

THESE
POUR LE
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par

Antoine EGRON

Présentée et soutenue publiquement le 24 février 2014

Impact du microbiote intestinal sur la
physiopathologie de l'hôte : exemple de l'autisme

Président : M. Jean-Marie BARD,
Professeur de Biochimie Générale et Clinique

Membres du jury : Mme. Françoise NAZIH-SANDERSON,
Maître de Conférences de Biochimie

Mme Aurélie FAUSSIÉ,
Pharmacien

Remerciements

A l'ensemble des membres du jury,
Pour le temps qu'ils ont passé à lire et à évaluer cette thèse

A Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD
Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Nantes
Pour avoir accepté de diriger cette thèse

A Madame Françoise NAZIH-SANDERSON
Maître de Conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Nantes
Pour les conseils qu'elle m'a apportés durant la rédaction de cette thèse
Pour sa disponibilité et son soutien

A l'ensemble des enseignants de la Faculté de Pharmacie de Nantes
Pour l'enseignement qu'ils m'ont offert durant mes années d'études

A mes parents,

Pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la relecture de cette thèse

A mon frère,

Pour avoir toujours cru en moi

A mes colocataires,

Pour leur soutien durant la rédaction

Table des matières

Introduction	1
Partie I : Méthodes d'investigation et diversité du microbiote intestinal humain	3
1. La systématique en bactériologie	3
1.1. Taxonomie et systématique	3
1.2. Evolution de la notion d'espèce	4
1.2.1. L'espèce en taxonomie phénotypique	4
1.2.2. L'espèce en taxonomie numérique.....	5
1.2.3. L'espèce en taxonomie phylogénétique	6
1.3. Proposition de définition.....	9
2. Définitions de microbiote, microbiome et métagénome.....	10
2.1. Les bactéries : des micro-organismes ubiquitaires.....	10
2.2. Définition de microbiote.....	11
2.3. Définition de microbiome	11
2.4. Définition de métagénome.....	12
3. Diversité du microbiote intestinal humain.....	12
3.1. Méthodes culture-dépendantes.....	13
3.1.1. Espèces mises en évidence par culture	14
3.1.2. Limite des techniques cultures-dépendantes	15
3.2. Méthodes cultures-indépendantes : étude de l'homologie de séquence de l'ADN bactérien.....	15
3.3. Méthodes cultures-indépendantes : séquençage de la sous-unité 16S ribosomique.....	17
3.3.1. Application du séquençage de la sous-unité 16S ribosomique	17
3.3.2. Limites du séquençage de la sous-unité 16S ribosomique	19
3.4. La différence entre fraction active et fraction totale	19
3.5. Comparaison des différentes méthodes	21
4. Espèces actives du microbiote	23
4.1. Phylum des Firmicutes.....	23
4.2. Phylum des Tenericutes	25
4.3. Phylum des Bacteroidetes.....	25
4.4. Phylum des Proteobacteria.....	26
4.5. Phylum des Actinobacteria	27
4.6. Phylum des Fusobacteria	27
5. L'avènement de la métagénomique	27

Partie II : Répercussions physiologiques et métaboliques du microbiote sur l'hôte... 30

1. Microbiote et physiologie intestinale	31
1.1. Rappels physiologiques	31
1.1.1. Rappels histologiques	32
1.1.2. Rappel sur la résorption des nutriments	33
1.2. Influence du microbiote	34
1.2.1. Augmentation de la motilité intestinale	34
1.2.2. Modification de la vascularisation intestinale	35
2. Influence sur le métabolisme lipidique	36
2.1. De la graisse alimentaire au nutriment lipidique	37
2.1.1. Les lipides et leurs rôles	38
2.1.2. Des graisses alimentaires aux lipides absorbables	39
2.1.3. Absorption au niveau de l'entérocyte	41
2.1.4. Evolution des lipides dans l'entérocyte	42
2.1.5. Dégradation plasmatique des chylomicrons	44
2.1.6. Dégradation des lipoprotéines hépatiques	45
2.1.7. Utilisation par les tissus périphériques	46
2.1.8. Rôle et synthèse des HDL	46
2.2. Influence du microbiote sur les étapes clés du métabolisme des lipides	48
2.2.1. Dé-conjugaison des acides biliaires par le microbiote	48
2.2.2. Augmentation de l'activité de la LPL	50
2.2.3. Diminution de la β -oxydation par le microbiote	51
3. Influence sur le métabolisme glucidique	54
3.1. Rappels sur le métabolisme des glucides	54
3.1.1. Digestion des glucides	56
3.1.2. Absorption par la muqueuse intestinale	58
3.1.3. La glycolyse = fourniture d'énergie	59
3.1.4. Le stockage d'énergie sous forme de glycogène	60
3.1.5. Le foie régule la libération du glucose dans le sang	60
3.1.6. Régulation hormonale de la glycémie	61
3.2. Influence du microbiote sur le métabolisme des glucides	64
3.2.1. Fermentation des fibres par le microbiote	64
3.2.2. Le microbiote modifie l'insulino-résistance	65
3.2.3. Effet « insuline-like » du microbiote	66
4. Influence sur le développement du système immunitaire	67
4.1. Le microbiote procure une protection mécanique	68
4.2. Le microbiote favorise le développement des tissus de l'immunité	69
4.3. Le microbiote modifie la prolifération des cellules de l'immunité	71

Partie III : Microbiote intestinal et pathologie humaine : exemple de l'autisme	73
1. Présentation et définition de l'autisme	74
1.1. Contexte épidémiologique de l'autisme.....	74
1.2. Les différentes classifications	75
1.2. Proposition de définition.....	75
2. Modifications du microbiote observé dans l'autisme.....	76
2.1. Le microbiote des personnes autistes diffère du microbiote normal.....	77
2.2. Le microbiote comme acteur dans l'autisme	79
2.2.1. Le lipopolysaccharide favoriserait l'aggravation des symptômes	79
2.2.2. Les bactéries du genre Clostridium ont un effet délétère sur la symptomatologie	79
2.2.3. Le genre Desulfovibrio tient un rôle clé dans la symptomatologie de l'autisme.....	80
Conclusion	82
Bibliographie.....	84
Glossaire	89
Liste des abréviations	93
Liste des figures	95
Listes des tableaux.....	96
Annexes.....	97

Introduction

Le maintien en bonne santé du corps humain se base sur une bonne communication entre les cellules de notre corps. En thérapeutique occidentale, il est donc considéré que la maladie est la conséquence d'une dysfonction pharmacologique. Pendant des années, la médecine a étudié les interactions entre nos cellules et les signaux qu'elles utilisaient. Il s'avère maintenant que les cellules de notre corps ne sont pas les seules à participer à notre état de santé.

Au sein de notre intestin se développent des bactéries. Ces bactéries, représentées par plusieurs centaines d'espèces et spécifiques de chaque individu, y résident en permanence. Elles influent sur notre santé au quotidien en luttant contre les infections, mais aussi en agissant dans l'immunité, l'inflammation, ou encore le métabolisme. En raison de son importance qualitative et quantitative, ce microbiote représente le prochain « organe » que la médecine doit étudier pour comprendre le fonctionnement de notre organisme.

Les avancées technologiques récentes ont permis de redéfinir la vision de cet organe oublié. On a ainsi pu réévaluer l'importance de la biodiversité du microbiote intestinal humain ainsi que son impact fonctionnel sur notre bien-être et notre santé grâce à de nouvelles approches à l'interface entre l'écologie microbienne, la génomique et la post-génomique.

Comme l'ensemble de nos organes, ce microbiote intestinal est dynamique fonctionnellement et il s'adapte aux différents facteurs environnementaux de l'écosystème intestinal. Parmi ces facteurs, notre alimentation joue un rôle majeur et peut modifier directement ou indirectement l'environnement gastro-intestinal. Plus généralement, ce sont nos pratiques culturelles, nos styles de vie, nos modes alimentaires à l'échelle locale voire mondiale qui entreraient en jeu dans l'interaction entre le microbiote et la santé. C'est pourquoi, il devient essentiel de comprendre comment un régime alimentaire modifie le microbiote intestinal afin de connaître en retour son impact sur notre santé.

Le travail qui m'a été confié, avait pour but de faire un état des lieux sur ce microbiote intestinal. Il s'agencera en trois parties. Dans un premier temps, il nous est paru indispensable de faire le point sur les méthodes d'investigation et la diversité du microbiote

intestinal humain. Ensuite, nous présenterons l'influence que peuvent avoir les bactéries de notre intestin sur l'organisme sain. Cette deuxième partie nous permettra d'aller plus avant dans les mécanismes d'interaction entre notre corps et les bactéries. Nous y ferons aussi certains rappels sur les métabolismes de base (lipidique et glucidique). Enfin, la dernière partie de notre travail prendra l'exemple de l'autisme pour présenter l'influence que peut avoir ce microbiote sur les pathologies humaines. Cette troisième partie permettra d'illustrer l'importance de celui-ci en thérapeutique. Elle nous permettra de mieux comprendre la sensibilité d'un individu à un traitement médical, à un pathogène, voire de démontrer enfin le lien entre l'alimentation et la santé ! C'est également la porte ouverte à des thérapies plus personnalisées et à une médecine préventive.

Partie I :

Méthodes d'investigation et diversité du microbiote intestinal humain

Les sciences qui étudient la classification des êtres vivants et leurs caractéristiques que sont la taxonomie et la systématique sont en constante évolution. Ainsi, un concept paraissant aussi simple que l'espèce a connu de nombreuses définitions, dépendantes de l'avancée des techniques de caractérisation des individus. Il est donc important, avant de présenter la population peuplant le tractus intestinal, de définir des notions indispensables à la compréhension des études s'y rattachant.

Nous allons dans un premier temps définir les termes d'**espèce**, de **microbiote** et de **métagénome**. Nous verrons ensuite quelles sont les espèces qui ont pu être mises en évidence au niveau de l'intestin de l'être humain et comment la découverte d'une nouvelle espèce est conditionnée par les techniques disponibles.

1. La systématique en bactériologie

1.1. Taxonomie et systématique

Avant d'étudier les concepts de microbiote et de microbiome, nous devons nous intéresser à la façon dont le monde scientifique classe les bactéries entre elles et par rapport aux autres organismes.

La taxonomie est la science ayant pour objet la **description et la classification des êtres vivants**. Afin d'avoir un langage commun, des groupes (appelés taxons) ont dû être définis afin de relier les individus se ressemblant ou, au contraire, de séparer ceux qui semblaient éloignés les uns des autres.

Un taxon regroupe les organismes suffisamment proches du point de vu des caractères pris en compte lors de leur classification. Nous pouvons voir à l'aide de la figure 1 que l'espèce représente le taxon le plus bas dans la hiérarchie. Il regroupe des individus

très proches les uns des autres. **L'espèce est donc le taxon de base dans la classification du vivant.** Le genre, qui est un taxon de niveau supérieur, regroupe un ensemble d'individus pouvant appartenir à des espèces différentes mais qui restent proches d'un point de vue taxonomique.

Les relations entre ces différents groupes, notamment la hiérarchie, sont étudiées par la science de la **systématique**. Ainsi, il a été défini une hiérarchie des taxons permettant de classer les individus. Cette représentation des taxons les uns par rapport aux autres découle des classifications proposées par Whittaker (1) et Woese (2) comme nous le verrons plus loin.

Il est important de noter dès à présent que la taxonomie et la systématique sont des sciences évolutives. L'objectif étant d'avoir un langage commun pour classer le monde vivant, elles sont conditionnées par l'évolution des techniques et par l'objectif de la classification. En bactériologie appliquée à la thérapeutique par exemple, il peut être intéressant de classer les bactéries en fonction de leurs résistances aux antibiotiques plutôt qu'à partir de caractères purement phénotypiques.

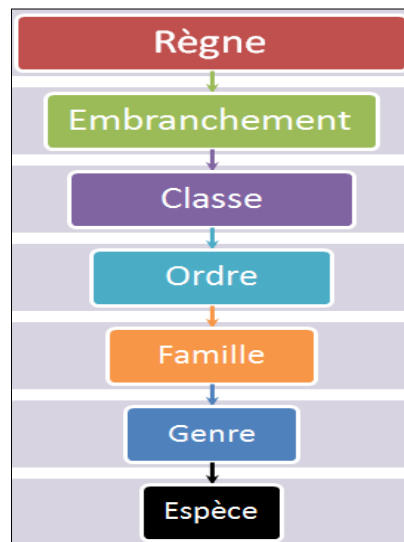


Figure 1 : Principaux taxons du monde vivant (wikispaces.com)

1.2. Evolution de la notion d'espèce

Ayant situé l'espèce en systématique, nous devons définir le concept d'espèce bactérienne. D'un point de vue taxonomique, l'espèce représente le taxon de base, c'est à dire la plus petite unité regroupant des individus considérés comme similaires. Néanmoins, le concept d'espèce en tant que représentation intellectuelle n'a cessé d'évoluer. Nous allons donc voir comment ce concept a évolué au cours du temps et quelles méthodes étaient et sont utilisées pour définir une espèce bactérienne.

1.2.1. L'espèce en taxonomie phénotypique

Il existe de nombreuses définitions de l'espèce dans la littérature scientifique. On attribue à Ernst Mayr (1942) la première définition précise de l'espèce : « Une espèce est

une communauté reproductrice de populations, isolée des autres communautés et occupant une niche particulière dans la nature » (3). Cette définition implique que l'individu décrit doit se multiplier par une reproduction sexuée et que l'on doit pouvoir le différencier des individus d'une autre espèce par des critères phénotypiques (morphologie, habitat, caractères biochimiques simples...). Nous pouvons donc déjà voir les limites de cette définition dans la description des bactéries, ces dernières se reproduisant par division cellulaire et étant souvent proches d'un point de vue morphologique.

A la fin du XIX^{ème} siècle, en se basant sur des caractères uniquement phénotypiques, Ferdinand Cohn décrivit les bactéries comme « des cellules sans chlorophylle de formes sphériques, allongées ou cylindriques, parfois torsadées ou courbées et se multipliant uniquement par division latérale » (4). Il classait ainsi les bactéries en 4 groupes : *Sphaerobacteria* (formes sphériques), *Microbacteria* (formes cylindriques ou en petits bâtonnets), *Desmobacteria* (bâtonnets allongés), *Spirobacteria* (formes spiralées).

Cette classification des bactéries en 4 grands groupes sert de base pour les classifications du monde vivant jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle.

1.2.2. L'espèce en taxonomie numérique

Sneath (5) proposa alors de compléter la description phénotypique par une centaine de caractères (culturels, structuraux, biochimiques...). Chacun des caractères était affecté du chiffre 0 (absence de caractère) ou 1 (présence de caractère). Un indice numérique était défini pour chaque espèce et permettait de les comparer les unes aux autres. Cette classification, dite « numérique », a l'avantage de multiplier les caractères pris en compte et donc de tendre vers une plus grande différenciation entre les espèces. Sur la base de ces observations, Copeland (6) puis Whittaker (1) (Figure 2) réorganisent le vivant en 4 puis 5 règnes : les monères, les protistes, les végétaux, les champignons et les animaux. Les organismes aujourd'hui appelés bactéries appartenaient au groupe des Monères, c'est à dire des organismes unicellulaires, sans noyau défini.

Les études sur la composition de l'ADN (Ghargaff), sa structure (7), et celles sur la dénaturation et la renaturation de l'ADN (8), ont ensuite permis de prendre en compte des caractères génétiques dans les classifications. Des études comparant le G+C pour cent et l'hybridation d'acides nucléiques ont ouvert la voie vers les classifications phylogénétiques.

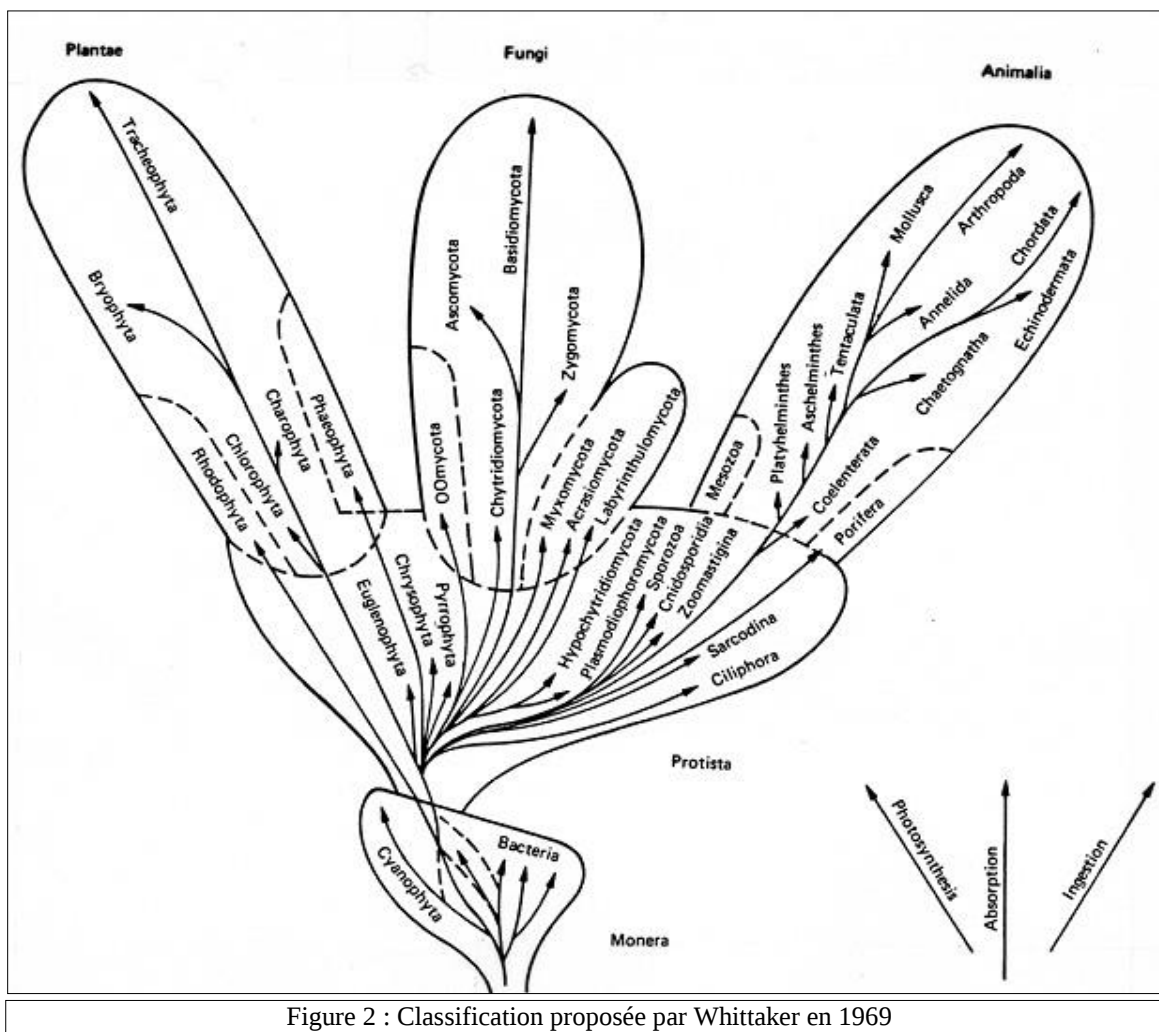


Figure 2 : Classification proposée par Whittaker en 1969

1.2.3. L'espèce en taxonomie phylogénétique

Tout être vivant possède un génome constitué d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acide ribonucléique). Ce génome lui permet de produire tous les outils nécessaires à son fonctionnement et à sa survie.

Un brin d'ADN est constitué d'un squelette sucré portant un enchaînement de bases : adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G). Ces bases sont complémentaires deux à deux, ce qui permet à un simple brin de se lier à un autre par des liaisons hydrogènes. Au sein d'un brin d'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). Cet enchaînement retrouvé dans l'ADN et l'ARN est caractéristique d'un individu. Il peut donc devenir un outil très puissant lorsque l'on veut comparer les populations entre elles.

Une technique de comparaison du génome bactérien consiste à mettre en présence le matériel génétique de deux bactéries et d'observer leur complémentarité. En effet, les bases des doubles brins d'ADN sont reliées par des liaisons hydrogènes de faible énergie (Figure 3). Par chauffage, on peut rompre ces liaisons et séparer les deux brins d'ADN (dénaturation de l'ADN). Ensuite, par refroidissement, les brins se « relient » (ré-apparient) entre eux par complémentarité de séquence (renaturation) (Figure 4). Ce principe est utilisé dans les **techniques d'homologie de séquence d'ADN bactérien**.

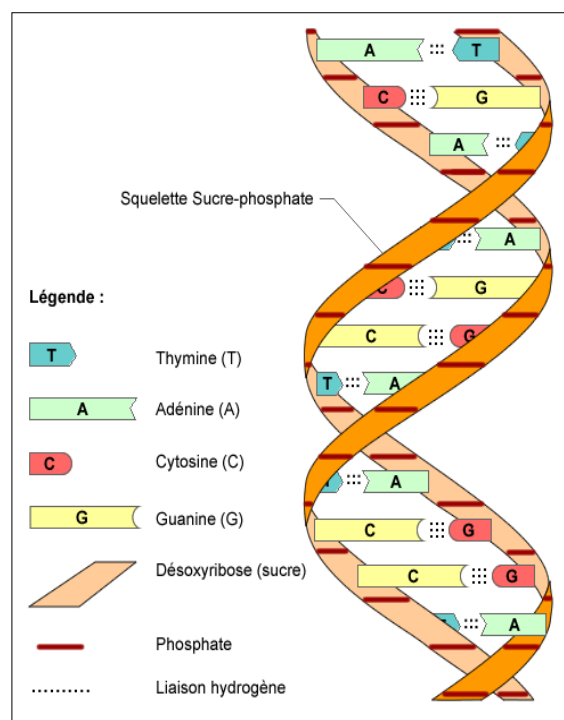


Figure 3 : Schéma d'un double brin d'ADN (adele.nicoweb.com)

Dans cette technique, le matériel génétique de deux bactéries est mis en présence et chauffé. Pas refroidissement, on observe si les brins d'ADN des deux bactéries sont complémentaires. On peut ainsi déterminer si les deux bactéries sont proches ou si, au contraire, leurs matériels génétiques sont trop dissemblables pour les classer dans un même groupe phylogénétique.

En complément des techniques décrites plus haut, cette technique permet de définir une espèce au niveau génomique. Elle est cependant coûteuse et difficile à mettre en place en routine ; on lui privilégie actuellement les techniques basées sur l'analyse des ARN ribosomiques.

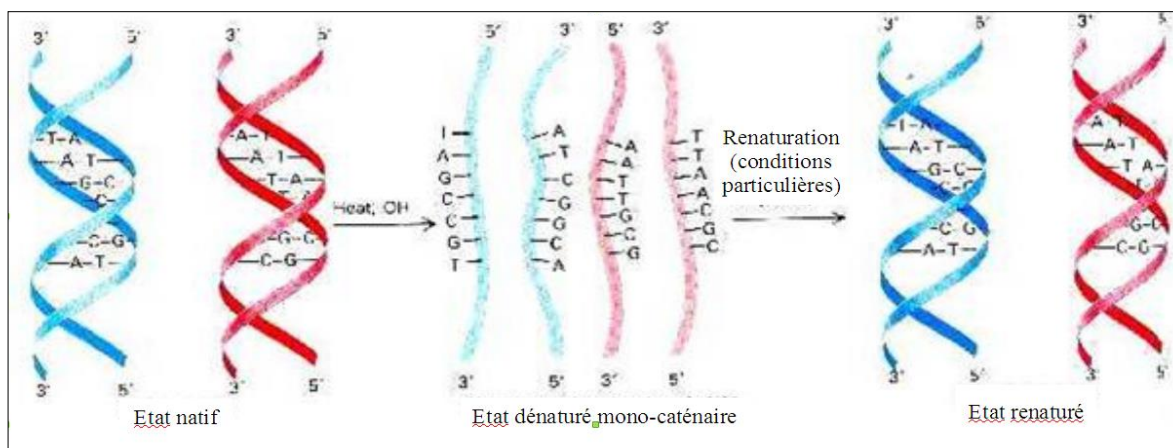
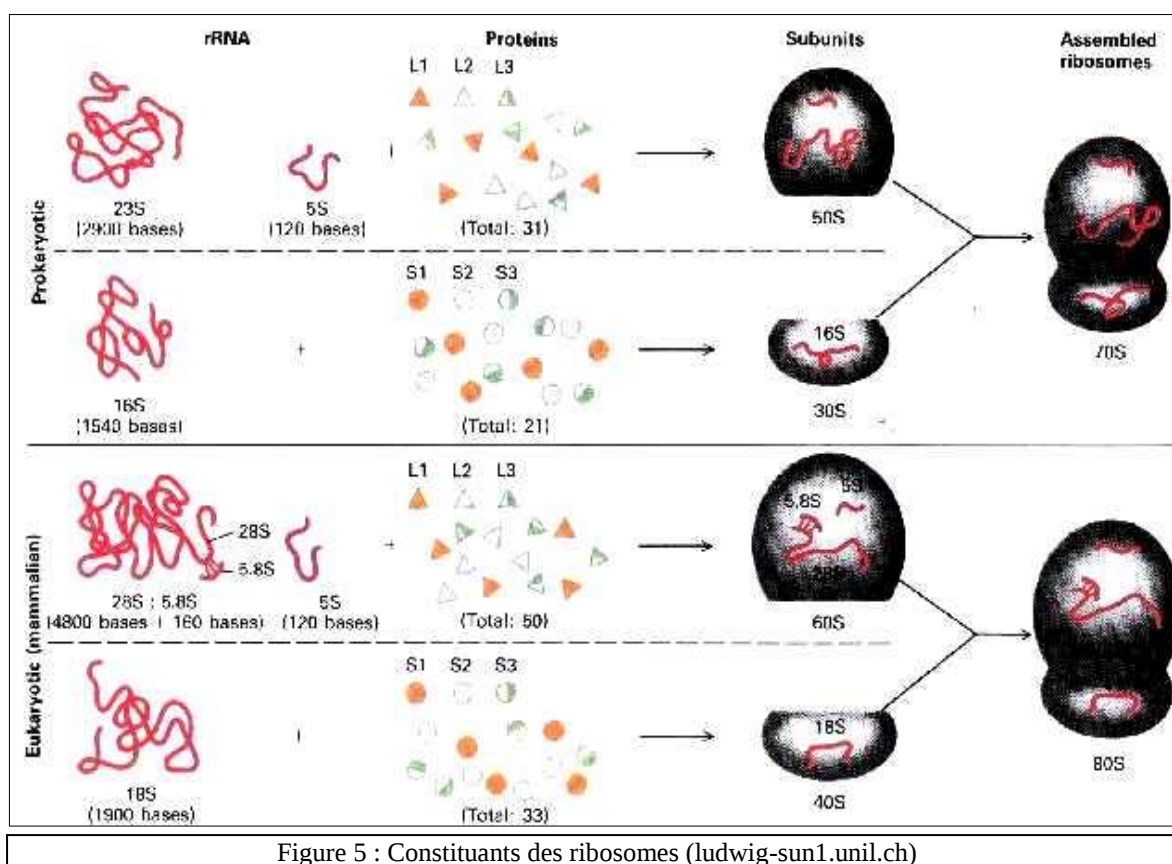


Figure 4 : Schéma de dénaturation/renaturation de l'ADN (www.edu.upmc.fr)

En complément de l'analyse de la séquence ADN des bactéries, **l'étude de la séquence de gènes homologues** est une base solide de comparaison et de classification des espèces. Des gènes sont dit homologues lorsqu'ils codent pour un gène ayant la même fonction au sein des êtres vivants et descendants d'un même gène ancestral. Il est donc important de comparer des séquences de gènes retrouvés chez tous les êtres vivants notamment chez les bactéries. En taxonomie, les ARN ribosomiques (ARNr) ont été choisis pour quatre raisons principales (5) :

- ils sont présents dans toutes les cellules ce qui permet des comparaisons entre procaryotes et eucaryotes.
- ils ont une structure bien conservée car toute modification pourrait avoir des conséquences importantes sur les synthèses protéiques.
- il existe des portions d'ARNr dont la séquence est identique chez tous les êtres vivants.
- ils sont abondants dans la cellule et faciles à purifier.

Associés entre eux et à des protéines, les ARNr forment les ribosomes, structure ubiquitaire dans le monde vivant permettant la synthèse des protéines (Figure 5).



En pratique, l'étude des séquences de la sous-unité 16S permet de comparer les procaryotes (et donc les bactéries) entre eux (9). Elle ne permet néanmoins pas de différencier des individus trop proches génétiquement. On estime que c'est une méthode fiable pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce (différencier plusieurs genres par exemple).

En se basant sur l'analyse des ARN ribosomiques, **Carl Woese proposa de séparer le monde vivant en trois grands domaines : les archées, les bactéries et les eucaryotes** (2). Il séparait ainsi les monères en archées et en bactéries. Cette classification du monde vivant en trois domaines est encore utilisée aujourd'hui en taxonomie. Combinée à la **classification en 5 règnes de Whittaker** elle a abouti aux classifications actuelles. Les classifications les plus récentes se présentent comme une synthèse de celles de Woese et de Whittaker sans pour autant les remettre en cause.

De ce fait, les classifications de Woese et de Whittaker sont encore largement reconnues par les scientifiques. La classification proposée par Woese, axée sur la structure cellulaire, est privilégiée par les microbiologistes. Celle proposée par Whittaker, plus précise, est souvent utilisée par les botanistes ou les zoologues.

1.3. Proposition de définition

Nous venons de voir que l'évolution des techniques d'identification et de caractérisation a fait évoluer les classifications du vivant et avec elle les concepts de bactéries et d'espèces bactériennes. Actuellement, **la classification du monde vivant et des bactéries obéit à une taxonomie consensuelle prenant en compte des caractères phénotypiques, biochimiques et surtout phylogéniques**. Il existe de nombreuses classifications différentes, variables en fonction des caractères pris en compte. Elles peuvent toutes être acceptées à partir du moment où l'auteur les justifie par des arguments scientifiques.

Ainsi, en bactériologie, la découverte de nouvelles espèces s'accompagne de la détermination de différents facteurs comme le recommandent l'I.C.S.B. (International Committee on Systematic Bacteriology) et l'I.C.S.P. (International Committee on Systematic of Prokaryotes) et du suivi des règles du code international de nomenclature des bactéries (International Code of Nomenclature of Bacteria).

La définition « d'espèce bactérienne », quant à elle, est dépendante de l'évolution des techniques d'identification. Il apparaît difficile d'énoncer une définition générale de l'espèce bactérienne. Dans ce document, nous définirons l'espèce bactérienne comme « **une collection de souches bactériennes qui partagent de nombreuses propriétés stables et qui diffèrent significativement des autres groupes de souches** » (10) en gardant à l'esprit que la description de chaque espèce se base sur des caractères phénotypiques et sur les analyses du génome que nous avons vues précédemment.

De même, la définition du terme bactérie a connu de nombreuses modifications en fonction de l'évolution de la taxonomie. Nous définirons une bactérie comme **un organisme unicellulaire, sans noyau (procaryotes), possédant dans sa paroi du peptidoglycane (10) et se multipliant par division cellulaire (asexué)**.

2. Définitions de microbiote, microbiome et métagénome

Ayant défini les concepts de bactérie et d'espèce bactérienne, nous pouvons maintenant définir les notions de microbiote et microbiome.

Depuis la découverte de ce que les biologistes appelaient au XVII^{ème} siècle les Animalcules (observation rendue possible par l'utilisation du microscope optique par Van Leeuwenhoek), l'Homme sait que les micro-organismes sont présents partout dans notre environnement. Parmi eux se développent les bactéries.

2.1. Les bactéries : des micro-organismes ubiquitaires

Ces dernières, en raison de leur présence ubiquitaire dans notre environnement ont été les premières observées et décrites (Van Leeuwenhoek, Koch, Pasteur). Elles ont d'abord été étudiées en raison de leur pouvoir pathogène et de leur implication dans de nombreuses maladies infectieuses. L'Homme s'est ensuite rendu compte du bénéfice qu'elles apportaient aux autres organismes auxquels elles étaient liées. Elles établissent alors un rapport symbiotique avec leur hôte et contribuent au maintien de son intégrité, en évitant les infections par d'autres micro-organismes, ou en participant à la digestion des

aliments. En contrepartie, l'hôte en hébergeant ces bactéries, leur fournit les substrats indispensables à leur développement et à leur prolifération.

