associé aux bactéries, provient du fait que les premiers scientifiques à s'intéresser à ces micro-organismes étaient des botanistes. Le microbiote intestinal humain constitue un écosystème complexe, qui est maintenant bien reconnu pour son impact sur la santé et le bien-être de l'homme. Il contribue à la maturation du système immunitaire et assure une barrière directe contre la colonisation par des agents pathogènes. Son implication possible dans les maladies des sociétés modernes, dont la prévalence est en augmentation, a été décrite. Ces maladies sont notamment les allergies, les maladies inflammatoires de l'intestin et, peut-être, des troubles métaboliques et dégénératifs². Son rôle dans l'homéostasie du corps humain fait qu'il est considéré comme un organe à part entière.

A composition

Le microbiote intestinal est composé de centaines de milliards (10^{14}) de micro-organismes, représentant dix fois plus de cellules que celles formant le corps humain. Le microbiome (génomme microbienne) code ainsi un ensemble de gènes dépassant de 150 fois le génome humain³. Les bactéries sont la composante principale du microbiote intestinal mais on peut également détecter des virus, des champignons et des protozoaires. La composition étant obtenue par analyse métagénomique, elle sera donc donnée selon la classification de Woese⁴, basée sur les différences d'un point de vue moléculaire. On retrouve 3 domaines : les bactéries et les archées qui forment les procaryotes et les eucaryotes (figure 1).

figure 1: Arbre phylogénique de la vie.

(Extrait de López-García et David Moreira, 2008)¹⁴³



A.1 Les eucaryotes et les virus

Le protozoaire *Blastocyste sp* peut être retrouvé de façon asymptomatique chez l'Homme. Des champignons comme *Aspergillus* et *Rhizochaete* peuvent également être retrouvés de façon transitoire dans l'intestin mais le plus souvent on retrouve la levure *Candida*. Chez l'Homme la diversité fongique est moins importante que chez la souris. En effet chez cette dernière 4 principaux phyla fongiques sont retrouvés: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, et *Zygomycota*⁵. Ils participeraient à la digestion et produiraient des composés immuno-modulateurs participant à l'homéostasie microbienne⁶. La flore fécale humaine contient différents virus mais principalement des bactériophages ou des prophages insérés dans certains génomes bactériens⁷, ainsi que des virus à ARN de plantes⁸. La plupart des virus à ARN retrouvé dans l'intestin sont des pathogènes de végétaux comme les légumes, les céréales et les fruits suggérant une contamination *via* l'alimentation⁹. Le virus le plus abondant dans les fèces provenant de végétaux est le « pepper mild mottle virus » (PMMV) et le virus eucaryote le plus fréquent est le picobirnavirus. L'étude des communautés virales est en pleine expansion grâce à l'émergence de nouvelles techniques de séquençage et il semblerait qu'elles puissent jouer un rôle dans le développement de pathologies comme la mucoviscidose¹⁰. L'étude du virome n'en est qu'à ses débuts et d'autres virus pourront certainement être reliés à d'autres pathologies.

A.2 Les archées

Les Archées font partie des micro-organismes procaryotes pouvant être retrouvés dans le microbiote intestinal humain. Ces organismes unicellulaires peuvent être subdivisés en plusieurs grands groupes définis par leurs capacités métaboliques mais seules les archées halophiles et méthanogènes ont pu être détectées dans l'intestin¹¹. Ces dernières ont été les premières à pouvoir être identifiées et isolées grâce à des techniques de culture et constituent la majeure partie des archées faisant partie du microbiote intestinal. Les *Methanobrevibacter* et les *Methanosphaera* sont les genres les plus représentés. Les espèces *Methanobrevibacter smithii* et *M. stadtmanae* auraient une prévalence respective de 95,5% et 29,4% dans l'intestin humain¹².

A.3 Les bactéries

Le tractus gastrointestinal représente une surface de 200 à 300m² colonisé par 10¹³ à 10¹⁴ bactéries parmi 400 espèces et sous espèces différentes¹³. Les bactéries composant ce microbiote appartiennent à 6 principaux phyla du domaine Bacteria: *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Actinobacteria*. La majorité appartenant au *Firmicutes* et aux *Bacteroidetes*¹⁴. La plupart des bactéries intestinales (99,9%) sont anaérobies¹⁵ et on observe une quantité croissante de ce type de bactéries en descendant le tractus gastro-intestinal. En particulier, les *Bacteroidetes* présentent une augmentation de leur représentation depuis l'intestin grêle jusqu'au caecum, côlon et fèces¹⁶. Une variation qualitative et quantitative est donc observée le long du tractus gastro intestinal selon les conditions physico-chimiques présentées dans le compartiment considéré¹⁴. De plus, des différences de composition du microbiote sont également observées entre le lumen et la surface de la muqueuse (Figure 2). Dans l'estomac, le duodénum et le jéjunum peu de bactéries sont retrouvées en raison du pH acide. Ce compartiment héberge des bactéries acidotolérantes, comme les streptocoques et les lactobacilles, pouvant résister ; mais seules des bactéries anaérobies strictes résistantes peuvent s'y implanter comme *Helicobacter pylori*¹⁴. L'iléon, région de transit de l'intestin, contient une flore beaucoup plus diversifiée représentant 10⁷ à 10⁸ CFU (Unités Formant Colonies)/mL. Ce compartiment est constitué de bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies strictes des genres *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ou encore *Enterobacteriaceae*. Dans le côlon le transit digestif est plus lent et par conséquent la flore microbienne est plus abondante. Ce dernier compartiment contient 10¹⁰ à 10¹¹ CFU/mL, composées de 400 à 500 espèces bactériennes. Enfin, la composition fécale est identique à celle du côlon terminal. (figure 2) La souris est l'animal modèle utilisé au laboratoire. Le microbiote intestinal de la souris et de l'Homme présente les mêmes phyla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *TM7*, *Fusobacteria* et *Spirochaetes*)(figure 3). Mais la plupart des genres et espèces bactériennes trouvés chez la souris ne sont pas observés chez l'Homme¹⁷. La majorité des bactéries (environ 80%) est non cultivable du fait de l'absence de connaissances sur leurs besoins de croissance. Par conséquent, des techniques d'identification par approche métagénomique sont réalisées à l'aide de

méthodes de biologie moléculaire basées sur l'analyse des ADN et ARN 16S ribosomiques bactériens.

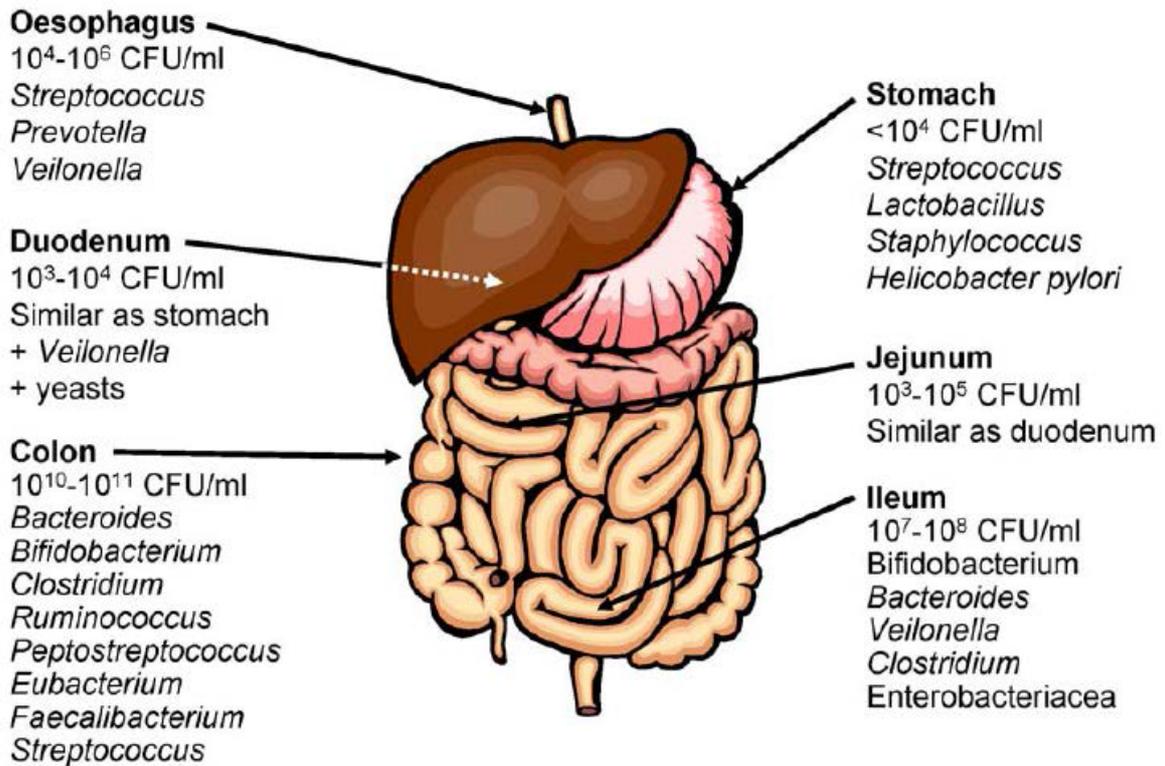


figure 2: Schéma représentant la variation qualitative et quantitative bactérienne le long du tractus gastro-intestinal.

(Extrait de Kirsti Tiihonen, Arthur C. Ouwehand, et Nina Rautonen, 2010)¹⁴⁴

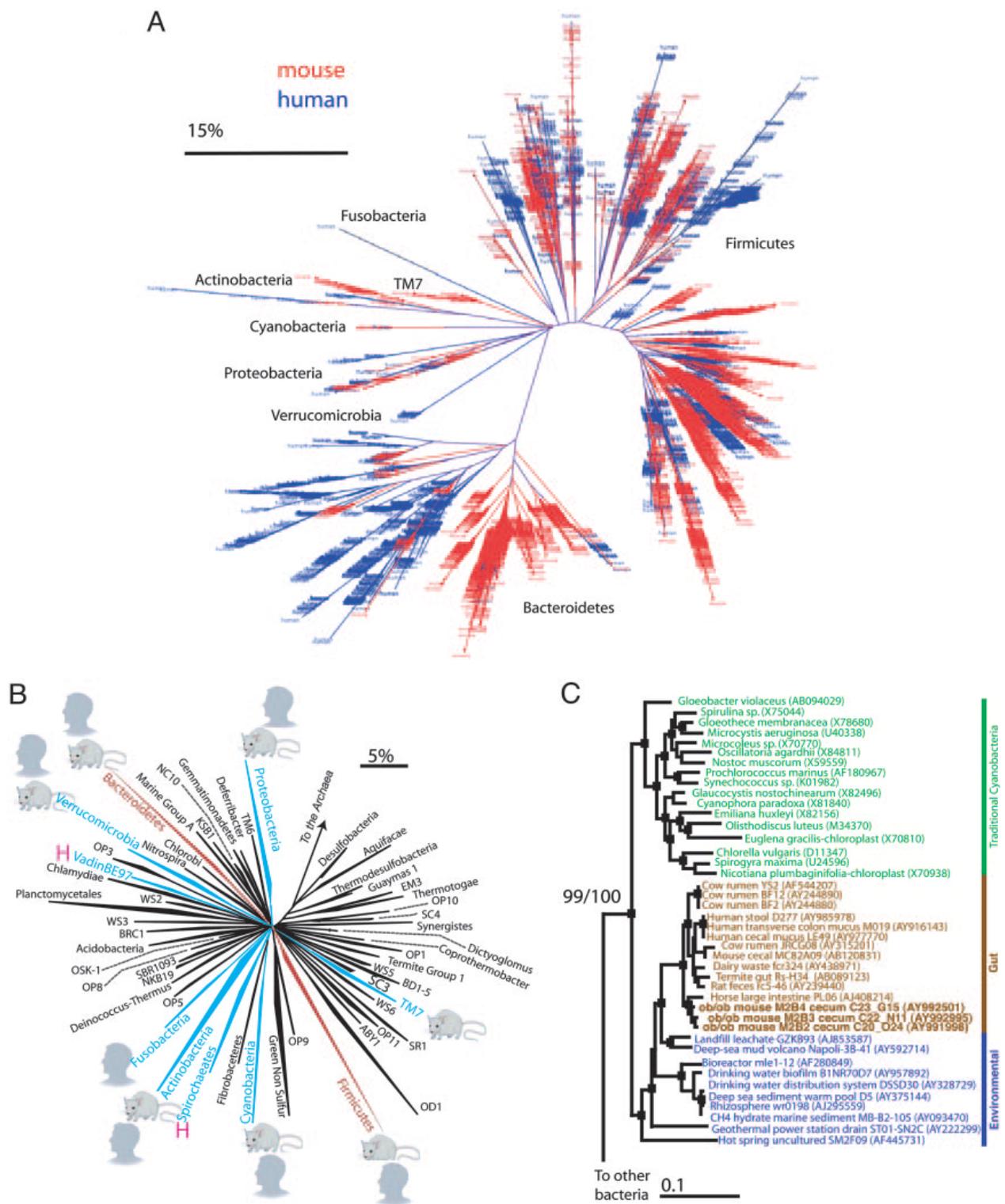


figure 3: Diversité bactérienne dans l'intestin distal de souris C57BL6.

(A) Arbre phylogénique de 5088 séquences ARNr 16S retrouvées dans l'intestin distal de la souris et de 11831 séquences ARNr 16S retrouvées dans le colon humain. Les données des bactéries cultivées chez chaque hôte ont été obtenues en utilisant des amorces du même gène de l'ARNr 16S et des cycles de PCR. La barre représente 15% de divergence de séquence. (B) Arbre phylogénique des bactéries montrant les différentes divisions décrites. Les divisions détectées dans cette étude sont représentées par le symbole de la souris et par le symbole de la tête humaine. « H » symbolise les divisions supplémentaires présentes dans la flore fécale de l'homme d'après les données de GenBank. Les divisions dominantes chez l'homme et chez la souris sont en rouge, celles qui sont plus rares sont en bleu alors que celles non détectées sont en noir. La barre indique le pourcentage de différence au niveau nucléotidique. (C) Arbre phylogénique montrant les espèces de cyanobactéries en vert, en incluant les séquences des chloroplastes des Eucaryotes. Les séquences détectées dans le tractus gastro-intestinal des animaux sont en marron et ceux détectés dans d'autres environnements sont en bleu.

(D'après Ruth E. Ley et al., 2005)¹⁵²

B régulation de la composition du microbiote

B.1 Facteurs influençant la mise en place du microbiote au cours de l'enfance

Le fœtus serait stérile lorsqu'il est dans l'utérus et serait colonisé par les bactéries au moment de la naissance. Cependant, bien que cette idée soit largement acceptée par la communauté scientifique, certaines études tendent aujourd'hui à prouver le contraire¹⁸. Quoiqu'il en soit, l'établissement du microbiote est un processus dynamique en plusieurs phases qui permet, si elles sont réalisées, l'émergence d'un microbiote stable contribuant à l'homéostasie énergétique de l'individu et à un système immunitaire pleinement fonctionnel. Pendant et juste après la naissance, l'enfant est exposé à un grand nombre de sources environnementales de bactéries (vagin, peau, lait de la mère, etc...). Ce microbiote initial évolue beaucoup au cours des premiers mois en raison de l'exposition continue à des bactéries de l'environnement. Lors d'une naissance par voie basse, les nouveau-nés sont rapidement colonisés par les microbiotes vaginal et fécal de leur mère, tandis que les enfants nés par césarienne sont quant à eux initialement colonisés par les bactéries de l'air, des vêtements et de la peau de leur mère et du personnel soignant. En conséquence, les enfants nés par césarienne présentent un microbiote différent et ont une plus faible proportion de bifidobactéries et de *Bacteroides spp* et sont plus souvent colonisés par *Clostridium difficile* que les enfants nés par voie basse ce qui peut expliquer les différences de prédisposition aux infections ainsi qu'aux allergies, à l'asthme et aux maladies autoimmunes¹⁹. Par ailleurs, les microbiotes de jumeaux monozygotes ou dizygotes sont aussi proches entre eux, ce qui suggère que la colonisation du tractus digestif par un microbiote issu d'une même mère est un facteur plus déterminant dans le devenir du microbiote adulte que l'empreinte génétique de l'individu^(20;21). Le microbiote se diversifie au cours des deux premières années ce qui coïncide avec le passage d'une alimentation liquide à base de lait riche en lipides, à une alimentation solide, plutôt riche en glucides. La composition du microbiote adulte conserve alors un noyau stable au cours de la vie de l'individu²².

B.2 Diversification alimentaire

L'alimentation constitue une partie du substrat énergétique du microbiote intestinal. Elle module des processus physiologiques impactant le microbiote (sécrétion d'enzymes digestives, de mucus, vitesse du transit, système immunitaire...). De ce fait, l'alimentation est un des déterminants majeurs de la modulation du microbiote intestinal et le régime alimentaire, qu'il soit bénéfique ou néfaste, est un sujet d'intérêt très important dans les programmes de recherche internationaux.

Lors de la diversification alimentaire du nourrisson, les deux principaux phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* surpassent en nombre ainsi qu'en diversité les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* implantés précédemment. Les études divergent sur le moment (entre une et quatre années) où le microbiote intestinal du nourrisson peut être considéré comme celui de l'adulte²³. Ainsi certaines études ont montré que l'adolescent possède un microbiote légèrement différent de celui de l'adulte avec une plus forte abondance des bactéries appartenant aux genres *Bifidobacteria* (phylum des *Actinobacteria*) et des *Clostridia* (phylum des *Firmicutes*) que celui de l'adulte²⁴.

La mise en place du microbiote s'accompagne aussi de changements métaboliques. En effet, alors que les capacités fermentaires du microbiote conduisent à une production de lactate et d'acétate pendant les premiers mois de la vie, les concentrations de butyrate et de propionate augmentent et se stabilisent dès la deuxième année de la vie.

B.3 Evolution de la flore au cours de la vie

Au cours des années, la composition du microbiote varie ; on observe une diminution des sécrétions digestives et une augmentation du pH gastrique, donc une moins bonne digestion. D'autre part, les habitudes alimentaires sont souvent modifiées (altération de l'odorat et du goût, isolement social, régime adapté à certaines pathologies liées à l'âge, problèmes de dentition...) et on observe une réduction globale des apports alimentaires. Enfin, les personnes âgées sont à risque d'hospitalisations répétées et de traitement médicamenteux qui peuvent influencer l'état de leur flore intestinale.

Globalement, la plupart des études ont décrit une réduction du nombre et de la diversité des bifidobactéries et une augmentation des bactéries de type anaérobie facultative,

tout particulièrement les Entérobactéries.

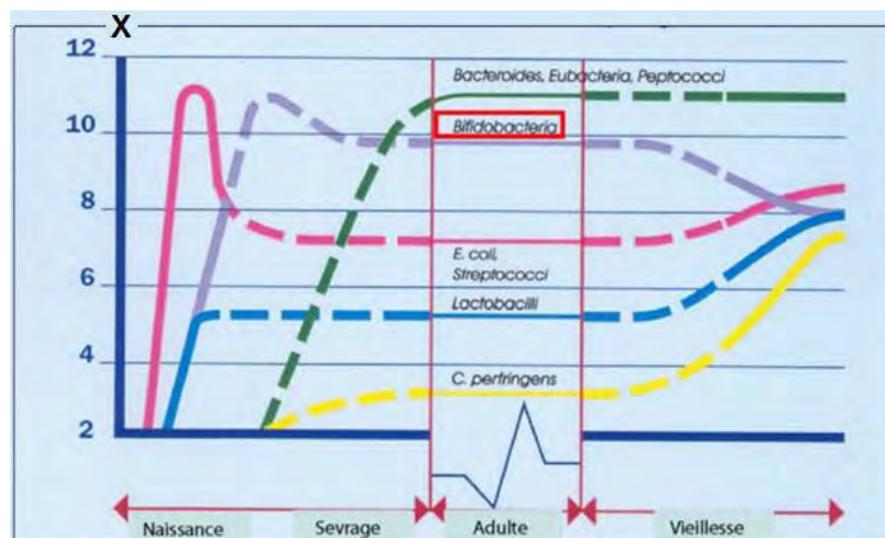


figure 4: évolution de la flore bactérienne fécale (10^x UFC par gramme de selle) au cours de la vie.

