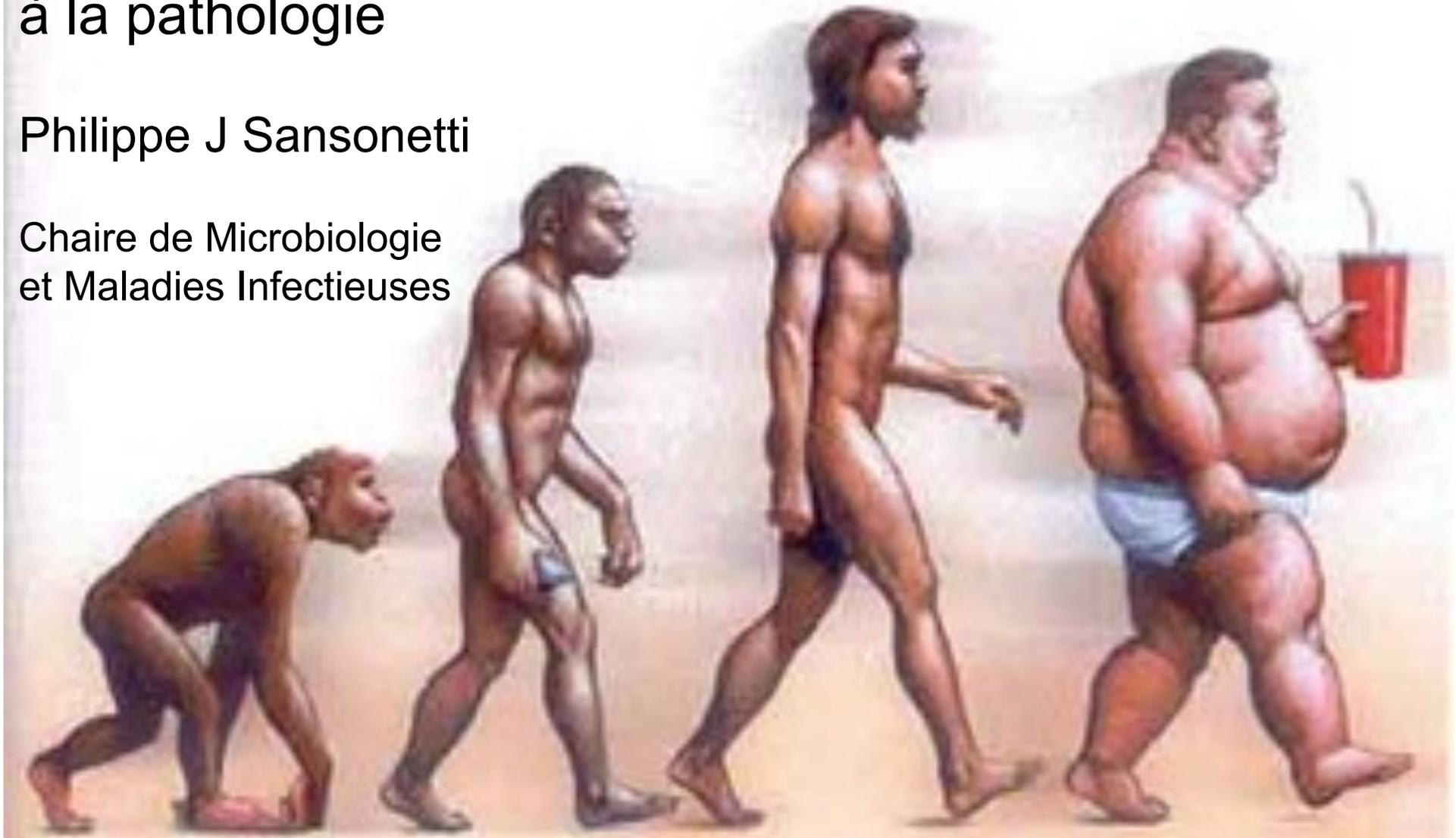


# Microbiome, nutrition et métabolisme: de l'homéostasie à la pathologie

Philippe J Sansonetti

Chaire de Microbiologie  
et Maladies Infectieuses



Collège de France  
15 janvier 2014

  
INSTITUT PASTEUR

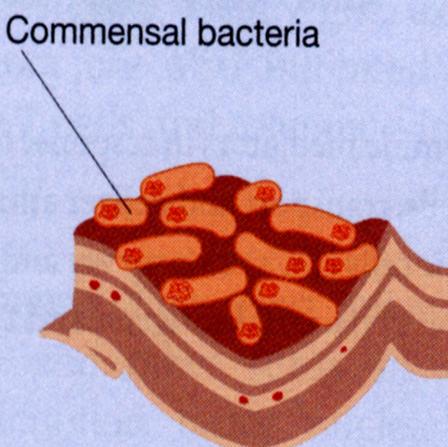
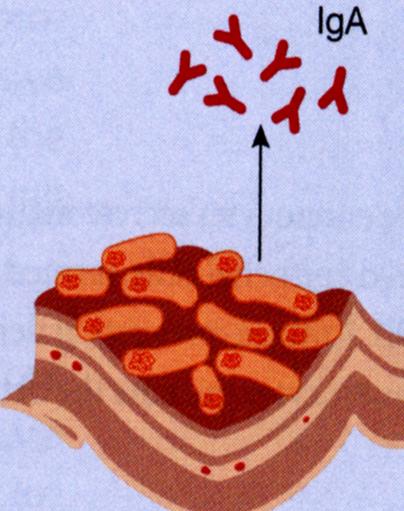
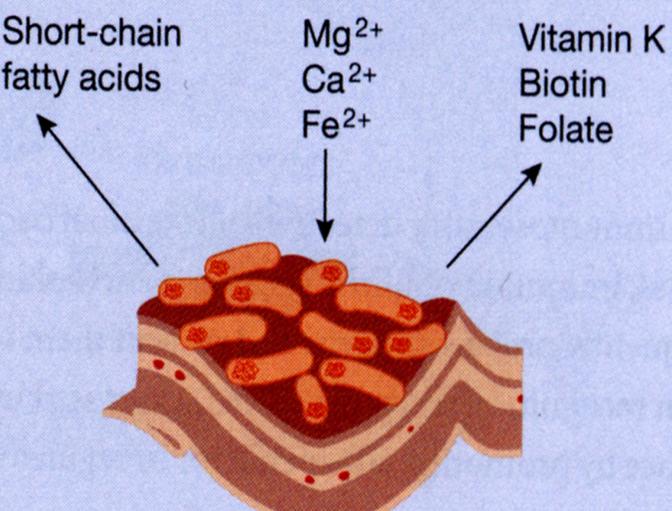