Présentes au niveau de la peau des mammifères par exemple, les bactéries commensales évitent un développement anarchique d'autres bactéries ou de champignons pathogènes. Elles occupent ainsi des niches écologiques qui les rendent indispensables au maintien de la santé d'un individu.

2.2. Définition de microbiote

Nous pouvons donc associer à chaque type de biotope un ensemble de micro-organismes se développant de façon concomitante. Anciennement dénommé « flore » bactérienne ou fongique, **on appelle maintenant microbiote l'ensemble des micro-organismes constitutifs d'un milieu donné.**

Au niveau intestinal, cette flore a été appelée microbiote intestinal. Il est constitué d'un microbiote commensal (essentiellement des bactéries) et d'un microbiote transitoire (bactéries, champignons, virus). Par simplification, le terme de microbiote intestinal désigne dans la majorité des publications l'ensemble des bactéries présentes au niveau intestinal, sans prendre en compte le microbiote fongique. Nous ferons de même dans ce document en désignant sous le terme **microbiote intestinal l'ensemble des bactéries présentes au niveau de l'intestin humain.**

2.3. Définition de microbiome

La présence de ce grand nombre de bactéries au sein de l'intestin des mammifères n'est pas sans conséquence sur la vie de l'hôte. Le microbiote représente en effet un nombre très élevé de cellules, estimé à l'heure actuelle à 100 000 milliards de bactéries (10^{14} bactéries) (11). Ces individus, par le biais de produits d'expression de leur génome interagissent avec leur environnement. Ils modifient la capacité de l'hôte lui-même à assimiler certains aliments ou à développer certaines maladies (12).

Le génome d'un individu est une caractéristique qui le définit et qui, par ses produits d'expression (protéines, lipides de membrane...), lui permet d'évoluer dans son environnement. Au niveau intestinal, l'ensemble du génome de tous les micro-organismes présents ainsi que les produits d'expression de ce génome est appelé microbiome.

Proposé en 2001 par Joshua Lederberg, le terme microbiome désignait alors l'ensemble des micro-organismes présents dans un environnement donné ainsi que les gènes et les produits d'expression de ces gènes. Actuellement, **le terme de microbiome désigne le génome exprimé par le microbiote pris dans son ensemble.**

2.4. Définition de métagénome

Durant ces dix dernières années, de nombreuses études visant à définir le microbiote et le microbiome intestinal, ont permis de reconsidérer le fonctionnement du métabolisme humain, notamment au niveau intestinal. Il est maintenant admis par la communauté scientifique que ce dernier n'est pas uniquement le fruit de l'expression du génome humain mais est modifié par l'expression concomitante du génome humain et du génome bactérien. Ainsi, une nouvelle branche de la génomique a fait son apparition : **la métagénomique.** Elle consiste en l'étude de l'ensemble du matériel génétique présent dans un environnement, sans préjuger de son origine. Appliquée au microbiote intestinal, cette discipline vise à caractériser l'ensemble des gènes dominants exprimés au niveau intestinal et leur influence sur le métabolisme humain. Elle utilise des techniques récentes de génie génétique, afin de séquencer, d'analyser et de décrypter le microbiome intestinal humain.

L'étude du métagénome pousse la communauté scientifique à considérer l'homme non plus comme un organisme indépendant mais comme un supra-organisme (11) en symbiose avec les bactéries qu'il héberge et directement influencé par celles-ci. Le microbiote intestinal de chaque individu est composé de quelques centaines d'espèces dominantes. Une première fraction est spécifique de l'hôte, tandis qu'une deuxième est commune à tous les humains. Cette deuxième fraction composée des espèces prédominantes constitue une sorte de noyau métagénomique (13).

3. Diversité du microbiote intestinal humain

L'existence et l'influence du microbiote intestinal ayant donc été mises en évidence, il semblait nécessaire d'en définir la composition.

Actuellement, il est admis que le microbiote intestinal est majoritairement constitué de bactéries appartenant à deux phyla : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. Certaines espèces très peu représentées quantitativement n'ont été mises en évidence que récemment. Nous pouvons citer les phyla des actinobactéries et des cyanobactéries qui, bien que très peu représentés quantitativement, constituent une part active du microbiote (14). L'observation de ces phyla n'a été possible que grâce au développement de nouvelles approches et de nouvelles techniques d'analyse. Les avancées de la génétique ont notamment permis de pallier les limites des méthodes cultures-dépendantes.

Les premières recherches visant à établir la composition du microbiote intestinal se basaient sur des méthodes cultures-dépendantes : une espèce ne pouvait être identifiée que si elle pouvait être cultivée. Dès le milieu du XX^{ème} siècle, l'isolement et la mise en culture des bactéries du tube digestif (15) ont mis en évidence les bactéries cultivables le constituant.

3.1. Méthodes cultures-dépendantes

On attribue à Louis Pasteur les premières cultures bactériennes à la fin du XIX^{ème} siècle. Les méthodes de stérilisation qu'il avait mises au point (chauffage puis refroidissement rapide) lui permirent d'isoler des souches bactériennes et de les cultiver ensuite. Il réfuta ainsi la théorie de génération spontanée qui fut abandonnée au profit de la théorie cellulaire définie plus tôt (milieu du XIX^{ème} siècle) par les travaux de Matthias Jakob Schleiden, Theodor Schwann et Rudolf Virchow. L'origine des cellules constituant le vivant n'était plus sous l'influence d'une puissance divine mais provenait de la division d'une cellule d'origine.

L'adhésion de la communauté scientifique à cette théorie fut le point de départ de nombreuses recherches sur les bactéries et sur leur culture. Celles-ci pouvaient être isolées et cultivées pour ensuite être étudiées. La découverte de nouvelles bactéries s'accompagnait de la mise au point de nouvelles méthodes de culture et de caractérisation.

3.1.1. Espèces mises en évidence par culture

Ce sont des études basées sur ces méthodes de culture et d'identification qui ont été les premières utilisées afin de déterminer la composition du microbiote intestinal humain. Ces études utilisaient notamment des cultures en milieux anaérobies et permirent d'isoler et de mettre en évidence plus d'une centaine d'espèces bactériennes.

Dans une étude des microbiotes intestinaux de 20 adultes sains (15), Moore et Holdeman ont utilisé ces techniques pour isoler et dénombrer 113 espèces de bactéries différentes dont certaines n'avaient jamais été décrites. Par des méthodes de comptage au microscope, les auteurs ont pu estimer le nombre de représentants de chaque espèce. D'après les résultats, les dix espèces les plus représentées pouvaient être classées dans 4 principaux genres : *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* et *Peptostreptococcus* (tableau 1).

Rang	Pourcentage par rapport à la population bactérienne totale	Espèce	Phylum (d'après NCBI taxonomy browser)
1	12,1	<i>Bacteroides fragilis ss fulgatus</i>	Bacteroidetes
2	7,15	<i>Fusobacterium prausnitzii</i> (reclassée <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)	Firmicutes classe des Clostridia
3	6,45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Actinobacteria
4	6,2	<i>Eubacterium aerofaciens</i> (reclassée <i>Colinsella aerofaciens</i>)	Actinobacteria
5	5,58	<i>Peptostreptococcus productus -II</i> (reclassée <i>Blautia producta</i>)	Firmicutes classe des Clostridia
6	4,45	<i>Bacteroides. fragilis ss thetaiotaomicron</i> (reclassée <i>B. thetaiotaomicron</i>)	Bacteroidetes
7	3,67	<i>Eubacterium eligens</i>	Firmicutes classe des Clostridia
8	3,32	<i>Peptostreptococcus productus-I</i> (reclassée <i>Blautia producta</i>)	Firmicutes classe des Clostridia
9	3,23	<i>Eubacterium. biforme</i>	Firmicutes
10	2,45	<i>E aerofaciens-III</i>	Actinobacteria

Tableau 1 : Espèces bactériennes les plus représentées au niveau du microbiote intestinal (d'après Moore et Holdmann)

3.1.2. Limite des techniques cultures-dépendantes

Cette étude avait comme but de faire un point sur les espèces pouvant être isolées, ainsi que de discuter des limites des méthodes de culture. Les auteurs eux mêmes mettaient en avant les limites des techniques de culture et d'isolation :

- il est impossible d'isoler une espèce trop peu représentée au niveau des échantillons
- certaines bactéries nécessitaient pour leur développement de conditions d'anaérobiose plus drastiques que celles utilisées
- il est probable que certaines espèces de bactéries nécessitaient un apport de nutriments spécifiques non présents dans les milieux de culture utilisés

Les deux derniers points sont d'autant plus vrais que les études et les techniques de culture sont anciennes.

En complément de cette étude, Moore et Holdeman ont publié un article sur les problèmes posés par l'isolement et la culture des bactéries de l'intestin humain (16). Ils y discutent la fiabilité des méthodes de comptage disponibles à l'époque. Les méthodes de dilution utilisées et le comptage au microscope donnent lieu à des variations qui peuvent altérer les résultats. De même, les méthodes de transport et de conservation des échantillons vers les laboratoires bactériologiques peuvent altérer la qualité des échantillons. Ainsi, les bactéries présentes peuvent ne pas survivre au transport et ne pas se multiplier lors de la culture.

Nous voyons donc à travers ces deux publications que les méthodes disponibles durant les années 1970 se heurtaient à certaines limites technologiques et ne permettaient donc pas de déterminer la composition précise du microbiote intestinal.

3.2. Méthodes cultures-indépendantes : étude de l'homologie de séquence de l'ADN bactérien

Afin de pallier aux limites imposées par les méthodes de culture, les scientifiques se sont tournés vers des méthodes d'étude du matériel génétique porté par les bactéries composant le microbiote.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude du matériel génétique des bactéries est actuellement à la base de la caractérisation du microbiote intestinal humain. A la fin du

XX^{ème} siècle, ces méthodes permirent de confirmer les limites imposées par les méthodes de culture. En effet, il s'est avéré que 60 à 80 % des espèces observables n'étaient pas cultivables (16).

Les méthodes d'analyse sont alors devenues totalement cultures-indépendantes. Elles se basent sur une analyse du matériel génétique qui nécessite 3 étapes principales :

- phase d'extraction
- phase d'amplification
- phase d'analyse

Les méthodes d'**extraction** sont classiquement basées sur des traitements par des agents physiques et chimiques entraînant la lyse de la paroi bactérienne et la mise en suspension des constituants cellulaires.

La phase d'**amplification** du matériel génétique est réalisée par une méthode devenue maintenant très courante : **la réaction en chaîne de la polymérase** (polymerase chain reaction ou PCR). Cette méthode est développée et expliquée en annexe 1.

La phase d'**analyse consiste à comparer les séquences génomiques de plusieurs espèces** afin de déterminer si elles sont proches ou éloignées. Dans l'analyse du microbiote, deux principales méthodes sont utilisées : l'étude de l'homologie de séquence de l'ADN bactérien et l'étude des séquences des ARN ribosomiques (ARNr).

La première se base sur la notion de dénaturation de l'ADN et de ré-hybridation des deux brins d'ADN que nous avons vue plus haut. Dans l'étude par comparaison des séquences ADN, les génomes de deux bactéries à comparer sont mis en présence. Le chauffage permet la séparation des doubles brins d'ADN. Ensuite, durant la phase de refroidissement, les simples brins vont se ré-apparier par complémentarité de séquence. Il se forme alors des ADN bicaténaires hybrides, c'est à dire provenant de l'association des séquences ADN de deux souches bactériennes distinctes. Plus les séquences ADN des deux bactéries sont proches, plus les complexes formés seront stables. Cette stabilité permet d'évaluer la proximité des deux souches d'un point de vu phylogénétique.

Les études par homologie de séquence de l'ADN permettent la comparaison d'individus très proches génétiquement. Elle est utilisée notamment pour différencier les sous-espèces entre elles, ce qui la place comme un outil majeur dans la description de

nouvelles espèces bactériennes. L'I.C.S.P. recommande que chaque nouvelle souche bactérienne soit caractérisée grâce à cette technique afin d'établir sa phylogénie.

Néanmoins, elle permet de comparer les génomes d'uniquement deux individus à la fois. Elle devient donc très fastidieuse et coûteuse dans l'analyse d'échantillons complexes constitués de multiples individus. De plus, l'ADN étant une structure résistante dans le milieu extérieur, cette technique ne permet pas de distinguer le matériel génétique provenant de bactéries vivantes et de bactéries mortes.

Il semblait donc naturel d'appliquer d'autres méthodes pour étudier la complexité du microbiote intestinal humain.

3.3. Méthodes cultures-indépendantes : séquençage de la sous-unité 16S ribosomique

A l'heure actuelle, la structure la plus commode à utiliser dans l'identification des bactéries est l'ARN ribosomique (ARNr). Les ARN ribosomiques sont des structures qui se prêtent très bien à l'étude des populations bactériennes. Ce sont des structures constituées d'un enchainement d'acides nucléiques retrouvées dans l'ensemble du monde vivant (annexe 2). De plus, bien que leur structure soit similaire chez tous les individus, ils comportent des régions dites hypervariables spécifiques. Leur comparaison permet donc de différencier deux espèces bactériennes. En pratique, à partir d'un échantillon, une extraction des ADN bactériens est réalisée. La zone codant les ARNr est ensuite amplifiée et séquencée. Les séquences obtenues sont comparées à des bases de données regroupant l'ensemble des séquences connues. On peut donc, à partir des séquences d'ARNr déterminer les bactéries en présence.

3.3.1. Application du séquençage de la sous-unité 16S ribosomique

En se basant sur le séquençage de la sous-unité 16S des ARNr, Eckburg et ses collaborateurs (17) analysèrent des échantillons prélevés sur trois personnes saines au niveau des selles et de 6 zones du colon des volontaires.

Le premier point mis en avant par les auteurs est la proportion de bactéries non décrites observées ainsi que la proportion de bactéries non cultivables. D'après cette étude, 62 % des espèces étaient considérées comme nouvelles et 80 % comme non cultivables

(« Of the 395 bacterial phylotypes, 244 (62%) were novel, and 80% represented sequences from species that have not been cultivated »).

Ils mirent en évidence 395 espèces de bactéries et une espèce appartenant au domaine des Archées. La très grande majorité des espèces appartenait aux embranchements (phyla) des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*, ce qui est en accord avec les études précédemment menées sur la composition du microbiote intestinal humain. (Most of the inferred organisms were members of the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla which is concordant with other molecular analyses of the gut flora). Les *Firmicutes* regroupaient 301 espèces et étaient principalement représentés par la classe des *Clostridia*. Les *Bacteroidetes* étaient représentés par 65 espèces dont *B.thetaiotaomicron* qui était présent dans tous les échantillons. Les espèces restantes appartenaient aux phyla des *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, et *Verrucomicrobia*.

Une autre étude réalisée par Andersson (18) expose des résultats comparables à celle de Eckburg et son équipe (17) en ce qui concerne la composition quantitative du microbiote. Dans leur étude, les auteurs utilisent une méthode de séquençage récente appelée pyroséquençage. Elle permet une analyse rapide d'un grand nombre de séquences d'ARNr. Ainsi, on peut multiplier le nombre d'échantillons et être plus exhaustif qu'avec les méthodes antérieures.

Ils analysèrent donc des échantillons provenant de la gorge, de l'estomac et des fécès. D'après leurs résultats, plus de 99 % de la population bactérienne est représentée par 5 phyla principaux : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Les espèces restantes appartenaient à 9 autres phyla.

Concernant les échantillons de fécès, les auteurs trouvent des résultats similaires à ceux de Eckburg et collaborateurs. Ainsi, les *Firmicutes* représentent plus de 80 % des bactéries présentes ($81,2 \pm 11,2$) avec une très forte prédominance du genre *Clostridia*. Le deuxième phylum majoritaire est celui des *Actinobacteria* ($14,6 \pm 9,8$) avec une forte représentation du genre *Bifidobacterium*. Le phylum des *Bacteroidetes* représente 2,5 % des espèces observées ($2,5 \pm 2,6$), on observe donc une inversion de l'ordre de prépondérance de ces phyla dans cette étude par rapport à ce qui est communément admis. Les auteurs expliquent cette inversion par les variabilités inter-individuelles et par le fait que le phylum *Bacteroidetes* est très sensible à l'état de santé ou de maladie de l'hôte. De plus, les primers utilisés dans leur étude lors de la phase d'amplification sont très sensibles au phylum *Actinobacteria*. Ces arguments, sans pour autant remettre en cause la qualité de

l'étude, expliquent l'importance quantitative des *Actinobacteria* retrouvées dans les échantillons. Ils illustrent aussi comment une variation des méthodes d'étude peut influencer le résultat final, surtout lorsque la population étudiée est aussi complexe que le microbiote intestinal humain.

3.3.2. Limites du séquençage de la sous-unité 16S ribosomique

La technique de séquençage des ARNr est très puissante et utilisée dans la très grande majorité des études actuelles sur le microbiote. Elle souffre néanmoins un inconvénient : elle n'est pas quantitative. En effet, il s'avère que le gène codant pour les sous-unités ribosomiques peut se répéter dans le génome d'une bactérie (jusqu'à 14 fois). On ne peut donc pas faire une analyse quantitative précise des bactéries constituant le microbiote à partir de l'analyse des séquences codant pour les ARNr (19).

Une autre limite réside dans la difficulté de détecter les espèces les moins représentées. En effet, certains phyla sont quantitativement plus représentés (overrepresented bacterial taxa : ORB) et « diluent » les phyla quantitativement moins importants (underrepresented bacterial taxa URB) (14). Plus le nombre d'individus représentant une espèce est faible, plus il est difficile de mettre en évidence et de caractériser cette espèce. Il est possible d'atténuer ce problème en modifiant les paramètres d'étude, notamment le type d'amorce utilisé lors de la phase d'amplification. Néanmoins la détermination de la composition quantitative exacte du microbiote intestinal reste très difficile et dépendante de la sensibilité des techniques utilisées.

3.4. La différence entre fraction active et fraction totale

Les études les plus récentes se basant sur le séquençage de la sous-unité 16S ribosomique introduisent une dernière notion importante dans la caractérisation du microbiote : il faut distinguer la fraction active du microbiote de la fraction totale. Cette notion est la continuité des réserves émises sur la méthode de séquençage de la sous-unité 16S ribosomique que nous avons vu plus haut.

Dans une étude datant de juillet 2011, Peris-Bondia et collaborateurs (14) combinèrent les méthodes les plus puissantes de caractérisation et de séquençage

(pyroséquençage, séquençage de la sous-unité 16S ribosomique) avec de la cytométrie de flux (annexe 3) pour isoler et identifier les bactéries viables au sein des échantillons.

Les auteurs ont détecté 79 familles appartenant à 13 phyla par comptage sur l'ensemble des fractions (active et totale). Les phyla quantitativement majoritaires sur l'ensemble des fractions étaient :

- *Firmicutes* : 86,43 %
- *Bacteroidetes* : 9,34 %
- *Proteobacteria* : 1,51 %
- *Actinobacteria* : 1,26 %

La comparaison des fractions actives et des fractions totales apporte un élément nouveau : sur les 79 familles identifiées, seules 46 se retrouvent dans la fraction totale. Cela confirme que certaines familles (appartenant aux URB) sont diluées par les familles majoritairement présentes au niveau des selles. Elles ne seront donc pas détectées par des méthodes classiques dans les fractions totales.

Une famille est considérée comme appartenant aux URB si elle représente moins de 1 % des bactéries présentes dans une fraction donnée. Les auteurs ont observé qu'elles représentaient 39 familles sur 46 dans la fraction totale et 65 familles sur 73 dans les fractions actives. Elles représentaient respectivement 5,69 % et 7,39 % des bactéries présentes dans chaque fraction. La diversité de notre microbiote intestinal est donc représentée par moins de 8 % du nombre d'individus le constituant (résultats résumés dans le tableau 2).

	Fraction totale	Fractions actives
Nombre de familles détectées	46	73
Nombre de familles appartenant aux URB	39	65
Rapport quantitatif des URB sur la fraction total	5,69 %	7,39 %

Tableau 2 : Place des URB dans les différentes fractions du microbiote

Nous pouvons donc voir par cette étude qu'il est important de distinguer la fraction active du microbiote intestinal de la fraction totale. La représentation quantitative ne laisse en effet pas préjuger de l'activité que peuvent avoir les bactéries au niveau intestinal (Figure 6).

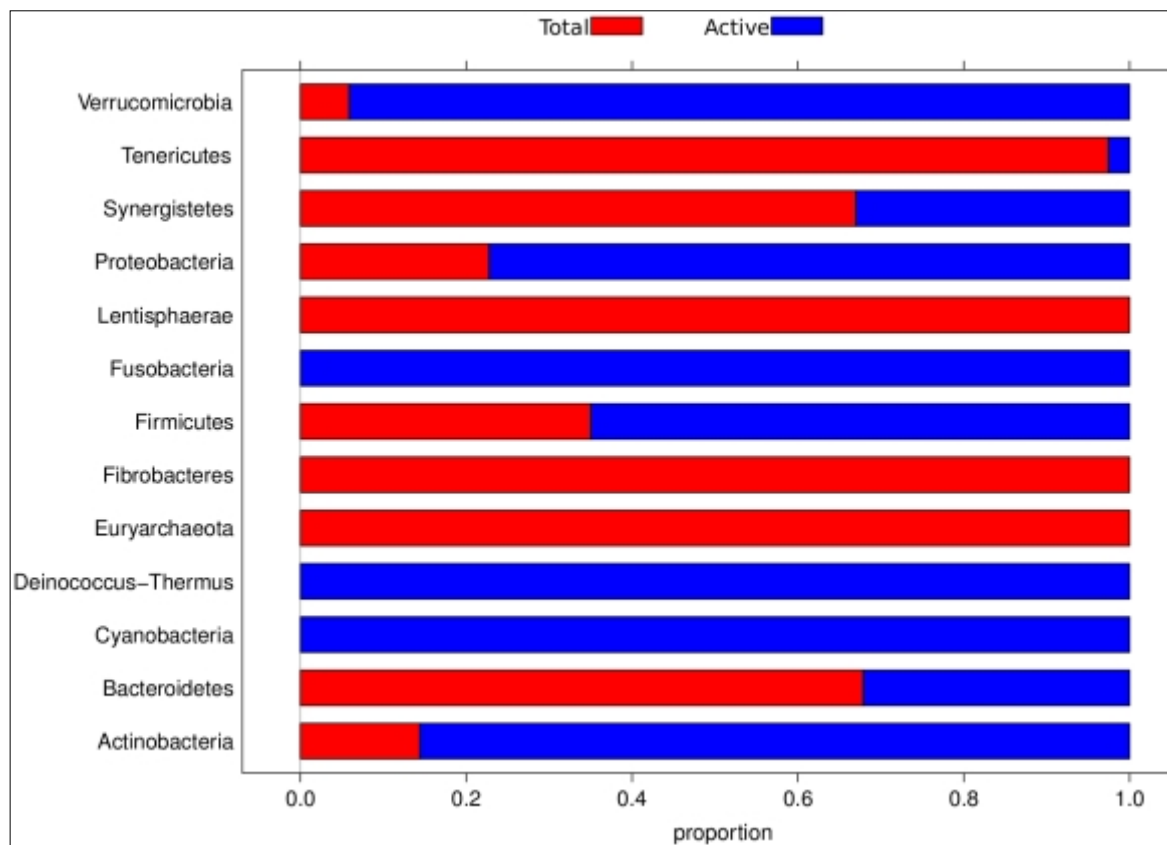


Figure 6 : Représentation de la fraction active du microbiote (Peris-Bondia et collaborateurs)

3.5. Comparaison des différentes méthodes

L'évolution des techniques bactériologiques et de génomique permet maintenant de mieux définir le microbiote intestinal. Les méthodes cultures-dépendantes souffraient de nombreux biais que les méthodes plus récentes permettent d'écarter en partie. Certaines précautions sont néanmoins nécessaires dans l'interprétation des résultats de telles méthodes. Notre étude a permis de montrer que le manque de sensibilité, notamment concernant les espèces sous-représentées, était un facteur limitant. L'association de plusieurs techniques d'étude devient alors le seul moyen d'améliorer l'objectivité des résultats. Nous résumons dans le tableau suivant les avantages et les inconvénients des techniques que nous avons présentées précédemment.

	Méthodes de culture (15), (16)	Hybridation ADN/ADN	Séquençage sous- unité 16S ribosomique (17)	Séquençage couplé aux techniques de séparation (20)
Principe	Isolation, mise en culture et comptage.	Comparaison des séquences ADN par hybridation.	Séquençage des gènes codant pour les sous-unités 16S ribosomiques.	Idem + séparation des cellules par cytométrie de flux.
Avantages	Ne prend en compte que les bactéries vivantes.	Permet de distinguer des individus très proches phylogénétiquement.	Facile à mettre en place en routine Technique puissante	Idem + analyse quantitative possible.
Inconvénients	Ne met en évidence que les bactéries cultivables. Méthodes de comptage très aléatoires. Méthodes dépendantes des conditions de conservation des échantillons.	Méthode coûteuse à grande échelle. Comparaison des individus deux à deux. Pas de distinction mort/viable.	Faiblement quantitative (19) Faible détection des URB si utilisée sur milieux complexes (14) Séquençage dépendant des amorces utilisées	Séquençage dépendant des amorces utilisées
Principales utilisations	En laboratoire, bactériologie clinique.	Distinction des sous-espèces entre elles.	Analyse des microbiotes complexes Diagnostic en bactériologie clinique	Analyse des microbiotes complexes.

Tableau 3 : Comparaisons des méthodes d'étude du microbiote

Quelle que soit la méthode utilisée, la diversité du microbiote intestinal humain est étudiée depuis plusieurs décennies. Les méthodes cultures-dépendantes ont montré de nombreuses limites. Les méthodes cultures-indépendantes, non dépourvues de biais, s'avèrent plus exhaustives. Elles nécessitent un travail d'analyse des résultats bruts et de discussion qui permet aux auteurs de conclure sur la composition quantitative et qualitative du microbiote.

Une synthèse des différentes approches cultures-indépendantes nous permet d'avoir une vue d'ensemble de la composition du microbiote : **90 % de notre microbiote regroupe des espèces appartenant à 4 phylas : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*** (14) (17). Les genres bactériens les plus représentés sont *Clostridia* (*Firmicutes*) et *Bacteroides* (*Bacteroidetes*). **La diversité du microbiote est donc représenté par un très faible pourcentage de la population bactérienne** car la faible proportion restante regroupe au moins 9 phyla différents (18). Enfin, **une analyse**

quantitative ne semble pas suffisante pour appréhender les fonctions du microbiote et de ce que l'on peut considérer comme la fraction active de celui-ci (14).

4. Espèces actives du microbiote

Dans toutes les études sur le microbiote, les auteurs utilisent le phylum pour en définir la composition. Le phylum est une unité taxonomique très élevée en systématique. Il regroupe donc de nombreuses familles bactériennes et une grande quantité de genres bactériens. Chaque genre se distingue d'un autre par ses caractéristiques, même si ils appartiennent au même phylum.

Afin d'apporter plus de clarté et de précision dans notre étude de la composition du microbiote, nous allons définir les principaux phyla que nous avons vus ainsi que les espèces essentielles les constituant. Nous nous arrêterons sur quelques espèces en raison de leur intérêt en santé humaine ou en fonction de leur importance quantitative dans le microbiote. Notre description s'appuie sur la classification du Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, sur les outils de taxonomie du site PubMed (NCBI taxonomy browser) ainsi que sur l'analyse des résultats fournis par le site du Human Microbiome Project (21).

4.1. Phylum des Firmicutes

Le phylum regroupe un très grand nombre d'espèces classées actuellement en trois classes (*Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*) regroupant elles même plusieurs dizaines d'ordres.

- Famille des Staphylococcacées : cocci gram positif, ils sont très répandus dans la nature et chez l'homme. Ils sont représentés principalement par le genre *Staphylococcus* auquel appartiennent *S. aureus* (staphylocoque doré) et les staphylocoques blancs. Au niveau du microbiote intestinal, on retrouve de **nombreuses espèces non pathogènes** telles que *S. saprophyticus*. *S.aureus* est aussi retrouvés chez certains porteurs sains. Cette famille de bactéries est très connue en raison de l'implication du staphylocoque doré dans certaines infections à germes multi-résistants. On notera aussi que certaines espèces de

staphylocoques blancs peuvent devenir opportunistes ou contaminer des zones du corps autres que leur zone de prolifération habituelle (infections urinaires, cutanées...).

- Famille des Lactobacillacées : bacille gram positif, ils sont très connus en raison de leur **utilisation en tant que pro-biotiques**. Ce sont des commensaux du microbiote vaginal et intestinal. Ils ont la particularité de réguler l'acidité d'un milieu par production d'acide lactique. En raison des bénéfices sur la santé avancés par certaines études, on les retrouve dans la composition de nombreux médicaments ou aliments portant l'allégation « pro-biotiques ». Les plus couramment utilisés sont *L. acidophilus* (PROBIOLOG®), *L. helveticus* (IMMUNOSTIM®, LACTIBIANE® référence) ou *L. casei* (ACTIMEL®). L'utilisation de ces souches se base sur des études étudiant le bénéfice qu'elles apportent sur la santé humaine. Il convient de garder une certaine réserve sur de telles études, la communauté scientifique n'ayant pas reconnu leur bénéfice de manière formelle. Par ailleurs, les instances décisionnelles ne reconnaissent pas ces allégations pour le moment. Il semblerait néanmoins que l'utilisation de certaines bactéries en tant que pro-biotiques exerce un effet bénéfique sur la santé humaine (22) même si de telles conclusions sont encore sujet à discussion.

- Famille des Streptococcacées : cocci gram positif, elle contient les genres *Enterococcus* et *Streptococcus*. Les premiers sont des constituants normaux du microbiote. Le genre *Streptococcus* est constitué d'espèces commensales de la flore oro-pharyngée et d'espèces à fort pouvoir pathogène (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*). Elles sont couramment retrouvées en tant qu'agents d'infections cutanées ou pulmonaires. De nombreuses espèces sont commensales de l'intestin, sans pouvoir pathogène.

- Famille des Clostridiacées : bacille **anaérobie strict** (ne pouvant pas se développer en présence d'oxygène). En raison de leurs exigences culturelles, les espèces de cette famille représentent une portion du microbiote difficile à explorer. Cela explique que les études se basant sur des techniques cultures-dépendantes n'aient répertorié que peu d'espèces appartenant à cette famille. Leur étude a donc été grandement facilitée par l'apparition des techniques cultures-indépendantes et on sait maintenant que les espèces la composant sont quantitativement très importantes au sein du microbiote. On y distingue les

espèces commensales des espèces pathogènes responsables d'infections graves (*C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile*).

4.2. Phylum des *Tenericutes*

Nous citerons ce phylum en raison de son origine. Il regroupe des espèces anciennement classées dans le phylum des *Firmicutes*. Leur séparation s'appuie sur des arguments structurels (structures cellulaires différentes) et phylogénétiques. Le phylum des *Tenericutes* comprend une seule classe, celles des *Mollicutes* (genre *Mycoplasma*, *Entoloplasma*...). Il nous semblait important de citer ce phylum car il est parfois considéré comme appartenant au phylum des *Firmicutes* dans les études sur le microbiote.

4.3. Phylum des *Bacteroidetes*

De même que pour le phylum des *Firmicutes*, le phylum des *Bacteroidetes* regroupe quatre classes et plusieurs dizaines d'ordres. Les quatre classes sont *Bacteroidia*, *Flavobacteriia*, *Sphingobacteriia* et *Cytophagia* d'après la classification la plus récente du Bergey's Manual.