(D'après O. Goulet, 2009)¹⁴⁵

C Fonctions

L'utilisation de modèles axéniques (dépourvus de flore) et gnotoxéniques (dont la flore est totalement identifiée) a permis d'étudier les fonctions physiologiques et pathologiques de la flore intestinale. Les études utilisant ce type de modèle ont suggéré une implication de la flore intestinale dans le métabolisme et la digestion, la fonction barrière intestinale, le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, la maturation du système immunitaire ainsi que la régulation de l'homéostasie intestinale.

C.1 Fonctions métaboliques du microbiote intestinal

Le côlon de l'homme héberge une communauté bactérienne extrêmement dense et diversifiée, composée de micro-organismes anaérobies stricts. Les principales sources de carbone et d'énergie de cette microflore sont les glucides et les protéines non digérées par la partie supérieure du tractus digestif, ainsi que par des sécrétions endogènes (mucopolysaccharides, débris cellulaires, enzymes...). La nature et la

quantité de ces différents substrats varient, pour une large part, en fonction du régime alimentaire. La quantité totale de glucides fermentescibles varie de 10 à 60 g par jour, alors que celle des composés azotés, dont 1 à 2 g provient de l'effluent iléal, est estimée entre 6 et 18 g/jour. Le métabolisme des glucides est ainsi quantitativement plus important que celui des protéines, en particulier dans le côlon proximal où la disponibilité en substrats fermentescibles est importante. Les polymères complexes sont dégradés par une grande variété d'hydrolases (polysaccharidases, glycosidases, protéases et peptidases) en fragments plus petits (oses, acides aminés) assimilables par les bactéries. La fermentation de ces substrats conduit ensuite à la production de divers métabolites comme les acides gras à chaîne courte (AGCC), les gaz et l'ammoniaque. Ces réactions de fermentation permettent aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires. Ces activités sont également importantes pour l'hôte car les métabolites formés sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'organisme.

a *Métabolisme des glucides par le microbiote intestinal*

Les glucides complexes non digestibles parvenant au côlon sont majoritairement constitués d'amidon résistant aux α -amylases de l'hôte, de polysaccharides végétaux (cellulose, hémicelluloses et certaines pectines) ainsi que quelques autres types de glucides (certains édulcorants, oligosides, etc.)²⁵. La fermentation de ces composés implique différents groupes bactériens aux activités enzymatiques complémentaires et possédant des enzymes non produites par l'hôte²⁶. Les polymères sont tout d'abord hydrolysés par certains groupes bactériens en oses ou oligosaccharides (microbiote hydrolytique), qui peuvent alors être assimilés par d'autres groupes bactériens ne possédant pas ces hydrolases (microbiote glycolytique) (Figure 5).

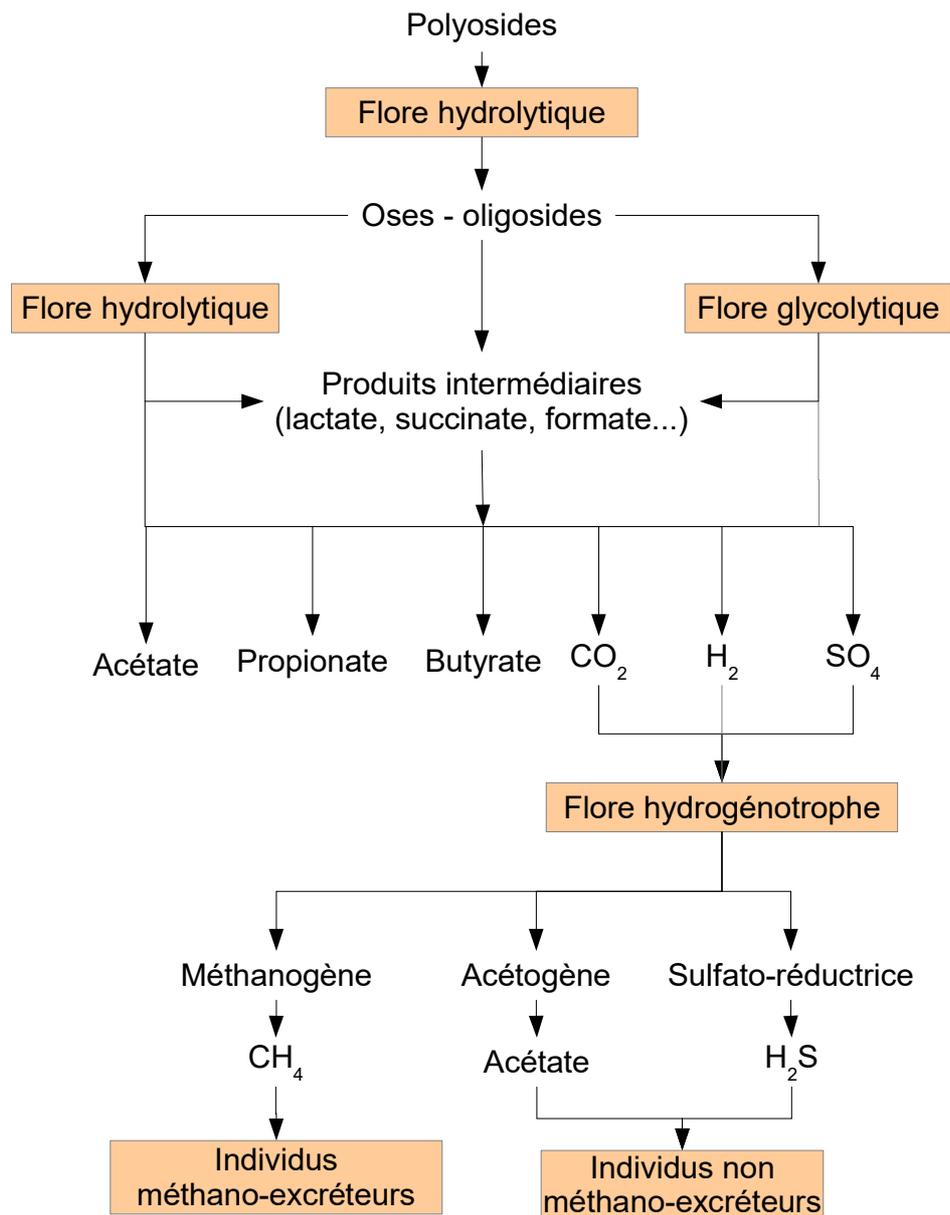


figure 5: Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par la microflore colique

Malgré la diversité des glucides disponibles issus de cette première étape d'hydrolyse et des espèces susceptibles de les fermenter, les substrats glucidiques sont catabolisés par le microbiote selon un nombre relativement restreint de voies métaboliques. La majorité des espèces du microbiote utilisent la glycolyse pour convertir ces glucides en pyruvate, qui est ensuite transformé en AGCC (acides gras à chaîne courte : acétate, propionate et butyrate) et en gaz selon différentes voies métaboliques (figure 5). Certaines espèces libèrent des métabolites intermédiaires tels que le succinate, le lactate ou le formate qui sont métabolisés par d'autres espèces bactériennes²⁷. La fermentation de ces glucides non digestibles constitue une source d'énergie non

négligeable pour l'hôte puisque les AGCC permettent à l'hôte de récupérer jusqu'à 10% d'énergie supplémentaire. Les produits finaux de la fermentation sont rapidement absorbés par l'épithélium intestinal et métabolisés *in situ* ou dans d'autres organes (foie, muscles, cœur). Dans l'intestin, les AGCC contribuent ainsi au maintien des fonctions de la barrière épithéliale notamment par la régulation de la prolifération cellulaire de l'épithélium et la modulation de la réponse immunitaire²⁸. Le butyrate est également utilisé au niveau de l'épithélium colique en tant que substrat énergétique du métabolisme cellulaire où il est oxydé en corps cétonique et CO₂. Par ailleurs le butyrate peut influencer sur l'expression de gènes dans les cellules de l'épithélium colique, en agissant comme un inhibiteur des histones désacétylases. Les AGCC régulent également la balance entre la synthèse et l'oxydation des acides gras ainsi que la lipolyse. L'oxydation des acides gras est activée par les AGCC tandis que la synthèse *de novo* et la lipolyse sont inhibées. Il en résulte une diminution de la concentration d'acides gras plasmatiques²⁹. Les AGCC favorisent l'activité de l'AMPK dans le muscle et dans le foie³⁰. L'activation de l'AMPK déclenche l'expression du cofacteur PGC-1 α , qui contrôle l'activité de facteurs de transcriptions tels que PPAR α , PPAR δ ou encore PPAR γ ³¹ qui interviennent dans la régulation du métabolisme du cholestérol, des lipides et du glucose. Enfin, les AGCC interviennent dans la régulation de l'expression de gènes en se liant à des récepteurs couplés à des protéines G: GPR41 (ou FFAR3) et GPR43 (ou FFAR2). Des expérimentations *in vitro* ont montré que le butyrate se fixe préférentiellement sur GPR41, l'acétate sur GPR43 et le propionate se fixe indifféremment sur les deux récepteurs³². Les voies de signalisations qui découlent des interactions entre les AGCC et GPR43 au niveau des granulocytes neutrophiles participent ainsi à la modulation de la réponse inflammatoire^(33;34). Ces interactions modulent également la sécrétion de l'hormone GLP-1 (hormone hypoglycémiant qui favorise la sécrétion d'insuline) au niveau des cellules L (cellules endocrines) de l'intestin²⁹. GPR43 intervient dans le stockage des lipides dans le tissu adipeux. Des souris GPR43^{-/-} sont obèses sous un régime contrôle tandis que des souris surexprimant GPR43 dans le tissu adipeux sont protégées d'une obésité induite par un régime hyperlipidique²⁹. Ces résultats mettent en avant GPR43 dans un rôle de capteur d'énergie alimentaire excessive, contrôlant ainsi l'utilisation de l'énergie du corps tout en maintenant l'homéostasie métabolique. L'hypothèse mécanistique proposée est que l'activation de GPR43 dans le tissu adipeux par les AGCC supprimerait la signalisation insulinémique ce qui inhiberait le stockage des lipides dans le tissu adipeux et favorise

le métabolisme du glucose et des lipides dans d'autres tissus. Une infusion d'acétate diminue le taux d'acides gras libres circulants chez la souris conventionnelle et la souris *ob/ob*²⁹ mais ces effets antilipolytiques sont abolis chez des souris *Gpr43*^{-/-}, ce qui suggère que l'activation de GPR43 par l'acétate est un mécanisme de régulation contrôlant la lipolyse et la concentration des acides gras libres circulants. Les souris *Gpr43*^{+/+} sont résistantes à l'obésité et à l'insulinorésistance induites par un régime hyperlipidique, ceci étant au moins partiellement dû à l'action régulatrice de GPR43 sur la dépense énergétique³³. De plus, la stimulation de *Gpr43* par les AGCC limite l'inflammation dans des modèles de colites, d'arthrite et d'asthme³³. Dans ces modèles, Maslowski et coll. ont montré que les souris axéniques, n'ayant pas d'AGCC compte tenu de l'absence de fermentation dans leur système digestif, présentent des niveaux d'inflammation comparables à ceux de souris GPR43 KO. La voie GPR43 semble être donc un des liens entre microbiote intestinal, régime alimentaire et système immunitaire. Par ailleurs, les interactions entre les AGCC et GPR41 induisent la sécrétion de PYY, une hormone impliquée dans la sensation de satiété³⁵, ce qui a pour effet de ralentir le transit intestinal et donc d'améliorer l'absorption des nutriments. L'inactivation du gène codant pour GPR41 chez des souris axéniques n'affecte pas la prise de poids. Chez les souris conventionnelles, cette inactivation entraîne une diminution de la prise de poids par rapport aux souris sauvages. Cette diminution est aussi retrouvée chez des souris axéniques colonisées avec *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Methanobrevibacter smithii*, deux espèces bactériennes couramment rencontrées dans le microbiote intestinal et produisant des AGCC³⁶. Ceci est associé à une forte diminution de l'expression de PYY, un transit intestinal plus rapide et une efficacité d'extraction de l'énergie à partir des aliments moindre. Il a également été montré que GPR41 est un médiateur de la synthèse de leptine induite par les AGCC³⁷. La supplémentation d'un régime hyperlipidique en butyrate³⁸ ou en acétate supprime le gain de poids sans diminution de la prise alimentaire et améliore l'insulinorésistance chez le rongeur. Par ailleurs, le propionate a été signalé comme diminuant la prise alimentaire chez l'homme mais les médiateurs moléculaires n'ont pas été identifiés à l'heure actuelle. Le butyrate et le propionate réguleraient le poids corporel au moins partiellement par l'inhibition de la prise alimentaire, conformément à leurs effets stimulants sur les hormones intestinales anorexigènes. En revanche, l'acétate inhibe le gain de poids sans diminuer la prise alimentaire et sans avoir une action clairement définie sur les hormones gastro-intestinales²⁹. L'équilibre entre les

différentes espèces bactériennes influe sur les quantités et les proportions d'AGCC produits par la fermentation d'un même substrat. L'acétate, par exemple, est synthétisé par la majorité des espèces dominantes du microbiote (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*...). Le propionate quant à lui, est principalement produit par les espèces du genre *Bacteroides*. Les espèces productrices de butyrate ont été identifiées plus récemment et appartiennent aux genres *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia* et *Faecalibacterium*. Le lactate est produit par ce qu'on appelle communément les bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*.

b Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal

A l'opposé de la fermentation des glucides, la dégradation des protéines dans le côlon génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indoles, ammoniacque, amines)(figure 6). Cette biodégradation fait également intervenir un nombre important d'interactions bactériennes, les espèces impliquées possédant des activités complémentaires (protéases, désaminases, transaminases...). Les protéines et les peptides étant la principale source azotée dans le côlon, les bactéries doivent hydrolyser ces polymères pour disposer des carbones et de l'azote qui les composent. Un nombre important d'espèces coliques est capable d'utiliser les acides aminés. Parmi celles-ci, certaines espèces des genres *Veillonella*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Acidaminococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium* utilisent les acides aminés comme source principale d'énergie, ces bactéries ne fermentant pas les glucides. Toutefois, de nombreuses espèces glycolytiques utilisent les acides aminés et les peptides uniquement comme source d'azote. La principale voie de fermentation des acides aminés dans le côlon est la désamination, conduisant à la production d'AGCC et d'ammoniacque. La plus grande partie de l'ammoniacque produit est rapidement absorbée, métabolisée en urée par le foie et excrétée dans l'urine. L'ammoniacque est un composé potentiellement toxique pour l'hôte et pourrait en particulier être impliqué dans les mécanismes d'initiation du cancer colique. La concentration en ammoniacque dans le côlon résulte d'un équilibre entre la désamination des acides aminés par les bactéries et l'utilisation du NH₃ libéré par les cellules pour leurs biosynthèses. La fermentation des glucides, en stimulant la protéosynthèse bactérienne, contribue, avec

l'absorption par la muqueuse, à la diminution de la concentration intraluminaire de NH_3 . La désamination des acides aminés aromatiques conduit à la production de composés phénoliques tels que le phenylpropionate (issu de la tyrosine), le phenylacétate (issu de la phénylalanine), et l'indole et le propionate (issus du tryptophane). Les composés phénoliques sont absorbés et détoxifiés par les cellules coliques, puis excrétés dans les urines. Les bactéries responsables de ces transformations sont les bactéries appartenant aux genres *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*³⁹.

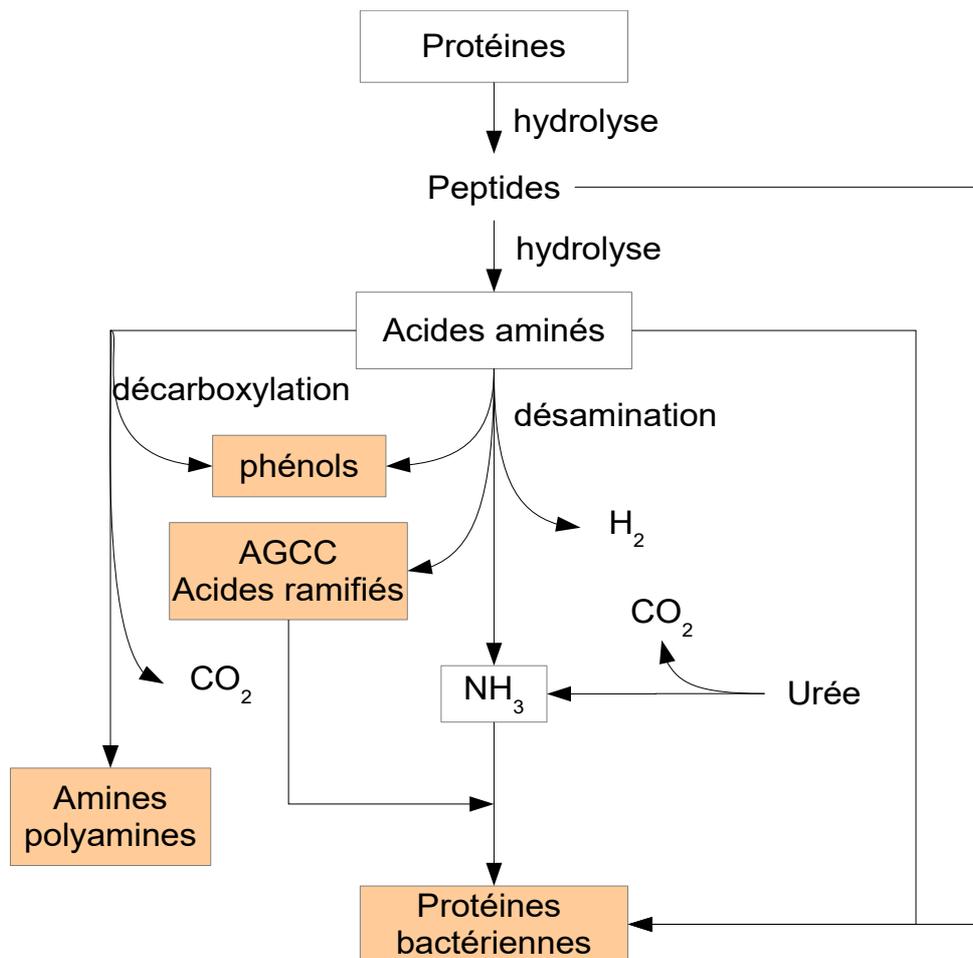


figure 6 Principales voies du métabolisme des protéines dans le côlon

c Métabolisme des lipides par le microbiote intestinal

Les acides gras alimentaires sont essentiellement absorbés dans l'intestin grêle humain. On estime que la quantité de lipides totaux qui parviennent dans le côlon en conditions physiologiques se situe entre 5 et 8 g par jour, auxquels il faut rajouter les lipides bactériens et ceux provenant de la desquamation des colonocytes. Les acides gras parvenant dans le côlon subissent alors de multiples transformations (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) grâce à l'action de bactéries du microbiote intestinal. De nombreuses espèces bactériennes possèdent ainsi des lipases permettant d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues. Cependant, tous les acides gras ne subissent pas ces transformations puisque les acides gras insaturés à 18 carbones sont réduits par le microbiote intestinal, tandis que les acides gras à 20 ou 22 carbones ne seraient pas métabolisés ou du moins de façon bien moins efficace⁴⁰. Enfin, certaines bactéries Gram positives, possèdent des activités phospholipasiques leur permettant d'hydrolyser les phospholipides différant par la spécificité de leurs substrats (lipides endogènes provenant de la bile ou provenant des colonocytes) et par leurs produits d'hydrolyse. Certains de ces produits, tels les diglycérides et les inositol triphosphates, peuvent pénétrer dans les cellules de l'hôte et agir comme messagers intracellulaires, en particulier au sein de voies de signalisation qui contrôlent l'expression de gènes⁴¹. Par ailleurs, le côlon reçoit jusqu'à 1 g par jour de cholestérol dont 70 % provient de la bile, 20 % de la fraction de l'alimentation non absorbée au niveau de l'intestin grêle et les 10 % restants de la desquamation des muqueuses intestinales. Le microbiote est capable de convertir le cholestérol en coprostanol, non absorbé au niveau intestinal et éliminé dans les fèces. Chez la majorité des individus, 70% du cholestérol est métabolisé par le microbiote, par contre, chez une minorité de personnes, celui-ci est très peu métabolisé (moins de 20%)⁴². Il a récemment été montré que ces différences individuelles s'expliquaient par des différences de niveaux de population de bactéries capables de réduire le cholestérol⁴³. Cependant les bactéries responsables de ce métabolisme restent peu connues. En 2007, la première souche bactérienne issue du microbiote fécal humain capable de métaboliser le cholestérol a été isolée et caractérisée. Cette souche est étroitement apparentée à l'espèce *Bacteroides dorei*⁴⁴. Au final, si ce métabolisme pouvait limiter l'absorption du cholestérol et donc le risque de maladies cardiovasculaires, l'impact réel du

métabolisme microbien intestinal du cholestérol sur la santé humaine n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude. Les acides biliaires sont synthétisés par le foie à partir du cholestérol (acides biliaires primaires) et sont ensuite conjugués à la glycine ou à la taurine. Ils sont alors absorbés par l'iléon puis transportés par la veine porte au foie où ils sont à nouveau excrétés dans la bile (c'est le cycle entéro-hépatique). Ils participent à la fragmentation des lipides alimentaires conduisant ainsi à la formation de microgouttelettes (micelles). Cette émulsion facilite alors la digestion des lipides par la lipase pancréatique au niveau du duodénum. Environ 5% des sels biliaires échappent à ce cycle et parviennent au côlon où ils sont métabolisés par le microbiote en acides biliaires dit secondaires ^(44;45). Plus de 20 acides biliaires ont ainsi été mis en évidence dans les fèces humaines, ce qui démontre la grande variété de conversions possibles des acides biliaires par le microbiote intestinal.

d Synthèse de vitamines

Les vitamines sont des micronutriments nécessaires en faible quantité au métabolisme d'un organisme vivant, et qui ne peuvent être synthétisées en quantité suffisante par l'organisme. Il est maintenant reconnu que les bactéries intestinales sont une source importante de vitamines pour l'Homme, en particulier la vitamine K et plusieurs vitamines du groupe B telles que la thiamine (vit B1), la riboflavine (B2), la piridoxine (B6), la biotine (B8), l'acide folique (B9) ou la cobalamine (B12)⁴⁶.