COLLÈGE  
DE FRANCE  
—1530—

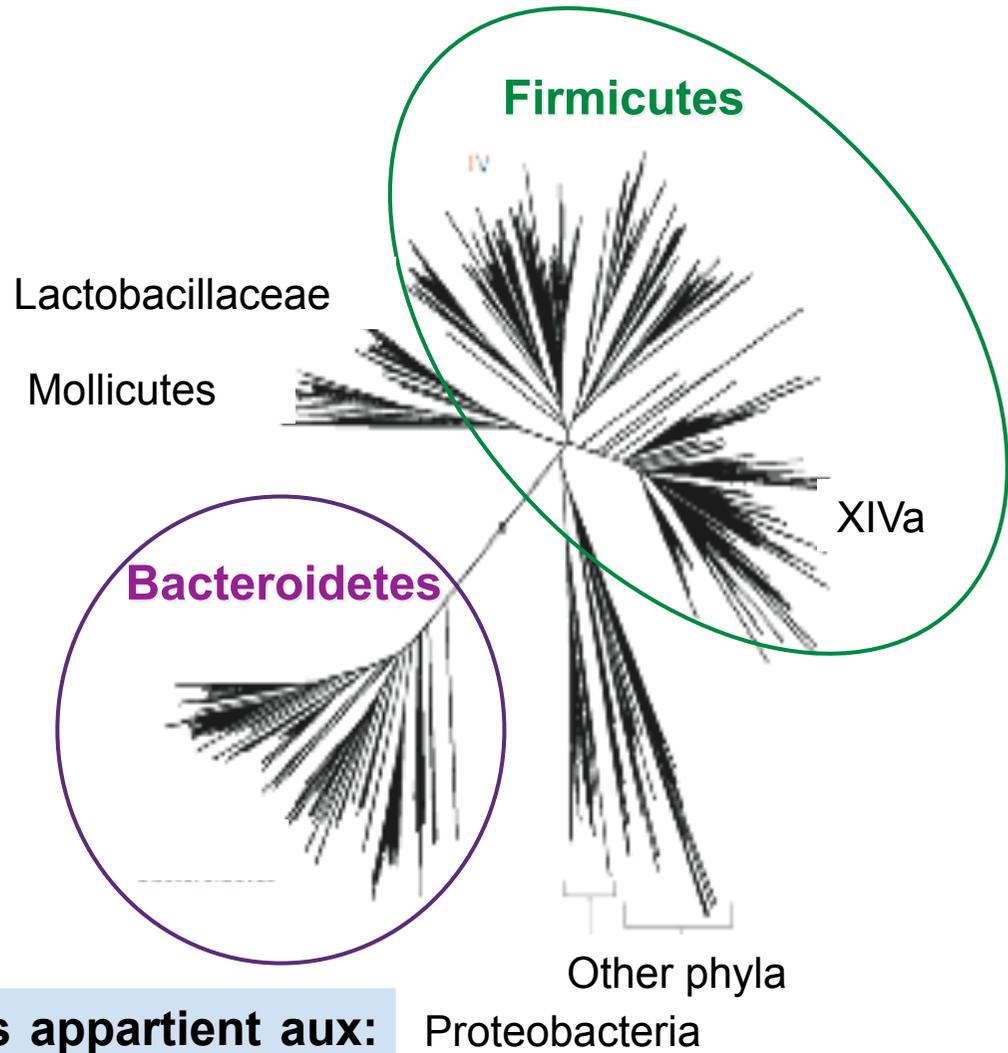
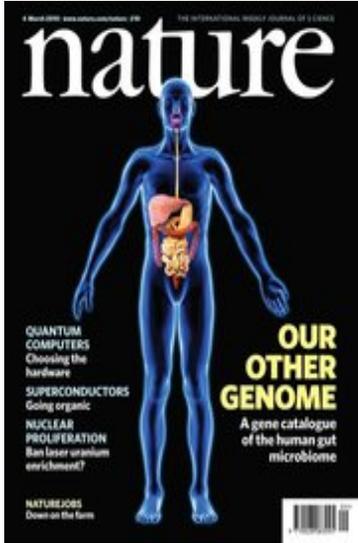