- Famille des Bacteroidacées : bacille gram négatif **anaérobie strict**. L'espèce type de cette famille est *Bacteroides fragilis*, commensale du tube digestif humain mais qui peut être responsable de suppuration intestinale lors d'actes chirurgicaux. *Bacteroides thetaiotaomicron* est également une espèce largement représentée dans le microbiote intestinal et couramment utilisée dans les études sur l'influence de ce dernier. Cette espèce est en effet utilisée pour re-coloniser des souris axéniques et ainsi étudier les modifications qu'entraîne le microbiote sur l'organisme de l'hôte. Elle occupe donc une place importante dans le phylum *Bacteroidetes* car considérée comme l'espèce de référence lorsque l'on étudie le microbiote. En complément de ces deux espèces, il existe plusieurs dizaines d'espèces telles que *B. intestinalis*, *B. cellulosilyticus* ou *B. pyogenes*. Ces dernières sont considérées comme éloignées des deux premières si bien que certaines études proposent de les classer dans un genre différent.

- Familles des Prevotellacées : bacille gram négatif **anaérobie strict**. Cette famille est constituée de bactéries appartenant initialement à la famille des Bacteroidacées. Le regroupement de plusieurs espèces a abouti à la création du genre Prevotella et de la famille Prevotellacées. Les deux familles sont néanmoins encore considérées comme très proches dans les classifications.

4.4. Phylum des Proteobacteria

Ce phylum comprend quatre classes principales : *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Zeta-proteobacteria*. Celle qui nous intéresse dans le microbiote est la troisième car elle regroupe de nombreuses espèces dont certaines très connues par leur implication dans des infections graves ou à grande échelle (*Escherichia coli*, *Legionella sp*, *Pasteurella sp*...).

- Famille des Entérobactériacées : bactérie gram négatif. Elles ont la capacité de se multiplier dans de très nombreux biotopes et sont donc très répandues dans l'environnement et dans notre microbiote. Elles sont commensales du tube digestif, mais peuvent devenir opportunistes ou pathogènes de l'homme. Cette famille regroupe de très nombreux genres séparés par leurs caractères morphologiques et culturels. La plus connue des espèces de ce phylum est *Escherichia coli* en raison de son implication dans de nombreuses infections communautaires (infections urinaires, diarrhées infectieuses, syndrome dysentérique...). Au niveau du microbiote intestinal, on retrouve beaucoup d'autres espèces appartenant à cette famille : *Proteus mirabilis*, *Providencia sp*, *Enterobacter cloacae*... On notera que de nombreuses espèces des Entérobactériacées ne font pas partie du microbiote intestinal normal mais peuvent être retrouvées en tant que parasite ou dans la flore transitoire : *Shigella sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*....

- Subdivision epsilon/delta : cette subdivision contient l'espèce *Helicobacter pylori*. Cette espèce et ses multiples sous-espèces sont retrouvées dans le microbiote en tant que bactéries commensales. Elle est normalement non pathogène mais peut être responsable d'infections du tube digestif, notamment de colites pseudo-membraneuses, maladie communautaire fréquente.

4.5. *Phylum des Actinobacteria*

Ce phylum comprend six classes dont une va nous intéresser particulièrement : celle des *Actinobacteria*, qui contient la famille des Bifidobactériacées.

- Famille des Bifidobactériacées : bacille gram négatif **anaérobie strict**. Cette famille comprend l'ordre *Bifidobacterium* dont on retrouve de très nombreuses espèces au niveau du microbiote (*B.longum*, *B.lactis*, *B.bifidum*...). Ce genre est **utilisé en tant que probiotique** par de nombreux laboratoires. Ces derniers développant des souches spécifiques de bactéries du genre *Bifidobacterium* en mettant en avant les bénéfices qu'elles peuvent apporter sur la santé. De même que pour le genre *Lactobacillus*, les allégations avancées par les laboratoires concernant le bénéfice apporté doivent être considérées avec précaution.

4.6. *Phylum des Fusobacteria*

Ce phylum ne comprend qu'une classe (*Fusobacteriia*) et un ordre (*Fusobacteriales*). L'espèce type de la famille des Fusobactériacées est *Fusobacteria nucleatum*. Nous citons ce phylum en raison de son importance quantitative et de l'activité de cette fraction du microbiote (Figure 6). L'activité de ce phylum au sein du microbiote n'a pas encore été explorée avec précision.

5. L'avènement de la métagénomique

La composition du microbiote intestinal humain est maintenant bien définie. Les techniques cultures-indépendantes disponibles permettent de détecter et de caractériser avec une bonne précision les espèces en présence.

Nous l'avons défini plus haut, un organisme interagit avec son environnement par l'intermédiaire des produits d'expression de ses gènes. La stratégie actuelle dans l'étude du microbiote consiste donc à se focaliser sur le matériel génétique du microbiote plus que sur chaque individu le constituant. C'est ce que l'on appelle une approche métagénomique.

Le but est donc d'extraire l'ensemble du métagénome, de le séquencer et de le décrypter. Le séquençage d'un tel nombre de gènes est rendu possible par les nouvelles techniques de séquençage (techniques dites de 3^{ème} génération). La création de banques de gènes et des produits d'expression qui leur sont associés est le but ultime des études de métagénomiques. Ces études associent donc des analyses sur le métagénome proprement dit et sur l'analyse des ARNr qui reste une des structures les plus commodes à analyser dans l'étude des populations bactériennes. On sait maintenant que le catalogue de gènes du métagénome intestinal humain est constitué de plus de 3,3 millions de gènes soit 150 fois plus que dans notre propre génome (23). Il ne correspond qu'à environ 1000 espèces bactériennes différentes, ce qui révèle que notre flore intestinale n'est constituée que d'un nombre limité et non excessif de bactéries. Chaque individu abrite au moins 160 espèces. Il peut alors être défini par son entérotype propre en fonction des espèces occupant sa flore intestinale. Les études préliminaires ont défini trois entérotypes (13) associés à trois genres bactériens prévalents : *Bacteroides* (phylum *Bacteroidetes*), *Prevotella* (phylum *Bacteroidetes*) et *Ruminococcus* (phylum *Firmicutes*). La compréhension que nous avons des entérotypes ne permet pour le moment pas de connaître les facteurs déterminant leur composition. Des études portant sur un nombre élevé d'échantillons et sur des populations différentes vont sûrement permettre de répondre aux questions entourant les entérotypes et le métagénome.

Actuellement, deux études à grande échelle sont en cours : MetaHit en Europe et Human Microbiome Project aux USA. Le projet **MetaHit** (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) (24) est un projet européen regroupant les unités de recherche de 8 pays. Son objectif principal est de **trouver les relations qui lient le microbiome (et le métagénome) de notre intestin avec un état de bonne ou de mauvaise santé**. Pour ce faire, les chercheurs proposent de référencer l'ensemble des gènes portés par le métagénome, d'en chercher la fonction et de connaître la fréquence à laquelle ils sont retrouvés chez différents individus.

Outre Atlantique, the **Human Microbiome Project** (21) est porté par the National Institute of Health. **L'objectif de ce projet est de répertorier l'ensemble des espèces constituant les microbiotes de l'Homme**. Cela comprend le microbiote intestinal mais aussi cutané, génital...Le second objectif, est d'étudier l'influence de ces microbiotes sur la santé. Les premiers résultats du projet HMP ont été présentés dans une publication datant du 12 juin 2012. Le projet étant d'étudier l'ensemble du métagénome humain, les résultats

décrits portent sur les microbiotes de plusieurs zones du corps (peau, tube digestif, cavité oro-pharyngée). Les auteurs y expliquent d'abord la grande diversité des souches bactériennes retrouvées ainsi que les variabilités interindividuelles. Les fonctions métaboliques portées par le microbiote sont ensuite explorées.

Outre la confirmation de la composition des microbiotes, ces deux projets vont nous permettre de comprendre la relation étroite que nous entretenons avec les bactéries commensales de notre organisme. En pratique, les microbiotes vont devenir des cibles thérapeutiques importantes. En le modifiant, nous pourrions améliorer notre état de santé ou traiter un état pathologique.

Cette première partie nous a permis de définir la prochaine frontière que les scientifiques devront franchir pour comprendre le métabolisme humain : le microbiote intestinal humain, le matériel génétique qu'il porte (métagénome) et le produit d'expression de ses gènes (microbiome).

Nous avons défini le microbiote d'un point de vue quantitatif : 4 phyla bactériens regroupent plus de 90 % du microbiote intestinal. Le reste du microbiote ne représente qu'un nombre restreint d'individus mais représente sa diversité en raison du nombre d'espèces différentes qu'il porte. Cet ensemble complexe interagit avec notre métabolisme, influence un état de santé ou de pathologie. Cet aspect du microbiote est actuellement exploré par les projets MetaHIT et HMP. Les résultats de ces projets pourront peut-être nous permettre de mettre en place des stratégies thérapeutiques basées sur une modification des microbiotes.

Mais avant de modifier le microbiote pour qu'il devienne un pilier thérapeutique, nous devons comprendre comment il influence notre organisme. Nous allons donc dans une deuxième partie explorer les grandes voies métaboliques de notre organisme et l'activité que peut avoir le microbiote intestinal sur celles-ci.

Partie II :

Répercussions physiologiques et métaboliques du microbiote sur l'hôte

L'amélioration des techniques d'étude du microbiote intestinal a permis de confirmer sa grande complexité. Le nombre d'espèces le constituant est estimé à plus de 400 et son influence sur notre santé n'est plus à démontrer. Il est alors légitime de rechercher les interactions liant notre microbiote intestinal et notre organisme. Le microbiote intestinal doit désormais être considéré comme un organe à part entière dont il faut comprendre le fonctionnement.

L'intestin appartient au tube digestif. Cette surface d'échange avec l'extérieur a pour rôle de filtrer les substances entrant en contact avec notre organisme. L'intestin est une des premières barrières immunitaires entre notre milieu intérieur et l'environnement extérieur. Cette immunité est en partie rendue possible par le microbiote intestinal intrinsèquement lié à la muqueuse intestinale.

Le tube digestif est par ailleurs le siège de la digestion. Au niveau de l'intestin, les aliments sont assimilés en vue de fournir les éléments essentiels à l'organisme humain. Les sucres, les protéines, les graisses sont transformés et absorbés par la muqueuse intestinale et le microbiote y participe d'une façon importante.

Nous allons donc, dans cette deuxième, partie explorer l'influence du microbiote sur la muqueuse intestinale et sur ses fonctions. La modification de l'anatomie et de la physiologie intestinale sera notre premier axe de réflexion car influençant l'ensemble des fonctions de l'intestin. Nous nous attarderons ensuite sur les principales voies métaboliques de l'organisme et sur les interactions du microbiote avec celles-ci. Notre exposé nous permettra aussi de faire des rappels sur les métabolismes glucidiques et lipidiques, indispensables pour appréhender les interactions microbiote-organisme humain. Enfin, nous verrons que le microbiote par sa présence et sa composition participe au développement et au maintien de l'immunité intestinale.

1. Microbiote et physiologie intestinale

Plusieurs portions constituent le tube digestif humain : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (Figure 7). Il est considéré comme appartenant au milieu extérieur et peut donc être comparé à la peau en ce qui concerne sa fonction de protection. La deuxième fonction du tube digestif est la digestion et la résorption des nutriments. Cela explique une grande disparité histologique entre ses différentes portions.

L'observation histologique montre une grande évolution dans la paroi du tube digestif. Cette évolution est corrélée aux différentes fonctions des portions du tube digestif. Ainsi, la bouche, l'œsophage et l'estomac sont dédiés à la digestion proprement dite, c'est à dire une réduction des aliments à une taille moléculaire. Les aliments sont ensuite absorbés sous forme de nutriments au niveau de l'intestin grêle et du gros intestin (25). **L'intestin est la portion du tube digestif qui va nous intéresser ici.** Elle est la principale zone de résorption des nutriments et elle **héberge le microbiote intestinal**, sujet de notre exposé.

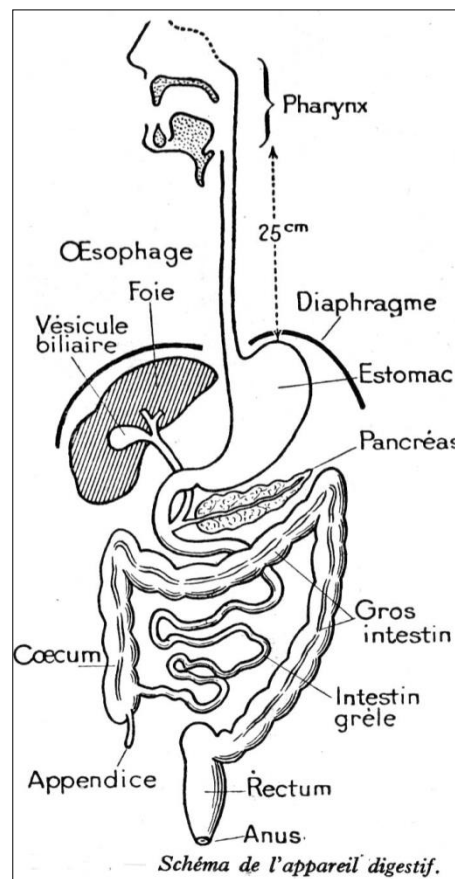


Figure 7 : Schéma du tube digestif humain (svt5eviora.wordpress.com)

1.1. Rappels physiologiques

L'intestin grêle mesure en moyenne 6 mètres de long pour un diamètre de 2,5 centimètres. On considère que **l'intestin a deux principales fonctions** :

- la **protection** mécanique et immunologique contre les facteurs extérieurs
- l'**absorption** des molécules essentielles au corps humain sous forme de nutriments. Cette absorption est aussi appelée résorption.

La muqueuse intestinale doit donc être capable d'absorber certaines molécules essentielles tout en empêchant la pénétration de molécules ou d'organismes potentiellement pathogènes. Ce double rôle est rendu possible grâce aux cellules la constituant.

1.1.1. Rappels histologiques

La paroi intestinale est constituée de cellules très différenciées qui ont chacune leur rôle propre (figure 8) (25) (26) :

- **l'entérocyte** : cellule de la résorption des nutriments. Elle dispose à son pôle apical d'une structure en brosse augmentant la surface en contact avec la lumière du tube digestif. Cela permet d'augmenter la quantité de nutriments pouvant être résorbée.

- les cellules caliciformes : elles sécrètent du mucus ayant un rôle à la fois de facilitation de la résorption et un rôle de protection mécanique.

- les cellules neuro-endocrines : présentes principalement à la base des cryptes, elles sécrètent des hormones de régulation de la digestion (gastric inhibiting peptid, sécrétion acide...) et de la contraction musculaire de l'intestin (CCK...).

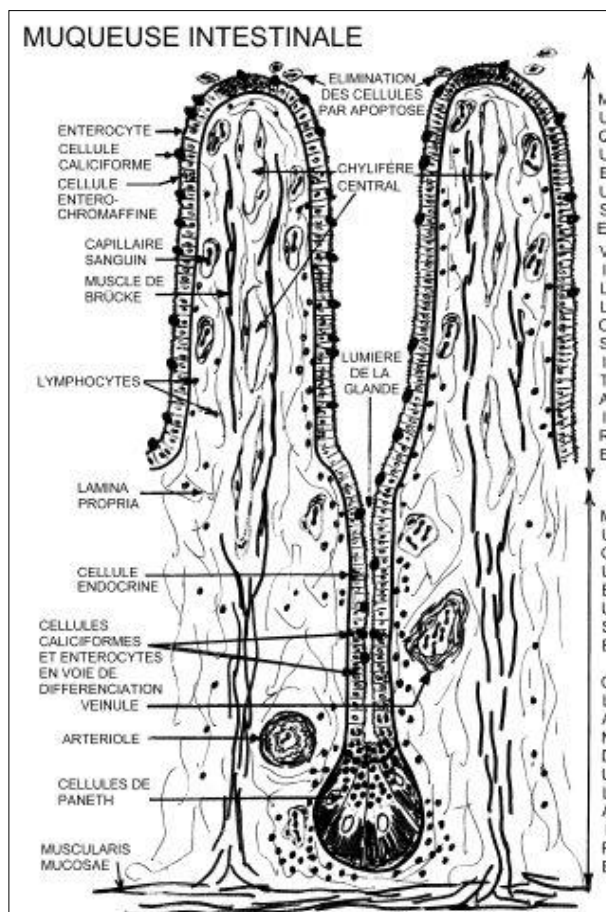


Figure 8 : Structure des villosités intestinales (db-gersite.com)

- les cellules de Paneth : elles représentent la première défense immunologique de l'intestin grêle. Ce sont des cellules excrétrices de médiateurs antimicrobiens (lysosymes, défensines...) (27).

Comme nous l'avons vu, une des principales fonctions du tube digestif est la résorption des nutriments. Cette résorption est réalisée au niveau de l'intestin dont la structure est adaptée à cette fonction. Ainsi, la surface de contact entre la muqueuse intestinale et le milieu extérieur est augmentée par plusieurs mécanismes (28) :

- les replis que réalise l'intestin dans l'abdomen
- la présence de replis macroscopiques au niveau de la paroi (valvules conniventes)
- les villosités dues à un soulèvement des couches cellulaires de la muqueuse

- les micro-villosités au niveau des entérocytes

La villosité intestinale est considérée comme **l'unité fonctionnelle** de base car elle regroupe l'ensemble des cellules que nous avons citées précédemment. Au niveau des cryptes de ces villosités se trouvent des cellules non différenciées qui vont donner naissance aux cellules constitutives de l'intestin. A partir de cette couche germinative, les futures cellules de Paneth vont migrer vers le fond de la crypte tandis que les cellules caliciformes et les entérocytes vont migrer vers la partie apicale de la villosité. A terme, les cellules les plus anciennes sont éliminées par desquamation.

1.1.2. Rappel sur la résorption des nutriments

Une fois digérés par l'estomac, les aliments évoluent dans l'intestin en vue d'être assimilés sous forme de nutriments. La digestion préalable par les enzymes salivaires, hépatiques et pancréatiques a permis aux aliments d'être réduits à des formes moléculaires facilement assimilables. L'absorption intestinale peut alors être effectuée par 3 mécanismes au niveau de l'entérocyte (25) :

- diffusion para-cellulaire, à travers le ciment de jonction des cellules
- diffusion à travers la paroi cellulaire (simple ou facilitée) de l'entérocyte
- transport actif par action de complexes enzymatiques de transport

L'absorption intestinale permet aux éléments contenus dans le tube digestif d'être ainsi assimilés sous forme de nutriments.

Les nutriments rejoignent alors la circulation sanguine afin d'être distribués dans les différents tissus du corps. L'intestin est irrigué par un réseau d'artères et de veines drainant un très grand volume de sang. Le réseau afférent vers l'intestin permet de fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement des cellules intestinales. Le réseau efférent permet aux nutriments d'être acheminés vers les organes du corps. Ils sont ensuite utilisés directement par certains organes (cerveau, muscles) ou stockés (tissus adipeux, foie).

En complément du **réseau artério-veineux intestinal**, on peut observer un tissu musculaire complexe, entourant l'intestin grêle. Il est constitué de fibres musculaires lisses lui procurant une « mobilité ». Dans le cas de l'intestin grêle, cette mobilité est appelée **motilité intestinale**. Cette motilité est sous l'influence du système nerveux autonome, par l'intermédiaire des fibres sympathiques et para-sympathiques (29). Elle permet de modifier

le temps de séjour des aliments dans l'intestin grêle et a donc une grande influence sur la quantité de nutriments disponibles. Elle peut être augmentée ou diminuée par de nombreux facteurs, notamment l'activité physique, un état pathologique, certains médicaments ou le microbiote intestinal.

1.2. Influence du microbiote

De nombreuses études sur l'influence du microbiote dans l'anatomie et la physiologie de l'intestin ont été réalisées. Elles se basent pour la plupart sur des modèles animaux, notamment des modèles de souris. Le principe utilisé dans toutes les études que nous verrons consiste à comparer des souris normales, dites holoxéniques ou conventionnelles, et des souris élevées dans un environnement stérile, dites axéniques (germ-free). **Les souris conventionnelles** sont des souris élevées dans un environnement non stérile et **disposent donc d'un microbiote intestinal intact. Les souris axéniques sont des souris dont le microbiote est totalement absent.** La comparaison de l'état de santé, du métabolisme, ou d'autres paramètres des deux types de souris, permet de comprendre l'influence du microbiote sur l'hôte. Le modèle murin permet de plus d'investiguer les mécanismes mis en jeu, chose qu'il est parfois difficile de faire sur un modèle humain.

1.2.1. Augmentation de la motilité intestinale

Nous avons défini la motilité intestinale. C'est une contraction réflexe des muscles entourant l'intestin permettant aux aliments d'évoluer dans le tractus intestinal. Elle est le fruit de la contraction des fibres lisses entourant l'intestin grêle et favorise l'assimilation des nutriments par notre organisme. Cette contraction, comme toutes les contractions musculaires, est régulée par un courant bioélectrique créé par un mouvement d'ions à travers les parois des cellules musculaires.

Chez les souris conventionnelles, les études concernant ce courant bioélectrique ont montré une augmentation de la fréquence de dépolarisation des fibres du muscle lisse intestinal (30). Il s'avère alors que **les souris conventionnelles** (avec un microbiote « normal ») **ont une motilité intestinale plus importante par rapport à celles dépourvues de microbiote.** Il a de plus été montré que cet effet est réversible. La

recolonisation de souris axéniques par des bactéries permet un retour à la normale de la motilité intestinale (31).

Plusieurs mécanismes ont été étudiés pour comprendre comment le microbiote pouvait modifier la motilité intestinale. Barbara et collaborateurs proposent 3 hypothèses (32) :

- par la libération de médiateurs bactériens ou de produits de fermentation des aliments ingérés par l'hôte.
- par la libération de facteurs intestinaux neuro-endocrines.
- par l'activation du système immunitaire et libération de médiateurs de l'immunité.

Ces trois mécanismes, loin d'être opposés, peuvent être vus comme complémentaires. Actuellement, les études réalisées sur l'influence du microbiote sur la motilité intestinale ne permettent pas de conclure sur un mécanisme précis.

1.2.2. Modification de la vascularisation intestinale

L'intestin est un organe fortement vascularisé en raison de sa fonction et de ses besoins. Il est constitué d'un réseau vasculaire complexe. Ce réseau artério-veineux a deux fonctions principales :

- acheminer les nutriments et l'oxygène nécessaires au fonctionnement de l'intestin. Ce rôle est tenu par un flux artériel en provenance du cœur (réseau afférent) contenant un sang riche en oxygène et en nutriments.
- transporter les nutriments issus de la digestion vers les organes de stockage et les organes qui les utilisent immédiatement (cerveau, muscles). Ce rôle est tenu par le système porte-hépatique qui relie l'intestin et le foie (réseau efférent).

On comprend alors les conséquences que peut entraîner une modification de ce réseau dans le bon fonctionnement de l'intestin et de l'ensemble de l'organisme.

En 2002, Stappenbeck et collaborateurs (33) étudièrent l'angiogenèse de l'intestin de souris en présence et en absence de microbiote (souris normales versus souris axéniques). Ils développèrent une technique permettant une observation tridimensionnelle du réseau artério-veineux. Dans la première partie de leur étude, ils mirent en évidence que **les souris « normales » disposaient d'une micro-vascularisation plus développée que**

leurs congénères axéniques. Ensuite, ils montrèrent que l'on pouvait restaurer un réseau vasculaire normal par recolonisation des souris axéniques par des bactéries (ils utilisent alors *Bacteroides thetaiotaomicron*, bactérie présente en grande quantité dans le microbiote normal humain et murin). L'augmentation de densité du réseau vasculaire était donc en lien direct avec la présence du microbiote.

Dans un deuxième temps, ils démontrèrent que **la présence des cellules de Paneth** (cellules clés de l'immunité intestinale -voir 1.1.1.-) **était indispensable au développement d'une micro-vascularisation**, que ce soit chez les souris normales ou axéniques.

La présence du microbiote intestinal modifie donc la structure du réseau vasculaire entourant l'intestin. Le mécanisme mis en cause reste encore inconnu, même s'il a été montré que certaines cellules de l'immunité (cellules de Paneth) jouaient un rôle clé dans la construction de l'édifice vasculaire.

Le **microbiote**, en **augmentant la motilité intestinale et la densité du réseau vasculaire** modifie donc l'architecture globale de l'intestin. Une augmentation de la motilité peut avoir pour effet de diminuer la durée de séjour des aliments dans l'intestin et donc diminuer la quantité d'énergie extraite à partir de l'alimentation. A contrario, une augmentation de la densité du réseau artério-veineux peut faciliter la pénétration des éléments nutritifs dans l'organisme. Au vue de ces deux données, il semble difficile de connaître les conséquences de la présence du microbiote sur la fonction nutritive de l'intestin.

Afin d'aller plus avant dans l'étude du microbiote intestinal, nous allons donc voir l'influence du microbiote sur les grandes fonctions métaboliques.

2. Influence sur le métabolisme lipidique

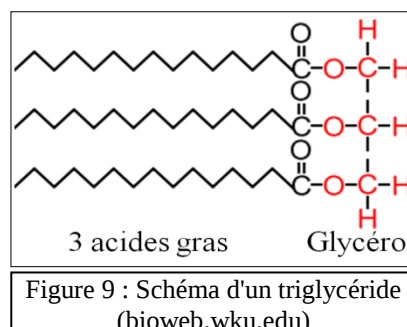
Le microbiote a une influence sur l'ensemble du corps humain et sur son fonctionnement. Son influence sur le métabolisme lipidique est très importante si bien que de nombreuses études ont démontré une corrélation entre le microbiote et l'obésité ou certaines pathologies (diabète sucré, maladie de Crohn...). En 2006, l'équipe de Gordon a montré que le transfert du microbiote de souris obèses chez des souris axéniques favorisait l'augmentation de leur poids.

Cette corrélation s'explique en partie par les relations complexes entre notre microbiote et le métabolisme des lipides. Afin d'exposer comment notre microbiote influence ces voies métaboliques majeures, nous allons en voir les principales étapes. Nous partirons des lipides alimentaires pour arriver aux lipides constituant nos tissus.

2.1. De la graisse alimentaire au nutriment lipidique

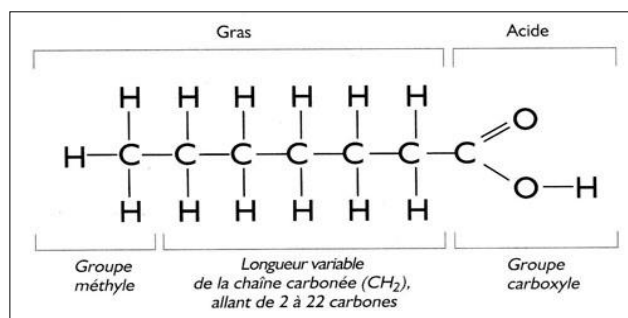
Nous avons vu plus haut que tous les aliments que nous absorbons sont digérés au niveau du tube digestif. Les graisses, ou **lipides**, sont retrouvées dans l'alimentation ou dans l'organisme sous différentes formes. Elles ont en commun d'être constituées d'un enchaînement d'atomes de carbone, ce qui leur confère une grande lipophilie et les rend peu solubles dans les composés polaires tels que l'eau. Il existe plusieurs classifications des lipides. La plus simple est certainement celle se basant sur leur structure proposée par Hennen en 1995 (34) (35) :

- **les triglycérides** (TG) ou triacylglycérol, qui sont les constituants majoritaires de l'alimentation (Figure 9). Ils sont composés d'un glycérol (en rouge) sur lequel sont estérifiés trois acides gras (en noir).



- les glycérophospholipides, de structure proche des triglycérides. L'acide gras situé en position 3 est remplacé par un groupement phosphate sur lequel se greffent différents radicaux (inositol, choline...). On les retrouve en tant que constituant des membranes cellulaires.

- **les acides gras** : constitués d'un squelette carboné linéaire, ils ont majoritairement pour origine l'hydrolyse d'une des fonctions ester d'un triglycéride. Leur fonction acide carboxylique leur confère une relative hydrophilie par rapport aux autres lipides (Figure 10). Leur amphiphilie permet une diffusion passive à travers la bicouche lipidique constituant la membrane cellulaire.



- les stérols et stéroïdes : principalement représentés par le **cholestérol** dans le monde animal, ils sont constitués d'un noyau carboné à 4 cycles qui leur confère une grande lipophilie. Une estérification du groupement hydroxyle situé sur le troisième carbone (figure 11) permet de moduler la polarité de la molécule. La forme 3'-OH donnera un caractère hydrophile au stéroïde, tandis qu'une estérification la rendra pratiquement apolaire.

- les sphingolipides : ils résultent d'une réaction d'amidification de l'amine d'une sphingosine avec l'ester d'un triglycéride. Ce sont des constituants de la membrane plasmique des cellules.

- les terpénoïdes, précurseurs de certaines vitamines (A, D, E, K) et du cholestérol. Ils correspondent à une association de deux structures de bases composées de 5 carbones : l'isopentyl pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP).

Dans l'alimentation **les lipides sont principalement ingérés sous forme de triglycérides** (95 à 98 % des lipides ingérés (36)), de cholestérol et d'acides gras libres. Bien que faiblement représentés dans l'alimentation, certains acides gras libres sont considérés comme essentiels car non synthétisés par l'organisme. C'est le cas des acides gras insaturés, tels que les omégas 3 (acide alpha-linolénique et dérivés) et oméga 6 (acide linoléique et dérivés). De même, certaines vitamines absorbées par l'alimentation sont considérées comme essentielles car non synthétisables par notre organisme.

2.1.1. Les lipides et leurs rôles

Souvent vus comme néfastes pour l'organisme car synonymes d'obésité, les graisses alimentaires sont indispensables à son fonctionnement.

Les triglycérides sont la forme de stockage des lipides dans l'organisme. Leur hydrolyse va fournir des acides gras endogènes, source importante d'énergie pour les cellules du corps humain.

Les glycérophospholipides insérés dans la paroi cellulaire vont la rendre plus perméable. Ils sont surtout précurseurs de seconds messagers (inositol tri-phosphate, diacylglycérols (DAG), leucotriènes) ainsi que des phospholipides, principaux constituants des membranes plasmiques.

Le cholestérol, grâce à son noyau stérol va être le précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes (Figure 11). Il est aussi un constituant de la bile sous sa forme estérifiée et permet donc l'émulsification des lipides alimentaires. C'est par ailleurs un des constituants de la membrane plasmique dans laquelle il s'insère au même titre que les glycérophospholipides.

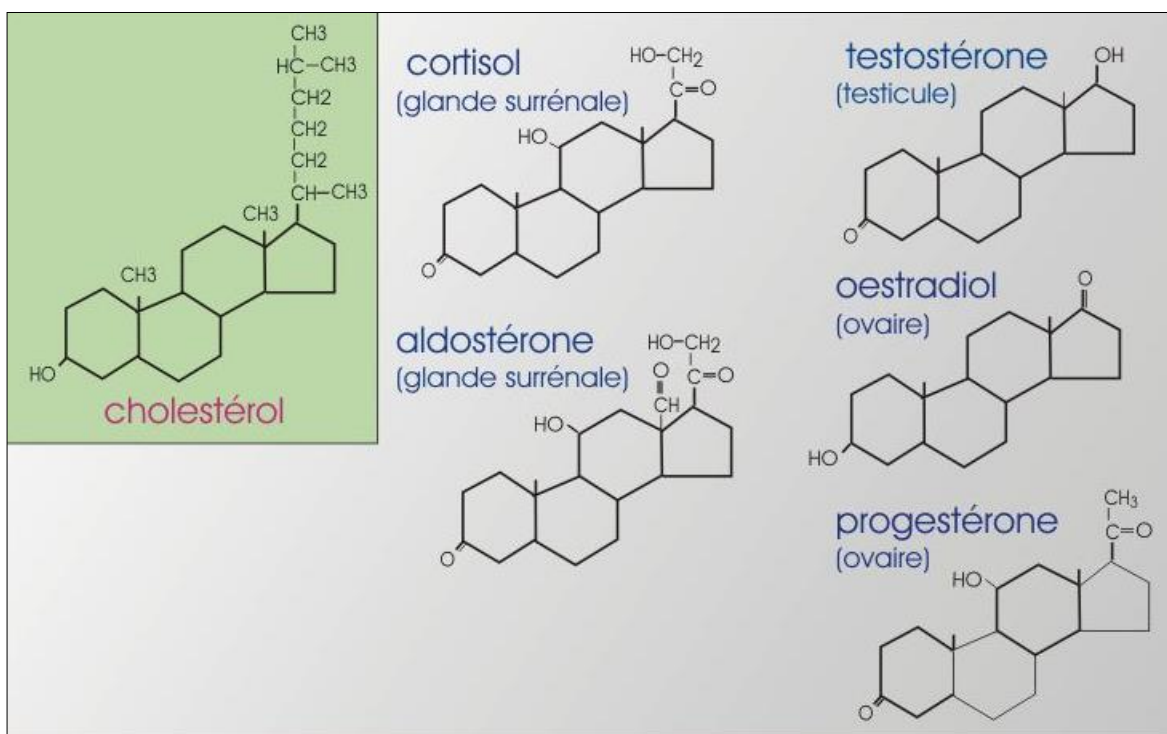


Figure 11 : Cholestérol, précurseur des hormones stéroïdiennes (ulysse.u-bordeaux.fr)

Enfin, les vitamines dites liposolubles (A, D, E, K) vont être co-facteurs de nombreuses réactions enzymatiques de l'organisme. La vitamine D par exemple est considérée comme une pro-hormone qui, après hydroxylation donnera le calcitriol, médiateur important du métabolisme phosphocalcique.