C.2 interactions avec le système immunitaire

Le système immunitaire intestinal joue un rôle très important dans la physiologie des mammifères: il empêche l'invasion des tissus par les micro-organismes résidents et est donc d'une importance fondamentale pour la préservation de la nature symbiotique de ces interactions. Ce système fait face à une grande charge microbienne continue très diverse combinée à une vaste surface d'échange. Son rôle étant de maintenir l'homéostasie intestinale, ceci implique:

- Une réponse immunitaire forte contre les virus, bactéries et parasites pathogènes.

•Une tolérance vis-à-vis des bactéries du microbiote intestinal tout en modulant la composition de ce dernier.

Pour ce faire il doit d'abord développer des réponses protectrices humorale et cellulaire dirigées contre les virus, les bactéries ou les parasites entéro-pathogènes⁴⁷.

Parallèlement à cette fonction protectrice, le système immunitaire intestinal doit également empêcher l'induction de réponses immunes envers les composants des aliments et des bactéries commensales présentes dans le tube digestif. Ce phénomène est nommé la tolérance orale⁴⁸. L'influence du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'hôte a initialement été mise en évidence grâce à l'étude de rongeurs dépourvus de microbiote intestinal. L'étude de ces rongeurs a ainsi permis d'élucider quelques-uns des mécanismes par lesquels le microbiote intestinal participe à la maturation et à la modulation du système immunitaire. Les animaux axéniques (dépourvus de flore) présentent en effet de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal: hypoplasie des plaques de Peyer⁴⁹, nombre de lymphocytes intraépithéliaux réduits, concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées⁴⁹. Les anomalies observées ne se limitent cependant pas à l'épithélium intestinal, puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées⁴⁹. L'ensemble de ces anomalies peut être réparé en quelques semaines en inoculant un microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques. Par ailleurs, le microbiote participe à l'inflammation dite physiologique de l'intestin, qui se traduit par la présence continue de cellules inflammatoires dans la paroi intestinale et la production de cytokines. Le microbiote régule le niveau de cette inflammation physiologique: par exemple, un traitement antibiotique entraîne une augmentation du niveau inflammatoire⁵⁰; il a été également démontré que le butyrate produit par des bactéries commensales était capable de moduler la voie NFκB en inhibant la dégradation de son inhibiteur IκB. Ceci diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-8, TNF-α) et permet le maintien de l'homéostasie⁵¹. Certains des mécanismes mis en jeu ont été établis et il a par exemple été montré que le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* était capable, à lui seul, d'induire la maturation du système immunitaire de souris axéniques⁵²; ou encore que le peptidoglycane des bactéries Gram positives induit la formation de follicules lymphoïdes⁵³ au niveau de l'épithélium intestinal. Cependant, certaines espèces du microbiote intestinal possèdent également la capacité de susciter l'inflammation sous certaines conditions⁴⁸. Le microbiote a donc la possibilité de

commander des réponses pro et anti-inflammatoires et la composition du microbiote intestinal est associée au bon fonctionnement du système immunitaire^(54;55). Une altération de la composition du microbiote augmente le risque de pathologies inflammatoires ou d'infections. Ainsi, dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn ou le syndrome de l'intestin irritable, la comparaison du microbiote de sujets sains et de patients atteints montre une différence de composition avec une proportion plus grande de bactéries appartenant aux phyla des *Bacteroidetes*⁵⁶ et des *Protéobactéries*⁵⁷ et une plus faible proportions de bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes* et plus précisément de l'ordre des *Clostridiales* et des *Lachnospiraceae* ainsi que du genre *Faecalibacterium*⁵⁸. Le microbiote intestinal participe à cette modulation de la réponse immunitaire et contribue à protéger l'hôte contre les pathogènes : les bactéries commensales bloquent l'accrochage des bactéries pathogènes sur les sites de liaison de l'intestin, première étape de la pathogénicité⁵⁹. De plus, la production d'IgA par les lymphocytes B, induite par l'interaction entre les bactéries commensales et les cellules dendritiques, limite la pénétration des bactéries, et donc notamment des pathogènes, dans la muqueuse (immunité humorale)²⁹ (figure 7). D'autre part, les lymphocytes intraépithéliaux permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal (immunité cellulaire) (figure 8).

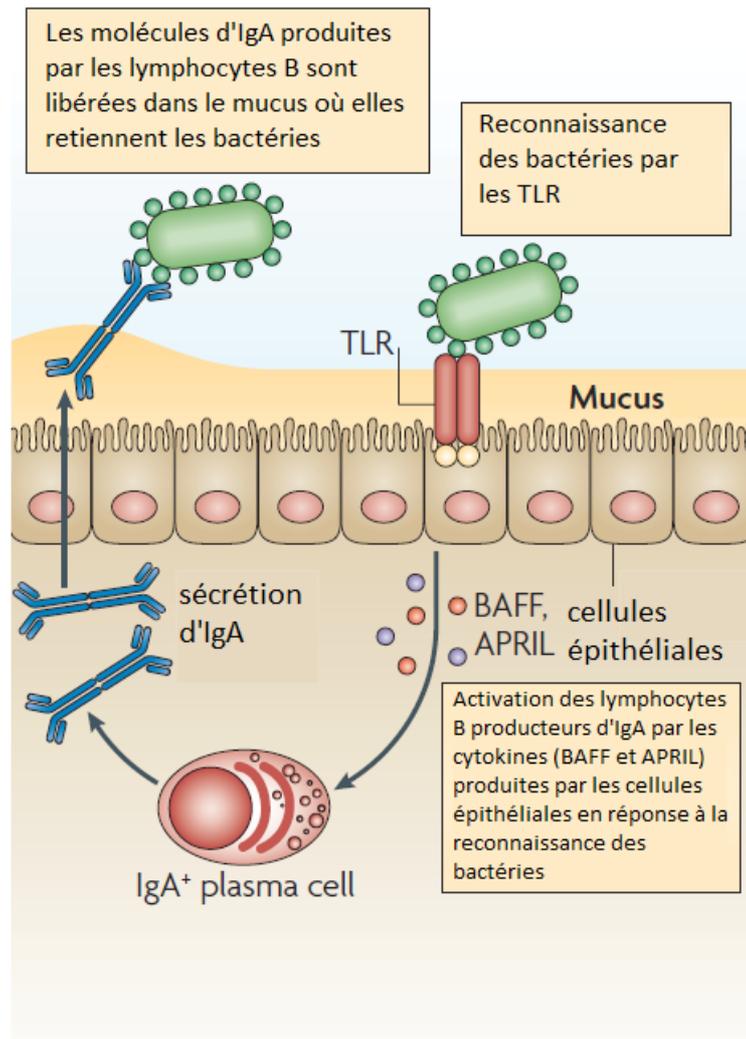


figure 7: Production d'IgA par le système immunitaire.

La reconnaissance des antigènes par les Tolllike Receptors, récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales, entraîne une libération de cytokines (B Cell Activating Factor (BAFF) et Prolifération Inducing Ligand (APriL)) qui, à leur tour, activent la production d'IgA par les lymphocytes B. Les IgA sont alors libérés dans le mucus où ils forment des complexes immuns qui empêchent la pénétration des bactéries.

(Extrait de Nadine Cerf-Bensussan et Valérie Gaboriau-Routhiau, 2010)¹⁵¹

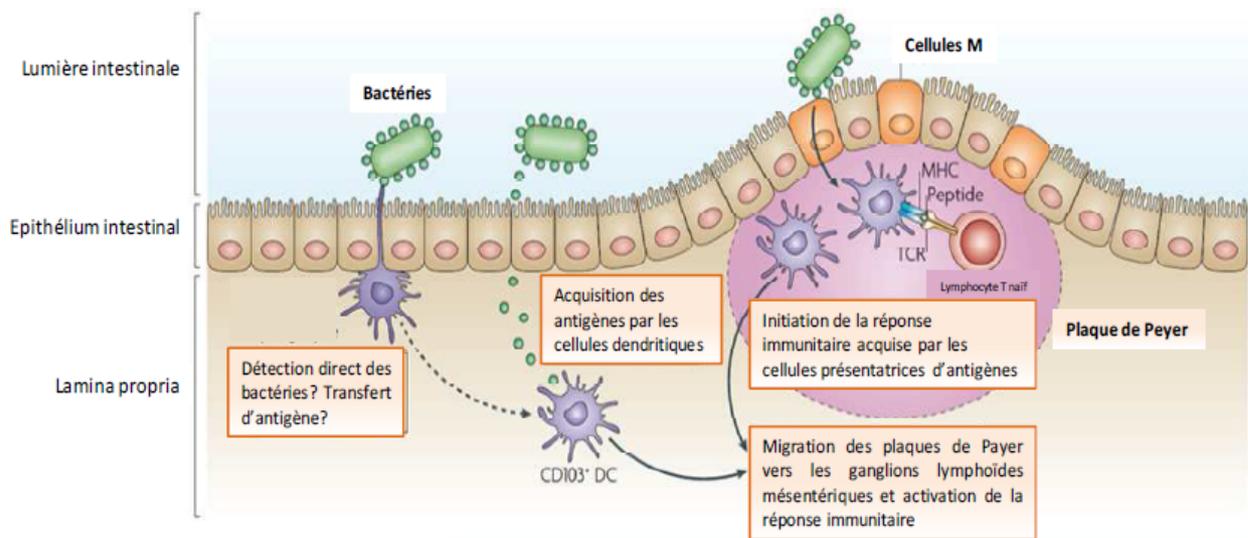


figure 8: Modulation de la réponse immunitaire par le microbiote intestinal.

La reconnaissance des antigènes bactériens par les Toll Like Receptor (TLR), récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales et des cellules dendritiques est surtout réalisée dans les plaques de Peyer, structures lymphoïdes composées de lymphocytes associés à des cellules épithéliales particulières: les cellules M. Ces cellules réalisent l'échantillonnage des antigènes bactériens. Les lymphocytes et les cellules dendritiques activés dans les plaques de Payer migrent ensuite vers les organes lymphoïdes mésentériques où ils activent, à leur tour, la réponse immunitaire. Il a également été suggéré que les cellules dendritiques aillent directement au contact des bactéries et réalisent ainsi un transfert d'antigène (mais ces résultats sont controversés à l'heure actuelle).

(Extrait de Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010)¹⁵¹

Chapitre II Le diabète

Le diabète est une maladie chronique touchant le métabolisme glucidique et entraînant un défaut du maintien de l'homéostasie glucidique dans l'organisme. Ce défaut de régulation conduit à une hyperglycémie (élévation du taux plasmatique de glucose). Le diabète chez l'homme est défini biologiquement par la présence de 2 glycémies veineuses à jeun supérieures à 1.26 g/l (7 mmol/l) ou une glycémie supérieure à 2.00 g/l (11.1 mmol/l) 2 heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale à 75 g de glucose.

A Épidémiologie

(données de l'institut de veille sanitaire (InVS))

A.1 Prévalence

La prévalence du diabète traité pharmacologiquement en France est estimée à 4,6 % en 2012, tous régimes d'Assurance Maladie confondus (BEH 2014 n°30-31), et a été actualisée à 4,7% en 2013, soit plus de 3 millions de personnes traitées pour un diabète. Une augmentation de la prévalence du diabète est observée depuis 2000. Toutefois, cette progression enregistre un ralentissement : le taux de croissance annuel moyen (TCAM) était de 5,1% sur la période 2006-2009, et de 2,4 % sur la période 2009-2013. (Figure 9). Ce ralentissement a également été observé récemment aux USA.

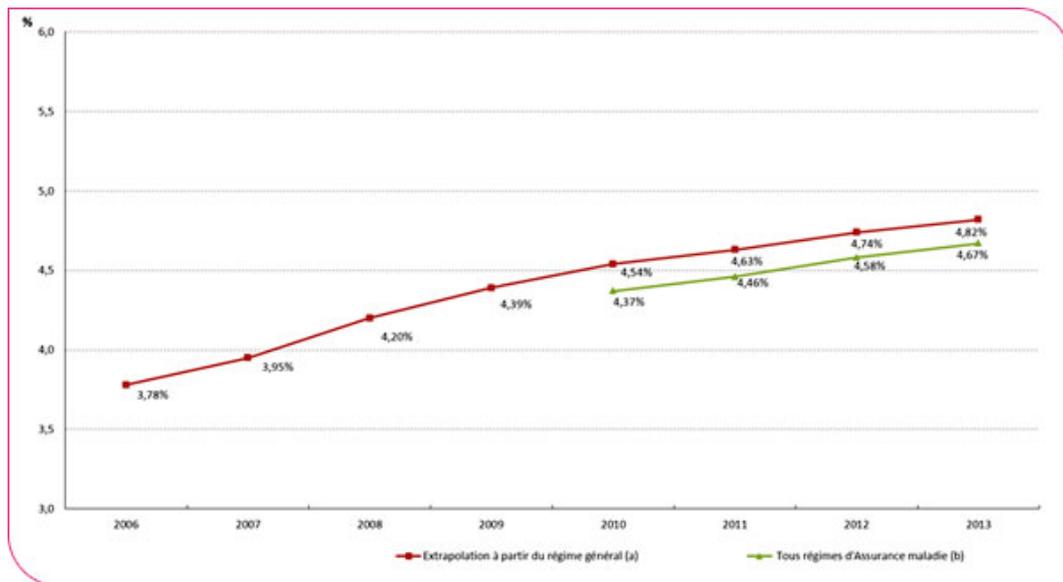


figure 9: Evolution de la prévalence du diabète traité pharmacologiquement de 2006 à 2013, France.

(Institut de veille sanitaire, 2009)

Un pic de prévalence est observé entre 75 et 79 ans: 20 % des hommes et 14 % des femmes de ce groupe d'âge sont traités pour un diabète. La prévalence du diabète est toujours plus élevée chez les hommes que chez les femmes, sauf en Outre-mer. La prévalence du diabète traité est la plus élevée dans les départements d'Outre-mer, jusqu'à deux fois plus élevée que la moyenne nationale. Elle est plus élevée dans certaines régions de métropole, en particulier dans le Nord et le Nord-est et dans certains départements d'Ile de France, mais elle est moins élevée en Bretagne. La prévalence du diabète est plus élevée dans les communes les plus défavorisées socio-économiquement, chez les personnes d'un niveau socio-économique moins favorisé et dans certaines catégories socio-professionnelles.

A l'estimation de la fréquence du diabète traité pharmacologiquement, il faut ajouter la prévalence du diabète diagnostiqué et non traité pharmacologiquement. Cette prévalence a été estimée par l'Etude Nationale Nutrition Santé (ENNS) à 0,6 % chez les personnes âgées de 18 à 74 ans vivant en France métropolitaine en 2006-2007. Cette même étude a permis d'estimer pour la même classe d'âge, au moyen d'une unique glycémie veineuse à jeun, que la fréquence du diabète non diagnostiqué s'élevait à 1 % (glycémie ≥ 7 mmol/L). Cette valeur implique que, parmi les 18-74 ans, environ 20 % des personnes diabétiques ne seraient pas diagnostiquées. Mais cette proportion

diminue fortement avec l'âge passant de 30 % chez les 30-54 ans à 13 % chez les 55-74 ans. Le dosage de la glycémie à jeun, recueilli par ENNS, a également permis d'estimer la fréquence de l'hyperglycémie modérée à jeun dans la population des 18-74 ans vivant en France métropolitaine en 2006-2007 : 5,6 %. L'hyperglycémie modérée à jeun ($6.1 \leq \text{glycémie} < 7 \text{ mmol/L}$) est en effet un stade précurseur du diabète. La fréquence de l'hyperglycémie à jeun augmente régulièrement avec l'âge (1,5 % chez les 18-29 ans, 5,2 % chez les 30-54 ans et 9,5 % chez les 55-74 ans) et est environ deux fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes (7,9 % versus 3,4 %)

A.2 Incidence

En France, l'incidence du diabète est mal connue. Toutefois, il est possible d'approcher l'incidence du diabète par l'incidence des Affections de Longue Durée (ALD) pour diabète. En effet, les personnes diabétiques bénéficient d'une prise en charge pour ALD, permettant l'exonération du ticket modérateur (appelée communément « prise en charge à 100 % »). Cette prise en charge n'est accordée que sur demande du médecin traitant auprès d'un médecin-conseil de l'Assurance Maladie. Il faut bien noter que l'incidence des ALD-diabète ne peut pas être assimilée à l'incidence réelle du diabète. Toutefois, les caractéristiques et les évolutions au cours du temps de l'incidence des ALD-diabète peuvent apporter des informations extrapolables à l'incidence du diabète.

Une étude a été réalisée à partir des données des trois principaux régimes de l'Assurance Maladie afin de dénombrer les nouveaux cas de prise en charge pour ALD-diabète, d'estimer l'incidence de 2000 à 2006 et de la décrire par âge, sexe, région (région d'affiliation) et catégorie socio-professionnelle à partir des données.

En 2006, environ 178 000 personnes ont été admises en ALD-diabète en France métropolitaine. Globalement, le nombre d'admissions a augmenté de 2000 à 2006 (+ 32 %), quels que soient l'âge et le sexe. Le taux standardisé d'admissions en ALD-diabète a également augmenté, de 236/100 000 en 2000 à 286/100 000 en 2006. Ce taux était plus élevé chez les hommes que chez les femmes.

En 2006, le taux standardisé d'incidence atteignait 230/100 000 au sein de la population couverte par le régime général. Les taux étaient très élevés chez les commerçants

(358/100 000), chez les salariés agricoles (326/100 000) et chez les artisans (305/100 000). A l'inverse, le taux d'incidence était faible chez les personnes exerçant une profession libérale (161/100 000).

Sur la période 2000-2006, les taux d'incidence, calculés globalement sur la période, étaient minimum à l'ouest de la métropole et élevés dans le nord-est, la région Centre et le bassin méditerranéen. Les taux standardisés étaient bien supérieurs en outre-mer qu'en métropole : 558/100 000 en Guadeloupe, 517/100 000 à la Réunion, 366/100 000 en Martinique et 307/100 000 en Guyane.

Environ 2 700 enfants et adolescents de moins de 20 ans ont été admis annuellement en ALD-diabète en France de 2003 à 2006. En 2006, les taux d'incidence étaient de 10/100 000 enfants âgés de 0 à 4 ans, 15/100 000 enfants de 5 à 9 ans, 21/100 000 jeunes de 10 à 14 ans et 17/100 000 jeunes de 15 à 19 ans. Entre 2003 et 2006, les taux d'incidence d'admissions en ALD-diabète avant 20 ans étaient stables.