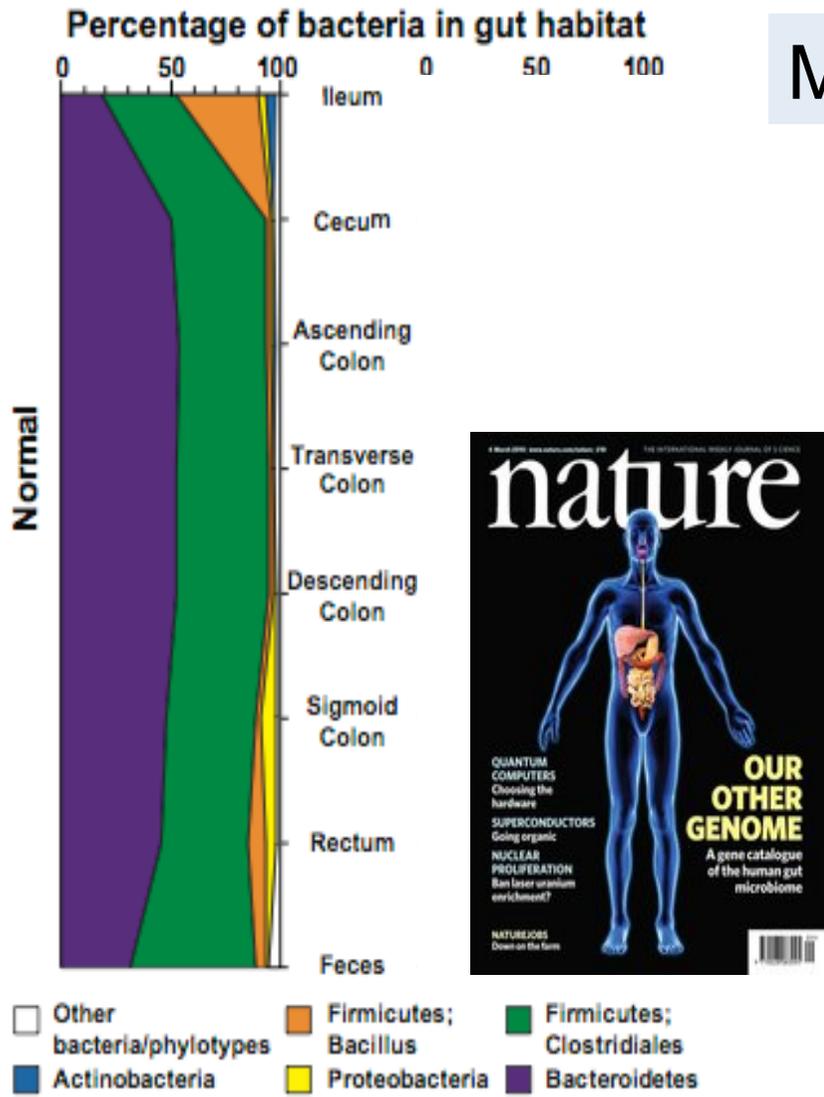
**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