L'ensemble de ces lipides doit, au niveau de l'intestin, être absorbé par les entérocytes. Leur lipophilie fait de cette phase un processus complexe. Les lipides alimentaires doivent préalablement subir une phase d'hydrolyse et une phase d'émulsification.

2.1.2. Des graisses alimentaires aux lipides absorbables

De par leur masse moléculaire et leur grande lipophilie, la majorité des lipides alimentaires ne peut pas être absorbée en l'état au niveau de l'entérocyte. **Le rôle de la**

digestion est donc d'une part **d'en réduire la taille**, d'autre part **de les rendre suffisamment hydrophiles pour permettre leur intégration aux cellules intestinales**.

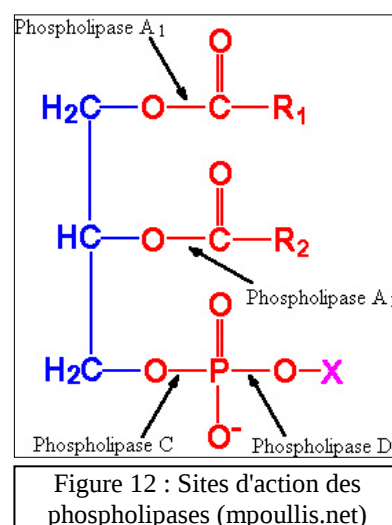
Triglycérides et glycérophospholipides subissent l'action d'enzymes spécifiques en vue de les rendre assimilables. Leur hydrolyse commence dès l'arrivée dans l'estomac par l'action de la **lipase gastrique**. Elle réalise des coupures non spécifiques sur le squelette carboné. Il en résulte la libération de premiers acides gras. Grâce à leur structure amphiphile, ils vont faciliter la digestion par deux mécanismes (37) :

- fourniture d'énergie immédiate par diffusion passive à travers la membrane cellulaire et intégration au cycle de Krebs
- début d'émulsification d'une partie des lipides alimentaires et facilitation de l'action de la lipase pancréatique

Une fois arrivés au niveau de l'intestin, triglycérides et glycérophospholipides vont continuer d'être hydrolysés par la **lipase pancréatique** et les **phospholipases**.

La lipase pancréatique, ou triglycéride lipase est une enzyme active au niveau de l'interface huile/eau. Son action est donc rendue possible par l'émulsification des lipides par les **acides biliaires**. Elle nécessite aussi l'intervention de la **colipase**. Cette dernière rend le site d'action de la lipase accessible aux triglycérides et est donc indispensable à son action. La lipase pancréatique agit alors sur deux sites enzymatiques pour donner un monoacylglycérol. Lorsque son action est complète, il y a libération de deux acides gras et du 2-monoacylglycérol. La lipase et la colipase sont des enzymes sécrétées par la partie exocrine du pancréas. Lors d'un repas, les deux enzymes sont sécrétées et mises en contact avec le contenu de l'intestin.

Les phospholipases sont des enzymes qui réalisent des hydrolyses spécifiques au niveau des triglycérides ou des glycérophospholipides (Figure 12) en donnant les produits de dégradation correspondants (38). L'expression de chaque phospholipase par la cellule est modulée par la fonction de la cellule considérée. Au niveau de la lumière intestinale, on retrouve la phospholipase A₂ (PLA₂). Comme la lipase pancréatique, la PLA₂ provient de la sécrétion exocrine du pancréas. Elle agit spécifiquement sur le deuxième carbone des triglycérides et a donc une action complémentaire à celle de la lipase pancréatique.



Le cholestérol, est ingéré dans l'alimentation sous forme de cholestérol libre et d'esters de cholestérol. Le deuxième est pris en charge par des cholestérol-estérases pour donner le cholestérol libre et ainsi être intégré aux micelles formées par les acides biliaires (39).

2.1.3. Absorption au niveau de l'entérocyte

La **membrane plasmatique** de l'entérocyte est une structure constituée d'une **bi-couche de phospholipides** dans laquelle sont insérées des structures protéiques, lipidiques et glucidiques (Figure 13). La partie hydrophile des phospholipides est orientée vers l'extérieur tandis que leur queue hydrophobe est orientée vers l'intérieur. Dans cette membrane sont insérées des structures protéiques permettant la transmission des messages (protéines G, récepteurs hormonaux...) ou la modulation de la perméabilité membranaire (pompes ATPase, canaux ioniques). De même, des glucides sont présents dans cette membrane. Associés aux protéines ou aux lipides, ils participent à l'édifice de récepteurs ou à la production des seconds messagers.

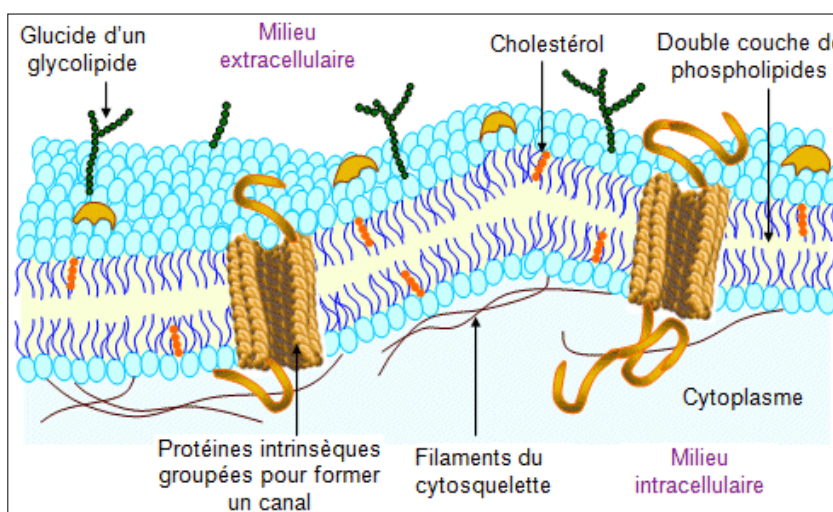


Figure 13 : Structure d'une membrane cellulaire (medicalorama.com)

Tous les produits de la digestion des graisses alimentaires, bien que de poids moléculaire plus réduit que leurs précurseurs restent des composés lipophiles. Or afin de pénétrer dans l'organisme, ils doivent pouvoir traverser la partie hydrophile de la membrane plasmique de l'entérocyte. Pour ce faire, l'intervention de la bile et des acides biliaires est indispensable.

La bile est contenue dans la vésicule biliaire qui fait partie des annexes hépatiques. Lors du repas, le contenu de la vésicule biliaire se déverse dans le canal cholédoque pour se mélanger aux sucs pancréatiques. Ensuite, l'ouverture du sphincter d'Oddi lui permet de rejoindre le duodénum (Figure 14). La bile est constituée en majorité d'eau (90%) ainsi que

de lipides (cholestérol, phospholipides) et d'acides biliaires. Cette composition lui confère deux rôles majeurs dans la digestion :

- elle facilite l'action des lipases, notamment de la lipase pancréatique.
- elle participe à la formation des micelles contenant les lipides issus de la digestion et permet ainsi leur absorption.

Nous avons vu plus haut que certains acides gras, d'un poids moléculaire faible, ont la possibilité de rejoindre le cytosol cellulaire par diffusion passive à travers la membrane. Mais ce mécanisme est une exception dans ceux nécessaires à l'absorption des lipides.

Regroupés au sein des **micelles d'acides biliaires**, les lipides vont pouvoir pénétrer la cellule digestive après fusion des membranes micellaires et plasmiques. Ces micelles vont déverser leur contenu dans le cytosol cellulaire où il va être pris en charge par des transporteurs ou des enzymes spécifiques. Ce mécanisme, qui est principalement responsable de la pénétration transmembranaire des lipides est complété par des phénomènes de diffusion passive (vu avec les acides gras de faible poids moléculaire) ou de transport actif.

L'absorption du cholestérol, initialement supposée passive, fait intervenir des protéines de transport actif capables de faire pénétrer la molécule dans la cellule (Niemann pick C₁ like₁ ou NPC₁L₁), mais aussi de l'en expulser (hétéro-dimère ABCG₅/ABCG₈) (15). Elles jouent ainsi un rôle important dans la régulation de la cholestérolémie.

2.1.4. Evolution des lipides dans l'entérocyte

Les lipides se retrouvent donc au niveau du cytosol cellulaire de l'entérocyte sous forme d'acides gras libres, de monoacylglycérol et de cholestérol libre. A ce niveau, ils peuvent soit être utilisés par la machinerie cellulaire pour son fonctionnement, soit être transformés en vue de rejoindre la circulation lymphatique et sanguine.

Cette deuxième étape nécessite des protéines de transport spécifiques de chaque lipide. Les acides gras nécessitent l'action de la FABP (fatty acid binding protein) qui

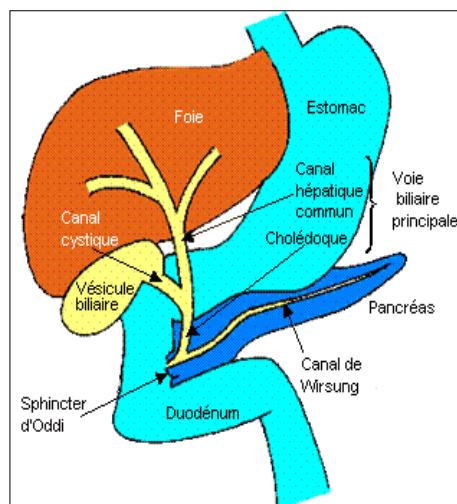


Figure 14 : Schéma des voies biliaires (savoirs.essonne.fr)

permet leur transport et leur activation dans la cellule. Cette activation consiste en l'association de l'acide gras avec le coenzyme A pour former des acyl-coenzyme A (Acyl-CoA). Les acyl-CoA vont ensuite être utilisés pour fournir de l'énergie (β -oxydation, cycle de Krebs) ou pour synthétiser des triglycérides grâce à la triglycéride-synthase.

Au niveau de l'entérocyte, la principale destination des acides gras et des autres lipides est le réticulum endoplasmique. Au sein de cet organite vont être synthétisées les structures permettant l'incorporation des lipides à la circulation sanguine : **les chylomicrons**. Y sont intégrés le cholestérol libre ou ré-estérifié par la cholestérol-synthase, les triglycérides ainsi que des phospholipides participant à l'architecture du chylomicron.

Les chylomicrons appartiennent à la famille des lipoprotéines. Dans l'organisme, les lipides ne peuvent migrer à l'état natif en raison de leur lipophilie. **Les lipoprotéines sont des structures de transport des lipides dans l'organisme**. Au centre sont concentrés les lipides les plus hydrophobes. Ils sont entourés par une monocouche de phospholipides dont la partie hydrophobe est

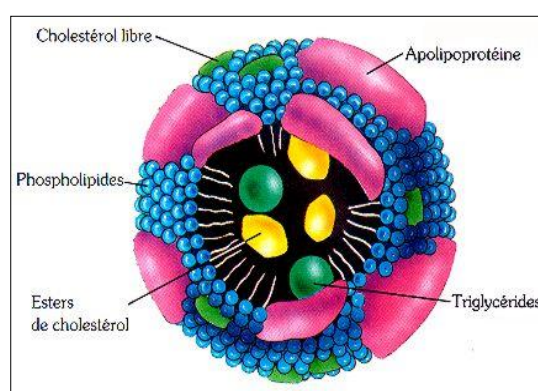


Figure 15 : Schéma d'une lipoprotéine (prevention.ch)

orientée vers le centre et la partie hydrophile vers l'extérieur (Figure 15). Dans cette monocouche sont insérées des apolipoprotéines. **Le complexe lipides-apolipoprotéines forme les lipoprotéines**. Celles-ci sont classées en fonction de leur densité (40) :

- chylomicrons : ce sont les moins denses et donc les plus grandes des lipoprotéines. Elles sont synthétisées uniquement par les entérocytes, après un repas notamment. On ne les retrouve donc présentes dans le sang qu'après un repas.
- VLDL, IDL, LDL : de densité croissante, ils acheminent les lipides (TG surtout) du foie vers les tissus périphériques de stockage (adipocytes) ou de consommation (muscles). Ils sont issus de la dégradation des chylomicrons par la lipoprotéine lipase.
- les HDL : ce sont les plus petites lipoprotéines. Elles ont deux origines : la dégradation des autres lipoprotéines et la synthèse hépatique. Elles ont pour rôle d'épurer le cholestérol des cellules pour le ramener au foie.

Au sein des lipoprotéines, **les apolipoprotéines ont d'abord un rôle structural**. Insérées entre les phospholipides elles participent à la cohésion de la lipoprotéine. Comme

toutes les protéines, les apolipoprotéines ont une structure tertiaire. Celle-ci permet une orientation des motifs lipophiles vers l'intérieur (où sont regroupés les lipides les plus apolaires) et des motifs hydrophiles vers l'extérieur pour permettre l'intégration aux réseaux lymphatique et sanguin. On retrouve différentes formes et différentes isoformes d'apolipoprotéines associées aux lipoprotéines. Leurs relations sont résumées dans le tableau 3.

Les apolipoprotéines ont par ailleurs un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines. Elles peuvent avoir un rôle de ligand (l'apo B100 est un ligand pour les récepteurs aux LDL (41), ou LDL-R), de cofacteur enzymatique (l'Apo A₁ est un cofacteur de la Lecithin Cholesterol Acyl Transferase, ou LCAT, enzyme importante du métabolisme du cholestérol). Ce sont donc des protéines clés du métabolisme lipidique dont l'expression peut être soumise à de nombreux facteurs.

Classe	Densité	Diamètre (Å)	Principales Apo	Composition (C/P/A/T/CE)
Chylomicrons	<0,95	800-5000	A, B-48, C, E	2/7/2/86/3
VLDL	<1,006	300-800	B-100, C, E	7/18/8/55/12
IDL	1,006-1,019	250-350	B-100, C, E	9/19/19/23/29
LDL	1,019-1,063	180-250	B-100	8/22/22/6/42
HDL 2	1,063-1,250	90-120	A-I, A-II	5/33/40/5/12
(C : cholestérol libre, P : phospholipides, TG : tryglycérides, A : apoprotéines, CE : cholestérol estérifié)				

Tableau 3 : Les différentes classes de lipoprotéines (40).

Les apolipoprotéines ont deux origines dans l'organisme : le foie (comme la plupart des protéines) et l'intestin (pour l'apolipoprotéine B-48 des chylomicrons). A la surface des lipoprotéines, elles peuvent être échangées ou captées pour enrichir une lipoprotéine déjà formée. Ainsi, les différentes lipoprotéines circulantes peuvent capter les apolipoprotéines hépatiques nécessaires à leur métabolisme.

2.1.5. Dégradation plasmatique des chylomicrons

Les entérocytes, comme le foie, ont une grande capacité de synthèse des lipoprotéines. Au sortir des entérocytes, les lipides sont concentrés dans les chylomicrons.

Ces lipoprotéines sont très riches en triglycérides et sont caractérisées par l'apolipoprotéine B-48.

Au fur et à mesure de leur avancée dans les vaisseaux, les chylomicrons vont voir leur taille et leur proportion en triglycérides diminuer. Ils vont aussi s'enrichir en apolipoprotéines hépatiques (A, C) apportées par les HDL circulantes. Dans les tissus périphériques (cœur, adipocytes, muscles), la prise d'un repas active l'expression à la surface des cellules endothéliales de la lipoprotéine lipase (LPL).

La lipoprotéine lipase est une enzyme qui **catalyse l'hydrolyse des triglycérides** contenus dans les lipoprotéines. Active au niveau plasmatique, elle a la capacité de migrer du cytosol vers la membrane cellulaire. L'extrémité N-terminale flotte alors librement dans l'espace vasculaire. Cela va lui permettre d'interagir avec l'apolipoprotéine C des lipoprotéines et d'hydrolyser les lipides qu'elles contiennent. Son action est comparable à celle de la triglycéride lipase, c'est à dire qu'elle agit sur le premier et le troisième carbone des triglycérides. Les acides gras et le monoacylglycérol libérés sont pris en charge par la sérum-albumine qui va les intégrer à la cellule sous-jacente.

La déplétion causée par l'action de la LPL sur les chylomicrons va former des espaces libres dans leur structure. Ces espaces libres vont former des replis dans la paroi des chylomicrons et un accolement des zones adjacentes de la monocouche de phospholipides. Le chylomicron va alors se scinder en lipoprotéines plus petites. Il en résulte la formation des « remnants » de chylomicrons. Ces résidus de chylomicrons appauvris en triglycérides vont être captés par le foie grâce à l'interaction de l'apo E avec son récepteur situé à la surface des hépatocytes. Les éléments structuraux les constituants vont être réutilisés par les hépatocytes pour la synthèse du cholestérol et des autres protéines.

2.1.6. Dégradation des lipoprotéines hépatiques

Comme nous venons de le voir, les chylomicrons sont synthétisés par l'intestin en période postprandiale. En parallèle et tout au long de la journée, le foie synthétise les autres lipoprotéines nécessaires au transport des lipides. Cette synthèse permet une sécrétion constante de triglycérides d'origine endogène.

Le foie synthétise donc des VLDL. Elles sont constituées d'une apolipoprotéine B-100 et d'apolipoprotéines C et E. De même que pour les chylomicrons, le métabolisme des

VLDL est sous l'influence de la LPL. Celle-ci va avoir la même action d'hydrolyse des lipides sur les VLDL pour donner les IDL puis les LDL à mesure que la proportion de triglycéride diminue. **Les LDL sont donc les derniers produits du métabolisme des lipoprotéines.**

2.1.7. Utilisation par les tissus périphériques

A terme, les LDL vont être extraites de la circulation sanguine. L'apolipoprotéine B-100 va être reconnue par les récepteurs aux LDL (récepteur B/E reconnaissant les deux apolipoprotéines) qui va permettre l'internalisation des LDL et leur dégradation. De même que pour les « remnants » de chylomicrons, le principal acteur de cette recapture est le foie. Néanmoins, toutes les cellules de l'organisme expriment les récepteurs au LDL en fonction de leurs besoins. L'ensemble des lipides captés va servir de source d'énergie (muscles), de stockage (adipocytes) ou de précurseurs (acides biliaires par le foie, hormones stéroïdiennes par les cellules dédiées).

On notera qu'il existe une deuxième voie de dégradation des LDL : la voie des récepteurs « scavenger » (éboueur). Ces récepteurs sont exprimés par les macrophages. Ils vont retirer de la circulation les LDL oxydées qui ne peuvent pas être reconnues par le récepteur aux LDL en raison d'un changement de conformation de l'apo B-100. Cette voie de dégradation est considérée comme la première étape de la formation de plaques d'athérome au niveau du système vasculaire. Trop stimulée, elle peut donc être à l'origine de pathologies cardio-vasculaires.

2.1.8. Rôle et synthèse des HDL

Les HDL sont les dernières lipoprotéines que nous devons décrire. Ce sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines. Elles ont pour rôle majeur le transport « reverse » du cholestérol, c'est à dire une sortie du cholestérol des cellules périphériques au profit du foie. Elles ont une double origine : la synthèse par le foie et la scission des chylomicrons et des VLDL. A leur état natif, les HDL sont discoïdales. Elles vont progressivement s'enrichir en cholestérol estérifié qui va migrer vers le centre de l'édifice pour donner une structure sphérique.

Comme nous l'avons vu, la couche externe des lipoprotéines est constituée d'une mono-couche de phospholipides dans laquelle sont insérées des molécules de cholestérol libre. Sous l'action de la lecithin cholestérol acyl-transférase (LCAT), le cholestérol libre situé dans la partie externe de la lipoprotéique va être estérifié et rejoindre le centre de l'édifice. L'espace laissé vacant va permettre une intégration de nouvelles molécules de cholestérol. Celles-ci peuvent provenir d'un transfert entre la HDL et une grosse lipoprotéine (VLDL, chylomicron) ou d'un transfert d'une membrane cellulaire vers les HDL. La sortie du cholestérol de la cellule est effectuée par une protéine hétéro-dimérique ATP dépendante (ABCG5/ABCG8). Elle permet de réguler l'efflux du cholestérol vers les HDL et un retour vers le foie (39).

Les HDL chargées en cholestérol vont ensuite être re-captées par le foie. Il va pouvoir utiliser le cholestérol dont il a besoin et excréter le surplus par l'intermédiaire des acides biliaires. Ce retour au foie par les HDL fait apparaître un cycle de circulation des lipoprotéines entre les tissus périphériques et le foie. Ce cycle est appelé voie endogène des lipides. Par opposition, la circulation des lipides entre l'intestin et le foie est appelé voie exogène des lipides (figure 16).

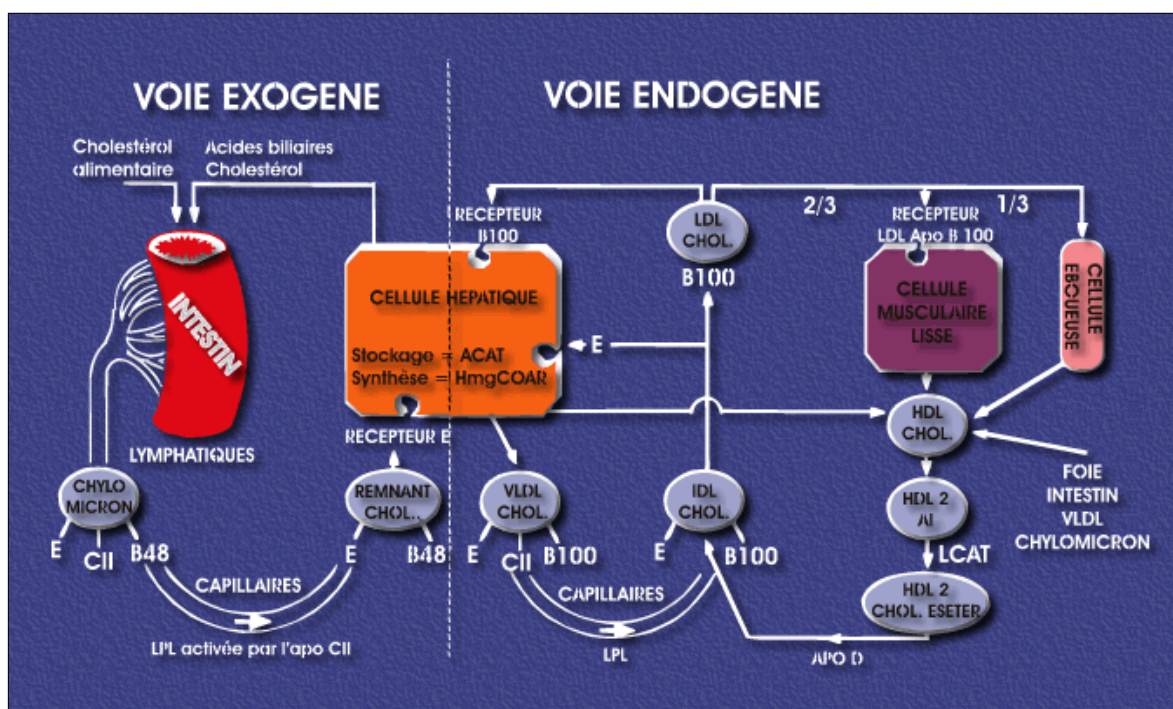


Figure 16 : Voies endogène et exogène des lipides (www-sante.ujf-grenoble.fr)

Le métabolisme lipidique fait intervenir de nombreux acteurs. Nous venons d'en présenter les principaux, notamment ceux influencés par le microbiote. Voyons les mécanismes qui permettent à notre microbiote d'interagir avec le métabolisme des lipides.

2.2. Influence du microbiote sur les étapes clés du métabolisme des lipides

Le métabolisme des lipides alimentaires est un enchaînement de réactions qui a pour but d'obtenir des nutriments facilement utilisables à partir de lipides complexes. Au sein de cet enchaînement, de nombreuses étapes sont influencées par le microbiote intestinal, ce qui entraîne des répercussions sur l'ensemble de notre organisme.

En 2004, Bäckhed et collaborateurs entreprirent d'explorer l'influence du microbiote sur la masse grasseuse des souris (42). Pour ce faire, ils comparèrent le pourcentage de graisse chez des souris axéniques avec celui de souris élevées normalement. Il s'est avéré que la masse grasseuse des souris normales était supérieure à celle des souris axéniques (+47%). Ce résultat était d'autant plus frappant que ces dernières avaient un régime alimentaire pauvre en graisses.

Par ailleurs, si on réintroduisait un microbiote non fragmenté chez les souris axéniques, on observait une augmentation de la masse grasseuse jusqu'à un taux comparable à celui des souris normales. On peut donc supposer que l'augmentation de la masse chez les souris normales est sous l'influence du microbiote.

De tels résultats nous poussent à nous demander comment le microbiote, par sa présence au niveau de l'intestin influe sur la résorption des lipides. Nous allons voir quelles étapes du métabolisme lipidique sont mises en cause.

2.2.1. Dé-conjugaison des acides biliaires par le microbiote

Les lipides, avant d'être intégrés à l'entérocyte, nécessitent une étape d'émulsification. Elle est en grande partie réalisée au niveau de la lumière intestinale par les sels biliaires comme nous l'avons expliqué plus haut (voir 2.1.3.). Nous allons voir plus en détail la structure de ces métabolites du cholestérol.

Les sels biliaires, ou acides biliaires, **sont synthétisés** au niveau du foie **à partir du cholestérol**. Ils possèdent donc tous dans leur structure un noyau stérol qui leur confère une grande lipophilie. Après avoir été synthétisés par le foie, ils vont rejoindre la lumière intestinale. A ce niveau, une très faible partie des acides biliaires va être éliminée dans les fèces tandis que le reste va rejoindre la circulation (via les entérocytes) et le foie. Au cours de ce cycle entéro-hépatique, les acides biliaires vont alterner entre une forme libre et une forme conjuguée. Cela va permettre une modulation de leur lipophilie. Prenons l'exemple de l'acide cholique.

L'acide cholique (Figure 17) est l'acide biliaire le plus représenté. Dans le foie, il est conjugué à deux acides aminés : la glycine, pour donner l'acide glycocholique, et la taurine pour donner l'acide taurocholique. La greffe d'un radical aminé sur l'acide carboxylique va donner une molécule amphiphile possédant un groupement hydrophile volumineux. Cela va permettre une meilleure solubilisation des lipides au niveau de la lumière intestinale.

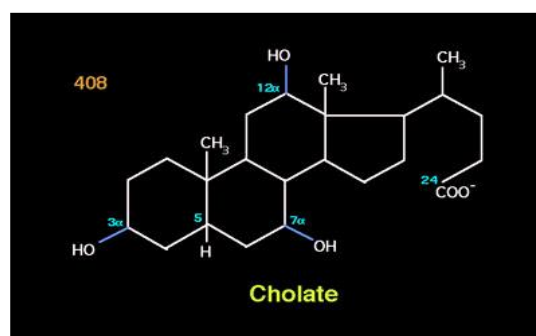


Figure 17 : Acide cholique sous forme ionisée
(chups.jussieu.fr)

Afin de traverser la paroi de l'entérocyte, les acides biliaires doivent être dé-conjugués. Cette dé-conjugaison est réalisée par le microbiote intestinal. In vitro, **les bactéries constituant le microbiote ont la capacité d'hydrolyser les dérivés conjugués des acides biliaires**. Certaines ont une action sur les conjugués taurines tandis que d'autres hydrolysent les conjugués glycoliques. D'autres, enfin, hydrolysent indifféremment les deux conjugués. In vivo, l'action des bactéries est restreinte par les conditions d'aérobiose. L'hydrolyse des acides biliaires ayant lieu au niveau de l'iléon (milieu anaérobie), l'hydrolyse in vivo est portée par les espèces du genre *Bacteroides*, *Clostridium* et *Lactobacillus* (43). Ces genres bactériens étant très fortement représentés dans le microbiote, **une absence de microbiote entraîne une diminution de la dé-conjugaison des acides biliaires**.

A contrario, un microbiote normal favorise la dé-conjugaison des acides biliaires et donc leur absorption par les entérocytes. Une plus grande quantité d'acides biliaires libres va rejoindre la circulation et le foie.

Nous pouvons conclure de ces études que **le microbiote intestinal accélère le cycle entéro-hépatique** des acides biliaires. Certains genres de bactéries anaérobies semblent impliqués, notamment *Bacteroides*, *Clostridium* ou *Lactobacillus*.

2.2.2. Augmentation de l'activité de la LPL

La lipoprotéine lipase est une enzyme clé du métabolisme des lipides (voir 2.1.5.). Elle est synthétisée au niveau des tissus périphériques (cœur, adipocytes, muscles) et migre au niveau des parois cellulaires afin d'exercer son action sur les grosses lipoprotéines. A ce niveau, elle se lie à l'apolipoprotéine C portée par les chylomicrons, les VLDL et les IDL et hydrolyse les triglycérides qu'elles contiennent. Elle augmente donc la libération des acides gras qui seront utilisés par les cellules pour fournir de l'énergie ou stockés par les adipocytes.

Dans l'étude portant sur l'augmentation de la masse grasseuse chez les souris (42) Bäckhed et collaborateurs observèrent une augmentation de l'activité de la LPL. L'expression de cette enzyme est sous la dépendance de nombreux facteurs, notamment du taux de lipoprotéines circulantes et des concentrations lipidiques intracellulaires. Elle est aussi régulée par un inhibiteur circulant : le **fasting-induced adipose factor** (Fiaf) aussi appelé angiopoietine-like protein 4. Il a été mis en évidence que l'expression du gène codant pour cette protéine est sous la dépendance des PPARs (Peroxisom Proliferator-Activated Receptor). Les PPAR (α , β , γ) sont un groupe de récepteurs nucléaires sensibles à de nombreux médiateurs endocriniens. Ils ont pour rôle de moduler l'expression de gènes de régulation du métabolisme. Il s'est avéré que le Fiaf est sous la dépendance du PPAR α (44).

Pour étudier précisément l'action du Fiaf, Mandard et collaborateurs (45) utilisèrent des souris transgéniques exprimant une quantité très élevée de cette protéine. Par comparaison avec des souris dites « sauvages », ils montrèrent que **la surexpression du Fiaf entraînait une augmentation des taux sériques de l'ensemble des lipoprotéines**. Celles dont le taux avait le plus augmenté étaient les VLDL. Parallèlement, le taux des triglycérides circulants avait aussi augmenté. Le rôle de la LPL étant d'hydrolyser les triglycérides des lipoprotéines, on comprend aisément qu'une répression de son action augmente les triglycérides sériques et diminue leur pénétration intracellulaire.

La deuxième question que nous pouvons nous poser porte sur le mécanisme d'action du Fiaf : a-t-il une action directe sur la LPL ou diminue-t-il sa synthèse par les cellules ? Afin de répondre à cette question, les auteurs ont étudié l'expression des ARNm codant le gène de la LPL chez les souris transgéniques et chez les souris sauvages. Il s'est avéré que les taux étaient semblables chez les deux lignées. **Nous pouvons donc supposer que l'inhibition de la LPL par le Fiaf n'est pas sous dépendance de l'expression du gène codant pour la LPL.** L'inhibition est sûrement due à une interaction directe entre les deux protéines.