B Physiopathologie

Le diabète regroupe plusieurs pathologies de pathogénies différentes ayant pour origine un trouble de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline, hormone hypoglycémiante de l'organisme. On distingue principalement le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2), anciennement appelés diabète insulino-dépendant et diabète non-insulino-dépendant. Ce dernier est le plus répandu ; les diabétiques de type 2 représentent environ 85% du nombre total de diabétiques.

B.1 diabète de type 1

Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabète observés dans le monde, bien loin derrière le DT2 (non insulino-dépendant). L'OMS estime à 10 à 15 millions le nombre de diabétiques de type 1 dans le monde. De plus, pour des raisons pas encore très bien comprises mais probablement liées aux modifications du mode de vie, l'incidence du diabète de type 1 augmente chaque année de 3 à 4% par an⁶⁰.

Le DT1 est une maladie auto-immune caractérisée par une réaction d'inflammation locale qui a lieu dans et autour des îlots de Langerhans. L'inflammation des îlots ou *insulinitis* est suivie par une destruction des cellules β sécrétrices d'insuline par les lymphocytes T. La destruction de ces cellules pancréatiques a pour conséquence une insulino-pénie à l'origine de l'hyperglycémie. Elle apparaît lorsqu'il ne reste que 10-20% des cellules β fonctionnelles. La maladie apparaît souvent chez des sujets jeunes (une fois sur deux avant 20 ans). Le facteur déclenchant de la maladie n'est actuellement pas bien identifié, même si les mécanismes immunitaires complexes conduisant à la destruction des cellules sont de mieux en mieux connus. Le DT1 survient sur un terrain génétique prédisposant. Plus de 20 gènes ont été retrouvés, une estimation probablement basse. Le plus important est localisé dans le système HLA (une région génétique qui contrôle le rejet des greffes, une autre conséquence de l'activation des lymphocytes T). Des facteurs environnementaux, par exemple des virus, sont probablement impliqués dans le déclenchement de la maladie qui conduit à l'activation initiale des lymphocytes T. Mais aucun n'a à ce jour été clairement identifié. D'autres facteurs d'environnement, en particulier infectieux, semblent paradoxalement avoir un effet protecteur vis-à-vis du diabète. Par exemple, en Europe, les gradients Nord-Sud d'incidence du diabète de type 1 et de l'hépatite A sont inverses, ce qui suggère un rôle protecteur de certains agents infectieux. D'autres agents infectieux, en particulier les mycobactéries, pourraient avoir le même effet protecteur⁶¹. Il n'existe actuellement pas de traitement définitif du diabète de type 1 permettant la guérison. Plusieurs essais thérapeutiques ont tenté de prévenir la maladie mais ont pour l'instant échoué⁶². C'est donc une maladie chronique, nécessitant un traitement à vie par insuline.

B.2 diabète de type 2

L'incidence du DT2 est croissante et on parle actuellement de véritable épidémie tant les prévisions de prévalence sur les prochaines années sont alarmantes. Le DT2 est en effet un problème de santé grave et répandu dans l'ensemble des pays du monde.

Cette explosion des cas de DT2 s'explique par des raisons sociologiques: mode de vie, alimentation, obésité, des facteurs de risques propres aux sociétés industrialisées, mais aussi par des raisons démographiques: allongement de l'espérance de vie, meilleur dépistage de la maladie. Le DT2 survient sur un terrain prédisposé, sous l'influence de facteurs environnementaux et donc souvent après 50 ans. Il est souvent associé à d'autres facteurs de risque cardiovasculaires dont il partage certaines causes comme l'hypertension artérielle et la dyslipidémie. La pathogenèse du DT2 est plus complexe que celle du DT1 car elle implique de nombreux tissus et de nombreux mécanismes physiopathologiques. Le DT2 possède schématiquement deux composantes principales: une insulino-résistance, nécessitant des besoins accrus en insuline pour maintenir une glycémie normale, et un trouble de l'insulinosécrétion, qui ne permet pas à l'organisme de compenser l'augmentation des besoins. Il existe donc une inadéquation de la production d'insuline (défaut des cellules du pancréas) par rapport aux besoins des tissus cibles qui ont augmentés car devenus résistants à l'insuline (insulino-résistance). Autrement dit, l'insuline continue à être sécrétée par les cellules du pancréas, mais en quantité insuffisante face à une demande accrue. La résistance à l'action de l'insuline explique que l'hormone ne parvienne plus à assurer l'entrée du glucose dans les cellules et son utilisation. Il en résulte des dysfonctionnements cellulaires, le glucose étant le principal substrat énergétique des cellules dans les conditions habituelles de vie. Les mécanismes à l'origine de l'insulino-résistance et du déficit d'insulinosécrétion sont complexes, multiples et partiellement compris.

L'insulino-résistance résulte de l'interaction entre une susceptibilité génétique et des facteurs d'environnement (augmentation des apports caloriques et lipidiques et diminution de l'activité physique). Ces facteurs environnementaux sont responsables de l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral, le foie, le muscle et le pancréas, à l'origine de phénomènes cellulaires délétères (inflammation, stress du réticulum endoplasmique, stress oxydant,...) conduisant à la fois à une diminution du signal insulinique au niveau des organes cibles (foie, muscle, tissu adipeux) et à une toxicité

sur les cellules entraînant des troubles de sécrétion de l'insuline au niveau pancréatique. La capacité des cellules à répondre à ce stress métabolique (augmentation des besoins, toxicité cellulaire) est déterminée génétiquement. Ainsi la combinaison de l'augmentation des besoins en insuline et un environnement toxique entraînent sur des cellules « fragiles » génétiquement, un dysfonctionnement et une diminution de leur masse. L'ensemble de ces phénomènes conduit progressivement à une intolérance au glucose, puis, finalement, au développement du DT2⁶³.

C Complications

Les perturbations du métabolisme glucidique représentent le fondement biologique essentiel de la maladie diabétique. L'hyperglycémie est à l'origine d'une toxicité pour un grand nombre de tissus. L'hyperglycémie chronique est ainsi associée à terme à des complications organiques spécifiques. La gravité du DT2 est ainsi liée à ces complications. En effet, l'hyperglycémie chronique est extrêmement délétère à long terme pour la cellule, entraînant de nombreux mécanismes adaptatifs délétères pour le fonctionnement des organes atteints. La principale cible des complications de l'hyperglycémie chronique est l'endothélium vasculaire, tissu en interface constante avec le plasma hyperglycémique. Ainsi on sépare schématiquement les complications du diabète en deux types en fonction du diamètre des vaisseaux atteints: micro et macro-vasculaires. Les complications micro-vasculaires touchent la rétine, le rein. Les complications macro-vasculaires sont celles de l'athérosclérose et touchent donc les coronaires, les artères à visée cérébrale et les artères des membres inférieurs. Le diabète touche également les nerfs conduisant à la neuropathie diabétique. Celle-ci est traditionnellement classée avec les complications micro-vasculaires même si les anomalies qui en sont à l'origine n'impliquent pas le vaisseau mais directement les différents types de cellules nerveuses.

Le risque de survenue des complications du diabète, surtout des complications micro-vasculaires, est dépendant de la durée d'exposition et de la sévérité de l'hyperglycémie. Il a bien été montré que le risque de complications augmente avec le temps et avec le taux d'hémoglobine glyquée⁶⁴.

Chapitre III Microbiote et diabète

Le diabète est une maladie inflammatoire chronique lié à l'équilibre glucidique de l'organisme. La flore microbienne intestinale jouant un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique ainsi que dans l'inflammation, elle a donc récemment été proposée comme facteur environnemental dans le développement de maladies métaboliques tel que le diabète.

A Rôle du microbiote dans le diabète de type 2

A.1 Composition

La composition de la flore microbienne intestinale pourrait être directement impliquée dans la survenue d'inflammation de bas grade associé au diabète de type 2 en réponse à un régime riche en graisse⁶⁵. Dans le but de déterminer les bactéries impliquées dans le développement du diabète de type 2, une étude comparant la flore intestinale des sujets sains par rapport à celles de sujets diabétiques a été réalisée. Une analyse moléculaire des bactéries fécales de seize diabétiques de type 2, comparativement à douze sujets sains, a montré que la composition bactérienne était relativement similaire au sein de chaque groupe mais différente entre les 2 groupes. Le groupe diabétique ne différait pas significativement du groupe sain au niveau de la diversité bactérienne mais quantitativement les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides vulgatus* étaient moins représentés dans la flore des patients diabétiques⁶⁶. L'analyse de la composition du microbiote intestinal chez 30 patients obèses dont sept patients diabétiques de type 2, comparativement à treize sujets de poids normal, a montré que l'espèce *Faecalibacterium Prausnitzii* était négativement corrélée avec le degré de résistance à l'insuline. En effet, plus la flore des patients est riche en *Faecalibacterium Prausnitzii* moins ils présentent de résistance à l'insuline. Ces bactéries semblent moduler l'inflammation et le diabète chez l'individu obèse⁶⁷. Cependant ces données ne

permettent pas de définir si la composition de la flore intestinale est responsable de la survenue de l'obésité et du diabète ou si elle en est la conséquence. En greffant la flore de souris obèses et de souris minces à des souris axéniques puis en les nourrissant de la même façon pendant 2 semaines, on constate une prise de poids plus importante chez les souris ayant reçu la flore de souris obèses. Ces données suggèrent que les caractéristiques de la flore des souris obèses participent au développement de l'obésité⁶⁸. Cependant, ces études montrent qu'il y a une différence entre la flore d'individus obèses et celle d'individus sains alors que le diabète est généralement considéré comme un attribut de l'obésité. Pour cibler plus spécifiquement le diabète de type 2 une étude a été réalisée entre des individus diabétiques de type 2 et des individus sains disposant d'une large gamme d'indices de masse corporel (IMC) allant de 23 à 48. Dans cette étude incluant dix-huit patients diabétiques et dix-huit sujets non diabétiques, la proportion du phylum *Firmicutes* était significativement abaissée chez les patients diabétiques, et le rapport *Bacteroidetes/Firmicutes* était positivement corrélé avec la glycémie à jeun, indépendamment de l'indice de poids corporel⁶⁹. (figure 10)

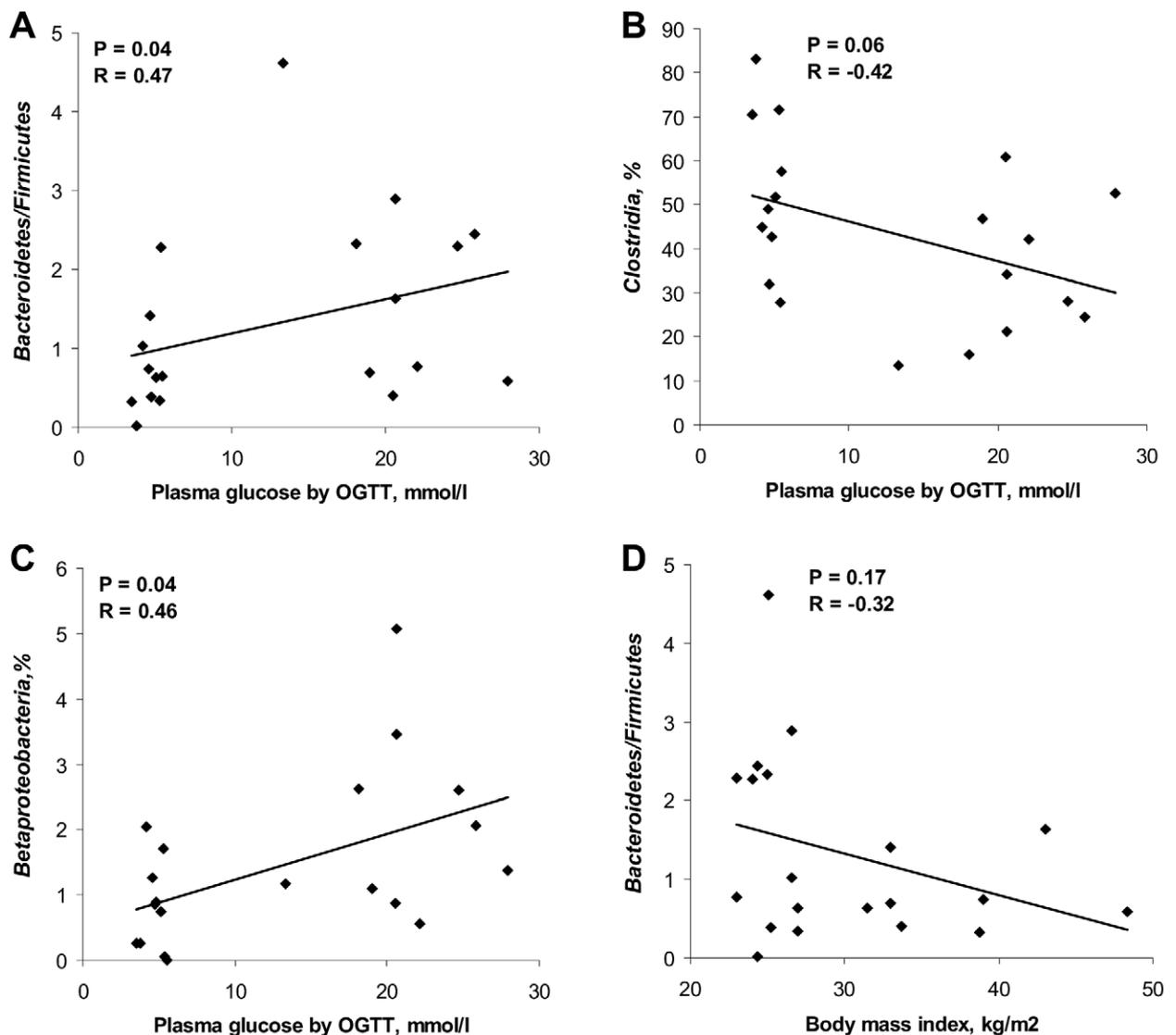


figure 10 : corrélation entre l'indice de masse corporel(BMI) ou le glucose plasmatique après test de tolérance oral au glucose (OGTT) et la composition bactérienne intestinale.

(Extrait de Nadja Larsen et al., 2010)¹⁴⁷

A.2 Réactions inflammatoires et insulinoresistance

Les maladies métaboliques diabète et obésité sont associées à une réaction inflammatoire tissulaire de bas niveau et définies comme suit⁶⁵. La concentration de cytokines telles que les interleukines 1 β et 6, le TNF α , et le PAI-1 est légèrement augmentée dans le sang circulant ce qui témoignerait d'un état inflammatoire de bas niveau. D'autre part des cellules du système immunitaire inné et acquis, notamment les lymphocytes⁷⁰, envahissent les tissus et parmi eux le tissu adipeux, le muscle et le

foie⁷¹. En présence d'antigènes, ces derniers étant mal définis, les cellules immunitaires y sécrètent des cytokines inflammatoires dont l'action moléculaire a, entre autres conséquences, d'inactiver le récepteur à l'insuline du muscle et du foie. Cet effet moléculaire contribue à la réduction de l'utilisation du glucose par ces tissus notamment au cours d'un repas (^{72;29}) (Figure 11). Cette insulino-résistance induite par les cytokines inflammatoires est donc une composante confondante de l'induction du diabète. Une question essentielle concerne l'origine des antigènes qui déclenchent cette réaction inflammatoire métabolique. Pour répondre à cette question Cani et al. ont étudié des souris rendues diabétiques par un régime riche en graisses et ont montré que ce régime induit un changement profond de l'écologie de la flore intestinale⁷³. Ce changement se traduit par une augmentation de l'absorption intestinale d'antigènes bactériens dans le sang circulant tels que les Lipopolysaccharides, ce qui définit une «Endotoxémie Métabolique».

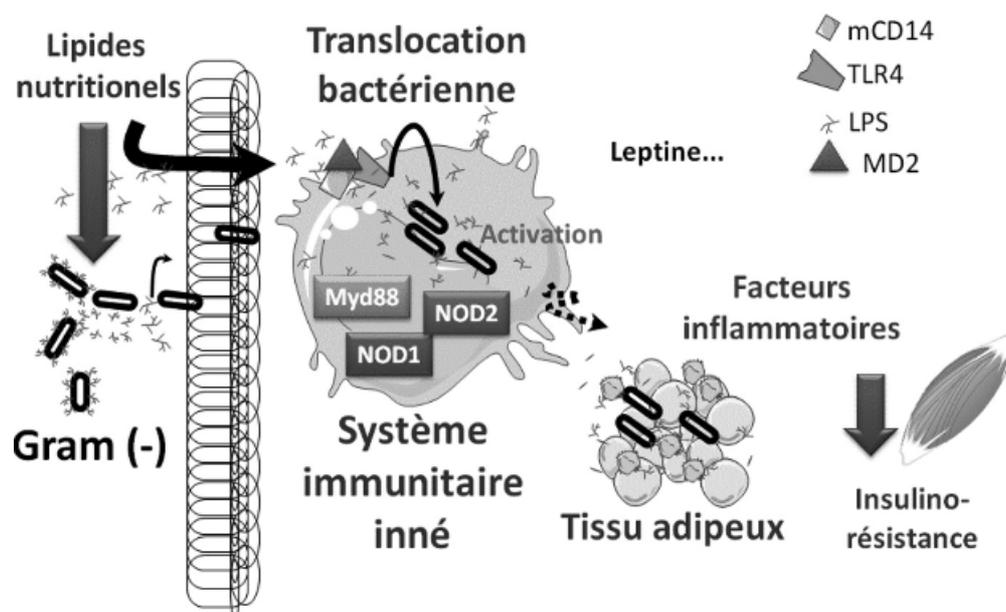


figure 11: flore intestinale: un facteur de risque des maladies métaboliques.

(Extrait de Rémy Burcelin, 2013)⁷⁴

a Endotoxémie métabolique

Les lipopolysaccharides (LPS), appelés couramment endotoxines, sont des molécules faisant partie intégrante de la paroi des bactéries Gram négatif (figure 12). Ils sont constitués d'une partie lipidique complexe, appelée le lipide A, qui a la particularité de

contenir des acides gras hydroxylés, et d'une partie polysaccharidique, elle même composée d'un noyau et d'une chaîne O spécifique (figure 12). Le lipide A est responsable du pouvoir toxique inflammatoire des LPS tandis que la partie polysaccharidique est responsable de la spécificité antigénique O (Antigène O). Ces deux éléments de structure moléculaire varient en composition selon la souche/espèce bactérienne considérée ; il existe ainsi une multitude de molécules de LPS différentes, dont l'activité biologique diffère du fait de leur structure, expliquant pourquoi certaines bactéries sont plus ou moins virulentes. Différentes revues traitent de ce sujet de manière exhaustive et relatent les différentes techniques analytiques mises en œuvre pour la détection des espèces moléculaires de LPS^(75;76). En pratique, la quantification globale de la présence de LPS dans un échantillon est effectuée par une mesure d'activité biologique, exprimée en UE ou unité d'endotoxines (Pharmacopée Européenne 2001). Les LPS, présents dans le tractus du fait de la lyse des bactéries Gram négatif résidentes, sont capables de rejoindre la circulation sanguine par différents moyens. Ils peuvent être absorbés au niveau de la muqueuse intestinale, au moment de l'absorption des lipides. En effet, certaines études ont montré la corrélation entre endotoxémie et lipémie suite à un régime riche en graisses, suggérant que l'absorption des LPS serait favorisée par l'absorption lipidique^(77;78). Le mécanisme de cette coabsorption a été débattu pendant plusieurs années. Ghoshal et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer que la formation de chylomicrons engendre l'absorption de LPS⁷⁹. Ils ont, en effet, mis en évidence que des cellules Caco-2 incubées avec de l'acide oléique (AG stimulant la production de chylomicrons) sécrétaient plus de LPS que celles incubées avec de l'acide butyrique (AG à courte chaîne, ne stimulant pas la formation de chylomicrons). De plus, l'effet de l'acide oléique sur la sécrétion de LPS est supprimé lors de l'ajout de Pluronic-81 (inhibiteur spécifique de la formation de chylomicrons). Parallèlement, ces auteurs ont gavé des souris invalidées pour le gène des LDL (dont la clairance des chylomicrons est retardée, leur permettant d'avoir une quantité de chylomicrons plus importante) avec des LPS radioactifs puis avec de la trioléine (trieste de l'acide oléique) en présence ou non de Pluronic-81 ; une fois de plus, l'absorption des LPS était favorisée par la trioléine et atténuée par l'inhibiteur. Enfin, les nœuds lymphatiques mésentériques des souris présentaient un taux de radioactivité supérieur suite à l'ingestion de trioléine et réduit en présence de Pluronic-81, démontrant ainsi le transport des LPS au travers des nœuds lymphatiques par des chylomicrons naissants. En outre, les travaux récents ont

confirmé, par colocalisation en microscopie électronique, la présence de molécules de LPS sur des chylomicrons humains, obtenus après digestion d'un repas gras⁸⁰. Parallèlement, la théorie d'un passage facilité des LPS par diffusion passive est également avancée. En effet, selon les régimes, la perméabilité intestinale peut varier laissant alors passer plus ou moins de LPS (passage paracellulaire). Lors d'un régime gras chez la souris, l'endotoxémie est associée à une diminution de l'expression des gènes codant pour des protéines de jonction, telles que les occludines (notamment zonula occludens 1, ZO1)⁸¹. Enfin, un autre transport alternatif a également été décrit: la translocation bactérienne. Elle réside dans le passage de bactéries viables d'origine digestive à travers la barrière de la muqueuse intestinale vers les ganglions mésentériques et, de là, vers les organes périphériques⁸². Les LPS, portés par ces bactéries, passeraient ainsi la barrière mais ce phénomène de translocation reste généralement observé lors d'«agressions» de la muqueuse intestinale. Suite à ces phénomènes, la présence de LPS dans la circulation sanguine génère une cascade pro-inflammatoire en cas d'infection, mais également en situation non septique où le niveau d'inflammation reste sub-clinique, comme en cas d'obésité.