# Fonctions du microbiote intestinal

Protective functions	Structural functions	Metabolic functions	
Pathogen displacement Nutrient competition Receptor competition Production of anti-microbial factors e.g., bacteriocins, lactic acids	Barrier fortification Induction of IgA Apical tightening of tight junctions Immune system development	Control IEC differentiation and proliferation Metabolize dietary carcinogens Synthesize vitamins e.g., biotin, folate	Ferment non-digestible dietary residue and endogenous epithelial-derived mucus Ion absorption Salvage of energy
 <p>Commensal bacteria</p>	 <p>IgA</p>	 <p>Short-chain fatty acids</p> <p>Mg<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup> Fe<sup>2+</sup></p> <p>Vitamin K Biotin Folate</p>	

# Microbiote intestinale humaine



**L'essentiel des bactéries intestinales appartient aux: Firmicutes**, particulièrement les "clusters" XIVA & = anaérobies à Gram-positif & à bas GC %, EOS, majoritairement incultivables

**Bacteroidetes** = anaérobies Gram-négatifs

## Microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal humain est dominé par cinq phyla (**Firmicutes**, **Bacteroidetes**, Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia) et un phylum d'Archaeobactérie (Euryarchaeota). Les groupes bactériens moins prévalents sont répartis parmi les phyla suivants: Cyanobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae, Spirochaetes et TM7.

**Firmicutes.** Ce phylum inclus Ruminococcus, Clostridium, Lactobacillus (plusieurs sont des probiotiques), des Eubacteries productrices de butyrate: Faecalibacterium, Roseburia.

**Bacteroidetes.** Ce phylum inclut les Bacteroides, Prevotella et Xylanibacter qui dégradent une série de glycanes complexes.

**Actinobacteria.** Ce phylum inclut Collinsella et Bifidobacterium (comprenant des souches probiotiques).

**Proteobacteria.** Ce phylum inclut les Escherichia (famille des Entérobactéries) et Desulfovibrio (bactéries sulfo-réductrices), Verrucomicrobia (récemment découvert) et Akkermansia (dégradation des mucines).

**Euryarchaeota.** Ce phylum contient Methanobrevibacter (un genre très prévalent impliqué dans la méthanogénèse intestinale).

## Fonctions métaboliques du microbiote intestinal

La compréhension des rapports structure–fonction du microbiote intestinal est un domaine clé de recherche (Robinson CJ et al. 2010. Microbiol Mol Biol Rev).

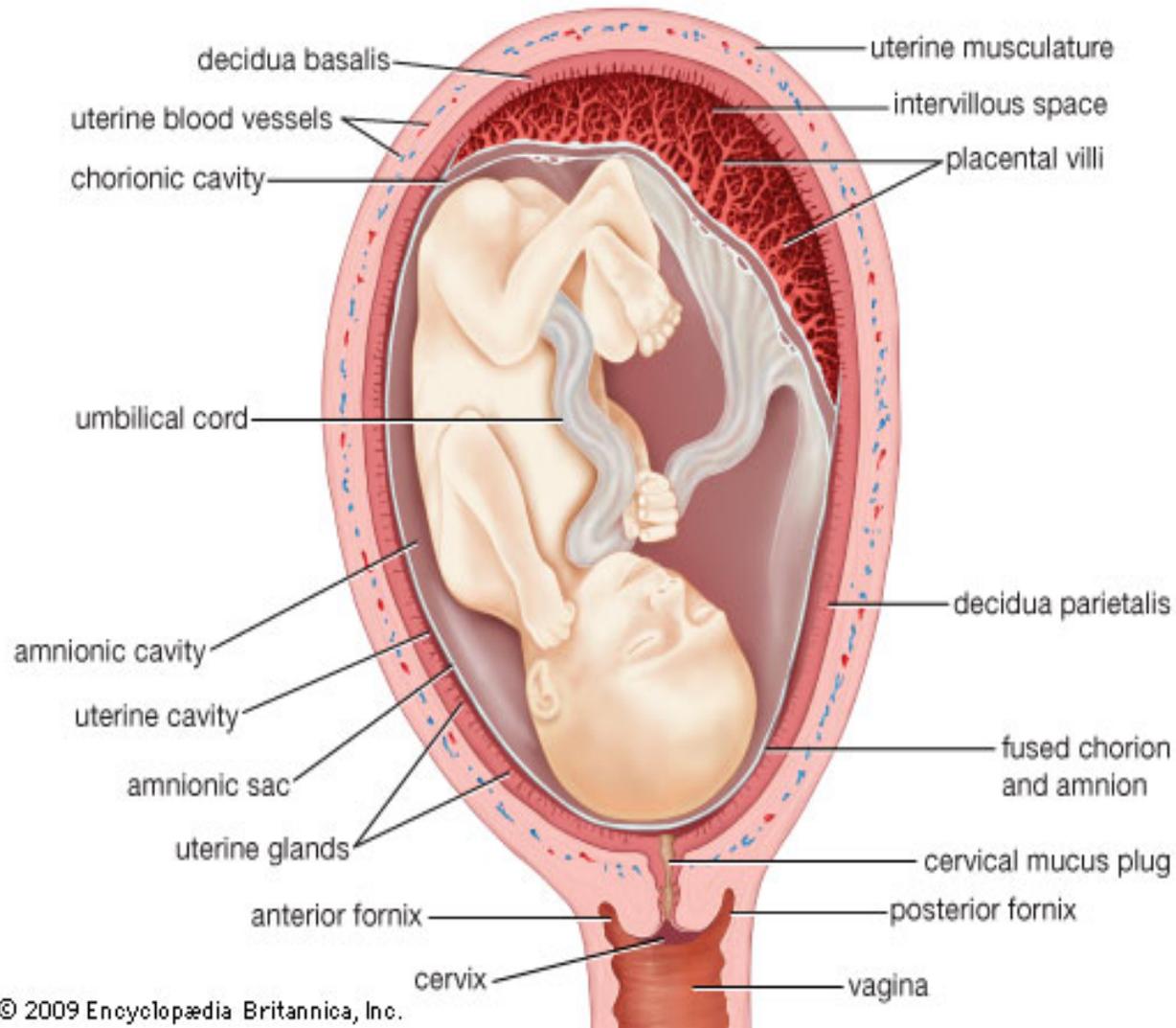
Les études exclusivement centrées sur la structure des microbiotes (rARN 16S) ne peuvent informer sans ambiguïté sur les fonctions.