Bäckhed et collaborateurs (42) ont observé que **la colonisation par le microbiote intestinal entraîne une diminution de l'expression du Fiaf par les adipocytes.** Le mécanisme liant le microbiote à cette diminution n'est pas encore élucidé. L'étude de Mandard et collaborateurs nous explique comment cette régulation par le microbiote entraîne une augmentation de l'activité de la LPL et une diminution des lipoprotéines circulantes.

Une synthèse de ces deux études nous permet de conclure que **le microbiote favorise la dégradation des lipoprotéines circulantes et le stockage des acides gras par les adipocytes par activation indirecte de la LPL.** Le stockage par l'organisme est donc augmenté ainsi que la masse grasse globale.

2.2.3. Diminution de la β -oxydation par le microbiote

Le microbiote entraîne donc une augmentation du stockage des lipides par son action sur une protéine extracellulaire : le Fiaf. Son action semble persister au niveau intracellulaire. En 2007, Bäckhed et collaborateurs avancent qu'en complément de son action sur le Fiaf, le microbiote aurait une action sur l'oxydation des acides gras. **Il diminuerait le catabolisme des acides gras par action sur la phosphorylation d'une kinase intra-mitochondriale (AMPK)** (« the presence of a gut microbiota suppresses skeletal muscle fatty acid oxidation through a metabolic pathway that may involve phosphorylation of AMPK ») (46).

Afin de comprendre le mécanisme complexe en jeu, nous devons approfondir le métabolisme intracellulaire des acides gras. Nous allons donc distinguer le catabolisme (utilisation des acides gras pour fournir de l'énergie) et l'anabolisme (utilisation de la machinerie cellulaire pour fournir des acides gras endogènes).

Arrivés dans une cellule, les acides gras peuvent être utilisés comme forme de stockage (synthèse de triglycérides) ou être utilisés comme substrats pour fournir de l'énergie. La fourniture d'énergie passe par une dégradation en plusieurs étapes des acides gras, appelée β -oxydation, qui a lieu au sein de la mitochondrie. Afin de rejoindre la matrice mitochondriale, les acides gras doivent être activés et pris en charge par un transporteur : la carnitine-palmitoyl transférase (Cpt). Elle va permettre le transfert des acides gras dans la matrice mitochondriale (Figure 18). Plusieurs étapes vont ensuite être nécessaires pour aboutir à la formation de molécules d'ATP, unité énergétique de base de la cellule.

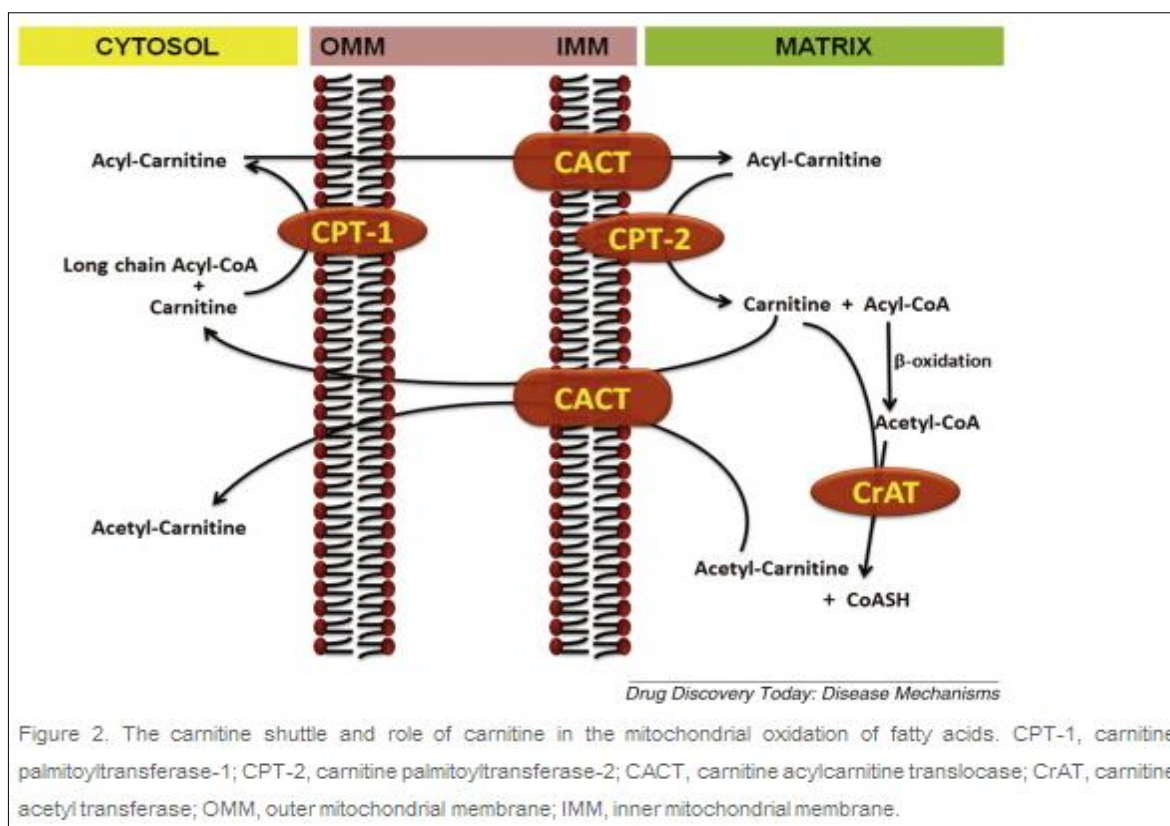


Figure 18 : Transfert des acides gras à travers la membrane mitochondriale (Sharma et al)

La machinerie cellulaire a aussi la capacité de synthétiser des acides gras à partir d'une unité de base : l'acétyl co-enzyme A (acétyl-CoA). L'assemblage de plusieurs de ces sous-unités à 2 carbones aboutit à la formation d'enchaînements carbonés plus longs et donc d'acides gras. Ils seront ensuite utilisés de la même façon que les acides gras apportés par l'alimentation.

Ces deux voies métaboliques opposées agissent l'une sur l'autre via les métabolites produits aux différentes étapes. Une forte augmentation des acides gras intracellulaires va inhiber les réactions d'anabolisme. Une augmentation du malonyl CoA va inhiber le catabolisme des acides gras (β -oxydation). Le ratio

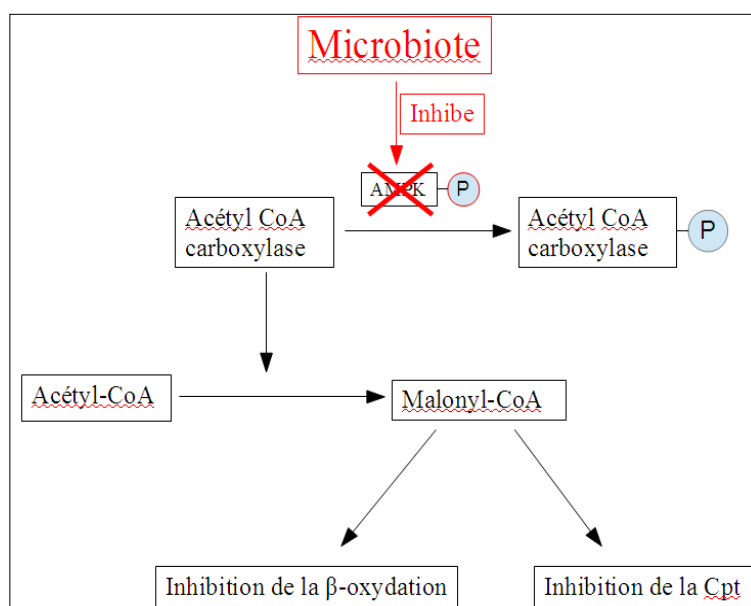


Figure 19 : Influence du microbiote sur le catabolisme des acides gras

AMP/ATP intracellulaire quant à lui est indicateur des réserves énergétiques de la cellule. Il est donc le principal facteur régulateur des réactions métaboliques. En réponse à une variation du ratio AMP/ATP une modification des taux d'AMPK est observée. Cette kinase va ensuite agir sur des enzymes clés du métabolisme (exemple de l'acétyl CoA carboxylase figure 19) en les phosphorylant. Le ratio AMP/ATP est donc considéré comme le principal régulateur de l'AMPK et donc de l'ensemble des réactions du métabolisme énergétique (47).

L'étude menée par Bäckhed et collaborateurs porte en particulier sur une étape de l'anabolisme des acides gras, le passage de l'acétyl-CoA au malonyl-CoA. Cette réaction est sous la dépendance de l'acétyl-CoA carboxylase. Celle-ci doit être sous sa forme non phosphorylée pour être active. **Le microbiote**, en diminuant le taux d'AMPK phosphorylée entraîne **une inhibition de la β -oxydation et de la carnitine-palmitoyl transferase** (Figure 19). Une diminution des taux d'AMPK phosphorylée est observée chez les souris colonisées par un microbiote normal par comparaison aux souris axéniques. Il en résulte une augmentation des taux de malonyl-CoA et une diminution de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie.

Cette persistance des acides gras au niveau du cytosol associée à une augmentation de l'activité de la LPL est en faveur d'une augmentation du stockage des lipides chez les individus colonisés par un microbiote normal (42) (46). Les cellules intègrent plus facilement les lipides au niveau de leur cytosol alors que l'utilisation par les mitochondries

est diminuée. Ainsi, on observe une augmentation de la quantité de lipides intracellulaires, particulièrement dans les adipocytes.

Le métabolisme lipidique est donc sous l'influence du microbiote intestinal. Notre exploration des différentes étapes de ce métabolisme nous a permis de présenter les mécanismes mis en cause et les conséquences sur l'organisme. **L'action du microbiote se retrouve au niveau intestinal, sanguin, et intracellulaire.** Il entraîne une **augmentation de l'absorption** des lipides (43), une **augmentation de leur entrée dans les cellules périphériques** (45) et aurait tendance à **augmenter le stockage intracellulaire** (46) par un mécanisme complexe impliquant une kinase intracellulaire.

3. Influence sur le métabolisme glucidique

Les glucides sont un groupe hétérogène de molécules indispensables au fonctionnement du corps humain. Ils constituent la première source d'énergie des cellules (glucose) et une forme de stockage facilement mobilisable (glycogène). Bien que leur métabolisme puisse sembler moins complexe que celui des lipides, il est indispensable d'en rappeler les principales étapes. Nous commencerons par voir la structure générale des glucides, puis nous verrons les principales étapes de leur métabolisme.

3.1. *Rappels sur le métabolisme des glucides*

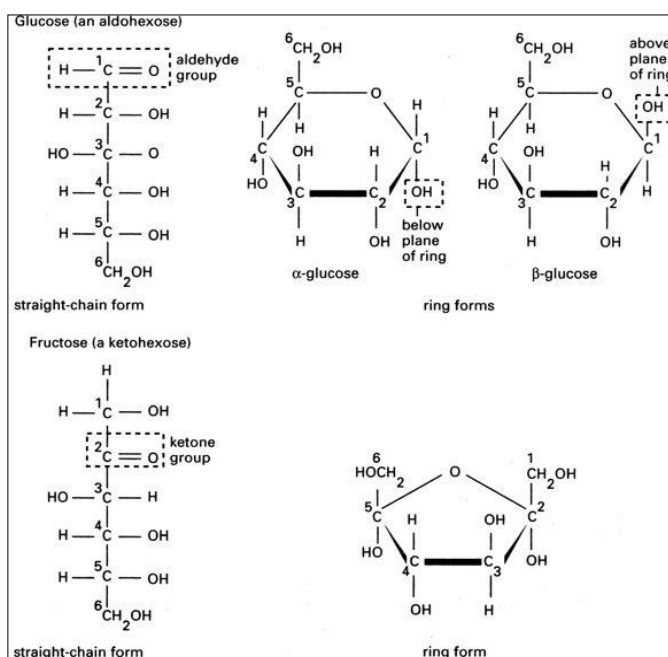
Structurellement, les glucides sont constitués d'un squelette carboné associé à de nombreuses fonctions hydroxyles (cela leur valait d'être nommés anciennement hydrates de carbone). Comme pour toutes les molécules organiques, plusieurs classifications peuvent être utilisées. Les plus commodes font appel soit à une approche diététique soit à une approche biochimique.

L'approche diététique fait intervenir 3 acteurs : **les amidons**, ou glucides complexes, **les sucres**, ou glucides simples, et **les fibres** (celluloses et pectines non digestibles). Ils représentent les trois formes sous lesquelles les glucides sont ingérés (48). La classification diététique se base sur la structure des glucides, sur la capacité de l'organisme à les digérer ainsi que sur l'influence qu'ils peuvent avoir sur la glycémie. Les glucides dits simples nécessitent une faible mobilisation des enzymes digestives pour être

assimilés et ont un index glycémique (capacité d'une substance à augmenter la glycémie dans les deux heures qui suivent son ingestion) élevé. Les glucides dits complexes doivent être fortement hydrolysés et ont, par conséquent, un index glycémique plus faible. Les fibres enfin ne sont pas résorbées et ne modifient la glycémie qu'indirectement.

Une approche biochimique se concentre plus sur l'aspect structural des glucides. Elle prend alors en compte le nombre de carbones de chaque monosaccharide, le nombre de sous-unités glucidiques constituant une macromolécule glucidique et l'association possible à des structures non glucidiques (49).

- nombre de carbones : le suffixe -ose représente l'appartenance de la molécule au groupe des glucides, le préfixe désigne le nombre de carbones du monomère. Les monosaccharides les plus courants sont par exemple des pentoses (structures à cinq carbones comme le ribose et le désoxyribose des ARN et des ADN) ou des hexoses (structures à six carbones comme le glucose, le fructose, le galactose). Il existe plusieurs façons de représenter les monosaccharides (linéaire, cyclique). Ces représentations sont utilisées d'une part par souci de commodité, d'autre part pour refléter l'équilibre qui existe dans la nature entre les



deux formes (figure 20). Bien que la forme cyclique soit la plus observée, car plus stable, la forme linéaire est elle aussi retrouvée naturellement. L'enchaînement de ces atomes de carbone est appelé **monosaccharide**. Il représente l'**unité fondamentale des glucides**.

- macromolécules glucidiques : les glucides simples s'associent entre eux pour donner des macromolécules glucidiques. Lorsque la structure ne comporte que des glucides, on parle d'holosides. On distingue alors les polyholosides (quelques centaines d'oses), des oligosides (quelques dizaines d'oses) et des oses plus petits. Au sein de ces macromolécules, les oses sont sous forme cyclique et sont liés entre eux par une fonction hydroxyle. La nature des liaisons constituant la macromolécule va conditionner sa

dégradation dans l'environnement. A titre d'exemple, l'amidon et les fibres sont des polyholosides.

- association à des structures non glucidiques : dans l'organisme, les glucides sont très souvent associés à des structures non osidiques. On parle alors d'hétérosides (glycolipides, glycoprotéines). Ces associations permettent de modifier la conformation spatiale de macromolécule ou d'en modifier la polarité.

En fonction du phénomène biologique ou de la réaction chimique que l'on étudie, on peut utiliser l'une ou l'autre des classifications. Dans notre exposé, nous utiliserons sans distinction les deux classifications par souci de clarté.

Voyons maintenant comment les glucides évoluent dans notre organisme.

3.1.1. Digestion des glucides

Les glucides arrivent dans l'alimentation sous forme de glucides complexes (amidons, fibres, polysaccharides) et de glucides simples (disaccharides, monosaccharides). Au niveau de l'entérocyte, seuls les glucides simples sont assimilés. Le travail de la digestion consiste donc à réduire les glucides complexes à une forme assez simple pour être assimilée.

Les glucides les plus représentés dans l'alimentation humaine sont les amidons. Ce sont des polyholosides constitués d'un enchaînement de monomères de glucose reliés entre eux par des liaisons dites α -1,4-glycosidiques (Figure 21). Ces liaisons forment

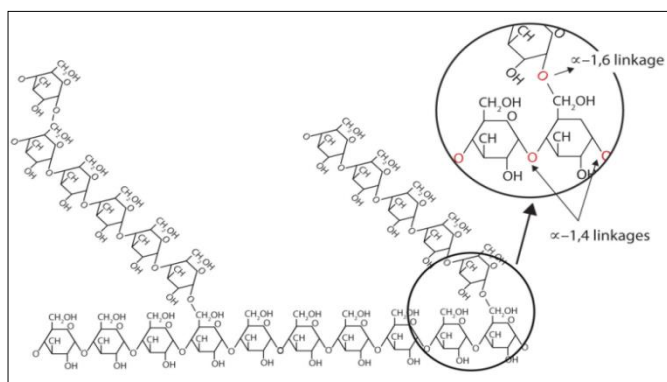
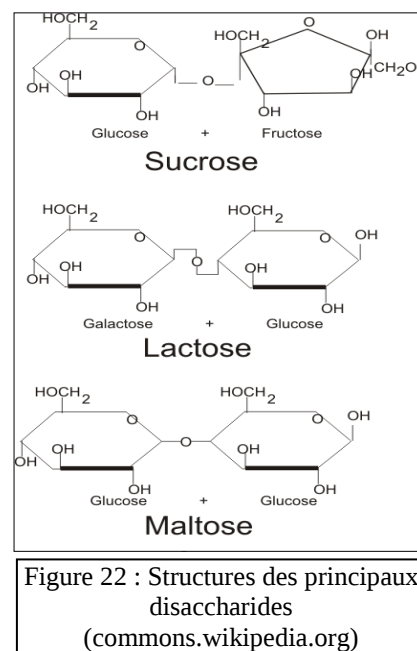


Figure 21 : Structure générale des amidons (afblum.be)

une structure linéaire de plusieurs centaines de monomères. On observe au sein de cet enchaînement des liaisons α -1,6-glycosidiques réalisant des branchements sur la structure linéaire. La fréquence d'apparition de la liaison α -1,6 est variable en fonction de l'espèce animale considérée. On parlera donc des amidons et non de l'amidon. On notera que les celluloses, contenus dans les végétaux, sont des glucides complexes constitués eux aussi de sous-unités de glucose. Les liaisons établies par les molécules de glucose (β -1,4 et β -1,6) les rendent indigestibles par les enzymes humaines (50).

Les oligosaccharides représentent la seconde forme ingérée lors du repas. Ils sont composés d'une association de monomères de sucres simples. Le nombre et le type de glucides constituant l'enchaînement caractérisent l'oligosaccharide. Les plus simples sont les disaccharides composés de deux glucides reliés par une liaison glycosidique. Les plus couramment retrouvés dans l'alimentation sont le saccharose (ou sucrose), le lactose et le maltose (Figure 22). Ils sont apportés tels quels par l'alimentation ou résultent de l'hydrolyse de polysaccharides.



Au début du tube digestif, on retrouve donc les glucides sous forme de polysaccharides (amidon), d'oligosaccharides (lactose, saccharose) et de monosaccharides. Dans la bouche, ils vont être mis en contact avec des enzymes de digestion.

L'amylase est la première enzyme à agir sur les polysaccharides. Elle est appelée **α -amylase** car elle a la capacité de rompre les liaisons de type α entre les molécules de monosaccharides. On distingue couramment l'amylase salivaire de l'amylase pancréatique. La première est sécrétée par les glandes salivaires dans la cavité buccale. Étant inactivée à un pH inférieur à 4,5, son activité est confinée entre la bouche et l'entrée de l'estomac. Elle réduit la taille des polysaccharides à l'état d'oligosaccharides de quelques monomères.

A l'arrivée dans le duodénum, le contenu de l'estomac est mis en contact avec les sécrétions exocrines du pancréas qui se déversent par le sphincter d'Oddi. Ces sécrétions contiennent l'amylase pancréatique qui va continuer d'hydrolyser les résidus d'amidon pour donner du maltose. Ainsi, tous les **glucides digestibles vont être sous la forme de disaccharides dans l'intestin.**

La dernière phase d'hydrolyse des disaccharides a lieu au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Les cellules de la paroi intestinale synthétisent plusieurs enzymes de dégradation des disaccharides capables de les réduire à l'état de monosaccharides. Les principales sont la maltase, la sucrase et la lactase. Des enzymes secondaires telles que la disaccharidase et l'isomaltase ont une action complémentaire sur les disaccharides présents.

Sous la forme de monosaccharides, les glucides vont pouvoir être résorbés par l'entérocyte. Le glucose étant le représentant majoritaire des glucides obtenus après digestion, nous nous concentrerons sur lui pour décrire le métabolisme glucidique.

3.1.2. Absorption par la muqueuse intestinale

Afin de rejoindre la circulation sanguine, les monosaccharides doivent traverser l'entérocyte. Ce passage à travers la cellule peut impliquer deux types de phénomènes : un transport actif (nécessite la consommation d'énergie sous forme d'ATP) ou une diffusion facilitée. L'hypothèse de la diffusion simple à travers la membrane entérocytaire a été longtemps avancée. Mais le processus de diffusion simple est un phénomène saturable. Or expérimentalement, on observait des taux de diffusion supérieurs à ceux donnés par le modèle théorique. Il s'avérait que des récepteurs permettant une diffusion facilitée étaient

GLUT	Classe	Nom du gène	Substrat *	Expression
GLUT1	1	SLC2A1	Glucose	Erythrocytes, cellules endothéliales de barrière, cerveau, gros intestin, estomac, muscle lisse
GLUT2	1	SLC2A2	Glucose Fructose	Foie, îlots pancréatiques
GLUT3	1	SLC2A3	Glucose	Cerveau, neurones
GLUT4	1	SLC2A4	Glucose	Muscles cardiaque et squelettique, adipocytes
GLUT5	2	SLC2A5	Fructose	Intestin, testicules, rein
GLUT7	2	SLC2A7	ND	Intestin
GLUT9	2	SLC2A9	Urate Glucose	Foie, rein
GLUT11	2	SLC2A11	Glucose Fructose	Muscles cardiaque et squelettique
GLUT6	3	SLC2A6	Glucose	Rate, leucocytes, cerveau
GLUT8	3	SLC2A8	Glucose Fructose	Testicules, blastocytes, cerveau
GLUT10	3	SLC2A10	Glucose	Foie, pancréas
GLUT12	3	SLC2A12	Glucose	Placenta, tissu mammaire, testicules
HMIT	3	SLC2A13	Myo-Inositol, H+	Cerveau

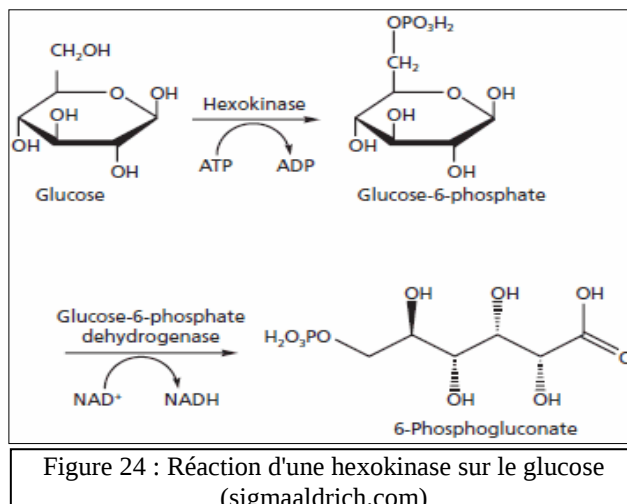
Figure 23 : Détail des isoformes de récepteurs GLUT (Steiner)

impliqués : les récepteurs GLUTs (Figure 23). Actuellement, 14 iso-formes ont été répertoriées chez l'homme (50) (51). Onze iso-formes ont été répertoriées comme impliquées dans le transport des sucres dans l'organisme (52). Leur présence est ubiquitaire dans les tissus humains, ce qui permet un maintien de l'homéostasie glucidique. Ils rendent possibles l'entrée et la sortie des monosaccharides dans l'ensemble des tissus humains.

D'autres transporteurs, nommés SGLTs, permettent un passage de la membrane contre le gradient de concentration. Ils permettent un co-transport de sodium et de monosaccharide grâce à la consommation d'ATP. Contrairement aux récepteurs GLUTs, ils ne sont pas ubiquitaires. Les 6 iso-formes caractérisées se répartissent principalement

dans l'intestin et dans les reins (52). Ils sont responsables des phénomènes de réabsorption et d'excrétion des sucres par le rein principalement.

Ces deux types de récepteurs sont à la base des flux de monosaccharides se déroulant dans le corps humain. L'entrée du glucose dans les cellules est couplée à une enzyme à fonction hexokinase (Figure 24). Elle réalise une phosphorylation du glucose à l'entrée dans la cellule. Le glucose est donc sous forme libre dans le sang et sous forme de **glucose-6-phosphate** (G6P) dans la cellule, forme utilisable par les outils cellulaires.

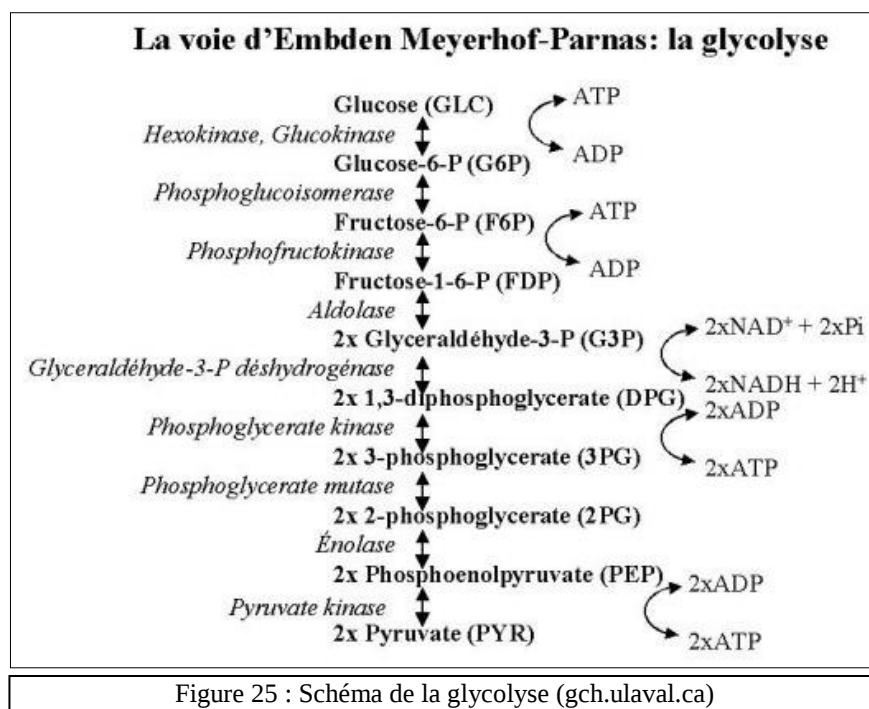


3.1.3. La glycolyse = fourniture d'énergie

Par leur forte hydrophilie, les monosaccharides ne nécessitent pas de transporteurs spécifiques dans la circulation sanguine. Ils vont donc rejoindre les tissus sous forme libre. Nous l'avons vu, à l'entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé en G6P. A partir de cette molécule, une suite de réactions va permettre d'obtenir deux molécules de pyruvate. Le pyruvate va ensuite être transformé en acétyl coenzyme A (acétyl CoA), point de départ du cycle de Krebs. L'enchaînement permettant de passer du glucose au pyruvate est appelée **glycolyse** (Figure 25).

Ce phénomène a la particularité d'être **universel**, **ubiquitaire** et indépendant des conditions d'aérobiose. Ainsi, il peut avoir lieu dans toutes les cellules de l'organisme.

Au niveau du bilan énergétique, la glycolyse est consommatrice d'ATP. En tout, 6 molécules d'ATP sont nécessaires pour obtenir 2 molécules de pyruvate à partir du glucose. Cette consommation d'énergie sera compensée par l'intégration du pyruvate au cycle de Krebs. Le cycle de Krebs, que nous ne détaillerons pas ici, est un enchaînement de réactions permettant de fournir une grande quantité d'énergie en présence d'oxygène. Il se déroule au niveau des mitochondries qui utilisent l'acétyl CoA pour fournir de nombreuses molécules d'ATP, « carburant des cellules ».



3.1.4. Le stockage d'énergie sous forme de glycogène

Lorsque le glucose n'est pas utilisé directement, il peut être stocké sous forme de glycogène. On retrouve le glycogène dans la plupart des cellules humaines, néanmoins, il prédomine dans le foie et dans les muscles. Le foie, est le premier organe de stockage car il peut contenir une journée de consommation de glucose (180g) sous forme de glycogène.

De même que pour la glycolyse, la **glycogénogenèse a pour point de départ le G6P**. Celui-ci va être converti et assemblé en un polymère ramifié de glucose. La structure du glycogène est proche de celle de l'amidon, avec un enchaînement de molécules de glucose liées par des liaisons α -1,4 avec des ramifications α -1,6. Cette macromolécule est synthétisée en période post-prandiale (glycogénogenèse) et hydrolysée en cas d'effort ou de jeûne (glycogénolyse).

3.1.5. Le foie régule la libération du glucose dans le sang

En période de jeûne, les sources exogènes de glucose sont nulles. L'organisme doit donc maintenir une glycémie normale sans apport extérieur de glucose. Il existe alors deux sources possibles : l'hydrolyse du glycogène pour donner du glucose, ou la néo-glucogénèse (52) :

- l'hydrolyse du glycogène a lieu dans les muscles et dans le foie. Elle permet aux muscles de répondre à ses propres besoins et elle permet une libération de glucose par le foie.

- la **néo-glucogénèse** est une voie annexe permettant l'obtention de glucose. En cas de jeûne prolongé, l'organisme, en plus de dégrader le glycogène, va synthétiser du glucose à partir d'éléments non glucidiques. La néo-glucogénèse est principalement réalisée par le foie. Elle ne devient importante au niveau du rein qu'en cas de jeûne long ou d'états pathologiques (diabète sucré). Les principaux éléments utilisables sont les lactates et le glycérol ainsi que les acides aminés dits glucoformateurs (cystéine, alanine, glycine).

Glycogénolyse et néoglucogénèse peuvent être réalisées par de nombreuses cellules de l'organisme. Néanmoins, **seul le foie** (le rein dans une très faible mesure) **a la capacité de faire sortir le glucose des cellules** pour maintenir la glycémie. Le G6P est déphosphorylé par la glucose-6-phosphate phosphatase pour donner le glucose qui est alors pris en charge par le transporteur GLUT-2. Celui-ci exporte le glucose vers la circulation sanguine afin de maintenir une glycémie normale.

Cette capacité de sortie cellulaire du glucose donne au foie un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucidique. L'entrée du glucose dans les cellules est quant à elle sous influence hormonale.