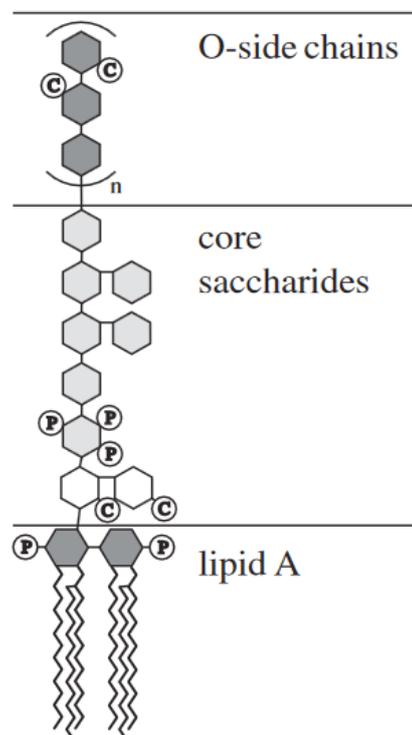


figure 12: structure d'un lipopolysaccharide

(D'après E. Schneck et al., 2009)¹⁴⁸

b **LPS et inflammation**

La causalité des LPS bactériens dans l'induction du diabète a été montrée en utilisant des souris dépourvues des gènes dont les protéines correspondantes composent le récepteur aux LPS que sont le CD14⁸³ et le TLR4⁸⁴. Ces souris mutantes ne développaient pas le diabète ni même l'obésité lorsqu'elles étaient nourries par un régime gras. De manière importante la stéatose hépatique et le développement du tissu adipeux étaient aussi totalement prévenues chez ces souris. Inversement, la perfusion continue pendant un mois de faibles débits de LPS par voie sous cutanée induisaient une endotoxémie métabolique constitutive ce qui générait l'ensemble des caractéristiques métaboliques liées au développement du diabète, telles que l'intolérance au glucose, l'insulino-résistance hépatique et le stockage des lipides dans le foie.

Un régime riche en graisses change la flore intestinale ce qui contribue au passage de facteurs bactériens de type Lipopolysaccharides dans le sang (figure 11). Ces derniers déclenchent une réaction inflammatoire en activant les cellules immunitaires de l'intestin, puis du stroma vasculaire des dépôts adipeux et du foie. Les cytokines générées induisent une insulino-résistance et le développement du tissu adipeux. Des bactéries entières peuvent être transloquées par des cellules immunitaires jusqu'aux tissus. Des récepteurs (NOD1/NOD2/ TLR4/mCD14/MD2) reconnaissent les déterminants bactériens ce qui active l'adaptateur Myd88 et contribue à l'initiation de la production de cytokines inflammatoires. La leptine contribuerait à la régulation du système immunitaire et donc au contrôle de la réaction immuno-inflammatoire prodiabétogène. Ces résultats démontraient la causalité moléculaire de ces LPS dans l'initiation de la maladie métabolique. Dès lors les LPS sont considérés comme des vecteurs moléculaires capables d'initier la réaction inflammatoire et ainsi l'insulinorésistance, puis le diabète. Cette découverte a été conforté par le fait qu'en manipulant la flore intestinale à l'aide de fibres alimentaires ou d'antibiotiques, le statut du métabolisme énergétique variait en fonction des changements de flore intestinale^(81;85). Le régime diabétogène réduisait notamment le nombre de Bifidobactéries or le traitement de ces souris par des fibres alimentaires inversait le processus. Ainsi, la proportion de Bifidobactéries intestinales était restaurée de manière concomitante avec l'amélioration métabolique⁸⁶. Enfin, la réplétion intestinale en Bifidobactéries par un traitement quotidien aux probiotiques *Bifidobacterium lactis* B420

améliorait l'équilibre métabolique et particulièrement l'insulino-résistance et ainsi le contrôle glycémique⁸⁷. Les effets métaboliques étaient associés à la réduction de l'inflammation métabolique. Le rôle de la flore intestinale dans le contrôle du poids a également été démontré chez des souris *ob/ob* dépourvues du gène de la leptine. Ce défaut moléculaire provoque un changement de l'écologie de la flore intestinale avec notamment une augmentation du nombre des bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes* et une diminution de celles appartenant aux *Bacteroidetes*⁸⁸. Ce changement d'écologie microbienne conférait à l'organisme la capacité de dégrader plus efficacement les fibres intestinales et favorisait ainsi la récupération énergétique par l'hôte et donc l'augmentation du poids. Cette hypothèse n'expliquait cependant pas l'endotoxémie métabolique et les mécanismes moléculaires de l'inflammation associée. Or nous avons récemment observé qu'un régime gras, ainsi que l'absence de leptine augmentait l'adhérence de certains groupes bactériens à la muqueuse intestinale notamment de l'iléon⁸⁷. Les cellules du système immunitaire inné, tel que les cellules dendritiques, phagocytent les bactéries adhérant à la muqueuse puis les transportent vers les ganglions mésentériques et le stroma vasculaire du tissu adipeux et du foie. L'arrivée des antigènes bactériens dans les tissus induit une réaction inflammatoire qui pourrait contribuer à l'insulino-résistance et le développement du tissu adipeux. Les récepteurs aux fragments bactériens tel que le CD14 (récepteur aux LPS), le Nuclear Oligomerization Domain 1 (NOD1) contrôlent la translocation bactérienne et favorisent l'induction du diabète par un régime gras. La régulation de ce processus de translocation bactérienne était également contrôlée par une hormone adipocytaire, la leptine⁸⁷. Des résultats supplémentaires montraient qu'un gavage quotidien par un probiotique génétiquement modifié, afin de produire la leptine directement dans l'intestin, réduisait l'impact d'un régime gras sur le développement du diabète et de l'obésité⁸⁷. Les mécanismes moléculaires par lesquels la leptine contrôle la translocation bactérienne ne sont pas connus mais pourraient être en relation avec l'effet de cette hormone sur la maturation du système immunitaire.

En résumé, une alimentation riche en lipides conduirait à un déséquilibre au niveau de la flore intestinale. L'altération de la flore entraînerait une diminution de la production de protéines de jonction (les occludines) ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et un passage accru d'endotoxines appelés LPS (les passages de LPS *via* les chylomicrons ou par translocation bactérienne sont d'autres hypothèses possibles). Enfin le passage d'endotoxines suite à une cascade de réactions serait responsable d'inflammations de bas grade et du développement de maladies métaboliques telles que le diabète.(figure 13)

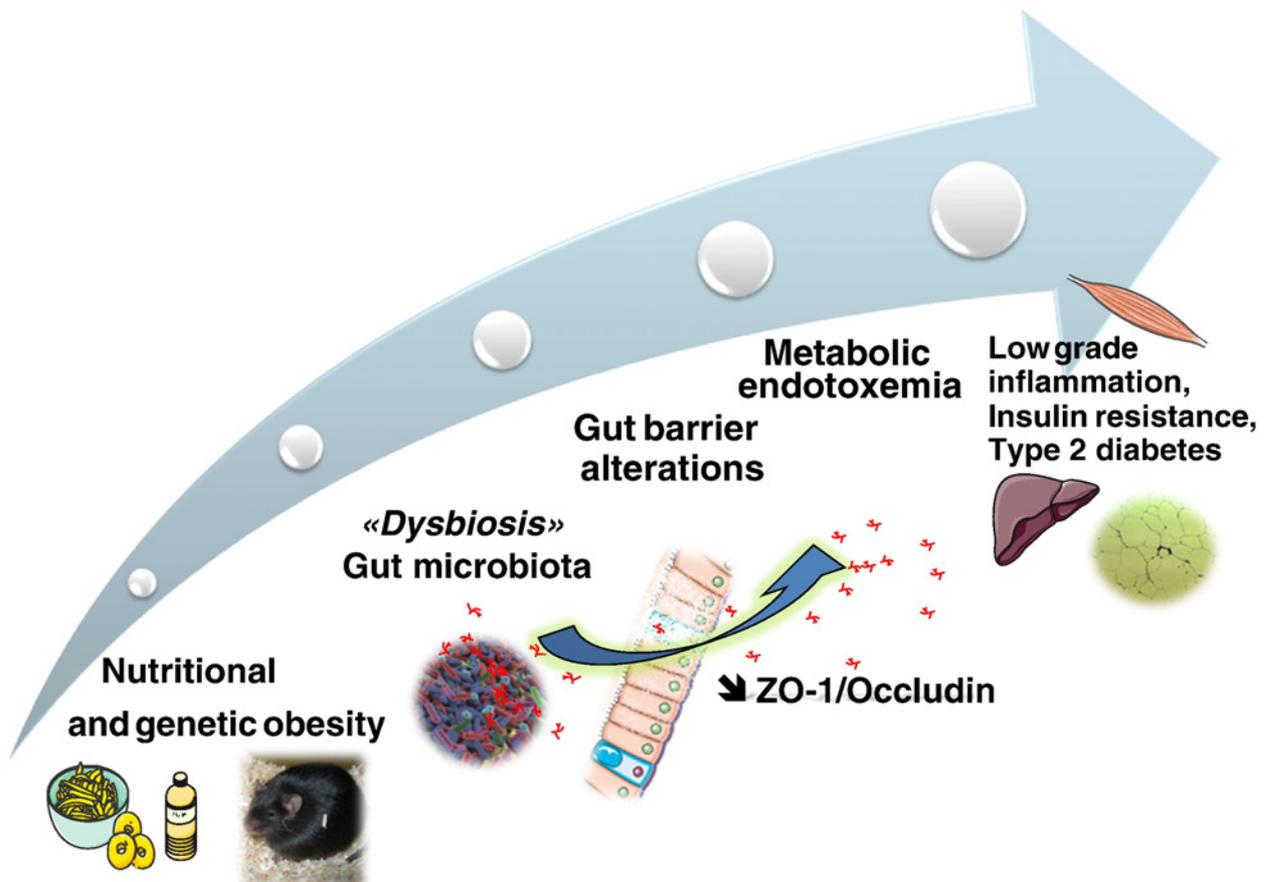


figure 13: Rôle du microbiote dans le développement de maladies métaboliques liées à l'obésité.

(D'après Patrice D. Cani et Nathalie M. Delzenne, 2011)¹⁴⁹

B Rôle du microbiote intestinale dans le diabète de type 1

Très récemment, il a été démontré que l'incidence du diabète de type 1 chez des souris non obèses était également influencée par la flore intestinale. Ceci pourrait suggérer un lien entre le système immunitaire, la flore intestinale et le développement du diabète de type 1. Wen et coll.⁸⁹ ont étudié l'effet du changement de l'environnement microbien des souris diabétiques non obèses rendues déficientes en immunité innée. Les souris non obèses et immuno-déficientes (manque d'une protéine MyD88) ne développent pas le diabète de type 1 quand elles se trouvent dans un environnement sans pathogène. Les souris non obèses, immuno-déficientes et axéniques, développent le diabète de type 1 plus facilement. L'exposition de ces souris, à la flore normalement présente chez l'humain, réduit l'incidence du diabète de type 1. La déficience de la protéine MyD88 a une influence sur la flore intestinale. Par conséquent, la MyD88 pourrait influencer la prolifération d'une certaine flore intestinale et la perte de ce mécanisme pourrait bloquer le développement du diabète de type 1. Cependant, les récepteurs et les voies de signalisation impliqués dans la prévention ou la facilitation de la maladie demeurent inconnus. Les signaux protecteurs déclenchés par le microbiote ont été révélés en testant les souris NOD (non-obèses diabétiques) déficientes en MyD88 combiné à une déficience à de multiples composants de l'immunité innée nécessaires au développement du diabète de type 1⁹⁰. Seules les souris déficientes en MyD88 et en adaptateur TRIF (TIR-domain containing adapter inducing IFN β) ont développé la maladie. Par conséquent, les voies de signalisation impliquant TRIF (probablement en aval de TLR4) font partie des voies induites par le microbiote responsable de la tolérance vis à vis de la maladie. D'autre part, un autre TLR (TLR2) induit un signal diabéto-gène en contrôlant la flore microbienne. En effet, chez les souris TLR2- possédant une flore normale, on constate que l'incidence du diabète de type 1 est réduite alors que cet effet est inversé chez les souris TLR2- axéniques. Ces résultats soutiennent l'hypothèse qu'il y a un équilibre entre les voies qui favorisent et celles qui inhibent l'auto immunité *via* des récepteurs, en particulier les récepteurs de la famille des TLR. Ces résultats suggèrent une nouvelle voie dans la prévention et le traitement du diabète de type 1. Ci dessous les voies de signalisation des TLR (Toll Like Receptor)

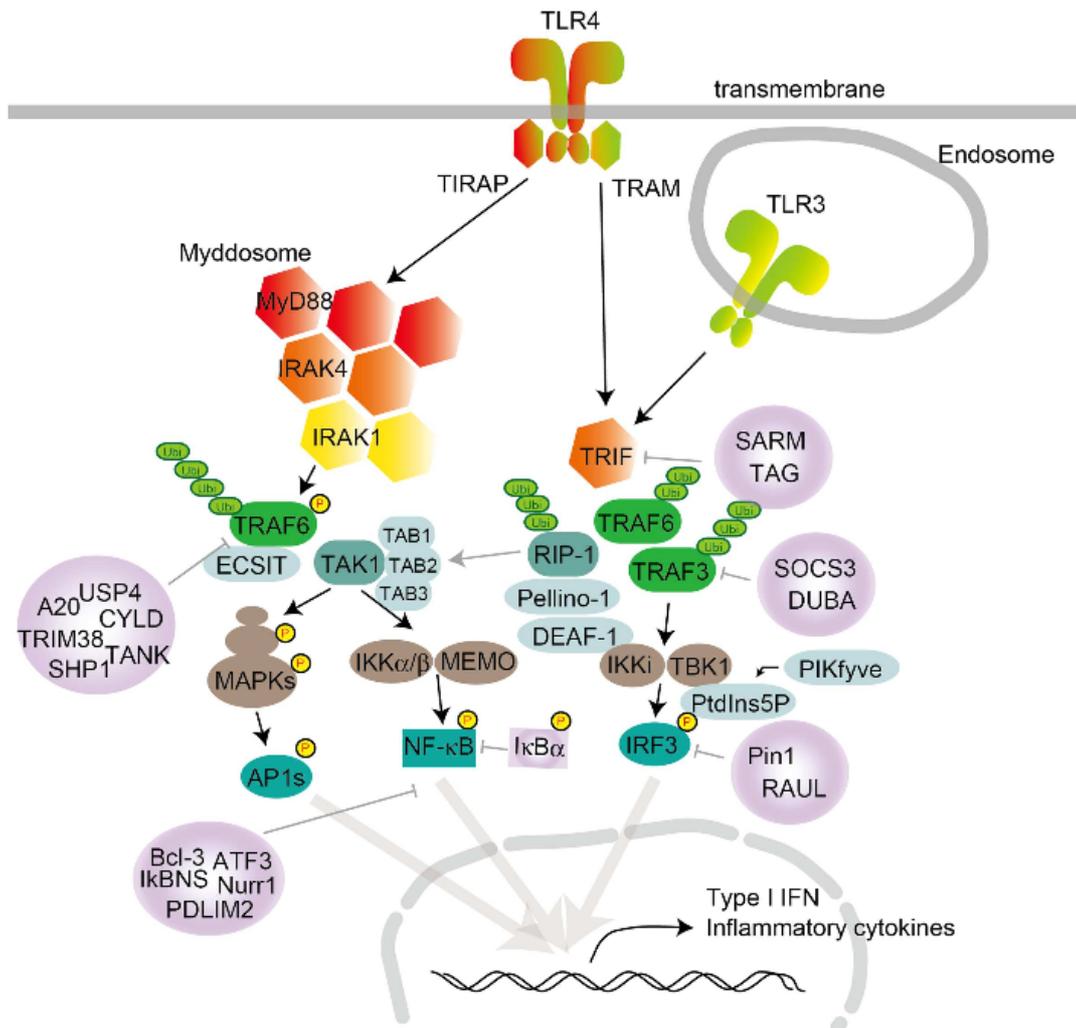


figure 14 Voies de signalisation des recepteurs TLR (Toll Like Receptor).

(D'après Takumi Kawasaki et Taro Kawai, 2014)¹⁵⁰

B.1 Composition

Une étude récente utilisant le modèle de la souris a montré que l'incidence du diabète pouvait être significativement retardée ou accélérée en fonction des populations bactériennes présentes au niveau de la flore intestinale⁹¹. Dans une autre étude, l'hypothèse était que le diabète de type 1 chez l'homme pourrait aussi être lié à une flore microbienne spécifique⁹². En comparant la flore d'enfants diabétiques de type 1 avec celle d'enfants sains, on constate une différence significative. Une altération importante au niveau des quantités de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Clostridium* ainsi que du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* pourrait être impliquée dans la glycémie des enfants diabétiques de type 1. En effet, les quantités de *Bifidobacterium*, de *Lactobacillus* ainsi que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* sont diminuées alors que celle de *Clostridium* est augmentée chez les individus diabétiques de type 1 par rapport aux individus sains. D'autre part les bactéries productrices d'acide lactique, les bactéries productrices de butyrate et les bactéries dégradant la mucine, essentielles au maintien de l'intégrité de la flore, sont significativement moins nombreuses chez les enfants diabétiques par rapport aux enfants sains. Ces différences de compositions pourraient être responsables de l'altération de la perméabilité intestinale chez les individus atteints de diabète de type 1.