Des microbiotes de structure très différente peuvent être fonctionnellement proches, certaines espèces taxonomiquement distinctes partageant des fonctions communes (particulièrement métaboliques).

L'interface structure – fonction des microbiotes nécessite donc un effort accru sur l'analyse fonctionnelle:

- au niveau génomique (deep sequencing),
- au niveau phénotypique (métabolomique)
- au niveau de l'étude des "cross-talks moléculaires"

# Etablissement du microbiote



# Généralités

Le système immunitaire de l'enfant est négativement régulé durant la grossesse.

Les premiers mois de la vie représentent une période de grande sensibilité aux infections.

Après la naissance, le système immunitaire présente un processus progressif de maturation.

**L'exposition à l'environnement microbien est considéré comme un des paramètres majeurs de cette maturation.**

# Influence prénatale du microbiote intestinal

**L'environnement intra-utérin du fœtus est "stérile" jusqu'à la délivrance... et jusqu'à preuve du contraire !**

Evidences récentes de la présence de bactéries dans l'environnement intra-utérin. Etablissement d'un microbiote avant le terme ?

(Jimenez E et al. 2008. Res Microbiol)

L'ADN de *Lactobacillus* et de *Bifidobacter* a été détecté dans le placenta de nouveaux-nés accouchés par voie vaginale ou par césarienne suggérant un transfert de l'intestin maternel (Satokari R et al. 2008. Lett Appl Microbiol)

Les bactéries dans l'environnement intra-utérin pourraient permettre une colonisation prénatale du méconium (DiGiulio DB et al. 2008. PLoS ONE; Jimenez E et al 2005. Curr Microbiol).

Chez la souris, gavage avec *E. faecium* donne lieu à la présence de bactéries dans le liquide amniotique

# Conclusions/hypothèses

Contaminations ?

Impact sur colonisation ? Difficile à évaluer car le méconium reflète essentiellement des équilibres post-nataux

Impact sur immunité ? CpG DNA/TLR9/activation d'une réponse Th-1 ?

Quid des PAMPs susceptibles de traverser la barrière placentaire ?

Travaux en cours sur microbiote et maturation placentaire (Pettersson S et al.)

# Microbiote et terme

Environ 40% des accouchements avant-terme sont attribués à des infections vaginales.

Cependant, le traitement antibiotique de ces infections ne ne réduit pas le risque d'accouchement avant-terme.

Nécessité de revoir le concept ? Infection *stricto-sensu* ou modifications d'équilibre de la flore vaginale?

Mères ayant eu au moins un travail déclenché avant le terme:

*Mobiluncus*, *Atopobium*, *Mycoplasma*: risque accru

*Lactobacillus* (flore normale) risque faible. Dépendant de l'ethnie.

Vaginose bactérienne récente BVAB-3 (Clostridiales): risque réduit de travail avant-terme ! Indépendant de l'ethnie.

Rééquilibrage de la flore vaginale ?

## Etablissement successive des communautés microbiennes dans l'intestin: "succession écologique"

Le microbiote intestinal du nourrisson est très différent de celui des adultes avec une grande variabilité interindividuelle.