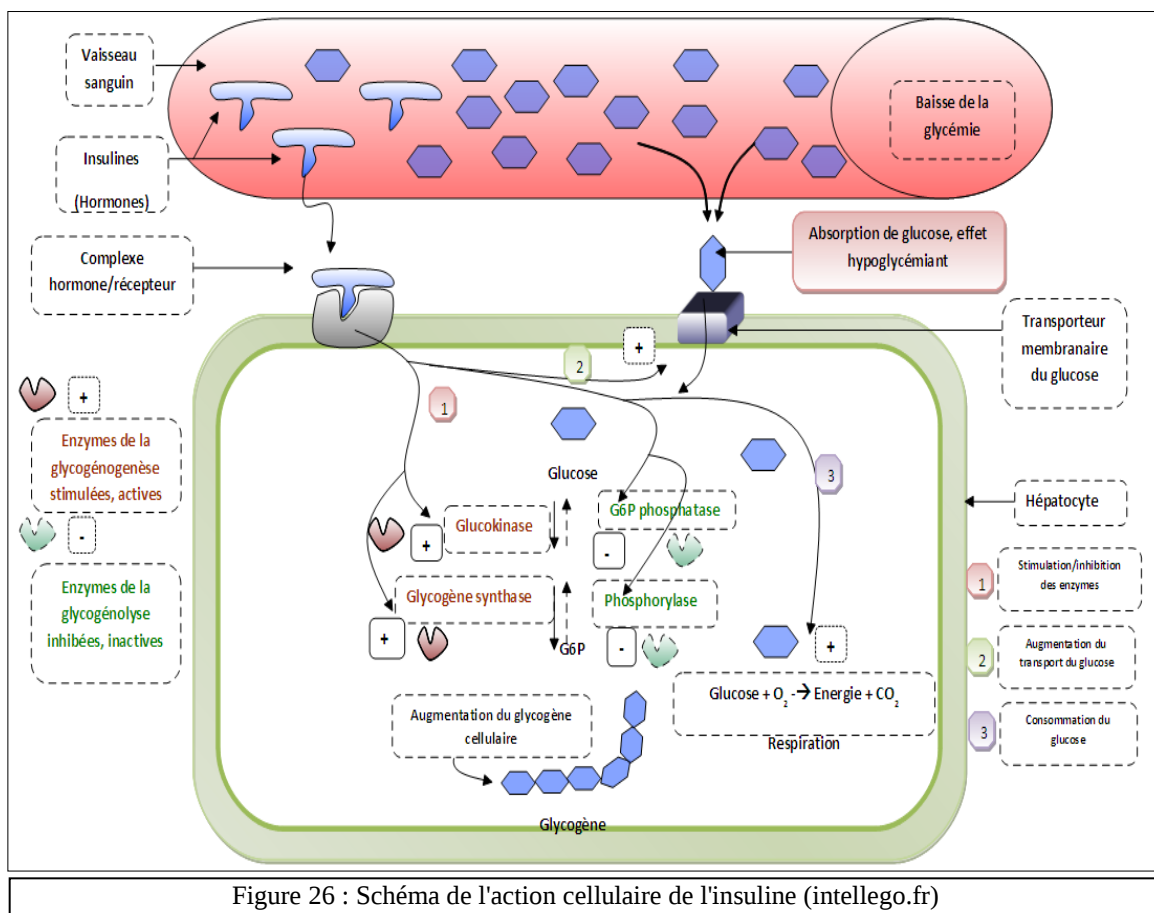
3.1.6. Régulation hormonale de la glycémie

L'entrée du glucose dans les cellules est fonction de leurs besoins. Elle est sous la dépendance de l'expression d'hormones, elle même corrélée à la glycémie. **Les deux principales hormones en jeu sont l'insuline et le glucagon.**

L'**insuline** est synthétisée par les cellules β du pancréas. Elle est libérée en grande quantité après un repas et entraîne la pénétration du glucose dans la cellule. Globalement, elle stimule le catabolisme du glucose, c'est à dire tous les phénomènes diminuant la glycémie et augmentant la consommation du G6P intracellulaire. Ainsi, on observe une activation des enzymes de la **glycolyse et de la glycogénogenèse** et une répression des enzymes de la néo-glucogénèse et de la glycogénolyse.

Les récepteurs de l'insuline sont retrouvés sur l'ensemble des tissus, majoritairement au niveau des muscles et du foie. La liaison entre l'insuline et son récepteur entraîne l'activation de la fonction tyrosine kinase intracellulaire du récepteur. L'activité tyrosine

kinase active un ensemble de cascades réactionnelles mettant en jeu des seconds messagers (52). Les seconds messagers seront actifs sur les enzymes clés du métabolisme du glucose en vue d'augmenter la pénétration et le stockage du glucose (figure 26).



La sécrétion de l'insuline par le pancréas est directement liée à la concentration plasmatique du glucose. L'entrée de glucose dans les cellules β active l'expression du gène de l'insuline et la synthèse de l'ARNm codant pour cette protéine. Elle est ensuite libérée dans la circulation pour exercer son action sur les tissus périphériques.

La deuxième hormone majeure de régulation de la glycémie est le glucagon (53). Elle est sécrétée par les cellules α du pancréas, proche des cellules β insulino-sécrétrices. Une baisse de la glycémie dans la circulation, va entraîner une activation de l'expression du gène du glucagon. Le **glucagon**, comme l'insuline, va rejoindre la circulation et interagir avec son récepteur. Les récepteurs au glucagon sont principalement situés sur les cellules hépatiques et rénales qui sont les principaux libérateurs de glucose. Ce sont des structures à 7 hélices transmembranaires couplées à une protéine G. Une activation du récepteur va entraîner une élévation de la concentration d'AMPc (second messenger) et une activation

des mécanismes de transduction intracellulaire (Figure 27). Cela va aboutir à une activation d'enzymes de la **glycogénolyse et de la néo-glucogénèse**.

Insuline et glucagon sont les deux principales hormones régulatrices de la glycémie. Elles sont sous le contrôle direct de la glycémie et effectuent un retro-contrôle l'une sur l'autre. La présence de récepteurs à l'insuline sur les cellules α et de récepteurs au glucagon sur les cellules β permet aux deux hormones d'interagir directement l'une sur l'autre. Cela permet un contrôle de la glycémie plus rapide et plus précis. En plus de leur action sur le métabolisme glucidique, les deux hormones agissent sur les lipides et les protéines. Via des récepteurs cellulaires, elles modifient l'action de nombreuses enzymes, notamment celles du métabolisme protéique et lipidique.

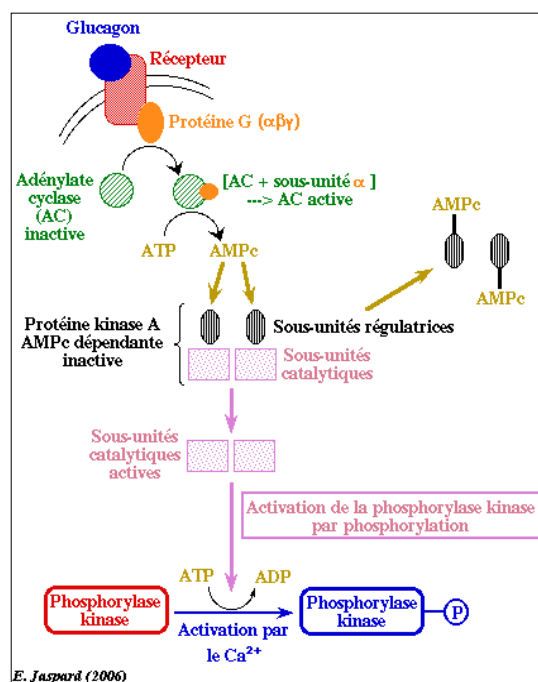


Figure 27 : Mécanisme intracellulaire du glucagon (ead.univ-angers.fr)

D'autres hormones modifient la glycémie en réponse à des situations particulières. Une activation du système sympathique (adrénaline, noradrénaline) par exemple va dans le sens d'une augmentation de la glycémie. En cas de stress, la sécrétion d'adrénaline inhibe l'action de l'insuline. Il en résulte une augmentation du taux sanguin de glucose, ce qui permet une réponse rapide et intense de la part des muscles.

De même, le cortisol, et les glucocorticoïdes en général, activent le catabolisme énergétique à long terme par action sur un récepteur nucléaire. Cela active de nombreuses enzymes activant la protéolyse, la glycogénolyse et la néoglucogénèse.

Le métabolisme du glucose fait intervenir de nombreuses enzymes et hormones de régulation. Pour atteindre l'équilibre, l'organisme réalise sans cesse des ajustements visant à maintenir une glycémie normale. Outre une modification des facteurs exogènes (modification des apports, exercice physique, maladie...) la glycémie est influencée par le microbiote intestinal. Nous allons voir quels mécanismes peuvent être envisagés.

3.2. Influence du microbiote sur le métabolisme des glucides

Ce rappel des points importants du métabolisme glucidique va nous permettre de mieux comprendre l'influence du microbiote et les mécanismes sous-jacents. Nous avons vu précédemment comment le microbiote pouvait favoriser ou apporter une protection contre des pathologies du métabolisme lipidique (42). Ces études ont aussi montré que le microbiote pouvait avoir une influence (positive ou négative) sur des pathologies du métabolisme glucidique, notamment le diabète de type 2 (54).

3.2.1. Fermentation des fibres par le microbiote

Parmi les glucides ingérés par l'homme, nous avons cité les fibres qui sont des glucides non digestibles par les enzymes du tube digestif. Dans la partie proximale de l'intestin se trouvent des bactéries qui ont la capacité de fermenter ces fibres. Elles disposent d'un matériel enzymatique adapté à la digestion des fibres par fermentation. La prise en charge des fibres par ces bactéries conduit à la formation d'acides gras à chaîne courte (short chain fatty acids) qui seront résorbés dans la partie distale de l'intestin. Ils sont représentés par le propionate, l'acétate et le butyrate.

L'influence des **SCFA** sur l'organisme a été étudiée chez l'homme. Ils ont un rôle mineur dans la fourniture d'énergie mais interviennent en tant que régulateurs du métabolisme de certains nutriments (55). Par liaison à des récepteurs d'acides gras libres couplés à des protéines G (free fatty acids receptors 1 et 2), ils semblent avoir un impact positif sur l'hyperglycémie en **inhibant la néo-glucogénèse hépatique, en augmentant la sensibilité des récepteurs à l'insuline et en augmentant la satiété.**

Le développement de certaines espèces du microbiote est directement lié à la production des SCFAs et inversement. Les espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ont une capacité accrue à produire des SCFA. De même, une alimentation supplémentée en SCFA entraîne une augmentation des représentants de ces espèces. Ces deux acteurs, intrinsèquement liés, ont un effet bénéfique sur la santé humaine. Les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* apporteraient une protection vis-à-vis du cancer colorectal et d'autres pathologies digestives (56), tandis que les SCFA ont l'action bénéfique que nous avons décrite.

3.2.2. Le microbiote modifie l'insulino-résistance

Au cours du métabolisme des glucides, l'insuline joue le rôle d'hormone de stockage. Elle est libérée par le pancréas et va interagir avec le foie et les tissus périphériques (muscles) qui vont stocker les monosaccharides sous forme de glycogène. Certains facteurs environnementaux (régime alimentaire, pathologies) et génétiques peuvent entraîner le développement d'une insulino-résistance. Les récepteurs de l'insuline sont désensibilisés et on observe une augmentation importante de la sécrétion d'insuline.

Bäckhed et collaborateurs ont montré que le microbiote modifie le stockage des lipides et des glucides (42) (46) avec l'apparition d'une insulino-résistance. Le mécanisme proposé pour expliquer cette insulino-résistance met en cause le lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est une structure importante de la paroi des bactéries Gram négatif. Lors de la mort des bactéries dans l'intestin, une partie du LPS est résorbée par la muqueuse et passe dans la circulation sanguine. On retrouve alors un taux sanguin de LPS non négligeable.

Cani et collaborateurs étudièrent l'influence du LPS sur les paramètres glucidiques chez les souris ayant un régime enrichi en lipides et glucides (57). Pour ce faire, ils implantèrent une pompe libérant du LPS à des souris. Ils observèrent une corrélation entre la présence de LPS et l'augmentation de la glycémie et de l'insulino-résistance hépatique. Le mécanisme proposé se base sur l'effet pro-inflammatoire du LPS. Le LPS étant d'origine bactérienne, il entraîne une réponse immunitaire de la part de l'organisme. On observe alors une augmentation concomitante de marqueurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6). Ces marqueurs sont responsables d'une inflammation à bas bruit retrouvée dans le diabète sucré de type 2 (58). Nous pouvons en conclure que **le LPS, par son action pro-inflammatoire entraîne une symptomatologie comparable à celle observée lors du diabète de type 2.**

Dans une deuxième partie de leur étude, Cani et collaborateurs montrèrent que les souris déficitaires en récepteur CD-14 étaient protégées de l'action pro-inflammatoire du LPS. Le récepteur CD-14 servant de ligand pour le LPS, ils en concluent que le couple LPS/CD-14 est à la base de l'insulino-résistance observée et est un bon candidat expliquant la libération de cytokines pro-inflammatoires.

Il est important de noter que l'inflammation observée est aussi fortement influencée par le régime alimentaire. Les auteurs rappellent le rôle de récepteurs aux acides gras portés par les adipocytes et les macrophages (TLR-4). Celui-ci en captant certains lipides

de la circulation entraîne la libération des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'insulino-résistance observée chez la souris en présence de LPS est moindre si elles ne sont pas nourries avec un régime riche en graisses et en sucres.

Cette étude nous montre que **le LPS, combiné à un régime riche, semble être à l'origine d'une inflammation latente et favorise le développement d'une insulino-résistante.**

3.2.3. Effet « insuline-like » du microbiote

Le glucagon est la deuxième principale hormone de régulation que nous avons évoquée. Sa sécrétion est en lien direct avec la glycémie, mais elle peut être modifiée par d'autres facteurs. Deux peptides sécrétés par les cellules intestinales permettent d'affiner la régulation de la glycémie. Le GLP-1 (glucagon-like peptide-1) sécrété par les cellules L de l'intestin, et le GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) sécrété par les cellules K de l'intestin sont nommés **incrétines**. Lors de l'ingestion de glucides, leur sécrétion va avoir une action pancréatique et une action extra-pancréatique.

Au niveau du pancréas, les incrétines entraînent une augmentation de la quantité de cellules β et stimulent la sécrétion d'insuline. Dans les compartiments extra-pancréatiques, les incrétines augmentent la sensibilité des hépatocytes vis-à-vis de l'insuline et augmentent la vidange gastrique et la satiété post-prandiale (59).

Plus spécifiquement, le GLP-1 a une action importante sur la sécrétion d'insuline par un mécanisme impliquant l'AMPc (60). Sa libération augmente la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques. Inversement, il inhibe la sécrétion du glucagon. Il a donc un impact important sur le ratio insuline/glucagon. Son action extra-pancréatique a aussi été démontrée avec notamment une stimulation de la vidange gastrique (61).

L'effet insuline-like du microbiote est lié à sa capacité à modifier les taux d'incrétines. Cani et collaborateurs ont notamment étudié l'impact de l'ingestion de prébiotiques sur la sécrétion de GLP-1 (62). Ils montrèrent que l'ingestion d'oligo-fructanes stimulait la croissance de certains genres bactériens (*Bifidobacterium*). Ces derniers stimulent l'activité des cellules L et donc la sécrétion d'incrétines (GLP-1 et 2). Le mécanisme précis aboutissant à l'augmentation des concentrations d'incrétines par le microbiote ne semble pas encore élucidé.

Le microbiote a donc une influence sur le métabolisme glucidique par une modification de la digestion des fibres et par une modification de la sécrétion et de l'action de l'insuline. Son action sur les SCFAs et sur les incrétines semble augmenter la satiété post-prandiale. En parallèle, la sécrétion d'insuline est augmentée, notamment par la présence de certaines espèces (*Bifidobacterium*). A contrario, les bactéries portant le LPS dans leur paroi semblent augmenter l'insulino-résistance en entretenant une inflammation à bas bruit.

Ces données doivent encore être approfondies et nous permettront à terme d'envisager des stratégies thérapeutiques basées sur une modification du microbiote intestinal. Une modification de la composition du microbiote intestinal permettra d'améliorer la symptomatologie de pathologies liées au métabolisme des glucides (diabète sucré, syndrome métabolique...)

4. Influence sur le développement du système immunitaire

Afin de conclure notre étude de l'influence du microbiote intestinal, nous allons présenter son influence sur le développement du système immunitaire. **Le système immunitaire représente l'ensemble des cellules et des processus métaboliques visant à conserver l'intégrité du corps humain.** Tout germe extérieur peut potentiellement être reconnu par ce système comme pathogène et être éliminé. Nous pouvons alors nous demander pourquoi les bactéries du microbiote ne sont pas reconnues comme pathogènes et si elles peuvent influencer notre système immunitaire.

Le système immunitaire est un système très complexe. Toutes les muqueuses de notre organisme disposent de tissus spécifiques spécialisés dans la défense immunitaire. L'ensemble de ces tissus est appelé MALT (mucous associated lymphoïde tissue). Dans la région du tube digestif, ces tissus prennent le nom de GALT (gut associated lymphoïde tissue). Le GALT est constitué d'amas de tissus lymphoïdes regroupant des cellules de l'immunité (lymphocytes T et B, cellules NK, macrophages...). Ces cellules interagissent entre elles par l'intermédiaire de récepteurs (TLR, BCR, CMH...) et de cytokines (TNF, interleukines, IFN...)

A la naissance, le système immunitaire est immature. Tout au long de la vie, il va se développer, « apprendre » à reconnaître les cellules du « non-soi » et à les éliminer. Dans cette maturation, le microbiote est maintenant connu comme particulièrement important.

En premier lieu, les espèces constituant le microbiote normal ont une action locale sur la prolifération d'organismes opportunistes ou pathogènes. En produisant un bio-film et en occupant des niches écologiques, le microbiote inhibe le développement d'autres micro-organismes.

L'influence du microbiote est aussi observée sur l'ensemble des tissus immunitaires et des cellules de l'immunité. En 2012, Hooper et collaborateurs (63) publient dans la revue Science un résumé des connaissances sur le sujet. Ils résument l'influence du microbiote par trois axes de réflexions :

- le microbiote stimule la croissance des tissus lymphoïdes
- le microbiote modifie l'équilibre des lymphocytes T et influence l'action des cellules NK
- le microbiote pourrait améliorer les symptômes liés à des maladies impliquant l'auto-immunité (diabète de type 2) ou à des pathologies inflammatoires chroniques (maladies de Crohn)

Le troisième point se rapportant à des états pathologiques, nous nous concentrerons sur les deux premiers axes de réflexion de Hooper et collaborateurs pour présenter les interactions entre microbiote et système immunitaire.

4.1. Le microbiote procure une protection mécanique

Dès la naissance, le tractus digestif est mis en contact avec une flore bactérienne amenée à devenir le microbiote intestinal normal de l'hôte. Il se développe alors un lien complexe entre la muqueuse intestinale et les bactéries résidentes. Le système immunitaire étant sans cesse en contact avec des antigènes du microbiote, il se développe une immunotolérance. Cette immunotolérance rend possible la présence des bactéries du microbiote sans que celles-ci ne deviennent immunogènes. Par conséquent, ces bactéries viennent à former un bio-film et occupent des niches écologiques. Une perturbation du

microbiote normal (pathologies, antibiothérapie...) peut rendre ces niches écologiques accessibles à des organismes opportunistes ou pathogènes (64).

L'organisme opportuniste le plus couramment mis en cause est *Candida albicans*. *C. albicans* est une levure appartenant à la flore intestinale et présente en proportion très faible. En cas de perturbation du microbiote (par un traitement antibiotique ou une immunodépression la plupart du temps), la levure va se développer (on peut parler de « bloom ») et coloniser l'ensemble du tube digestif. *C. albicans* étant normalement présente au niveau du tube digestif, la réponse immunitaire reste faible et le développement devient anarchique et pathologique.

Cet exemple illustre la capacité du microbiote à procurer une protection mécanique à la muqueuse intestinale. Par sa présence, il évite que des organismes opportunistes ou pathogènes ne se développent suffisamment pour coloniser l'ensemble de la muqueuse.

4.2. *Le microbiote favorise le développement des tissus de l'immunité*

Les muqueuses du corps humain sont entourées et protégées par le MALT. Au niveau de l'intestin le MALT prend le nom de GALT. Ce tissu croît dès la naissance, les cellules qui le constituent sont mises contact avec les antigènes du milieu extérieur ce qui permet une maturation des cellules immunitaires « mémoires ». Celles-ci reconnaîtront ensuite plus facilement ces antigènes. **La réponse immunitaire comporte deux versants : la réponse humorale et la réponse cellulaire.** La réponse humorale correspond à la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Ces anticorps vont neutraliser les antigènes de taille réduite ou entourer les cellules étrangères pour faciliter la réponse cellulaire. La réponse cellulaire correspond à l'activation des lymphocytes T_{CD8} et des cellules NK (natural killer). Celles-ci vont reconnaître les cellules du non-soi et les détruire.

En 1999, Cebra utilise un fragment de microbiote pour comparer le développement du GALT chez les souris axéniques et les souris colonisées (65). Il utilise une fraction du microbiote appelé SFB (Segmented Filamentous Bacteria) pour coloniser des souris axéniques. L'ensemble de ses observations lui permet de conclure que cette fraction permet le développement du système immunitaire de la muqueuse via les IgA (« it seems that

SFB, which appear in rats and mice only around the time of weaning may be a major stimulus of the development of the natural mucosal IgA system »). Il observe une augmentation des IgA au niveau de la muqueuse intestinale ainsi qu'une augmentation de l'activité immunitaire au niveau des plaques de Peyer.

Plus récemment, des études ont montré que chez les souris axéniques, la diminution de la sécrétion des IgA s'accompagnait d'une réduction de la taille de l'ensemble des tissus lymphoïdes entourant l'intestin. Le GALT en particulier ainsi que les plaques de Peyer sont de taille plus réduite en absence de microbiote (66). En parallèle, on observe une diminution de l'activité du système immunitaire se traduisant par une diminution de l'expression de nombreux messagers humoraux incluant les récepteurs TLR et les défensines (Figure 28)

Immunological defect	Site	Phenotype in germ-free mice compared with conventionally housed mice
Development of small intestine	Peyer's patches	Fewer and less cellular
	Lamina propria	Thinner and less cellular
	Germinal centres	Fewer plasma cells
	Isolated lymphoid follicles	Smaller and less cellular
Development of mesenteric lymph nodes	Germinal centres	Smaller, less cellular and with fewer plasma cells
CD8 ⁺ T cells	Intestinal epithelial lymphocytes	Fewer cells and with reduced cytotoxicity
CD4 ⁺ T cells	Lamina propria	Fewer cells; decreased T _H 17 cells in the small intestine but increased T _H 17 cells in the colon
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells	Mesenteric lymph nodes	Reduced expression of FOXP3 and reduced suppressive capacity
Expression of angiogenin 4	Paneth cells	Reduced
Expression of REG3γ	Paneth cells	Reduced
Production of secretory IgA	B cells	Reduced
Levels of ATP	Intestine	Reduced
Expression of MHC class II molecules	Intestinal epithelial cells	Reduced
Expression of TLR9	Intestinal epithelial cells	Reduced
Levels of IL-25	Intestinal epithelial cells	Reduced
FOXP3, forkhead box P3; IL-25, interleukin 25; REG3γ; regenerating islet-derived 3γ; T _H 17, T helper 17; TLR9, Toll-like receptor 9.		

Figure 28 : Déficience du système immunitaire chez les souris axéniques (d'après Round et Mazmanian)

La diminution de l'ensemble de ces messagers peut avoir un effet direct sur les mécanismes de défense de l'organisme. Prenons comme exemple le facteur RegIIIγ. Il a été mis en évidence que le LPS bactérien pouvait localement favoriser la réparation cellulaire par stimulation de la sécrétion de RegIIIγ. Cette voie de réparation, impliquant aussi les TLR, apparaît comme altérée chez les souris dépourvues de microbiote (63). Cet exemple

nous montre que **le microbiote agit sur la fonction immunitaire de l'intestin par modification de la sécrétion de molécules de régulation** ou par modification de l'expression de certains récepteurs. Les mécanismes sont encore mal connus mais ces études permettent de conclure à l'effet bénéfique du microbiote sur la maturation du système immunitaire.

4.3. Le microbiote modifie la prolifération des cellules de l'immunité

L'efficacité de la réponse immunitaire est dépendante de l'équilibre qu'il existe entre ses différents acteurs. Nous avons décrit ce qu'était la réponse immunitaire cellulaire. Cette réponse se base sur un équilibre entre les lymphocytes T_{CD8} et T_{CD4} (aussi appelés helper). **Les lymphocytes T_{CD8} sont des acteurs cytotoxiques pour les cellules cibles tandis que les lymphocytes T_{CD4} jouent le rôle de « chefs d'orchestre »** en régulant le rapport LT_{CD8} /plasmocytes.

La lignée des lymphocytes T_{CD4} se divise en deux lignées principales, les LT_{H1} et les LT_{H2} (aussi appelés Treg). Les premiers, par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, $IFN\gamma$...), vont favoriser une réaction inflammatoire importante. Les seconds vont sécréter des médiateurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10...).

Au sein des LT_{H1} , les LT_{H17} sont les mieux connus. Leur différenciation nécessite l'action de cytokines (IL-6, IL-21, IL-23, $TGF-\beta$) et peut être modifiée par la présence du microbiote. Récemment, il a été montré que la prolifération des cellules LT_{H17} nécessitait la présence du microbiote (67). Par ailleurs, la présence du microbiote était indispensable au maintien d'un nombre suffisant des représentants de cette lignée. Ces conclusions suggèrent qu'un composant spécifique du microbiote est indispensable à la prolifération des LT_{H17} .

Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence qu'une modification de la composition du microbiote modifiait la prolifération des cellules LT_{H17} . Ils démontrent notamment que les bactéries appartenant au groupe des *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* favorisent la différenciation et le maintien des LT_{H17} .

Le ratio LT_{H1}/LT_{H2} conditionne l'efficacité de la réponse immunitaire. En modifiant ce ratio, le microbiote peut influencer la réponse immunitaire. Pour être efficace la réponse

immunitaire doit maintenir un niveau d'inflammation assez élevé sans que celui-ci ne devienne pathologique. Une dérégulation du ratio LT_{H1}/LT_{H2} peut conduire à des phénomènes inflammatoires chroniques ou, à court terme, allonger la durée de l'inflammation dans les processus infectieux.

La réponse immunitaire intestinale est donc conditionnée par la présence du microbiote. Celui-ci, par sa simple présence procure une protection mécanique et occupe des niches écologiques qui ne peuvent par conséquent pas être occupées par des organismes pathogènes. Ensuite, le microbiote favorise le développement et la maturation du système immunitaire intestinal. Il favorise la prolifération des tissus de l'immunité, la sécrétion de médiateurs immunitaires et la prolifération de certaines sous populations de lymphocytes T. Il semblerait enfin que certaines espèces du microbiote aient une action pro-inflammatoire. C'est le cas des bactéries appartenant au phylum *Bacteroides*. Ces observations peuvent être mises à profit en thérapeutique : en modifiant notre microbiote, nous pourrions peut être influencer sur l'évolution de pathologies chroniques intestinales (maladie de Crohn, rectocolite...) ou sur des phénomènes inflammatoires aigus.

La deuxième partie de cette thèse a présenté l'influence du microbiote intestinal sur l'organisme sain. Physiologie intestinale, métabolismes glucidique et lipidique, système immunitaire, les conséquences de la présence du microbiote intestinal sont clairement établies.

Le microbiote modifie la physiologie intestinale en densifiant le réseau vasculaire et en augmentant la motilité intestinale. Les métabolismes glucidique et lipidique se voient modifiés par des mécanismes complexes présentés précédemment. Enfin, le microbiote intestinal est un acteur de l'immunité en fournissant une protection mécanique et en tant que modulateur des cellules immunitaires. La présentation du fonctionnement normal de ces grands systèmes ainsi que des mécanismes les reliant au microbiote nous poussent même à conclure à l'action bénéfique du microbiote.

Mais les connaissances que nous avons sur le microbiote intestinal peuvent elles être exploitées en thérapeutique ? En prenant l'exemple de l'autisme dans notre troisième partie, nous allons donner des éléments de réponse à cette question.

Partie III :

Microbiote intestinal et pathologie humaine : exemple de l'autisme

La connaissance du microbiote et de ses relations avec notre organisme nous a permis de comprendre son influence sur notre corps. Nous venons d'étudier comment le microbiote modifie le métabolisme de l'hôte sain. Nous allons maintenant voir comment les connaissances sur le microbiote peuvent être utiles en pathologie humaine. Nous verrons ainsi quels liens il peut y avoir entre les pathologies humaines et les bactéries intestinales.

Le but final des études sur le microbiote est de mettre à profit les découvertes réalisées pour améliorer la santé humaine. Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances dans le domaine, les liens entre microbiote et pathologies sont devenus évidents pour l'ensemble de la communauté médicale. L'obésité et les pathologies inflammatoires du tube digestif (maladies de Crohn, rectocolite) ont été les premières à faire l'objet d'études spécifiques (68). Par la suite, le microbiote a montré l'influence qu'il pouvait avoir sur des pathologies telles que le diabète sucré ou des pathologies psychiatriques (69).

Dans cette troisième partie, nous prendrons l'exemple de l'autisme pour illustrer les liens entre le microbiote et un état pathologique. En raison du faible nombre d'étude portant sur ce domaine, notre exposé consistera essentiellement en une présentation des modifications du microbiote chez les individus présentant une pathologie autistique. Nous commencerons par définir l'autisme puis nous verrons les liens qui existent entre cette pathologie et le microbiote. Enfin, nous étudierons les mécanismes envisagés pour expliquer l'influence du microbiote sur la pathologie.

1. Présentation et définition de l'autisme

1.1. Contexte épidémiologique de l'autisme

L'autisme est une pathologie psychiatrique dont l'incidence est en augmentation (prévalence estimée à environ 1% actuellement (70)). Elle a une origine multifactorielle avec une forte composante génétique et une influence de l'environnement. Des antécédents familiaux ainsi que la présence d'un enfant autiste dans la fratrie sont reconnus comme des facteurs de risque de développer la maladie. Elle touche par ailleurs préférentiellement les garçons (sexe ratio de 4 pour 1).

On observe une forte augmentation des cas diagnostiqués d'autisme (figure 29 (71)). Il est considéré que cette augmentation est la conséquence de deux facteurs, l'augmentation réelle de l'incidence de l'autisme et une augmentation des diagnostics d'autisme fait par les médecins grâce à une détection plus précoce des symptômes. En effet, le diagnostic repose sur des critères et des symptômes qui évoluent constamment. L'évolution des classifications concernant les pathologies psychiatriques tend à augmenter le nombre d'enfants diagnostiqués « autistes ».

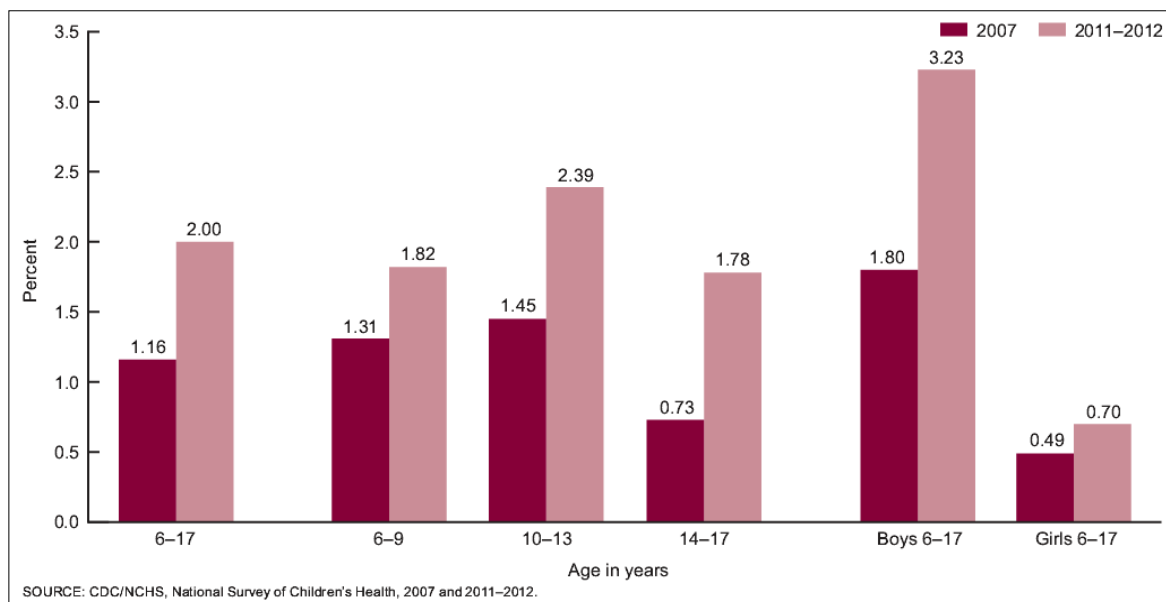


Figure 29 : Pourcentage des enfants (6-17 ans) présentant un trouble du spectre de l'autisme (USA 2007 et 2011-2012)

1.2. Les différentes classifications

L'autisme est une pathologie psychiatrique complexe. Ce que l'on appelle couramment autisme regroupe en réalité un ensemble de pathologies reliées entre elles par des symptômes communs. Il est plus juste actuellement de parler de **troubles du spectre de l'autisme**. Ce terme regroupe un ensemble de pathologies avec des expressions allant de simples troubles de l'expression verbale à des formes beaucoup plus profondes.