B.2 Mécanismes moléculaires du diabète de type 1

Pour expliquer le lien entre le diabète de type 1 et la flore intestinale, il est nécessaire d'étudier le microbiote comme un organe à part entière. L'alimentation fournit différents substrats qui peuvent aboutir à différents produits au cours des processus de fermentation. Les changements liés à l'alimentation dans la structure du microbiote sont dus au fait que certaines communautés bactériennes sont génétiquement mieux équipées pour métaboliser ces substrats. D'autre part, un même substrat peut être utilisé dans différentes voies métaboliques en fonction des types bactériens qui colonisent l'intestin ou en fonction de leur abondance et de leur disponibilité⁹³. Par exemple, le lactate est un substrat qui peut être transformé en butyrate ou en acides gras à chaîne courte tel que l'acétate, le succinate et le propionate au cours de la fermentation

bactérienne anaérobie en fonction du type de flore bactérienne⁹⁴. Le modèle du lactate apparaît comme une des explications les plus plausibles pour comprendre le lien entre le diabète de type 1 et la dysbiose (figure 15). Selon ce modèle la présence de bactéries productrices d'acides lactiques et de butyrate telles que *Prevotella* et *Akkermansia* aide à maintenir l'épithélium sain. Ceci est due au fait que le butyrate contribue à la synthèse de mucine et à l'assemblage des jonctions serrées⁹⁵. De plus, le butyrate peut contribuer à maintenir une réponse anti inflammatoire en inhibant l'activation de NF-κB, qui signale par l'intermédiaire de récepteurs couplés à une protéine G et qui conduit à l'expression de cytokines inflammatoires^(96;97). Les régimes riches en fibres diminuent les risques de maladies inflammatoires liées à l'immunité. Toutefois, nous ignorons si cet effet est du au butyrate lui même ou s'il est associé au profil microbien⁹⁶. Le butyrate améliore également la différenciation extra thymique de lymphocytes T régulateurs (Treg), tandis que d'autres acides gras à chaînes courtes tels que l'acétate, bloquent ce processus⁹⁸. La différenciation de Treg semble être liée à l'acétylation des histones dans le promoteur du locus Foxp3 lui aussi régulé par le butyrate⁹⁷. Ces éléments suggèrent que les produits dérivés de la flore microbienne agissent comme des médiateurs dans la communication entre les bactéries et le système immunitaire de l'hôte et conduisent à des réponses pro ou anti inflammatoires⁹⁸, et peuvent être un facteur responsable de l'auto immunité cellulaire et intervenir dans le diabète de type 1. Les effets systémiques du butyrate intestinal dans la régulation de la réponse immunitaire se produisent aussi au niveau pancréatique. Le butyrate joue un rôle dans l'expression d'un peptide antimicrobien lié aux cathélicidines (CRAMP) dans les cellules de souris NOD (non obese diabetic). Ce peptide a montré un effet protecteur contre le diabète de type 1 en introduisant une réponse qui régule ou supprime le processus inflammatoire dans les îlots pancréatiques des souris pré-diabétiques⁹⁹. Le récepteur 2 aux acides gras libres (FFAR2) est l'un des récepteurs couplé à une protéine G qui peut être activé par le butyrate produit par le microbiote. Ce récepteur est impliqué dans la régulation stimulée par l'insuline dans le tissu adipeux et dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Son activation favorise la sécrétion de GLP-1 dans l'intestin, la suppression de l'accumulation de graisse et augmente la sensibilité à l'insuline¹⁰⁰. Ce mécanisme est intéressant car, bien que la résistance à l'insuline ne soit pas le principal problème dans le diabète de type 1, elle joue un rôle dans la théorie d'accélération du diabète. Cette théorie suggère qu'au cours du diabète de type 1, la corpulence, la résistance à l'insuline et l'auto-immunité seraient des

processus qui accélèrent la perte de cellules β par apoptose¹⁰¹. Cette théorie se confirme lorsque l'on observe que les enfants ayant une plus forte résistance à l'insuline évoluent plus rapidement vers un diabète de type 1¹⁰². Ainsi, une baisse de production de butyrate chez les enfants avec un bas niveau de *Prevotella* dans leur flore intestinale pourrait contribuer au développement du diabète de type 1. Selon Kostic et al¹⁰³, dans l'étude DIABIMMUNE, des enfants avec une forte prédisposition génétique au diabète de type 1 sont suivis depuis leur naissance. Leurs résultats montrent des associations entre les communautés bactériennes et le profil métabolique chez les jeunes enfants, tel que le niveau de *Blautia* avec les triglycérides à longues chaînes ou encore les *Ruminococcus* avec les triglycérides à chaînes courtes. En outre, ces deux micro-organismes sont abondants chez les enfants progressant vers un diabète de type 1 et sont positivement corrélés avec la présence d'acides aminés ramifiés comme la valine, l'isoleucine et la leucine. Entre temps, Oresic et al¹⁰⁴ ont découvert que la dérégulation du métabolisme des lipides et des acides aminés précède l'apparition de l'acide glutamique décarboxylase et d'anticorps anti insuline chez les enfants qui développeront plus tard un diabète de type 1.

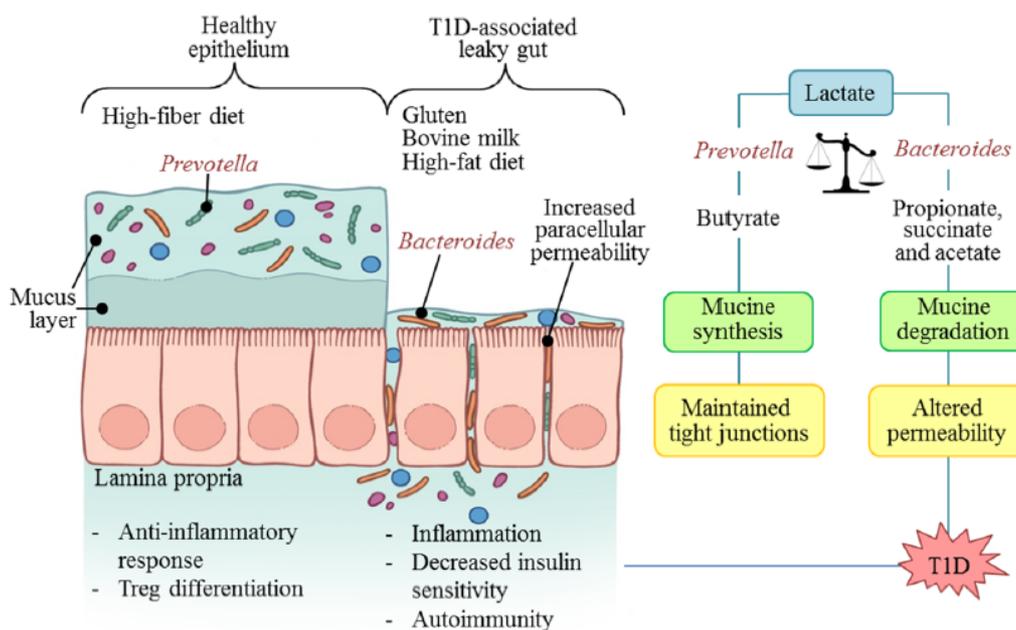


figure 15: Mécanismes associés au microbiote et à l'alimentation dans le développement de l'autoimmunité et du diabète de type 1.

(D'après María Mejía-León et Ana Barca, 2015)⁹⁴

Chapitre IV Perspectives thérapeutiques

A le microbiote comme marqueur prédictif du diabète

Les patients obèses ou en surpoids ayant une diversité de leur flore digestive réduite, présentent des anomalies métaboliques et des manifestations inflammatoires plus marquées que ceux ayant une diversité normale de la flore²⁰. De manière intéressante, après intervention diététique introduisant une alimentation riche en fibres, cette diversité s'améliore. Néanmoins, les patients qui présentaient de façon basale une flore appauvrie et des complications métaboliques, restent plus «métaboliquement malades» à la fin de l'intervention et perdent moins de poids que les patients dont la flore est normalement riche. Cela suggère que l'étude de la flore intestinale pourrait jouer un rôle prédictif dans la réponse à une intervention. Dans le même esprit, la cohorte DESIR a suivi plus de 3 000 patients non diabétiques pendant 9 ans et a évalué le nombre de nouveaux cas de diabète au cours du suivi. Les auteurs ont quantifié l'ADN bactérien systémique circulant, qu'ils ont retrouvé augmenté chez les patients ayant déclaré un diabète au cours du suivi¹⁰⁵. Ces données mettent encore une fois en exergue le rôle de la flore bactérienne comme un outil prédictif, afin de mieux poser les indications d'une intensification des traitements préventifs. Sur le plan mécanistique, les résultats des études murines suggèrent qu'au cours de l'obésité et avec une alimentation riche en graisses, la perméabilité intestinale est accrue et est responsable d'un passage des bactéries ou de certains de leur composants, induisant une endotoxémie elle-même à l'origine des anomalies métaboliques rencontrées (insulino-résistance et diabète)¹⁰⁶. chez certains patients à risque. Le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle prédictif pour évaluer le risque de développer une pathologie métabolique tel que le diabète sur le long terme ou pour prédire la réponse à une intervention diététique. Pour diagnostiquer un déséquilibre au niveau de la flore intestinale (dysbiose), on peut effectuer un examen bactériologique ou étudier les métabolites de la microflore.

A.1 Examen bactériologique

Le microbiote intestinal humain peut maintenant être caractérisé en détail par une approche basée sur le séquençage à haut débit de l'ADN total des selles appelé métagénomique quantitative. Cette méthode est la plus fiable actuellement car la plupart des espèces bactériennes présentes dans l'intestin ne sont pas cultivables. Le cœur de l'approche est un catalogue qui répertorie tous les gènes des microbes intestinaux qui sont connus soit plus de 9,9 millions, identifiés par l'analyse de 1267 échantillons de selles. Au-delà de la liste des gènes, les unités génétiques qui les portent commencent à être connues : beaucoup d'entre elles correspondent à des espèces bactériennes qui n'ont jamais été isolées et encore moins cultivées. La métagénomique quantitative permet de développer des algorithmes puissants pour diagnostiquer une maladie, de surveiller des patients, ainsi que d'identifier les personnes qui présentent un risque de développer une maladie. Cela jette les bases du développement de nouvelles approches pour mieux restaurer et même préserver la santé par modulation d'un microbiote altéré qui contribue à favoriser ou aggraver une maladie¹⁰⁷.

Pour caractériser le microbiome intestinal le protocole est le suivant (figure 16) :

L'ADN total est extrait des selles puis séquencé pour générer des millions de lectures. Les lectures sont mappés à un catalogue qui référence tous les gènes microbiens connus de l'intestin. Un décompte des gènes est généré sous forme de tableau pour chaque échantillon. Ce tableau permet d'obtenir un profil génétique qui sera lui même associé aux données cliniques. Le profil génétique de la flore pourrait donc servir de marqueur prédictif dans des pathologies telles que le diabète.

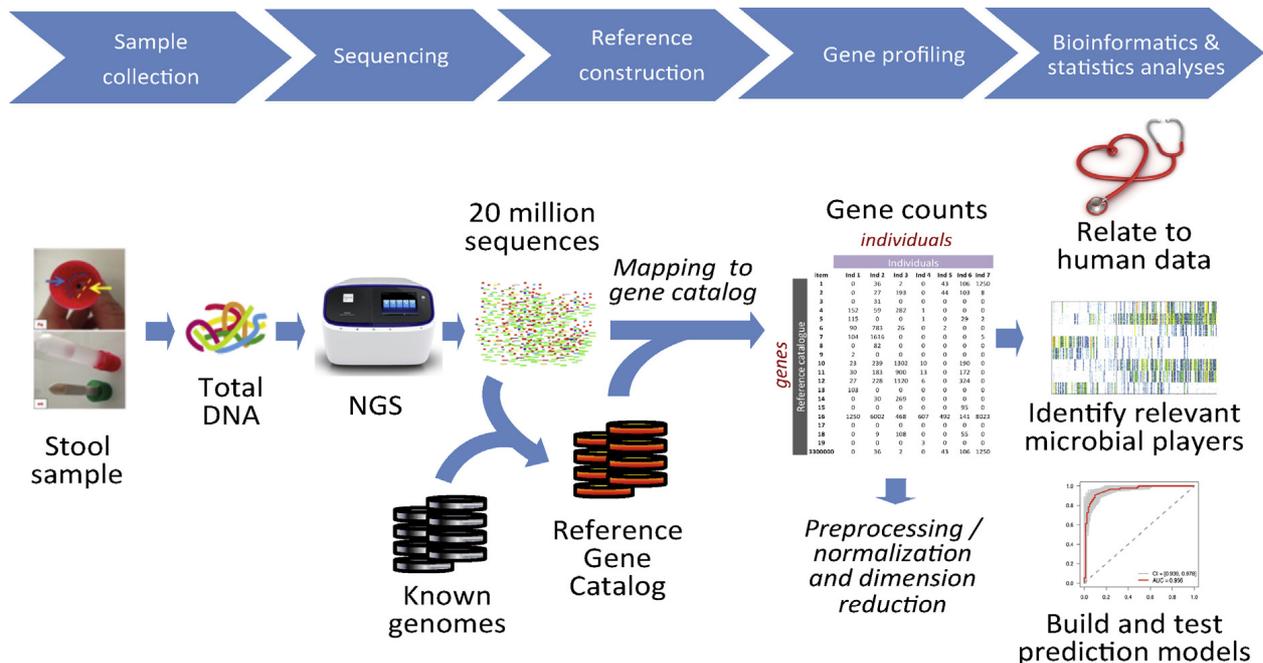


figure 16 : la métagénomique quantitative pour caractériser le microbiome intestinal humain.

(D'après Stanislav Dusko Ehrlich, 2016)¹⁰⁷

A.2 Examen métabolique de la microflore

Afin de déterminer la composition du microbiote un test respiratoire appelé : « Hydrogen breath test »¹⁰⁸ peut être utilisé. Ce test consiste à mesurer les métabolites (en particulier l'hydrogène et le méthane) expirés suite à l'ingestion d'une quantité connue d'un glucide non digestible:le lactose (2g par kg de poids corporel et 50 g max) (figure 17). Il est également nécessaire d'être à jeun le jour de l'examen et d'avoir suivi un régime particulier au cours des 2 semaines précédant l'examen¹⁰⁹. Les résultats obtenus traduisent l'intensité de la fermentation dans le tractus digestif.

On mesure essentiellement 5 types de composés organiques volatils (COV) :

- l'hydrogène (H₂)
- le méthane (Isobutylène)
- le méthylacétate : le plus acidifiant de tous (sorte de vinaigre), propice entre autres aux candidoses
- l'hydrogène sulfureux : très rare, indique un état inflammatoire (H₂S)
- le monoxyde d'azote (NO)

Mais en pratique on mesure essentiellement l'hydrogène et le méthylacétate.

Ce test est utilisé pour diagnostiquer certaines pathologies liées à des déséquilibres au niveau de la flore intestinale (dysbioses) (cf Tableau 1).

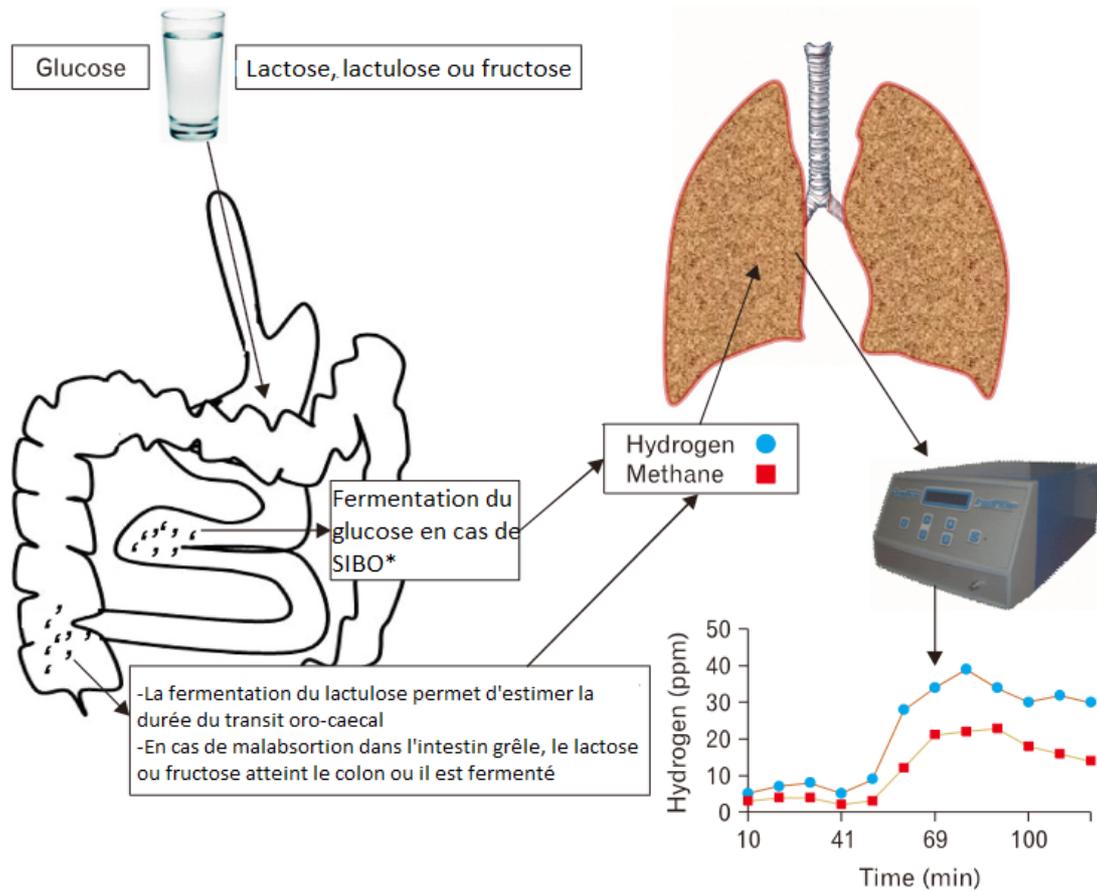


figure 17: Schéma de l'hydrogen breath test.

*SIBO : small intestinal bacterial overgrowth ; ppm:parties par millions

(Extrait de Uday C Ghoshal, 2011)¹⁰⁹

Nom du test	Substrat	Intérêt
Glucose hydrogen breath test	Glucose	prolifération bactérienne dans l'intestin grêle
Lactulose hydrogen breath test	Lactulose	Estimation de la durée du transit oro-caecal prolifération bactérienne dans l'intestin grêle
Lactose hydrogen breath test	Lactose	Malabsorption du lactose
Fructose hydrogen breath test	Fructose	Malabsorption du fructose

Tableau 1: Les différents "hydrogen breath test" et leur utilités cliniques.

(D'après Ghoshal, 2011)¹⁰⁹

B Le microbiote comme cible de traitement

De nombreuses maladies sont liées à la flore intestinale, en particulier les maladies inflammatoires. En traitant la flore, il serait donc possible de prévenir, de guérir ces maladies ou d'en soulager les symptômes. Pour y parvenir, de nombreuses méthodes sont possibles notamment l'utilisation de prébiotiques ou de probiotiques.

B.1 probiotiques et prébiotiques

L'étude des prébiotiques et probiotiques est un domaine en pleine expansion: les cibles des prébiotiques et probiotiques peuvent être liées à la prévention et au traitement de pathologies.

Les probiotiques sont définis comme des «suppléments alimentaires apportant des micro-organismes vivants bénéfiques pour l'hôte par leurs effets dans les voies digestives». Les bifidobactéries et les lactobacilles sont classiquement les probiotiques le plus souvent utilisés dans des interventions nutritionnelles. On a montré que des interventions par probiotiques ont réduit l'intolérance au lactose, renforcé l'immunité chez des nourrissons et diminué le risque de diarrhée à rotavirus¹¹⁰. Une supplémentation en probiotiques a également amélioré des troubles diabétiques dans des modèles animaux de diabète de type 1 et de type 2. L'ingestion de *Lactobacillus casei* a retardé la survenue d'un diabète chez des souris diabétiques non obèses ou chez des souris présentant un diabète alloxanique (^{111;112}). Comme l'alloxane, la streptozotocine (STZ) induit un diabète insulino-dépendant chez le rat et la souris en raison de sa toxicité pour les cellules pancréatiques bêta. Une alimentation contenant *Lactobacillus rhamnosus* peut retarder la survenue d'un diabète à la suite d'une injection néonatale de STZ chez le rat¹¹³. De plus, l'administration de dahi, produit laitier fermenté indien contenant *Lactobacillus acidophilus* (NCDC14) et *L. casei* (NCDC19), améliore la tolérance au glucose et réduit la cholestérolémie totale, les LDL et les VLDL et la triglycéridémie chez le rat traité par STZ¹¹⁴. L'administration orale de *L. casei* diminue significativement la glycémie, l'insulinémie et le poids corporel malgré des apports alimentaires similaires¹¹⁵ dans un modèle de diabète de type 2 chez la souris KK-Ay, qui présente une obésité et une insulino-résistance dues à une mutation du gène Ay. L'administration de dahi a également retardé la survenue d'une insulino-résistance

induite par une alimentation riche en fructose dans un modèle animal de diabète d'origine non génétique¹¹⁴.