Tendance à la convergence à un an vers une flore se rapprochant de plus en plus de la composition adulte (Spor et al. 2011. Nat Rev Microbiol)

Grandes tendances malgré la variabilité:

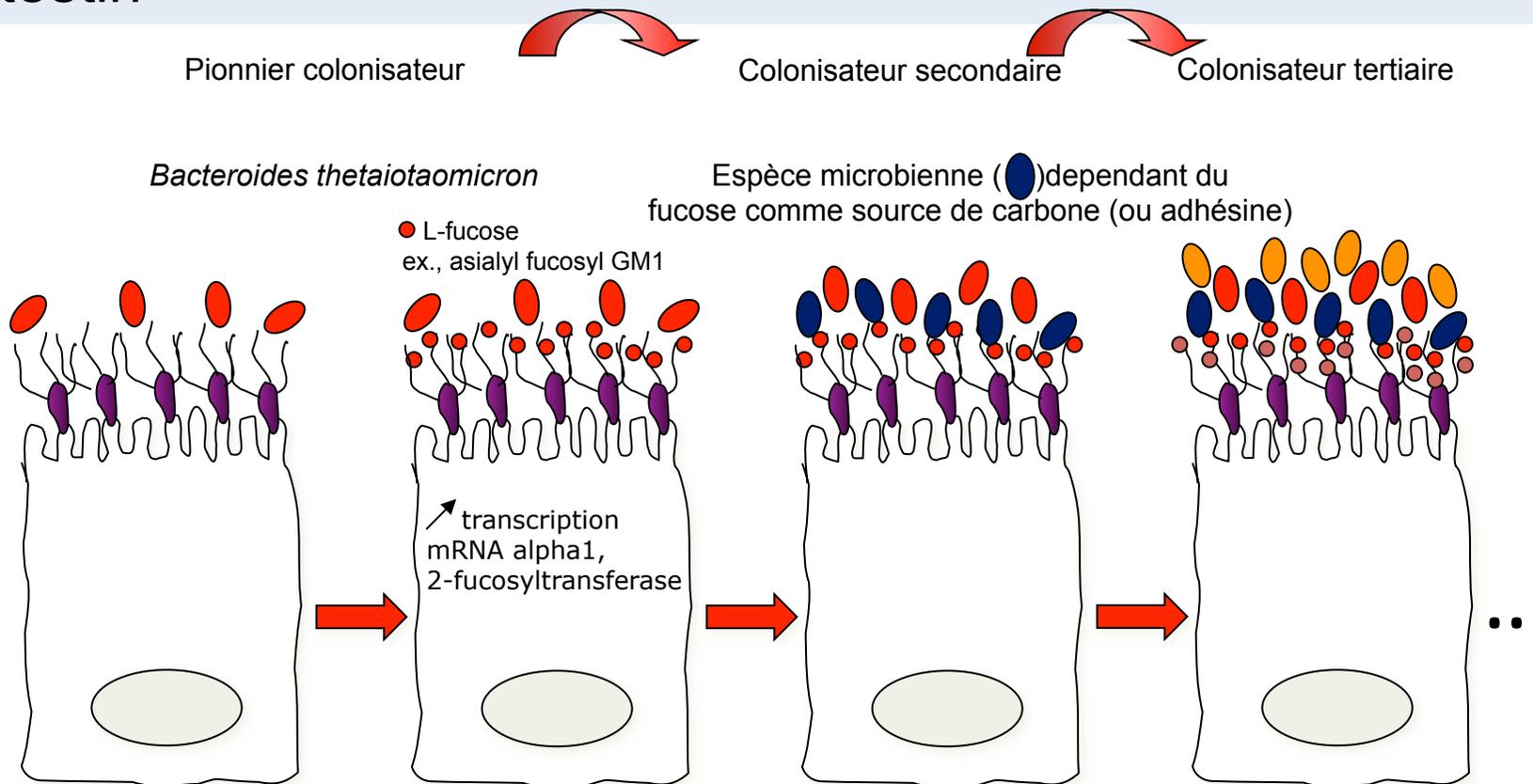
Colonisation précoce par des espèces anaérobies facultatives (*E. coli* et autres Entérobactéries)

Dès que ces espèces ont consommé l'oxygène initialement présent dans l'intestin et créé un environnement largement anaérobie (colon), des bactéries anaérobies peuvent s'implanter: *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* (Jemenez E et al. 2008. Res Microbiol).