Selon la Haute Autorité de Santé, les troubles du spectre de l'autisme sont à rapprocher de l'ensemble des **troubles envahissants du développement (TED)** en raison de la proximité des symptômes observés (72). La HAS se base sur la Classification Internationale des Maladies (CIM). Elle définit l'autisme et les TED comme « un trouble caractérisé par des altérations qualitatives des interactions sociales réciproques et des modalités de communication, ainsi que par un répertoire d'intérêts et d'activités restreint, stéréotypé et répétitif ». Succinctement, l'autisme au sens large repose sur une triade : **troubles de la communication et du langage, troubles des interactions sociales, et comportements répétitifs**. En France, la Classification Française des Troubles Mentaux de l'Enfant et de l'Adolescent (CFTMEA) propose une définition sensiblement identique en rapprochant l'autisme des TED (73).

Une deuxième classification internationalement reconnue est celle fournie par l'American Psychiatric Association par l'intermédiaire du DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) dont la 5^{ème} version (DSM-V) a été publiée en mai 2013. Cette nouvelle version modifie d'une façon importante la classification se rapportant à l'autisme et aux troubles associés. Dans la 4^{ème} version, on distinguait l'autisme du syndrome d'Asperger et des troubles envahissants du développement non spécifiés (TED-NS). Dans la nouvelle version, cet ensemble se regroupe sous le terme de troubles du spectre de l'autisme. Notre étude portant sur le microbiote intestinal, nous ne discuterons pas de ces modifications de classification ici. Nous nous contenterons de nous référer aux différentes classifications citées pour avoir une vision plus précise de l'autisme.

1.2. Proposition de définition

La lecture des différentes classifications décrivant l'autisme permet de faire ressortir une définition générale. Nous pouvons donc considérer que **l'autisme est un**

trouble envahissant du développement dont la symptomatologie repose sur une **triade : troubles de la communication avec autrui, troubles des relations avec les autres personnes et présence de comportements répétitifs**. Les composantes de cette triade sont observées avec une intensité variant d'un individu à l'autre (74). Les patients diagnostiqués autistes ou présentant un TED englobent donc une population très hétérogène. Le diagnostic et la prise en charge repose donc sur une approche multidisciplinaire incluant des psychiatres, des psychologues, les personnes aidantes et l'entourage proche.

Il est important de noter que les patients souffrant de troubles du spectre de l'autisme ont des symptômes associés dont la prévalence est très élevée. Ceux qui nous intéressent particulièrement sont les troubles digestifs. En effet, les sujets autistes présentent dans la majorité des cas des épisodes récurrents de diarrhées/constipation et de douleurs musculaires intestinales, proportionnels au degré d'autisme. Ces symptômes annexes peuvent entraîner une modification directe de la composition du microbiote. Les études sur sa composition seront par conséquent plus difficiles à interpréter. Par ailleurs, les troubles intestinaux ainsi que d'autres pathologies associées (infection ORL ou digestives) justifient la prise régulière d'antibiotiques. Ces médicaments, par leur action sur les bactéries modifient considérablement la composition du microbiote. Ces deux éléments sont indispensables à prendre en compte lorsque l'on veut étudier le microbiote intestinal des sujets souffrant de troubles du spectre de l'autisme.

2. Modifications du microbiote observé dans l'autisme

Voyons maintenant les modifications observées dans le microbiote des individus présentant un autisme ou un TED. Les études portant spécifiquement sur cette population restent assez peu nombreuses. Ainsi, il reste encore difficile de savoir si la modification du microbiote est une conséquence de la pathologie autistique ou si la modification du microbiote peut influencer la gravité des symptômes. Nous allons d'abord présenter les modifications observées sans préjuger de leur origine, puis nous verrons les mécanismes sous-jacents.

2.1. Le microbiote des personnes autistes diffère du microbiote normal

Le microbiote intestinal dit normal est une notion difficile à définir en raison de la grande diversité des profils observables. Nous avons tout de même défini dans la première partie de cette thèse ce que l'on pouvait considérer comme un microbiote normal ainsi que les espèces pouvant le composer. Voyons maintenant en quoi il peut différer de celui observé chez les patients autistes.

L'équipe de Finegold et collaborateurs a mené plusieurs études visant à caractériser le microbiote des personnes autistes et l'influence de ce dernier sur la pathologie (75). En 2010, ils entreprirent de comparer le microbiote de 33 patients autistes (figure 30) à celui de sujets témoins de la même famille (siblings control au nombre de 7) ou non (non-siblings control au nombre de 8). La première information apportée par cette étude est que **le microbiote intestinal des patients autistes présente une plus grande diversité d'espèce**. Par extrapolation aux mesures faites dans les échantillons, Finegold et son équipe estime que le microbiote des enfants autistes présentait 1118 espèces là où celui des témoins n'en comportait que 567. Parallèlement, **on observe une modification importante du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes***. Chez les témoins, on observait des pourcentages respectifs de 64% et de 30%. Chez les sujets autistes, on observe des pourcentages de 39% et 51%.

Phylum	Control (n = 8)	S-control (n = 7)	Mild-autism (n = 19)	Severe autism (n = 11)
Firmicutes	63.631 ± 17.593	44.012 ± 24.576	38.975 ± 15.434	38.015 ± 13.772
Actinobacteria	1.812 ± 1.679	1.037 ± 1.515	0.732 ± 1.426	0.464 ± 0.597
Bacteroidetes	30.226 ± 16.413	44.326 ± 17.794	51.591 ± 12.327	51.248 ± 7.043
Proteobacteria	0.535 ± 0.428	2.327 ± 3.789	2.281 ± 2.414	3.122 ± 2.579
Verrucomicrobia	5.031 ± 7.920	9.498 ± 13.214	8.092 ± 7.968	8.079 ± 11.990
Cyanobacteria	0.318 ± 0.178	0.256 ± 0.408	0.090 ± 0.117	0.069 ± 0.075
Fusobacteria	0.081 ± 0.0	0.0	0.024 ± 0.010	0.024 ± 0.0
Tenericutes	0.0	0.110 ± 0.079	0.789 ± 0.117	0.167 ± 0.209
Lentisphaerae	0.0	0.0	0.037 ± 0.0	0.0

Figure 30 : Comparaison du microbiote de sujets atteints d'autisme et du microbiote de sujets sains (Finegold et collaborateurs)

En complément, on notera qu'il existe une modification importante de la répartition des espèces du genre *Clostridium* dans les populations atteintes d'autisme. En 2002, Finegold et son équipe avaient mis en évidence une **plus grande diversité d'espèces du genre *Clostridium* chez les patients autistes** (76). Ils notèrent en complément une quasi-absence des espèces formant des spores chez les sujets témoins alors que les patients autistes présentaient une persistance de ces espèces. En 2005, Parracho et collaborateurs

obtenaient des résultats similaires en observant une augmentation des bactéries du groupe de *C. histolyticum* (77).

Les nouvelles espèces observées chez les sujets autistes semblent modifier l'influence du microbiote sur l'organisme. Finegold et collaborateurs citent notamment **le genre *Desulfovibrio*** (phylum *Proteobacteria*) **qui semble avoir une action négative sur les symptômes de l'autisme** (78). De même, on observe une augmentation significative de *Bacteroides vulgatus*, qui appartient au phylum *Bacteroidetes*.

A contrario, certaines espèces sont observées dans un nombre plus restreint chez les patients autistes que chez les sujets témoins. **On observe une diminution quantitative et qualitative des espèces du genre *Bifidobacterium*.** Le nombre d'individus est inférieur et la diversité des espèces diminue chez les patients atteints d'autisme. Les espèces *B.*

Species	Avg A (n = 11)	St. dev A	Avg C (n = 8)
<i>B. adolescentis</i>	0.125	0.261	0.154
<i>B. angulatum</i>	0.000	0.000	0.046
<i>B. animalis</i>	0.005	0.016	0.000
<i>B. bifidum</i>	0.012	0.020	0.017
<i>B. dentium</i>	0.001	0.005	0.000
<i>B. longum</i>	0.084	0.150	0.636
<i>B. pseudocatenulatum</i>	0.025	0.063	0.161
<i>B. pseudolongum</i>	0.000	0.000	0.012
<i>B. saeculare</i>	0.006	0.020	0.000
<i>Bifidobacterium</i> genus	0.258		0.409

Figure 31 : Comparaison de la prévalence des espèces du genre *Bifidobacterium* chez des sujets atteints d'autisme (Avg A) et des sujets sains (Avg C) (Finegold et collaborateurs)

longum et *B. adolescentis* semblent être particulièrement concernées par cette diminution. Il est intéressant de noter que ces deux espèces sont reconnues pour leurs effets bénéfiques et utilisées couramment comme pro-biotiques.

La comparaison du microbiote normal et du microbiote de sujets autistes nous montre donc l'existence de différences qualitatives et quantitatives :

- il existe une modification de la répartition des phyla principaux avec notamment une inversion du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*
- on observe une grande modification de la répartition des espèces du genre *Clostridium* avec une persistance des espèces formant des spores chez les autistes
- il existe une plus grande diversité d'espèces chez les patients autistes avec l'observation de nouvelles espèces. La présence de *Bacteroides vulgatus* et *Desulfovibrio* semble particulièrement préjudiciable.
- on observe une diminution de bactéries considérées comme bénéfiques comme par exemple *Bifidobacterium longum* et *B. adolescentis*.

2.2. *Le microbiote comme acteur dans l'autisme*

Nous venons de présenter les modifications qualitatives et quantitatives du microbiote chez les patients atteints de troubles du spectre de l'autisme. Le but final des études que nous avons citées est de trouver de nouvelles cibles pouvant améliorer la symptomatologie de ces troubles, voire d'identifier des facteurs les favorisant. Nous allons donc voir maintenant les mécanismes expliquant l'influence du microbiote.

2.2.1. Le lipopolysaccharide favoriserait l'aggravation des symptômes

Nous avons vu plus haut que la modification la plus notable dans la composition du microbiote des patients autistes est une inversion du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Un microbiote normal possède environ 60% de *Firmicutes* et 30% de *Bacteroidetes*. Les études sur le microbiote des patients autistes montre des pourcentages d'environ 50 % de *Bacteroidetes* contre 37% de *Firmicutes* (75).

L'augmentation significative de la proportion de *Bacteroidetes* entraîne une augmentation du lipopolysaccharide (LPS). Le phylum *Bacteroidetes* comprend de nombreux genres bactériens Gram négatif dont la paroi est composée de LPS. Nous avons présenté l'action du LPS au niveau de l'organisme (II.3.2.2.). La production de certains médiateurs pro-inflammatoires pourrait avoir une action négative sur la symptomatologie autistique (79). **Le LPS par une activité pro-inflammatoire au niveau cérébral est supposé délétère dans la pathologie autistique.**

2.2.2. Les bactéries du genre *Clostridium* ont un effet délétère sur la symptomatologie

L'utilisation d'antibiotiques chez les patients souffrant d'autisme ou de maladies proches altère le microbiote habituel des patients. En 2000, l'équipe de Sandler et Finegold supposa que cette altération pouvait favoriser l'implantation de bactéries productrices de neurotoxines ayant un effet négatif sur les symptômes de l'autisme (80). Ces neurotoxines, seraient produites par certaines bactéries (notamment le genre *Clostridium*) lors de la digestion de blé et de produits laitiers.

Afin d'étayer leur hypothèse, ils utilisèrent la vancomycine, un antibiotique très peu résorbé par voie orale et ayant une action préférentielle sur les bactéries du genre *Clostridium*. Ils observèrent une amélioration à court terme des symptômes. L'arrêt de l'antibiotique provoquait un retour à l'état initial.

D'après les auteurs, l'amélioration de la symptomatologie pourrait s'expliquer par la suppression d'espèces du genre *Clostridium* qui sont des espèces productrices de neurotoxines, notamment de l'acide propionique (81). Ces neurotoxines seraient alors considérées comme des facteurs délétères dans les troubles du spectre de l'autisme (77).

Le retour à l'état initial quant à lui s'expliquerait par la production de formes de résistances (spores) par les *Clostridium* (75) (79). Ces dernières, après l'arrêt de l'antibiotique, permettraient une prolifération rapide des espèces considérées et un retour à l'état initial.

Les espèces du genre *Clostridium*, par la production de neurotoxines et par la production de spores de résistance pourraient avoir un effet négatif sur la symptomatologie autistique.

Il est par ailleurs intéressant de noter que la production de ces toxines serait liée au régime alimentaire (produits laitiers, blé). Une modification de l'alimentation pourrait donc avoir un effet sur la pathologie autistique.

2.2.3. Le genre *Desulfovibrio* tient un rôle clé dans la symptomatologie de l'autisme

Le microbiote des patients autistes montre une plus grande diversité avec l'apparition de nouvelles bactéries. Parmi elles, celles du genre *Desulfovibrio* semblent avoir un rôle clé dans l'autisme. Elles sont retrouvées dans au moins 50% des cas chez les patients autistes alors qu'elles n'appartiennent pas au microbiote considéré comme normal (78). Les mécanismes mis en jeu se basent sur trois hypothèses.

Le genre *Desulfovibrio* est une bactérie gram négatif. Il possède donc dans sa paroi du lipopolysaccharide (LPS). De même que pour les bactéries gram négatif, le LPS présent dans la paroi des *Desulfovibrio* pourrait avoir une influence sur la symptomatologie autistique (79).

Les conséquences sur le cerveau de la présence de *Desulfovibrio* semblent aussi avoir pour origine les modifications enzymatiques engendrées par ces bactéries (82). Elles

agissent sur le stress oxydatif par action sur des réactions de méthylation et d'oxydation de groupement sulfate (78). Il est tout de même important de garder en tête que les bactéries ne sont pas les seuls acteurs pouvant modifier le métabolisme oxydatif.

En complément, les espèces du genre *Desulfovibrio* s'avèrent augmenter fortement les taux d'acides gras à chaîne courte (short chain fatty acids ou SCFAs). Dans l'étude de 2007 effectuée par McFabe et ses collaborateurs (81) les auteurs étudièrent les effets de l'acide propionique sur le développement cérébral de rats. Ils injectèrent différentes quantités d'acide propionique chez des rats et observèrent les conséquences. Leurs résultats montrent une toxicité de l'acide propionique in vivo. En s'appuyant sur cette étude, Finegold (78) (79) avance l'hypothèse que **la présence de *Desulfovibrio* au niveau de l'intestin entraîne une neurotoxicité accentuant les symptômes de l'autisme.**

L'autisme, et plus largement les troubles envahissant du développement, sont des maladies complexes ayant des origines génétiques et environnementales. Au sein des multiples facteurs pouvant influencer la maladie, le microbiote est un acteur important. Les études sont encore peu nombreuses mais nous montrent les modifications importantes observées dans le microbiote des patients autistes.

De même, plusieurs hypothèses sur les modifications entraînées par le microbiote sont avancées. Il reste encore beaucoup d'investigations à réaliser pour permettre de comprendre tous les mécanismes mis en causes.

Nous venons donc de voir comment le microbiote influence la symptomatologie autistique. Bien que l'ensemble de la communauté scientifique n'adhère pas à cette hypothèse, il semble qu'une action sur le microbiote ou sur l'alimentation (83) (84) puisse avoir des conséquences bénéfiques sur la symptomatologie.

Cet exemple de l'autisme nous permet de montrer comment la connaissance du microbiote pourrait devenir un outil thérapeutique. Les bactéries de notre intestin ont une influence sur notre organisme, qu'il soit en bonne santé ou non. L'exemple de l'autisme que nous avons pris reflète l'influence qu'a le microbiote sur de nombreuses maladies. Ainsi, en agissant sur le microbiote, notre deuxième cerveau, nous pourrions à l'avenir agir et améliorer les symptômes de nombreuses pathologies.

Conclusion

Les travaux sur le microbiote intestinal ont pris une grande importance depuis que les recherches sur le métagénome sont venues bouleverser nos connaissances. Son étude est un secteur exploratoire considérable pour la santé humaine : le microbiote apparaît de plus en plus comme un élément essentiel à notre organisme avec lequel il vit en symbiose. Physiologiquement, il interagit avec de nombreuses fonctions de notre organisme. Et à l'inverse, on le retrouve dans un certain nombre de pathologies liées à une dysbiose.

Notre étude nous a permis de faire un état des lieux, de définir le microbiote et les notions qui s'y rattachent, et d'effleurer les enjeux de cette nouvelle science. Le microbiote regroupe donc l'ensemble des micro-organismes présents dans un milieu donné, et plus particulièrement les bactéries. Ce microbiote interagit avec son environnement grâce aux produits d'expression de son génome, regroupés sous le terme de microbiome.

L'intestin humain possède son microbiote. On considère maintenant qu'il est constitué de plus de 400 espèces et que plus de 90% des bactéries appartiennent à quatre phyla : les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Proteobacteria* et les *Actinobacteria*. Le reste des espèces appartient à une dizaine d'autres phyla qui représentent la diversité du microbiote. Ces espèces, que ce soit prise individuellement ou dans leur ensemble, interagissent avec l'organisme humain. La physiologie intestinale, les grands métabolismes, l'immunité, sont sous l'influence du microbiote. Les mécanismes en causes sont encore complexes et parfois mal identifiés, mais la connaissance de ces mécanismes laisse entrevoir de nombreuses stratégies utilisables en thérapeutique, et permet d'imaginer à l'avenir des traitements microbiens pour de nombreuses pathologies.

Déjà connue pour les pathologies inflammatoires intestinales, l'influence du microbiote montre actuellement l'ensemble de ses répercussions sur l'organisme. De nombreuses études montrent le potentiel de la modification du microbiote sur des pathologies très variées ; des pathologies métaboliques, inflammatoires mais aussi psychiatriques. Il semble maintenant possible d'intégrer la modification du microbiote dans de nombreuses stratégies thérapeutiques. Un apport d'éléments nutritifs pour certaines bactéries, voire un apport de ces bactéries, peut devenir la clé d'une amélioration

d'un état pathologique. C'est grâce à ce potentiel thérapeutique et son influence sur l'organisme que le microbiote est souvent appelé notre « deuxième cerveau ».

Afin de rester en bonne santé, il semble donc indispensable de pouvoir le protéger dès le plus jeune âge et de le maintenir en "bonne santé". Pour cela il faut d'abord, éviter les produits responsables d'une disparition de tout ou partie du microbiote, responsables d'une diminution de la biodiversité et d'une dysbiose potentiellement dangereuse pour l'organisme. Il faut ensuite poursuivre les recherches afin de mettre au point de nouvelles thérapies basées sur les interactions microbiennes au niveau intestinal en utilisant tout ou partie d'un microbiote ayant les qualités requises.

Cependant, certaines des stratégies mises en œuvre ne sont pas nécessairement sans risque. Devant le nombre de plus en plus important de publications sur le traitement de certaines pathologies digestives par des transferts de flore fécale, il convient d'être très prudent et d'attendre des études complémentaires afin d'évaluer les risques et de définir un protocole standardisé portant sur la sélection des donneurs, la vérification de l'innocuité du microbiote, la préparation de l' inoculum, son contrôle et son administration.

Bibliographie

1. Whittaker RH. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*. 10 janv 1969;163(3863):150- 160.
2. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. nov 1977;74(11):5088- 5090.
3. Mayr E. *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press; 1942.
4. Chung KT. Ferdinand Julius Cohn (1828-1898) : Pioneer of Bacteriology. 2012.
5. Euzéby JP. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire [Internet]. 2012 [cité 1 août 2012]. Disponible sur: <http://www.bacterio.cict.fr>
6. Copeland HF. The classification of lower organisms. [Internet]. Palo Alto, Calif.,: Pacific Books; 1956 [cité 21 juin 2012]. Disponible sur: <http://www.biodiversitylibrary.org>
7. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 25 avr 1953;171(4356):737- 738.
8. Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*. juill 1962;5(1):109- 118.
9. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Natl Acad Sci U S Am*. oct 1985;82(20):6955- 6959.
10. Willey J, Sherwood L, Woolverton C. *Microbiologie*. BU santé; 2012.
11. Bäckhed F, Crawford PA. Coordinated regulation of the metabolome and lipidome at the host-microbial interface. *Biochim Biophys Acta*. mars 2010;1801(3):240- 245.
12. Caesar R, Fålk F, Bäckhed F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J Intern Med*. oct 2010;268(4):320- 328.
13. Qu'est-ce donc qu'un microbiote intestinal normal ? - Revue médicale suisse [Internet]. [cité 11 juin 2013]. Disponible sur: <http://rms.medhyg.ch/numero-301-page-1434a.htm>
14. Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, Moya A, D'Auria G. The Active Human Gut Microbiota Differs from the Total Microbiota. *PLoS ONE*. 28 juill 2011;6(7).
15. Moore WEC, Holdeman LV. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*. mai 1974;27(5):961- 979.
16. Moore WE, Holdeman LV. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr*. déc 1974;27(12):1450- 1455.
17. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 10 juin 2005;308(5728):1635- 1638.
18. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS One*. 2008;3(7):e2836.

19. Huybens, Mainil, Marlier. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann Médecine Vét.* 6 avr 2009;(153):112- 128.
20. Dupperray, Costes, Baldet, Parpaleix. Flow and image cytometry: principles and applications [Internet]. 1993. Disponible sur: <http://hdl.handle.net>
21. NIH Human Microbiome Project [Internet]. [cité 29 avr 2013]. Disponible sur: <http://www.hmpdacc.org>
22. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *BMJ.* 10 avr 1999;318(7189):999- 1003.
23. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 12 mai 2011;473(7346):174- 180.
24. MetaHIT [Internet]. [cité 6 juill 2012]. Disponible sur: <http://www.metahit.eu>
25. Dahmani O, Belcaid A, El Azzouzi O, El Hami H. L'absorption intestinale [Internet]. Absorpt. Intest. [cité 26 sept 2012]. Disponible sur: <http://www.chufes.ma>
26. Ricort J-M. Physiologie de la digestion [Internet]. 2010 [cité 26 sept 2012]. Disponible sur: <http://www.med.univ-montp1.fr>
27. Faculté Pierre et Marie Curie. Le tube digestif [Internet]. [cité 26 sept 2012]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr>
28. Pellestor F. Histologie de l'appareil digestif [Internet]. Faculté de Médecin Montpellier-Nîmes; [cité 13 nov 2012]. Disponible sur: <http://www.med.univ-montp1.fr>
29. Baud L. Physiologie digestive DCEM1 [Internet]. 2003. Disponible sur: <http://www.chusa.upmc.fr>
30. Husebye E, Hellström PM, Midtvedt T. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci.* mai 1994;39(5):946- 956.
31. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* déc 1998;62(4):1157- 1170.
32. Barbara G, Stanghellini V, Brandi G, Cremon C, Di Nardo G, De Giorgio R, et al. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am J Gastroenterol.* nov 2005;100(11):2560- 2568.
33. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 nov 2002;99(24):15451- 15455.
34. Bérard. Ue nutrition DCEM1 : lipides alimentaires [Internet]. Fich. PDF. [cité 22 nov 2012]. Disponible sur: <http://www.fichier-pdf.fr/2011/10/23/d1-nutrition->
35. Cuvelier C, Cabareau J-F, Dufrasne I, Hornick J-L, Istasse L. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. 26 sept 2004;8.
36. ANSES. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. mai 2011;323.
37. Favé G, Peyrot J, Hamosh M, Armand M. Digestion des lipides Alimentaires : intérêt de la lipase gastrique humaine ? *Cah Nutr Diététique.* sept 2007;42(4):183- 190.
38. Zinsou. Dégradation des lipides [Internet]. [cité 19 nov 2012]. Disponible sur: <http://calamar.univ-ag.fr>

39. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* juin 2009;296(6):E1183- E1194.
40. Dallongeville J. Le métabolisme des lipoprotéines [Internet]. Institut Pasteur Lille; 2006 [cité 5 déc 2012]. Disponible sur: <http://www.ysonut.fr/pdf/>
41. Lamant M. Caractérisation d'une nouvelle apolipoprotéine, l'apo O [Internet]. [Toulouse]: Paul Sabatier; 2006 [cité 5 déc 2012]. Disponible sur: <http://thesesups.ups-tlse.fr>
42. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 nov 2004;101(44):15718- 15723.
43. Midtvedt T. Microbial bile acid transformation. *Am J Clin Nutr.* 11 janv 1974;27(11):1341- 1347.
44. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem.* 15 sept 2000;275(37):28488- 28493.
45. Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Müller M, et al. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem.* 13 janv 2006;281(2):934- 944.
46. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JJ. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 janv 2007;104(3):979- 984.
47. Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK dans le foie [Internet]. EM-Consulte. [cité 25 mars 2013]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article>
48. ANSES. Les glucides [Internet]. [cité 9 janv 2013]. Disponible sur: <http://www.anses.fr>
49. Berrada S. Les glucides : structure, propriétés et application technologiques. Académie de Montpellier;
50. Faure P. Digestion et absorption des glucides [Internet]. Université de Grenoble; 2010 [cité 14 févr 2013]. Disponible sur: uvp5.univ-paris5.fr
51. Steiner T. Essai de cartographie immunohistochimique d'un transporteur du glucose chez la souris à l'aide d'un anticorps spécifique. Créteil; 2013.
52. Bastard J-P, Hainque B. Mécanismes d'action cellulaire de l'insuline et insulino-résistance périphérique. *Sang Thromb Vaiss.* 17 juill 1995;7(6):365-74.
53. Pecker F, Pavoine C. Mode of action of glucagon revisited. *Handb Exp Pharmacol.* 1996;123:75-104.
54. Petriccioli AP et N. Microbiote intestinal, obésité et résistance à l'insuline. *Médecine Interne Générale.* 16 nov 2011;Volume 317(41):2236- 2238.
55. Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Curr Diab Rep.* juin 2011;11(3):154-159.
56. Hijova E, Chmelarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy.* 2007;(108):354-358.
57. Cani P, Amar J, Iglesias MA. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* juill 2007;56.

58. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 2 févr 1996;271(5249):665-668.
59. Thorens B. incrétines, sécrétion d'insuline et diabète. *Médecine/Science*. 2003;19(8-9).
60. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mai 1987;84(10):3434-3438.
61. Drucker DJ. Minireview: The Glucagon-Like Peptides. *Endocrinology*. 2 janv 2001;142(2):521-527.
62. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*. mai 2006;55(5):1484-1490.
63. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*. 6 août 2012;336(6086):1268-1273.
64. Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol*. 1 sept 2009;587(Pt 17):4159-4167.
65. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. mai 1999;69(5):1046S-1051S.
66. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. mai 2009;9(5):313-323.
67. Ivanov II, de Llanos Frutos R, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of Th17 cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host X* 0026 Microbe. 16 oct 2008;4(4):337-349.
68. Doré J, Corthier G. Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clin Biol*. sept 2010;34(4, Supplement 1):7-16.
69. Bested AC, Logan AC, Selhub EM. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part I – autointoxication revisited. *Gut Pathog*. 18 mars 2013;5(1):5.
70. CDC - Data and Statistics, Autism Spectrum Disorders - NCBDDD [Internet]. [cité 22 sept 2013]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>
71. Blumberg S, Bramlett M, Kogan M, Schieve L, Jones J, Lu M. Changes in Prevalence of Parent-reported Autism Spectrum Disorder in School-aged U.S. Children: 2007 to 2011–2012 — TEACCH. *Natl Health Stat Rep* [Internet]. [cité 22 sept 2013]; Disponible sur: <http://teacch.com/news>
72. HAS. Autisme et autres troubles envahissants du développement (TED) [Internet]. 2010 [cité 3 août 2013]. Disponible sur: www.has-sante.fr
73. Misès R. Classification française des troubles mentaux de l'enfant et de l'adolescent. 5ème éd. Presses de l'école des hautes études en santé publique; 2012.
74. HAS. Autisme et autres troubles envahissant du développement, état des connaissances. [Internet]. 2010 [cité 5 août 2013]. Disponible sur: <http://www.has-sante.fr>

75. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. août 2010;16(4):444-453.
76. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen M-L, Bolte E, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 sept 2002;35(Suppl 1):S6-S16.
77. Parracho HMRT, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol*. oct 2005;54(Pt 10):987-991.
78. Finegold SM, Downes J, Summanen PH. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*. avr 2012;18(2):260-262.
79. Finegold SM. State of the art; microbiology in health and disease. Intestinal bacterial flora in autism. *Anaerobe*. déc 2011;17(6):367-368.
80. Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Väisänen ML, et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol*. juill 2000;15(7):429-435.
81. MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hoffman JE, Boon F, et al. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*. 10 janv 2007;176(1):149-169.
82. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr*. déc 2004;80(6):1611-1617.
83. Whiteley P, Shattock P, Knivsberg A-M, Seim A, Reichelt KL, Todd L, et al. Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front Hum Neurosci* [Internet]. 4 janv 2013 [cité 22 sept 2013];6. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3540005/>
84. Elder JH, Shankar M, Shuster J, Theriaque D, Burns S, Sherrill L. The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *J Autism Dev Disord*. avr 2006;36(3):413-420.

Glossaire

Adipocyte : cellule de stockage des lipides dans un organisme, notamment l'organisme humain. Les lipides sont retrouvés sous forme de gouttelettes de triglycérides dans le cytoplasme de la cellule.

Amphiphilie : capacité d'une molécule à se solubiliser aussi bien dans les solvants polaires que dans les solvants apolaires. Elle dispose en général des plusieurs groupements chimiques volumineux donc certains sont hydrophiles et d'autres hydrophobes. Les acides gras sont un exemple type de molécule amphiphile.

Anabolisme : branche du métabolisme qui s'intéresse à l'assemblage d'unités de base pour aboutir à des macro-molécules. Il correspond à la phase de construction des tissus d'un organisme. Les réactions en jeux sont la plupart du temps consommatrice d'énergie et aboutissent à des structures plus complexes que les éléments d'origine. Il est contraire au catabolisme.

Anaérobie : se dit d'un milieu dans lequel on ne retrouve aucune trace d'oxygène. Les organismes qui y vivent doivent donc disposer d'un métabolisme pouvant se passer d'oxygène, notamment dans leur chaîne respiratoire mitochondriale.

Angiogenèse : croissance de vaisseaux sanguins à partir d'un réseau veineux ou artériel déjà présent.

Apolipoprotéine : structure lipidique entrant dans la composition des lipoprotéines. Elles y ont un rôle structural en participant à la cohésion de l'édifice. Elles ont aussi un rôle métabolique en servant de cofacteurs enzymatiques ou de ligands à différents récepteurs.

Axénique : se dit d'un organisme exempt de tout germe. Une souris est dite axénique lorsqu'elle a été élevée dans un environnement stérile ne permettant pas le développement d'un microbiote, que se soit au niveau intestinal ou sur une autre partie de son corps.

Biotope : milieu de vie défini par des caractéristiques physiques et chimiques considérées comme homogènes. Le biotope d'un organisme est le milieu dans lequel il se développe et évolue.

Catabolisme : branche du métabolisme qui s'intéresse à la dégradation de macromolécules en molécules plus petites. Les réactions mis en jeu dans les différentes voies métaboliques sont la plupart du temps libératrices d'énergie. Il est contraire à l'anabolisme.

Commensalisme : relation biologique entre deux organismes où le premier se nourrit de la nourriture du deuxième sans lui porter préjudice. L'hôte considéré ne tire, en théorie, aucun bénéfice dans cette relation. On parlera par exemple de bactéries commensales du tube digestif lorsqu'elles sont présentes au niveau de l'intestin sans avoir de pouvoir pathogène.

Homologie : propriété de ce qui est semblable, ou comparable. On parlera de caractères phénotypiques homologues lorsqu'ils sont communs à plusieurs organismes et qu'ils descendent d'un organisme commun. On parlera aussi de séquences ADN ou ARN homologues lorsqu'on peut les rapprocher et les comparer.