Les prébiotiques sont définis comme des «substances non digestibles apportées par l'alimentation et qui exercent des effets bénéfiques chez l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une bactérie colique ou d'un petit nombre de bactéries de ce type»¹¹⁰. Les fibres alimentaires sont un exemple de ce type de substance. Des auteurs ont suggéré que la consommation de polysaccharides non digestibles pourrait réduire le risque de diabète, probablement à la fois par leurs propriétés physiques et par les proportions d'acides gras à courtes chaînes produits par la fermentation colique des fibres¹¹⁶. La consommation de prébiotiques a également amélioré le diabète induit par une alimentation riche en lipides chez la souris. Cani et coll⁷⁷ ont observé que, dans ce modèle animal, une supplémentation en oligofructose avait amélioré la tolérance au glucose et réduit le taux plasmatique des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1. Il est intéressant de noter que l'alimentation riche en lipides module la composition du microbiote cæcal, réduisant notamment la population des bifidobactéries. L'ajout d'oligofructose, mais non de cellulose, augmente le nombre des bifidobactéries à une valeur proche de celui observé chez les animaux témoins⁷⁷. La corrélation négative entre le nombre des bifidobactéries intestinales et l'insulinorésistance soulève la question de l'importance de l'impact de ces bactéries dans le diabète. De nouvelles études sont nécessaires afin de déterminer si l'augmentation de la population des bifidobactéries intestinales pourrait être une stratégie thérapeutique dans le diabète. Outre les fibres non digestibles, d'autres composants de l'alimentation pourraient également influencer la composition et les fonctionnalités du microbiote intestinal. Les acides chlorogènes présents dans les boissons caféinées et le thé sont intensivement métabolisés par le microbiote intestinal¹¹⁷. Taguri et coll.¹¹⁸ ont démontré que l'épigallocatechine-3-gallate, polyphénol présent dans le thé, exerçait des activités antimicrobiennes en inhibant *in vitro* la croissance de nombreuses bactéries pathogènes apportées par l'alimentation. Reste à savoir si les activités antimicrobiennes de l'épigallocatechine-3-gallate concernent le microbiote intestinal commensal, auquel cas, la consommation habituelle d'aliments contenant des composés de ce type pourrait modifier la composition et les fonctionnalités des populations bactériennes intestinales. Le microbiote intestinal fait partie intégrante de l'organisme humain, mais ses fonctions et ses interactions avec l'hôte demeurent largement méconnues. Nous avons analysé ici les résultats expérimentaux les plus

récents décrivant les rôles éventuels des bactéries intestinales et de l'obésité dans le diabète de type 2. Ces données peuvent n'avoir révélé que le sommet de l'iceberg que constituent les importantes influences du microbiote intestinal sur la santé. Avec l'avènement de méthodes ne dépendant pas de cultures pour l'étude du microbiote intestinale, des relations plus intriquées entre la physiologie humaine et les trillions de bactéries résidant dans l'intestin pourraient être révélées. Le défi à relever dans les années qui viennent sera de traduire des résultats à venir en moyens et stratégies pour l'amélioration de maladies chroniques telles l'obésité et le diabète de type 2. Pour atteindre cet objectif, il faudra répondre aux questions suivantes: la modulation de la composition du microbiote intestinal est-elle une stratégie utile pour le traitement des patients atteints de ces maladies et, si oui, quel serait le profil «idéal» du microbiote intestinal? Des interventions nutritionnelles ou pharmaceutiques peuvent-elle transformer ce profil? Il faut espérer que les réponses à ces questions aideront à améliorer la qualité de vie des centaines de millions de patients obèses et diabétiques de par le monde.

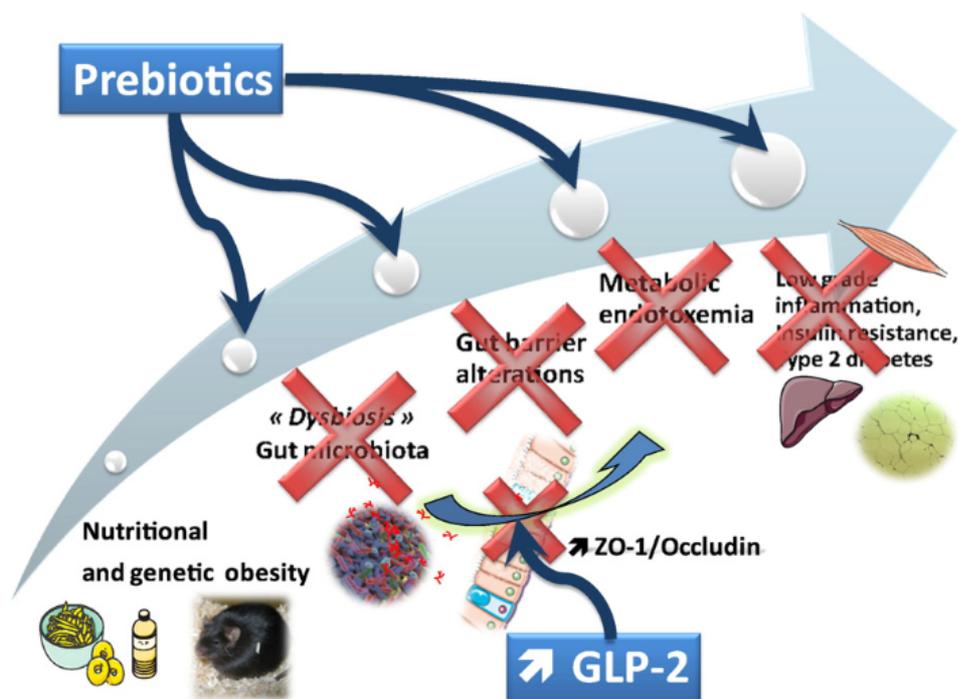


figure 18 : impact des altérations du microbiote induit par les prébiotiques.

(D'après Cani et Delzenne, 2011)¹⁴⁹

B.2 les antibiotiques

La composition de la flore intestinale joue un rôle dans le développement du diabète. Cette flore intestinale peut être affectée par des facteurs extérieurs, incluant les traitements antibiotiques¹¹⁹. Les traitements antibiotiques peuvent conduire à une sélection de genres bactériens résistants et à une modification de la flore. Brugman et al., ont montré que la modulation de la flore intestinale par un traitement antibiotique chez des rats prédisposés au diabète de type 1 retardait et diminuait significativement l'incidence du diabète. De plus, la combinaison d'un traitement antibiotique et d'un régime à base de caséine hydrolysée était même capable de totalement prévenir le diabète chez ces mêmes rats¹²⁰. La modulation de la flore par traitement antibiotique serait responsable de la charge antigénique ce qui aurait pour conséquence de diminuer l'incidence du diabète. Toutefois, le traitement antibiotique (acide fucidique) a également montré qu'il diminuait le taux de TNF- α et d'interleukin-1 ainsi que la stimulation des lymphocytes par les cytokines IL-1 et IL-6. L'acide fucidique aurait un effet sur le processus immuno-inflammatoire comparable à celui de la ciclosporine A qui est un puissant immunosuppresseur¹²¹. Un traitement antibiotique pourrait donc avoir un effet indirect sur le pancréas. En outre, les régimes protecteurs tels que les régimes sans gluten ont montré qu'ils altéraient la composition bactérienne¹²².

Dans l'optique de traiter le diabète de type 2, Cani et coll ont cherché à modifier le microbiote intestinal au moyen d'un traitement antibiotique, afin de réduire la concentration élevée de LPS plasmatique chez des souris nourries par un régime riche en gras et chez des souris obèses ob/ob. Ils ont utilisé des antibiotiques à large spectre (ampicilline et néomycine) afin de modifier la communauté microbienne intestinale de la souris.

Un traitement antibiotique de 4 semaines a fortement modifié le microbiote intestinal, à la fois chez les souris contrôle et chez les souris traitées par un régime riche en gras, ce qui a entraîné une réduction de l'endotoxémie et une amélioration de la tolérance au glucose dans les deux modèles animaux.

Nous avons aussi démontré que le régime riche en matière grasse augmente considérablement la perméabilité intestinale, par l'expression réduite des protéines de jonctions serrées telles que ZO-1 et Occludine. Or, cet effet a été entièrement restauré

par le traitement antibiotique. Ces données confirment que les bactéries intestinales sont impliquées dans le contrôle de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie métabolique.

Aussi, le traitement antibiotique réduit l'apparition de l'inflammation du tissu adipeux, du stress oxydatif, et des marqueurs de l'infiltration des macrophages chez les souris nourries par un régime riche en graisse.

Ces observations démontrent que la restauration de l'insulinosensibilité est associée à une diminution du statut inflammatoire, confortant le concept selon lequel une modulation du microbiote intestinal réduit l'inflammation et accroît l'insulinosensibilité chez la souris.

Des études ont montré qu'une antibiothérapie à court terme améliorerait un diabète chez la souris, mais les bénéfices et effets indésirables à long terme de cette approche restent à déterminer¹²³.

B.3 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des molécules ayant la capacité de tuer une variété de bactéries Gram positives et Gram négatives ainsi que certains champignons et virus. La présence de régions hydrophobes et basiques dans leurs structures permet l'établissement d'interactions électrostatiques avec les phospholipides des membranes ou le peptidoglycane bactérien chargé négativement. Ces interactions permettent leur insertion dans les membranes cellulaires microbiennes et causent la formation de pores déstabilisant l'intégrité bactérienne. Les charges des phospholipides des membranes eucaryotes et procaryotes ne sont pas distribuées de la même façon, ce qui confère aux peptides antimicrobiens une spécificité d'action dirigée à l'encontre des bactéries¹²⁴. Chez l'Homme, diverses protéines exercent des activités antimicrobiennes : les défensines, les cathélicidines et les lectines de type C.

a **les défensines**

Les défensines constituent la famille principale des peptides antimicrobiens. Ce sont des peptides de 2 à 6 kDa exprimés par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages. Les défensines humaines peuvent être divisées en trois groupes : les α -défensines, les β -défensines et les θ -défensines, mais seules les α -défensines, les β -défensines sont présentes chez l'homme.

les α -défensines

Les α -défensines exercent leur activité anti-microbienne sur les bactéries Gram positives et négatives, les champignons, les virus et les protozoaires. Ces défensines peuvent elles-mêmes être subdivisées en deux parties en fonction du type cellulaire les produisant. Ainsi, il existe 4 α -défensines produites par les neutrophiles, les HNP1 à HNP4 (Human neutrophil peptide) et seulement 2 sont exprimées par les cellules de Paneth de l'intestin grêle, HD-5 et HD-6 (Human defensin) chez l'Homme¹²⁵. Il faut noter que HD-5 et HD-6 sont également retrouvées dans le côlon mais dans ce cas leur expression est beaucoup plus faible que dans l'iléon¹²⁶. Chez la souris, les α -défensines sont appelées cryptidines, mais sont seulement sécrétées par les cellules de Paneth dans l'intestin. Plus de 20 cryptidines différentes ont été décrites au niveau transcriptionnel mais seulement 6 cryptidines ont montré un effet antimicrobien *in vitro*¹²⁷. D'autres peptides cationiques à activité antimicrobienne sont retrouvés au niveau intestinal chez la souris. Ces peptides, similaires aux α -défensines, sont appelés les cryptidin-related sequence (CRS) peptides¹²⁸. Les α -défensines ne sont pas produites sous forme active. Les cellules de Paneth relarguent une pro-forme inactive de défensine qui doit être clivée pour acquérir son activité. Les enzymes participant à ce processus enzymatique sont : la trypsine dans le cas de la défensine HD5 ou encore la metalloprotéinase 7 (MMP-7 encore appelée matrilysine) pour les cryptidines murines

¹²⁹.

les β -défensines

Exprimées principalement par les entérocytes dans l'intestin, les β -défensines ont un rôle antimicrobien identique aux α -défensines et jouent un rôle dans la chimioattraction des cellules dendritiques et des lymphocytes T¹²⁵. Les β -défensines HBD1 et HBD2 (human beta defensin) peuvent être respectivement exprimées de façon indépendante ou dépendante du microbiote intestinal. Mais, la plupart des β -défensines épithéliales sont induites par des stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF α , l'IL-1, l'IL-6 et ceci de façon dépendante de NF- κ B¹³⁰.

b **les cathélicidines**

Ces peptides antimicrobiens exercent leur action sur les bactéries Gram positives et négatives et sur les champignons. Les cathélicidines sont exprimées dans de nombreux tissus tels que la moelle osseuse, le thymus, le foie, la rate et l'estomac. Elles sont retrouvées de façon abondante dans les granules des neutrophiles et cellules épithéliales¹²⁵. La famille des cathélicidines est représentée chez l'Homme et la souris par un seul gène, appelé respectivement CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide) et CRAMP (cathelin-related antimicrobial peptide). Ce gène code les deux principales cathélicidines, les peptides LL-37 et CAMP (cathelin antimicrobial peptide). Le peptide LL-37, seule cathélicidine existante chez l'Homme, est généré par clivage de sa proforme hCAP-18 par la protéinase 3¹³¹. Au-delà de leurs rôles anti-microbien les cathélicidines ont un pouvoir chimioattractant, induisent et relarguent des médiateurs inflammatoires comme les chimiokines, et peuvent neutraliser des endotoxines bactériennes¹³². Le peptide LL-37 exprimé indépendamment du microbiote par les monocytes, les NK, les lymphocytes B et les lymphocytes T $\gamma\delta$ ¹³² peut ainsi recruter des monocytes, des macrophages et des lymphocytes T par chimiotactisme. Leur expression est augmentée par des motifs bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharide) et l'acide lipotéichoïque chez les mastocytes¹²⁵. Des études ont démontré que CRAMP est sécrété par les cellules β pancréatiques et que son expression est régulée en réponse à son inducteur physiologique : le butyrate, au PBA (phenyl butyric acid) ou à des signaux inflammatoires variés (Il-1b, LPS et ARN double brin)¹³³. Le CRAMP stimule la croissance des cellules β pancréatiques *in vitro* via EGFR (epidermal growth factor receptor) en modulant l'expression des protéines cellulaires antiapoptotiques. Sur des îlots pancréatiques isolés CRAMP stimule la sécrétion

d'insuline. Dans des conditions pathologiques, CRAMP atténue les stimuli diabétogènes déclenchés par des réponses inflammatoires et par la mort des cellules β en modulant les enzymes inflammatoires et la signalisation des protéines apoptotiques. L'absence de CRAMP chez la souris provoque une diminution de la sécrétion d'insuline alors que son administration régule la glycémie chez les souris NOD après une hyperglycémie provoquée. L'expression de CRAMP dans les cellules endocrines pancréatiques est contrôlé par la production d'acides gras à chaînes courtes produits par les bactéries spécifiques de la flore intestinale⁹⁹. Les acides gras à chaînes courtes butyrate et son dérivé phénylé le PBA (phenyl butyrate acid) induisent la production de cathélicidine dans les colonocytes, le colon et les cellules épithéliales de l'intestin et du poumon¹³⁴. Cette régulation par le butyrate et PBA s'étend aux cellules β pancréatiques¹³³. La production de butyrate par les bactéries commensales est inversement associée à l'auto-immunité contre les cellules β pancréatiques et au développement de diabète de type 1¹³⁵, ce qui soutien le rôle anti-inflammatoire du butyrate dans le diabète de type 1.

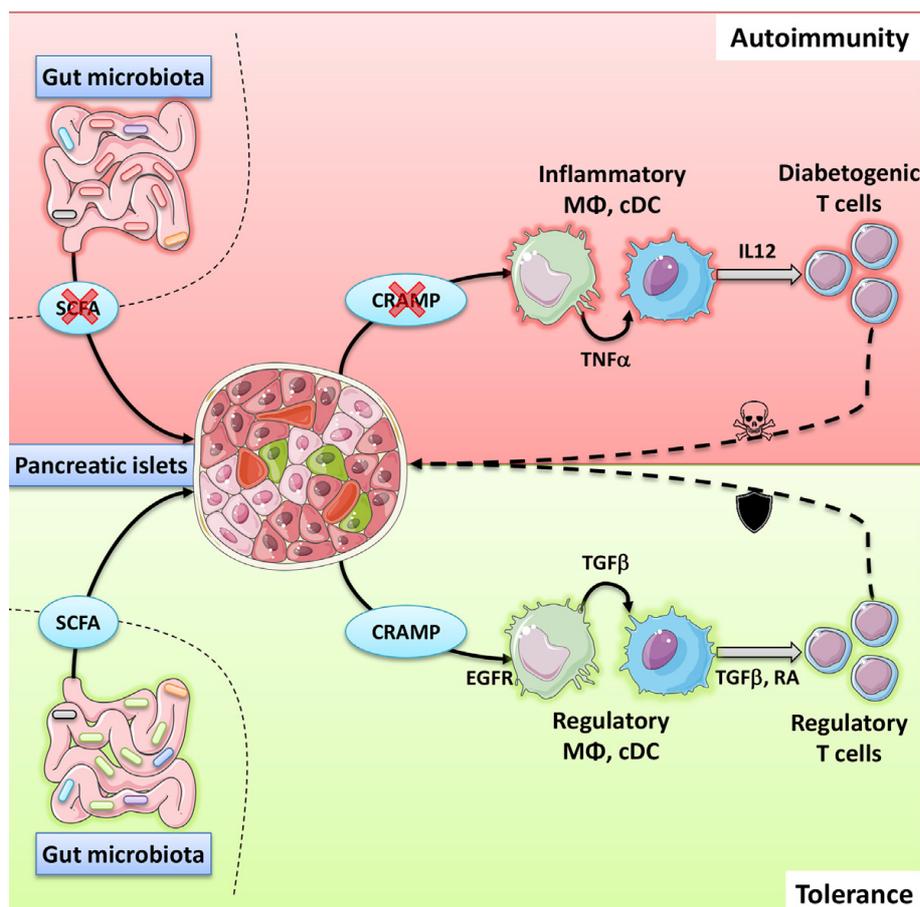


figure 19: Mécanismes associés à CRAMP dans l'immunité. SCFA=short chain fatty acid.

(Extrait de Jia Sun et al., 2015)⁹⁹

c **les lectines de type C REG3 β et REG3 γ**

Les lectines de type C sont des protéines capables de fixer des sucres de façon dépendante du calcium. Ces protéines, comme la PAP (pancreatic-associated protein) peuvent exercer un rôle antimicrobien. La PAP, exprimée par les entérocytes et les cellules de Paneth chez l'Homme, possède un homologue murin mieux décrit, Reg3 γ (Regenerating islet-derived protein 3 γ). Reg3 γ médie spécifiquement l'élimination des bactéries Gram positives grâce à sa capacité à lier le peptidoglycane¹³⁶ après avoir été activé par clivage par la trypsine¹³⁷. La recolonisation bactérienne de souris axéniques augmente son expression¹³⁸ alors qu'un traitement antibiotique¹³⁹ et la déficience en MyD88 chez la souris provoquent une réduction de son expression¹⁴⁰. Ainsi, l'expression de Reg3 γ est induite par la flore et en particulier le LPS bactérien¹³⁹ par l'intermédiaire des TLR (Toll like receptor). La lectine Reg3 β , de la même famille que Reg3 γ , pourrait être induite par TLR2 après infection à *Yersinia pseudotuberculosis*¹⁴¹.

d **Les peptides à activité enzymatique**

La déstabilisation des parois bactériennes peut également être initiée par des peptides à activité enzymatique tels que le lysozyme et la phospholipase A2. Dans l'intestin, ces molécules sont sécrétées de façon constitutive par les cellules de Paneth. La production de lysozyme conduit à la dégradation enzymatique du peptidoglycane, composant la paroi des bactéries Gram positives. Retrouvée de façon ubiquitaire, la phospholipase A2 conduit à l'hydrolyse des phospholipides composant les membranes bactériennes. Une autre enzyme de la famille des ribonucléases exerce une action antimicrobienne à l'encontre des bactéries Gram positives et Gram négatives, l'angiogénine 4 (Ang-4). Cette protéine est exprimée de façon dépendante du microbiote par les cellules de Paneth mais son mécanisme d'action reste indéterminé¹²⁵.

Les peptides antimicrobiens et la composition du microbiote ont montré qu'ils y avait un lien étroit entre eux. En effet, à l'image des antibiotiques, les peptides antimicrobiens ont la capacité de tuer certaines bactéries ce qui modifie la composition

du microbiote. D'autre part la composition du microbiote a un effet indirecte sur l'expression des peptides antimicrobiens. En les utilisant de façon directe ou en modulant leur expression, les peptides antimicrobiens pourraient permettre de sélectionner les bactéries présentes dans la flore intestinale. L'intérêt scientifique actuellement porté à ces "antibiotiques naturels" est d'autant plus considérable que la résistance aux "antibiotiques classiques" est de plus en plus importante. Outre son effet sur la flore intestinale, l'utilisation des peptides antimicrobiens, plus spécifiquement celle des cathélicidines, reflète la mise en place de l'inflammation au niveau du pancréas et ainsi, réprime le développement du diabète auto-immun chez la souris. Un mécanisme similaire pourrait exister chez l'homme et ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le cadre du traitement du diabète.