Induction de modifications secondaires des polysides des mucines et du glycocalyx des cellules épithéliales (Bry et al. 1996. Science)

De cette faible diversité / complexité, la flore va progressivement s'enrichir et construire ses équilibres vers la flore "adulte" (2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> année)

# Etablissement séquentiel des communautés microbiennes dans l'intestin



Une lignée murine incapable d'utiliser le L-fucose est incapable d'initier le processus de colonisation

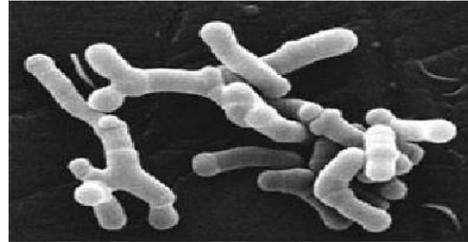
Modification et complexification croissante du milieu via des modifications secondaires (ex., fucosylation) des domaines polysidiques des protéoglycanes de la surface épithéliale qui favorisent l'implantation d'une nouvelle espèce bactérienne, etc...

Il est donc probable que la nature et l'ordre de constitution du microbiote intestinal ne soit absolument pas aléatoire.

Bry et coll., Science, 1996

# Bifidobacterium

*Bifidobacterium rhamnosus*



*Bifidobacterium* (Actinobactérie) est le genre bactérien dominant de l'intestin du nourrisson  
Au moins 6 espèces différentes: *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. breve*, *B. longum* (Harmsen HJ, 2012, J Pediatr Gastroenterol Nutr; Turroni et al. 2012. PLoS ONE).

Bacille Gram positif, immobile à morphologie ramifiée  
Proche des Actinomycetes  
Anaérobie strict, nitrate réductase +, croissance nécessite des concentrations élevées de CO<sub>2</sub>.

Fermentation hétérolactique = fermentation d'acide lactique associé à de l'acétate, sans dégagement gazeux.

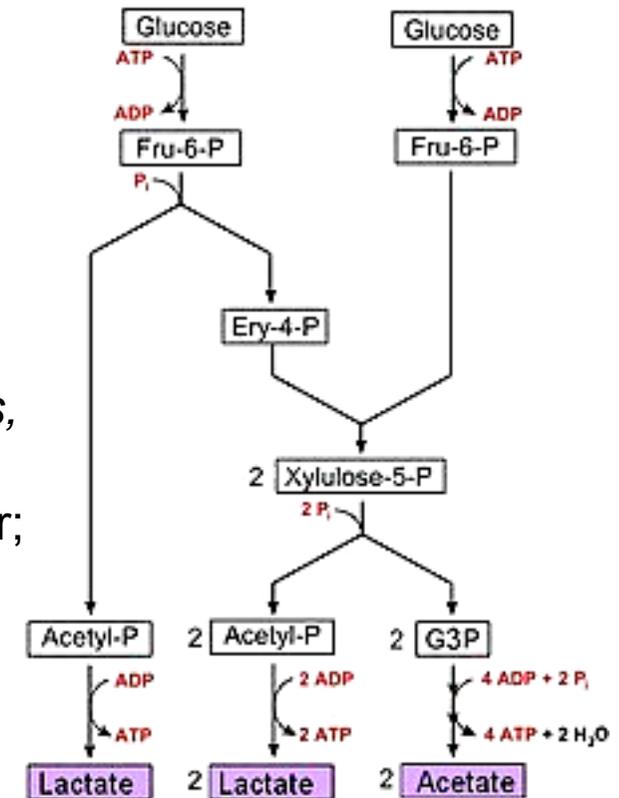
6-phosphocétolase permet la transformation directe du glucose en fructose-6-phosphate, palliant à l'absence de glucose-6-phosphate déshydrogénase. Utilisent ensuite la voie des pentoses phosphates pour transformer le glucose en lactate et acétate.

Effet bénéfique ?

Meilleure absorption du lactose chez les adultes déficients en lactase intestinale.

Assure l'équilibre lors de la diminution de l'expression de la lactase chez le nourrisson ?

Autres effets ?



# Paramètres de variabilité du microbiote intestinal humain

## **La colonisation dépend de la voie d'accouchement:**

- L'accouchement vaginal favorise l'établissement d'une flore intestinale reflétant la flore vaginale de la mère (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*)
- L'accouchement par césarienne favorise l'établissement d'une flore reflétant la flore cutanée (*Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*)

## **La colonisation dépend du mode d'alimentation du nourrisson:**

- Différences significatives entre flores des nourrissons nourris au sein et nourris au biberon.
- Rôle important de l'alimentation au sein dans l'apport de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Fernandez L et al. 2013. Pharmacol Res).

**La colonisation dépend aussi** du niveau d'hygiène maternel, d'une hospitalisation et de la prématurité.

La convergence vers une flore adulte survient en fin de première année.

Dominguez-Bello MG et al. 2010. PNAS

Penders J et al. 2006. Pediatrics

Palmer C et al. 2007. PLoS Biol

# Paramètres de variabilité du microbiote intestinal humain

Le temps de gestation est un paramètre important de la composition de la flore du nouveau né/nourrisson.