Hydrophilie : correspond à l'affinité d'une molécule pour les composés polaires tels que l'eau. Cette hydrophilie est retrouvée dans les molécules porteuses de groupements acides carboxyliques, amines, ou de nombreuses fonctions hydroxyles. Une molécule se solubilisant dans l'eau est dite polaire ou hydrophile.

Immunogène : propriété d'une molécule à entraîner une réponse immunitaire, c'est-à-dire à activer les cellules de l'immunité d'un individu. Ce pouvoir immunogène est à distinguer du pouvoir pathogène. Les vaccins par exemple activent la mémoire immunitaire par leur pouvoir immunogène sans pour autant avoir de pouvoir pathogène.

Index glycémique : capacité d'une substance à modifier la glycémie dans les deux heures suivant son ingestion par l'organisme. La valeur de cet index est comprise entre 0 et 1. Par

définition, l'index glycémique du glucose est de 1. Plus un aliment augmente la glycémie rapidement, plus son index glycémique se rapprochera de 1.

Lipase gastrique : enzyme présente au niveau de l'estomac réalisant des coupures non spécifiques sur un squelette carboné lipidique, notamment sur les triglycérides et les glycérophospholipides. Elle est active en milieu acide (activité optimale entre pH 4,5 et 6) et est donc inactive au niveau de l'intestin.

Lipase pancréatique : enzyme présente au niveau de l'intestin réalisant des coupures spécifiques au niveau des triglycérides. Son action nécessite la présence de la colipase et permet la conversion d'un triglycéride en une molécule de monoacylglycérol et deux molécules d'acides gras.

Lipophilie : correspond à l'affinité d'une molécule pour les composés apolaires. Ces composés sont la plupart du temps constitués d'un enchaînement de carbones que l'on peut retrouver dans les corps gras ou dans les solvants apolaires. Une molécule se solubilisant dans un corps gras est dite lipophile ou hydrophobe. A contrario, une molécule ayant une faible lipophilie sera dite hydrophile ou polaire et sera soluble dans les solvants aqueux.

Lyse : correspond à la destruction d'un élément organique, par exemple d'une membrane cellulaire. On parle de lyse cellulaire lorsque la membrane est détruite et que les éléments cytoplasmiques se déversent dans le milieu.

Membrane plasmatique : structure constituant la partie externe des cellules. Elle permet d'en maintenir l'intégrité et d'éviter une fuite des éléments cytoplasmiques vers l'extérieur. Elle est constituée d'une double couche de phospholipides. La partie externe de cette membrane est hydrophile, tandis que l'espace inter-membranaire est lipophile. La diffusion facilitée à travers la membrane nécessite donc des propriétés amphiphiles.

Métabolisme : ensemble des réactions chimiques observées dans un organisme et permettant son bon fonctionnement. Il regroupe le catabolisme et l'anabolisme, qui sont deux voies métaboliques opposées.

Monocaténaire : qualifie ce qui est constitué par une seule chaîne. En génomique, on parle d'acides nucléiques monocaténaires lorsqu'ils ne sont pas sous forme de doubles brins, mais d'un brin unique.

Murin : adjectif se rapportant à la famille animales des Murinées regroupant un ensemble de rongeurs dont les rats ou les souris. On parlera de modèles murins lorsque les études portent sur des expérimentations faites sur cette famille animale.

Nutriment essentiel : nutriment non synthétisable par l'organisme et devant donc être apporté par l'alimentation. On parle souvent d'acides gras essentiels (notamment oméga 3 et 6), d'acides aminés essentiels (lysine, leucine, méthionine...) ou de vitamines (vitamine C, B₁₂).

Pathogène : capacité d'une substance ou d'un être vivant à entraîner une maladie, c'est-à-dire un ensemble de troubles délétères pour l'individu.

Phylum : singulier de phyla, le phylum est un taxon de rang élevé regroupant de très nombreux organismes ayant des caractères phénotypiques communs et un ancêtre commun. Le phylum est un terme synonyme d'embranchement. Hiérarchiquement, il se situe juste en dessous du règne.

Post-prandial : qualifie ce qui est après un repas. La période post-prandiale correspond à la période de digestion qui suit une prise d'aliments.

Taxons : groupe d'individus partageant des caractères phénotypiques communs et un ancêtre commun. L'espèce en taxonomie est le taxon le plus bas dans les classifications.

Ubiquitaire : l'ubiquité ou l'omniprésence est à l'origine la capacité à se trouver dans plusieurs endroits différents au même moment. En biologie, une substance ou une structure est dite ubiquitaire lorsqu'on considère qu'elle est présente dans tous les organismes vivants.

Liste des abréviations

Acétyl CoA : acétyl coenzyme A
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ARN : acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomique
ATP : adénosine tri-phosphate
BCR : B cell receptor
CCK : cholécystokinine
CD (récepteur) : cluster of differentiation (récepteur)
CIM : classification internationale des maladies
CFTMEA : classification française des troubles mentaux de l'enfant et de l'adolescent
CMH : complexe majeur d'histo-compatibilité
CPT : carnitin-palmitoyl transferase
DAG : diacylglycérols
DMAPP : diméthylallyl pyrophosphate
DSM : diagnostic and statistical manual of mental disorders
FABP : fatty acids binding protein
FIAF : fasting induced adipose factor
GALT : gut associated lymphoïde tissue
G6P : glucose-6-phosphate
GIP : glucose-dependant insulintropic polypeptide
GLP-1 : glucagon-like peptide-1
HAS : Haute Autorité de Santé
HDL : high density lipoprotein
HMP : human microbiome project
ICSB : international committee on systematics bacteriology
ICSP : international committee on systematics of prokaryotes
IDL : intermediate density lipoprotein
IFN : interféron

IL-1, IL-6 : interleukine-1, -6
IPP : isopentyl pyrophosphate
LCAT : lecithin cholesterol acyl transferase
LDL : low density lipoprotein
LDL-R : low density lipoprotein receptor
LPL : lipoprotéine lipase
LPS : lipopolysaccharide
MALT : mucous associated lymphoïde tissue
MetaHit : metagenomics of the human intestinal tract
NK : natural killer
NPC₁L₁ : niemann pick C1 like1
PCR : polymerase chain reaction
PPAR : peroxisom proliferator activating factor
SCFA : short chain fatty acid
SFB : segmented filamentous bacteria
SGLT : Sodium dependant GLucose Transporteur
TED : troubles envahissants du développement
TG : triglycéride
TGF : transforming growth factor
TLR : toll-like receptor
TNF- α : tumor necrose factor- α
URB : underrepresented bacterial taxa
VLDL : very low density lipoprotein

Liste des figures

Figure 1 : Principaux taxons du monde vivant (wikispaces.com)	4
Figure 2 : Classification proposée par Whittaker en 1969	6
Figure 3 : Schéma d'un double brin d'ADN (adele.nicoweb.com)	7
Figure 4 : Schéma de dénaturation/renaturation de l'ADN (www.edu.upmc.fr)	7
Figure 5 : Constituants des ribosomes (ludwig-sun1.unil.ch)	8
Figure 6 : Représentation de la fraction active du microbiote (Peris-Bondia et collaborateurs)	21
Figure 7 : Schéma du tube digestif humain (svt5eviora.wordpress.com)	31
Figure 8 : Structure des villosités intestinales (db-gersite.com)	32
Figure 9 : Schéma d'un triglycéride (bioweb.wku.edu)	37
Figure 10 : Représentation d'un acide gras (des-livres-pour-changer-de-vie.fr)	37
Figure 11 : Cholestérol, précurseur des hormones stéroïdiennes (ulyse.u-bordeaux.fr)	39
Figure 12 : Sites d'action des phospholipases (mpoullis.net)	40
Figure 13 : Structure d'une membrane cellulaire (medicalorama.com)	41
Figure 14 : Schéma des voies biliaires (savoirs.essonne.fr)	42
Figure 15 : Schéma d'une lipoprotéine (prevention.ch)	43
Figure 16 : Voies endogène et exogène des lipides (www-sante.ujf-grenoble.fr)	47
Figure 17 : Acide cholique sous forme ionisée (chups.jussieu.fr)	49
Figure 18 : Transfert des acides gras à travers la membrane mitochondriale (Sharma et al)	52
Figure 19 : Influence du microbiote sur le catabolisme des acides gras	53
Figure 20 : Représentations linéaires et cycliques des monosaccharides (answers.com)	55
Figure 21 : Structure générale des amidons (afblum.be)	56
Figure 22 : Structures des principaux disaccharides (commons.wikipedia.org)	57
Figure 23 : Détail des isoformes de récepteurs GLUT (Steiner)	58
Figure 24 : Réaction d'une hexokinase sur le glucose (sigmaaldrich.com)	59
Figure 25 : Schéma de la glycolyse (gch.ulaval.ca)	60
Figure 26 : Schéma de l'action cellulaire de l'insuline (intellego.fr)	62
Figure 27 : Mécanisme intracellulaire du glucagon (ead.univ-angers.fr)	63
Figure 28 : Déficiency du système immunitaire chez les souris axéniques (d'après Round et Mazmanian) ..	70
Figure 29 : Pourcentage des enfants (6-17 ans) présentant un trouble du spectre de l'autisme (USA 2007 et 2011-2012)	74
Figure 30 : Comparaison du microbiote de sujets atteints d'autisme et du microbiote de sujets sains (Finegold et collaborateurs)	77
Figure 31 : Comparaison de la prévalence des espèces du genre Bifidobacterium chez des sujets atteints d'autisme (Avg A) et des sujets sains (Avg C) (Finegold et collaborateurs)	78

Listes des tableaux

<i>Tableau 1 : Espèces bactériennes les plus représentées au niveau du microbiote intestinal (d'après Moore et Holdmann).....</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 2 : Place des URB dans les différentes fractions du microbiote.....</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 3 : Comparaisons des méthodes d'étude du microbiote.....</i>	<i>22</i>

Annexes

Annexe 1 : Présentation de l'amplification par Polymerase chain reaction

Annexe 2 : Structure et séquençage de l'ARN ribosomique bactérien

Annexe 3 : Schéma de la cytométrie de flux

Annexe 4 : Principe du séquençage par méthode shotgun

Annexe 5 : Pyroséquençage couplé à la technologie 454

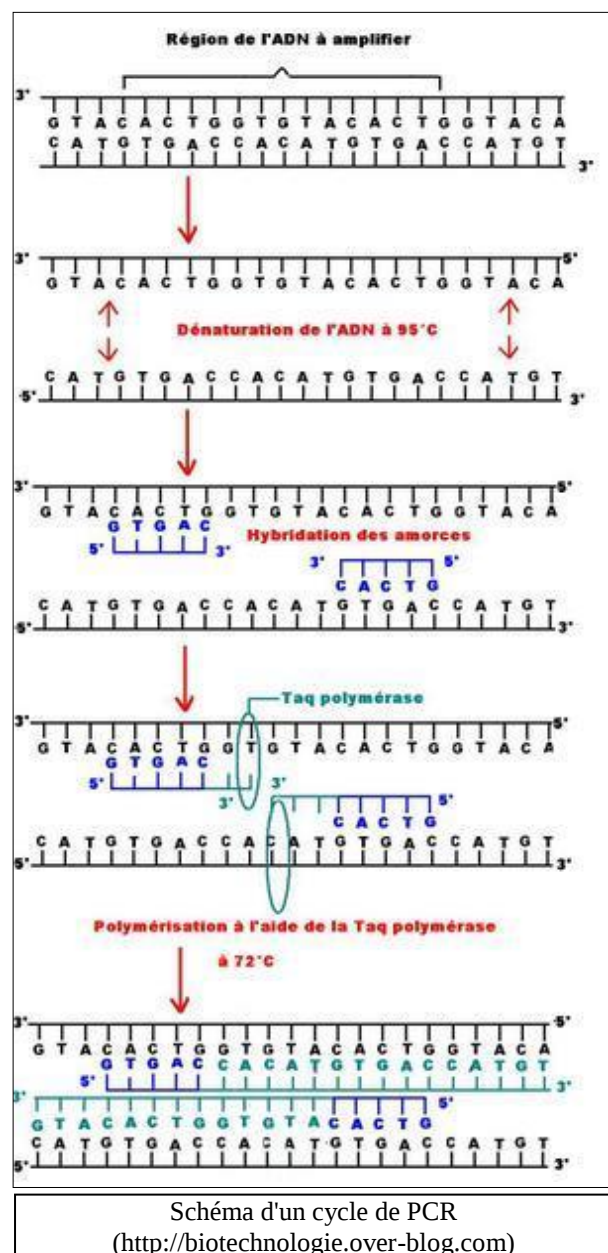
Annexe 1 :

Présentation de l'amplification par Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR est une méthode qui permet, à partir d'un double brin d'ADN d'obtenir une multitude de copies de l'ADN d'origine. L'amplification est une étape importante dans les méthodes décrites car le matériel génétique extrait est en trop petite quantité pour être analysé.

En effet, une fois extrait, le matériel génétique ne représente pas un échantillon quantitativement suffisant pour subir les tests nécessaires. Ainsi, il faut en augmenter la quantité pour pouvoir l'étudier. L'amplification est rendue possible par la méthode de la réaction en chaîne de la polymérase. Cette technique à été mise au point par Mullis et collaborateurs (Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. Mullis et al, 1986).

L'ADN est constitué de bases (A,T,C,G) reliées par des liaisons hydrogènes. En chauffant un double brin d'ADN, on peut le dissocier et faire agir des enzymes telles que la polymérase. La polymérase est une enzyme qui peut synthétiser, à l'aide d'un brin d'ADN matrice, un brin complémentaire. Elle est la base de la technique d'amplification par PCR qui peut se résumer en 3 étapes :



- dénaturation par chauffage du double brin d'ADN
- hybridation des amorces/primers nécessaires à la fixation de la polymérase
- synthèse des brins complémentaires par la polymérase (après ajout de désoxyribonucléotides)

En répétant cette procédure un grand nombre de fois, on obtient de multiples copies de l'ADN initial. La quantité d'ADN à étudier disponible est alors suffisante pour réaliser les différentes méthodes d'analyses. Elle permet une reproduction qualitativement rigoureuse d'un matériel génétique. La méthode de base ne permet par contre pas de suivre l'aspect quantitatif de l'amplification.

L'amplification par PCR a permis l'essor de la génomique à la fin du 20^{ème} siècle et le développement des méthodes d'analyse des génomes. Depuis sa découverte en 1986, cette technique a donné lieu à de nombreuses études visant à l'améliorer. Il est maintenant possible d'amplifier à partir d'un ARN (ARN messager, ARN ribosomique) de nombreux brins d'ADN grâce à l'utilisation de reverse transcriptase (RT-PCR). De plus, le suivi quantitatif peut maintenant être effectué grâce à la PCR en temps réel.

Annexe 2 :

Structure et séquençage de l'ARN ribosomique bactérien

Les ARN ribosomiques sont constitués d'un enchaînement monocaténaire de bases nucléotidiques (A,U,G,C) qui sont au nombre de 1500 dans la sous-unité 16S des ribosomes bactériens. Les bases étant complémentaires deux à deux, elles forment des boucles par formation de liaisons hydrogènes. Au sein de l'enchaînement nucléotidique, on trouve des régions très conservées au cours de l'évolution et à contrario, des régions hypervariables (V1 à V9 sur la figure 1). Les premières permettent la fixation d'amorces lors de l'amplification, les deuxièmes permettent la différenciation des individus.

En utilisant des amorces complémentaires des zones conservées, on peut appliquer le principe de la RT-PCR sur les gènes codant pour les ARNr et ainsi obtenir un ADN complémentaire (ADNc) de la séquence à analyser. Certaines de ces amorces sont dites universelles car elles doivent permettre d'amplifier les

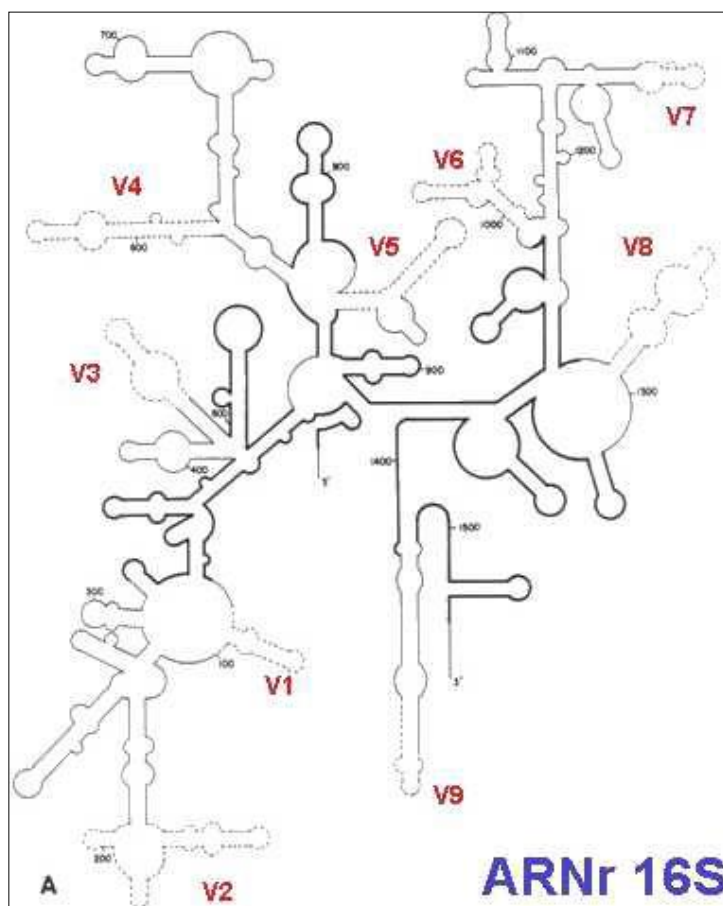


Figure 1 : Domaines de la sous-unité 16S ribosomique
(bacterioweb.univ-fcomte.fr)

séquences de tous les ARNr présents dans un échantillon. D'autres sont considérées comme spécifiques et peuvent être utilisées pour étudier un groupe de bactéries. Néanmoins, les connaissances en matière de génomique étant en constante évolution, de moins en moins d'amorces sont considérées comme totalement spécifiques.

Suite à l'amplification, le principe de séquençage de type Sanger (du nom de son inventeur) est ensuite utilisé. Il se base sur l'action de la polymérase sur le double brin d'ADN bactérien obtenu par RT-PCR.

Comme dans la PCR, la polymérase va utiliser les bases présentes dans le milieu réactionnel pour synthétiser le brin complémentaire d'un brin matrice à séquencer. En plus des désoxyribonucléotides (dNTP) on ajoute aléatoirement des didésoxyribonucléotides (ddNTP). Ces derniers ont la particularité de stopper la polymérase. On obtient ainsi un mélange de simples brins de tailles variables (figure 2). Ils sont ensuite séparés par migration électrophorétique et révélés par un procédé adéquat (principalement par fluorescence). On peut ensuite facilement déterminer l'enchaînement des nucléotides dans le brin néo-synthétisé et donc la séquence du brin matrice.

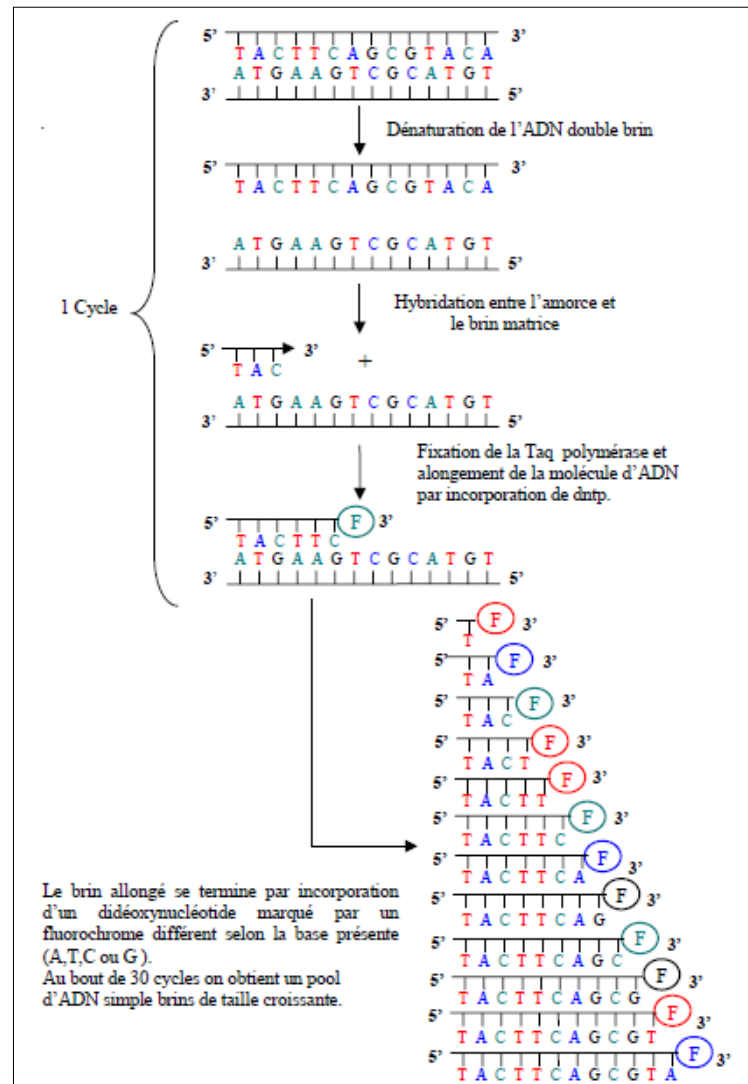
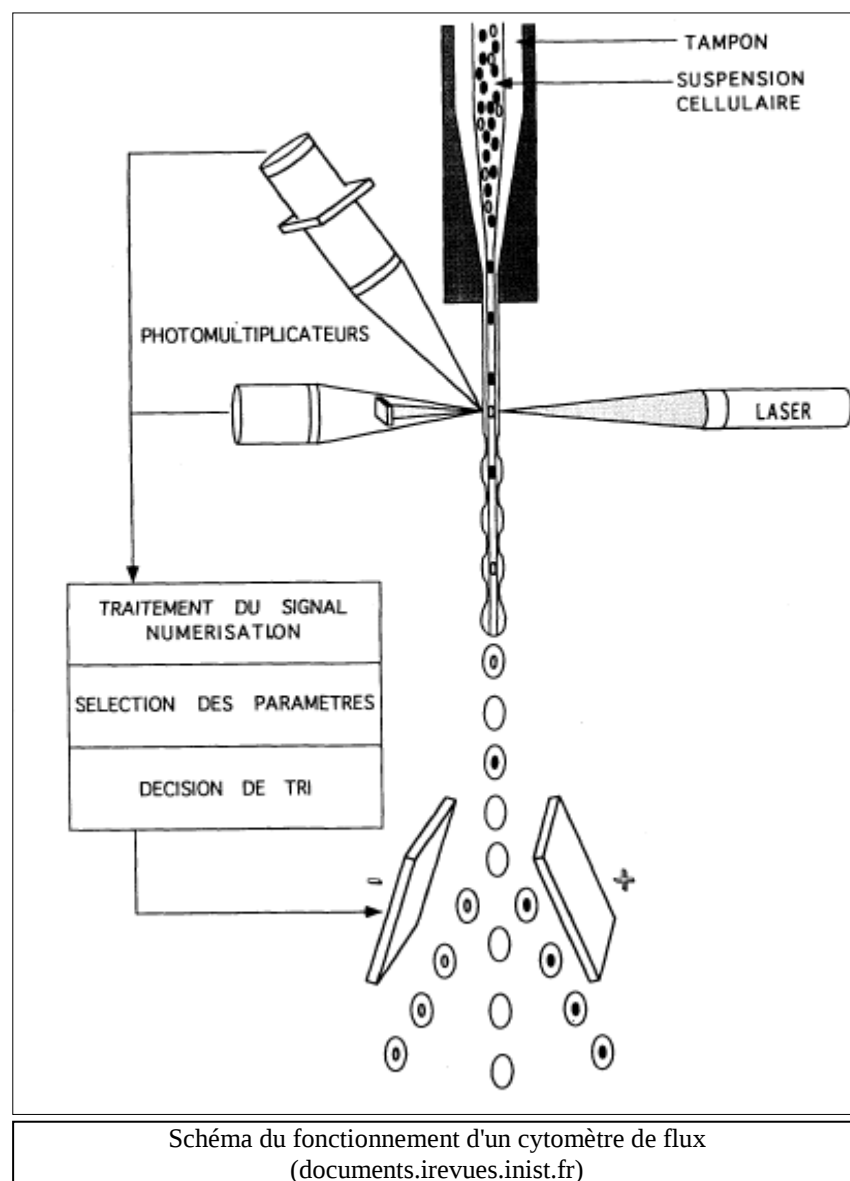


Figure 2 : Schéma de séquençage par méthode Sanger
(<http://cochin.inserm.fr>)

Annexe 3 :

Schéma de la cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique permettant de trier les cellules en fonction de paramètres choisis. Dans les études qui nous intéressent, un marqueur se fixe à un élément cellulaire uniquement présent chez les bactéries vivantes. Il est alors possible de distinguer et de séparer les bactéries vivantes des bactéries mortes, et donc celles qui sont actives au niveau intestinal.

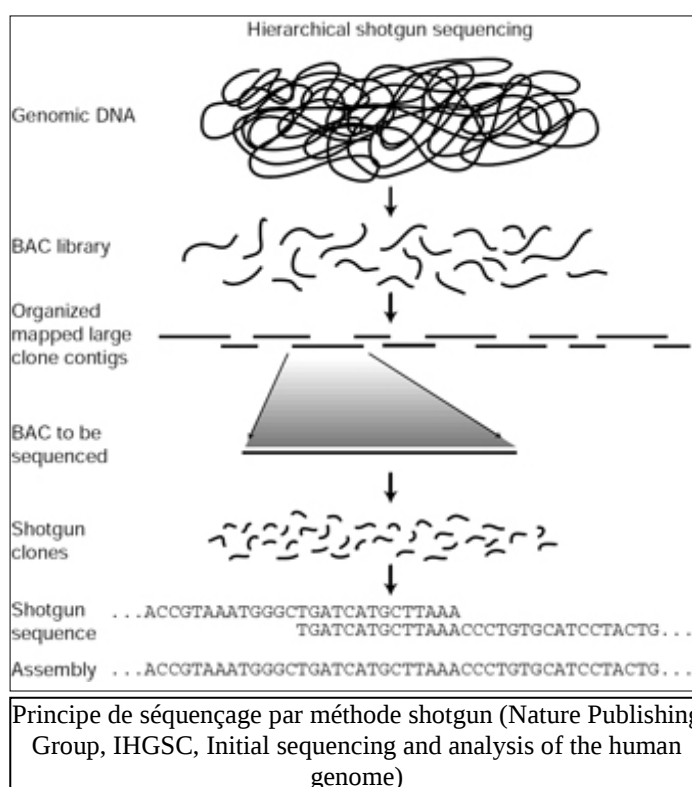


Annexe 4 :

Principe du séquençage par méthode shotgun

Le séquençage global dit par méthode shotgun consiste à extraire l'ensemble du métagénome, à le purifier et à le séparer aléatoirement en une multitude de séquences. Ces séquences sont ensuite clonées afin d'établir plusieurs banques de séquences dites shotgun. Par recoupement à l'aide de puissants outils informatiques, un assemblage des différentes séquences peut être effectué. On peut ainsi séquencer l'ensemble du génome des espèces en présence.

Cette méthode a l'avantage d'être relativement peu coûteuse et rapide. Elle est bien adaptée aux génomes courts comme celui des bactéries. En effet, la limite principale de cette technique réside dans l'assemblage des séquences clonées. Si le génome analysé comporte de nombreuses séquences identiques, il est difficile de savoir où les insérer lors de l'assemblage. Le génome des bactéries étant constitué d'une séquence unique (si on ne prend pas en compte les plasmides) et assez courte (de quelques milliers à quelques millions de paires de bases), le nombre d'assemblages possibles est limité. Il semble pertinent d'utiliser cette méthode pour analyser le métagénome intestinal humain étant donnée sa puissance.



Annexe 5 :

Pyroséquençage couplé à la technologie 454

Le pyroséquençage est une méthode non Sanger qui permet le séquençage rapide d'un génome sans étape de clonage, ce qui réduit les coûts. Elle est précédée d'une phase d'amplification par PCR afin d'augmenter la quantité d'échantillon. Elle peut se résumer en 5 étapes (Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes, Huybens et al, 2009) :

- préparation du mélange réactionnel : ADN polymérase, nucléotides, brin matrice
- ajout des nucléotides un à un. L'ADN polymérase utilise celui nécessaire à la synthèse du brin complémentaire et il y a libération d'un pyrophosphate
- ce pyrophosphate subit deux dégradations enzymatiques successives pour donner un métabolite producteur d'un message lumineux
- il y a dégradation enzymatique des nucléotides en surplus dans le milieu réactionnel
- le signal lumineux est détecté et intégré

informatiquement. Un enchaînement de deux bases identiques se traduit par un signal deux fois plus intense. Par détection des signaux successifs, on obtient la séquence du brin étudié.

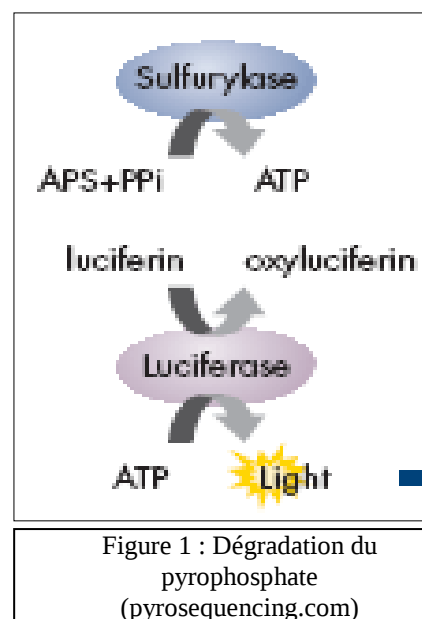


Figure 1 : Dégradation du pyrophosphate (pyrosequencing.com)

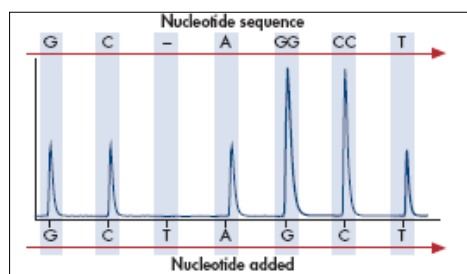


Figure 2 : Détermination de la séquence étudiée (pyrosequencing.com)

Initialement, cette technique ne permettait que de séquencer des fragments d'une centaine de nucléotides. Avec le couplage à la technologie 454 (four five four), il est possible de séquencer des fragments de 20 millions de bases par cycle de 4 heures. Cela permet de pouvoir l'appliquer aux études de métagénomiques actuelles.

Vu, le Président du jury,

Jean-Marie BARD

Vu, le Directeur de thèse,

Françoise NAZIH

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénoms : EGRON Antoine, Emmanuel, Emilien, Marie

Titre de la thèse : Impact du microbiote intestinal sur la physiopathologie de l'hôte : exemple de l'autisme

Résumé de la thèse : Notre organisme est un assemblage complexe de nombreux organes qui interagissent entre eux pour assurer la bonne santé de l'ensemble du corps. Depuis plusieurs années maintenant, il semble évident que la médecine doit prendre en compte un nouvel organe : le microbiote intestinal. Anciennement appelé flore intestinale, notre « deuxième cerveau » a une composition bactérienne propre à chaque individu et dispose de ses propres voies d'interaction avec le reste du corps. Il peut ainsi influencer l'ensemble du métabolisme humain et modifier un état de bonne santé ou un état pathologique. Son influence est telle qu'elle montre des répercussions aussi bien au niveau intestinal, qu'au niveau de pathologies psychiatriques telles que l'autisme.

MOTS CLES : MICROBIOTE INTESTINAL, METABOLISME HUMAIN, BACTERIES, AUTISME

JURY

PRESIDENT : Mr Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie Générale et Clinique
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mme Françoise NAZIH-SANDERSON, Maître de Conférences de
Biochimie Faculté de Pharmacie de Nantes

Mme Aurélie FAUSSIER, Pharmacien

Adresse de l'auteur : 115 rue bobillot
75013 PARIS