C Transplantation de flore intestinale

Une transplantation fécale consiste à transplanter chez quelqu'un la flore intestinale d'une autre personne. En pratique, il ne s'agit pas de se débarrasser de la totalité des cent mille milliards de bactéries qui peuplent un intestin pour les remplacer par d'autres, mais juste d'en éliminer un certain nombre par un lavage colique, afin d'apporter une flore plus appropriée. Ensuite, il faut introduire les bactéries étrangères ; pour cela, on utilise tout simplement des selles débarrassées de leurs résidus. Celles-ci peuvent être introduits directement dans le rectum à l'aide d'une seringue, ou alors être mises dans une pilule qui sera avalée. En quelques heures, les «nouvelles» bactéries auront colonisé l'intestin. La transplantation de flore possède un effet limité dans le temps, le microbiote intestinal revenant à sa composition initiale.

L'efficacité de ce type de traitement a été démontrée dans le traitement d'infection à *Clostridium difficile*¹⁴². En France, l'Autorité Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) a émis en 2014 un document validant l'utilisation de cette pratique à des fins de recherche médicale.

D Discussion

Dans cette quatrième partie, nous avons examiné comment le microbiote intestinal pouvait être utilisé à des fins thérapeutiques.

Dans un premier temps, il pourrait être utilisé comme marqueur prédictif dans le cadre du diabète. En effet, grâce au progrès réalisés ces dernières années en métagénomique, un profil génétique bactérien lié au diabète a pu être déterminé. Un séquençage ADN à haut débit des selles associé à des algorithmes puissants pourrait permettre de diagnostiquer le diabète, de surveiller son évolution chez les patients atteints ou d'identifier les personnes présentant un risque de développer la maladie. D'autres méthodes d'analyses tel que l' « hydrogen breath test » présentent l'avantage d'être moins coûteuses et plus faciles à réaliser mais demeurent moins précises que l'analyse métagénomique des selles.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le microbiote intestinal comme cible de traitement dans le cadre du diabète. Des études ont montré l'amélioration du diabète chez l'animal suite à l'utilisation de probiotiques et de prébiotiques. Leur utilisation demeure encore sous exploitée. D'autres études ont montré qu'une antibiothérapie à court terme améliorerait un diabète chez la souris, mais les bénéfices et effets indésirables à long terme de cette approche restent à déterminer. Parmi les autres méthodes étudiées pour modifier la flore intestinale, l'utilisation des peptides antimicrobiens en particulier celle des cathélicidines semble prometteuse et aurait montré un effet protecteur contre le diabète de type 1.

Enfin, la transplantation de flore intestinale pourrait représenter une perspective thérapeutique intéressante. Elle aurait déjà démontré son efficacité dans le cadre d'un traitement d'infection à *Clostridium difficile* mais ne fait pas encore l'objet de recherche dans le traitement du diabète.

Conclusion

Le diabète touche de plus en plus de personnes en France et dans le monde. De plus, il touche une population de plus en plus jeune. Cette maladie est responsable de nombreuses complications graves. Son impact économique et humain en font un véritable enjeu de santé publique au niveau mondial.

Pour lutter contre le diabète, de nombreux moyens sont mis en place (campagne de prévention, traitements...).

De nouvelles pistes ont été étudiées dont le microbiote intestinal, ce qui a fait l'objet de cette thèse.

Bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement établis, on sait désormais que le microbiote joue un rôle indéniable dans le développement et l'évolution du diabète en participant de façon indirecte au processus inflammatoire. Une meilleure connaissance du microbiote permettra à l'avenir de mieux appréhender le diabète.

Des stratégies utilisant la flore intestinale sont dorénavant et déjà étudiées dans le but de prévenir ou de traiter le diabète. Bien qu'elles ne soient pas encore suffisamment développées, elles offrent des perspectives de recherches intéressantes pour le futur.

Bibliographie

1. Petriccioli, A. P. et N. Microbiote intestinal, obésité et résistance à l'insuline. *Médecine Interne Générale* **Volume 317**, 2236–2238 (2011).
2. Doré, J. & Corthier, G. The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **34**, S7–S15 (2010).
3. Petriccioli, A. P. et N. Microbiote intestinal, obésité et résistance à l'insuline. *Médecine Interne Générale* **Volume 317**, 2236–2238 (2011).
4. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4576–4579 (1990).
5. Scanlan, P. D. & Marchesi, J. R. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and-independent analysis of faeces. *ISME J.* **2**, 1183–1193 (2008).
6. Scupham, A. J. *et al.* Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 793–801 (2006).
7. Breitbart, M. *et al.* Metagenomic Analyses of an Uncultured Viral Community from Human Feces. *J. Bacteriol.* **185**, 6220–6223 (2003).
8. Breitbart, M. *et al.* Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res. Microbiol.* **159**, 367–373 (2008).
9. Zhang, T. *et al.* RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. *PLoS Biol.* **4**, e3 (2006).
10. Willner, D. *et al.* Metagenomic Analysis of Respiratory Tract DNA Viral Communities in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Individuals. *PLoS ONE* **4**, e7370 (2009).
11. Horz, H.-P. & Conrads, G. The Discussion Goes on: What Is the Role of Euryarchaeota in Humans? *Archaea* **2010**, 1–8 (2010).
12. Dridi, B. Laboratory tools for detection of archaea in humans. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 825–833 (2012).
13. Hao, W.-L. & Lee, Y.-K. Microflora of the gastrointestinal tract. *Public Health Microbiol.*

Methods Protoc. 491–502 (2004).

14. Wang, M., AhrnÃ©, S., Jeppsson, B. & Molin, G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**, 219–231 (2005).
15. Hao, W.-L. & Lee, Y.-K. in *Public Health Microbiology* 491–502 (Springer, 2004).
16. Turnbaugh, P. J. *et al.* The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* **1**, 6ra14–6ra14 (2009).
17. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11070–11075 (2005).
18. Jiménez, E. *et al.* Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193 (2008).
19. Neu, J. & Rushing, J. Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clin. Perinatol.* **38**, 321–331 (2011).
20. Turnbaugh, P. J. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480–484 (2009).
21. Tims, S. *et al.* Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J.* **7**, 707–717 (2013).
22. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**, e177 (2007).
23. Yatsunenkov, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature11053
24. Agans, R. *et al.* Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults: Gut microbiota of adolescents differs from that of adults. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 404–412 (2011).
25. Cummings, J.H. & Macfarlane, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 443–459 (1991).
26. Xu, X., Xu, P., Ma, C., Tang, J. & Zhang, X. Gut microbiota , host health , and polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **31**, 318–337 (2013).
27. Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P. & Louis, P. Interactions and competition within the

- microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* **9**, 1101–1111 (2007).
28. Brown, C. T. *et al.* Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* **6**, e25792 (2011).
 29. Lin, H. V. *et al.* Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE* **7**, e35240 (2012).
 30. Bjursell, M. *et al.* Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet. *AJP Endocrinol. Metab.* **300**, E211–E220 (2011).
 31. Sozio, M. S., Lu, C., Zeng, Y., Liangpunsakul, S. & Crabb, D. W. Activated AMPK inhibits PPAR- and PPAR- transcriptional activity in hepatoma cells. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **301**, G739–G747 (2011).
 32. Brown, A. J. *et al.* The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.* **278**, 11312–11319 (2003).
 33. Maslowski, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282–1286 (2009).
 34. Sina, C. *et al.* G Protein-Coupled Receptor 43 Is Essential for Neutrophil Recruitment during Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* **183**, 7514–7522 (2009).
 35. Inoue, D., Tsujimoto, G. & Kimura, I. Regulation of Energy Homeostasis by GPR41. *Front. Endocrinol.* **5**, (2014).
 36. Samuel, B. S. *et al.* Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16767–16772 (2008).
 37. Zaibi, M. S. *et al.* Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett.* **584**, 2381–2386 (2010).
 38. Gao, Z. *et al.* Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes* **58**, 1509–1517 (2009).

39. Šefčíková, Z., Hájek, T., Lenhardt, L., Ľudovít, Raček, L. & Možeš, Š. Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats. *Physiol Res* **57**, 467–474 (2008).
40. Howard, F. A. C. & Henderson, C. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 193–196 (1999).
41. Schmiel, D. H. & Miller, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **1**, 1103–1112 (1999).
42. Wilkins, T. D. & Hackman, A. S. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer Res.* **34**, 2250–2254 (1974).
43. Veiga, P. *et al.* Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 81–86 (2005).
44. Gerard, P. *et al.* Bacteroides sp. Strain D8, the First Cholesterol-Reducing Bacterium Isolated from Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5742–5749 (2007).
45. Ridlon, J. M. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **47**, 241–259 (2005).
46. LeBlanc, J. G. *et al.* Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 160–168 (2013).
47. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–341 (2003).
48. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323 (2009).
49. Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**, 1268–1273 (2012).
50. Verdu, E. F. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* **55**, 182–190 (2006).
51. Magalhaes, J. G., Tattoli, I. & Girardin, S. E. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* **19**, 106–115 (2007).
52. Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O. & Kasper, D. L. An Immunomodulatory

- Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* **122**, 107–118 (2005).
53. Bouskra, D. *et al.* Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **456**, 507–510 (2008).
 54. Duerkop, B. A., Vaishnav, S. & Hooper, L. V. Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity* **31**, 368–376 (2009).
 55. Purchiaroni, F. *et al.* The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **17**, 323–33 (2013).
 56. Walker, A. W. *et al.* High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* **11**, 7 (2011).
 57. Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 13780–13785 (2007).
 58. Baumgart, M. *et al.* Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* **1**, 403–418 (2007).
 59. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **489**, 231–241 (2012).
 60. Patterson, C. C. *et al.* Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989–2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia* **55**, 2142–2147 (2012).
 61. Dubois-Laforgue, D. & Timsit, J. Diabète de type 1 et environnement. (2000).
 62. Bluestone, J. A., Herold, K. & Eisenbarth, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**, 1293–1300 (2010).
 63. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
 64. Bakris, G. *et al.* Standards of Medical Care in Diabetes 2015. (2015).
 65. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).

66. Wu, X. *et al.* Molecular Characterisation of the Faecal Microbiota in Patients with Type II Diabetes. *Curr. Microbiol.* **61**, 69–78 (2010).
67. Furet, J.-P. *et al.* Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery–induced weight loss links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* **59**, 3049–3057 (2010).
68. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–131 (2006).
69. Larsen, N. *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE* **5**, (2010).
70. Shoelson, S. E. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 1793–1801 (2006).
71. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
72. Winer, D. A. *et al.* B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* **17**, 610–617 (2011).
73. Cani, P. D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374–2383 (2007).
74. Burcelin, R. L'intestin métabolique: dualité fonctionnelle des incrétones et de la flore intestinale. *Bull. Académie Natl. Médecine* **197**, 79–92 (2013).
75. Rietschel, E. T. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217–225 (1994).
76. Holst, O. in *Bacterial Lipopolysaccharides* (eds. Knirel, Y. A. & Valvano, M. A.) 21–39 (Springer Vienna, 2011).
77. Cani, P. D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374–2383 (2007).
78. Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M. & Webb, D. J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1286–1292 (2007).

79. Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W. & Eckhardt, E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* **50**, 90–97 (2008).
80. Laugerette, F. *et al.* Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *AJP Endocrinol. Metab.* **302**, E374–E386 (2012).
81. Cani, P. D. *et al.* Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481 (2008).
82. Neal, M. D. *et al.* Enterocyte TLR4 Mediates Phagocytosis and Translocation of Bacteria Across the Intestinal Barrier. *J. Immunol.* **176**, 3070–3079 (2006).
83. Cani, P. D. *et al.* Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
84. Poggi, M. *et al.* C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* **50**, 1267–1276 (2007).
85. Amar, J. *et al.* Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1219–1223 (2008).
86. Cani, P. D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374–2383 (2007).
87. Amar, J. *et al.* Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment: Bacterial translocation during diabetes. *EMBO Mol. Med.* **3**, 559–572 (2011).
88. Gill, S. R. *et al.* Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* **312**, 1355–1359 (2006).
89. Wen, L. *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455**, 1109–1113 (2008).
90. Burrows, M. P., Volchkov, P., Kobayashi, K. S. & Chervonsky, A. V. Microbiota regulates type 1 diabetes through Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9973–9977 (2015).

91. King, C. & Sarvetnick, N. The Incidence of Type-1 Diabetes in NOD Mice Is Modulated by Restricted Flora Not Germ-Free Conditions. *PLoS ONE* **6**, e17049 (2011).
92. Murri, M. *et al.* Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med.* **11**, 1 (2013).
93. Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P. & Fitzgerald, G. F. Intestinal microbiota, diet and health. *Br. J. Nutr.* **111**, 387–402 (2014).
94. Mejía-León, M. & Barca, A. Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. *Nutrients* **7**, 9171–9184 (2015).
95. Peng, L., Li, Z.-R., Green, R. S., Holzman, I. R. & Lin, J. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J. Nutr.* **139**, 1619–1625 (2009).
96. Brandtzaeg, P. The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *Eur. J. Pharmacol.* **668**, S16–S32 (2011).
97. Davis-Richardson, A. G. & Triplett, E. W. A model for the role of gut bacteria in the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *Diabetologia* **58**, 1386–1393 (2015).
98. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451–455 (2013).
99. Sun, J. *et al.* Pancreatic β -Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota. *Immunity* **43**, 304–317 (2015).
100. Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A. & Kimura, I. Dietary Gut Microbial Metabolites, Short-chain Fatty Acids, and Host Metabolic Regulation. *Nutrients* **7**, 2839–2849 (2015).
101. Wilkin, T. J. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia* **44**, 914–922 (2001).
102. Furlanos, S., Narendran, P., Byrnes, G. B., Colman, P. G. & Harrison, L. C. Insulin resistance is a risk factor for progression to Type 1 diabetes. *Diabetologia* **47**, 1661–1667 (2004).
103. Kostic, A. D. *et al.* The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development

- and in Progression toward Type 1 Diabetes. *Cell Host Microbe* **17**, 260–273 (2015).
104. Orešič, M. *et al.* Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J. Exp. Med.* **205**, 2975–2984 (2008).
105. for the D.E.S.I.R. Study Group *et al.* Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia* **54**, 3055–3061 (2011).
106. Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M. & Cani, P. D. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb. Cell Factories* **10**, 1 (2011).
107. Ehrlich, S. D. The human gut microbiome impacts health and disease. *C. R. Biol.* **339**, 319–323 (2016).
108. Di Stefano, M., Mengoli, C., Bergonzi, M., Pagani, E. & Corazza, G. R. Hydrogen breath test and intestinal gas production. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 36–38 (2013).
109. Ghoshal, U. C. How to Interpret Hydrogen Breath Tests. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **17**, 312–317 (2011).
110. Roberfroid, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1682s–1687s (2000).
111. MATSUZAKI, T. *et al.* Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *Apmis* **105**, 643–649 (1997).
112. MATSUZAKI, T. *et al.* Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on alloxan-induced diabetes in mice. *Apmis* **105**, 637–642 (1997).
113. Tabuchi, M. *et al.* Antidiabetic Effect of *Lactobacillus* GG in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1421–1424 (2003).
114. Yadav, H., Jain, S. & Sinha, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* **23**, 62–68 (2007).
115. Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S. & Yokokura, T. Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr. J.* **44**, 357–365 (1997).

116. Weickert, M. O. & Pfeiffer, A. F. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J. Nutr.* **138**, 439–442 (2008).
117. Couteau, D., McCartney, A. L., Gibson, G. R., Williamson, G. & Faulds, C. B. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 873–881 (2001).
118. Taguri, T., Tanaka, T. & Kouno, I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2226–2235 (2006).
119. Sullivan, A. A., Edlund, C. & Nord, C. E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 101–114 (2001).
120. Brugman, S. *et al.* Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* **49**, 2105–2108 (2006).
121. Hageman, I. & Buschard, K. Antidiabetogenic Effect of Fusidic Acid in Diabetes Prone BB Rats: A Sex-Dependent Organ Accumulation of the Drug is Seen. *Pharmacol. Toxicol.* **91**, 123–128 (2002).
122. Hansen, A. K. *et al.* Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **22**, 220–225 (2006).
123. Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V. & Amar, J. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* **48**, 257–273 (2011).
124. Yeaman, M. R. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**, 27–55 (2003).
125. Mukherjee, S., Vaishnava, S. & Hooper, L. V. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3019–3027 (2008).
126. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. O. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 2377–2392 (2009).
127. Ouellette, A. J. *et al.* Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect. Immun.* **62**, 5040–5047 (1994).
128. Andersson, M. L., Karlsson-Sjöberg, J. M. T. & Pütsep, K. L.-A. CRS-peptides: unique defense peptides of mouse Paneth cells. *Mucosal Immunol.* **5**, 367–376 (2012).

129. Ayabe, T. *et al.* Activation of Paneth Cell α -Defensins in Mouse Small Intestine. *J. Biol. Chem.* **277**, 5219–5228 (2002).
130. Hong, Y. H., Song, W., Lee, S. H. & Lillehoj, H. S. Differential gene expression profiles of α -defensins in the crop, intestine, and spleen using a necrotic enteritis model in 2 commercial broiler chicken lines. *Poult. Sci.* **91**, 1081–1088 (2012).
131. Sørensen, O. E. *et al.* Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951–3959 (2001).
132. Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J. & Oppenheim, J. J. Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense*. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 181–215 (2004).
133. Sun, J. *et al.* Cathelicidins positively regulate pancreatic β -cell functions. *FASEB J.* **30**, 884–894 (2016).
134. Schaubert, J. *et al.* Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* **52**, 735–741 (2003).
135. de Goffau, M. C. *et al.* Fecal Microbiota Composition Differs Between Children With β -Cell Autoimmunity and Those Without. *Diabetes* **62**, 1238–1244 (2013).
136. Lehotzky, R. E. *et al.* Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7722–7727 (2010).
137. Mukherjee, S. *et al.* Regulation of C-type Lectin Antimicrobial Activity by a Flexible N-terminal Prosegment. *J. Biol. Chem.* **284**, 4881–4888 (2009).
138. Cash, H. L. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science* **313**, 1126–1130 (2006).
139. Brandl, K. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* **455**, 804–807 (2008).
140. Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R. P. & Pamer, E. G. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* **204**, 1891–1900 (2007).
141. Dessein, R. *et al.* Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Gut* **58**, 771–776 (2009).

142. van Nood, E. *et al.* Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **368**, 407–415 (2013).
143. López-García, P. & Moreira, D. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res. Microbiol.* **159**, 67–73 (2008).
144. Tiihonen, K., Ouwehand, A. C. & Rautonen, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res. Rev.* **9**, 107–116 (2010).
145. Goulet, O. La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *J. Pédiatrie Puériculture* **22**, 102–106 (2009).
146. Cerf-Bensussan, N. & Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 735–744 (2010).
147. Larsen, N. *et al.* Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE* **5**, (2010).
148. Schneck, E. *et al.* Calcium ions induce collapse of charged O-side chains of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. R. Soc. Interface* **6**, S671–S678 (2009).
149. Cani, P. D. & Delzenne, N. M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* **130**, 202–212 (2011).
150. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
151. Cerf-Bensussan, N. & Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 735–744 (2010).
152. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11070–11075 (2005).

MICROBIOTE INTESTINAL ET DIABETE

RÉSUMÉ

Le diabète est une pathologie chronique dont l'incidence ne fait qu'augmenter et qui est responsable de complications lourdes qui en font un réel problème de santé publique. Face à l'émergence de cette maladie, de nouvelles pistes de recherche sont étudiées. Ces dernières années, le microbiote intestinal est devenue l'une des pistes les plus intéressantes de cette recherche. Grâce aux récentes avancées en biologie moléculaire, il est désormais possible de déterminer quelles sont les bactéries présentes dans notre intestin. Leur implication ou non dans le diabète reste cependant à déterminer. L'étude de la flore intestinale pourrait permettre de déterminer les mécanismes de survenue de la maladie et pourrait même représenter une perspective thérapeutique intéressante pour diagnostiquer, prévenir ou traiter la maladie.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacie

MOTS CLÉS : microbiote intestinal – diabète – prébiotiques – probiotiques – dysbiose – inflammation

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Faculté de Médecine et Pharmacie de Poitiers

6 rue de la Milétrie

86073 POITIERS CEDEX

Directeur de thèse : Caroline CHARVET