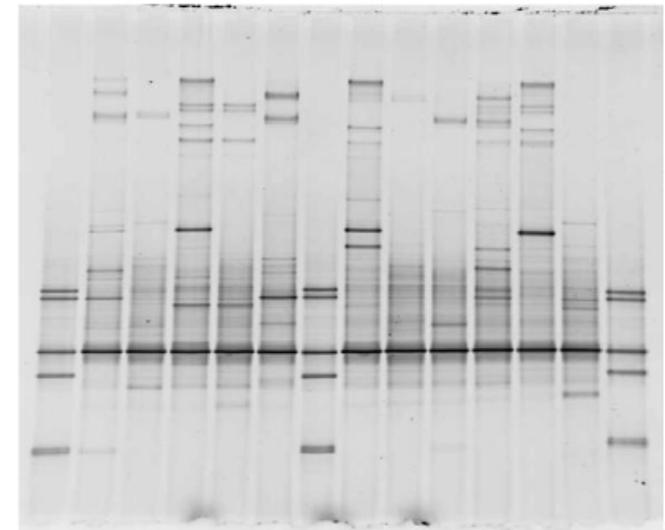
Enfants nés à terme:

Diversité importante, présence des genres bactériens communs:  
*Bifidobacterium*,  
*Lactobacillus*, *Streptococcus* (Arboleya S et al. 2012. Anaerobe)

Prématurés: Diversité restreinte

Présence plus fréquente et en plus grande abondance d'Entérobactéries, voire d'espèces à potentiel pathogène comme *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae* (Schwiertz A et al. 2003. Pediatr Res)

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis):  
diversité très restreinte reflétant l'acquisition d'une flore hospitalière (nosocomiale ?) avec prévalence d'*E. coli*, *Enterococcus spp.* et *K. pneumoniae*



(Fanaro S et al. 2003. Acta Paediatr Suppl. 91:48-55)

# Paramètres de variabilité du microbiote intestinal humain

## Importance du lait maternel

Le lait humain est une source importante d'oligosides jouant un puissant rôle prébiotique dans l'établissement du microbiote du nouveau né/nourrisson (Bode L. 2009. Nutr Rev).

***Bifidobacterium longum ssp infantis*** possède plusieurs gènes/opérons dédiés au métabolisme de ces oligosides ou HMO (human milk oligosaccharides) (Sela DA, Mills DA. 2010. Trends Microbiol)

Les HMO induisent l'expression de gènes impliqués dans la dégradation des carbohydrates et l'adhérence bactérienne (Gonzalez R. 2008. Appl Environment Microbiol).

Les colonisateurs pionniers comme les Actinobactéries et les Firmicutes sont bien adaptés à l'utilisation du lait humain. Ils possèdent aussi des gènes/opérons permettant la digestion/assimilation de polyosides de plantes non digestibles avant même le sevrage et l'introduction des aliments solides. Ceci constitue une capacité pour ce "protomicrobiote" de digérer des aliments végétaux simples comme le riz (Koenig JE et al. 2011. PNAS)

Avec l'introduction d'une alimentation solide et diversifiée, le microbiote va lui même se diversifier avec en particulier l'apparition de *Bacteroides* colonisateurs qui vont accroître les capacité d'hydrolyse des carbohydrates, de détoxification des xénobiotiques et de biosynthèse des vitamines (Koenig JE et al. 2011. PNAS)

# Paramètres de variabilité du microbiote intestinal humain

## Antibiotiques et "états stables alternatifs" du microbiote

Changements majeurs dans le microbiote d'enfants recevant des antibiotiques.

Glissements spectaculaires pouvant même rendre la flore indétectable (Palmer C et al. 2007. PLoS Biology).

L'antibiothérapie chez le nourrisson est associée à une plus forte proportion d'Entérobactéries et d'*Enterococcus* et à une plus faible proportion de *Bifidobacterium*. Rémanence = 1 mois ! (Tanaka S et al. 2009. FEMS Immunol Med Microbiol)

L'administration d'un traitement antibiotique à des nouveau-nés/nourrissons de faible poids entraîne une diminution drastique du microbiote intestinal en densité et diversité.

Un déséquilibre est aussi observé en cas de traitement antibiotique de la mère

# Paramètres de variabilité du microbiote intestinal humain

La diminution de la diversité phylogénique du microbiote intestinal du nouveau-né / nourrisson ayant subi un traitement antibiotique a pu être corrélée à une plus grande fréquence de survenue d'un sepsis néonatal chez les enfants prématurés (Madan JC. 2012. Arch Child Dis Fetal Neonatal)

# Vers une microbiologie cellulaire de la symbiose

Les grandes études génomiques et métagénomiques ont masqué les efforts jusqu'à présent insuffisants d'identification des facteurs bactériens nécessaires à l'établissement dans l'environnement intestinal, à la colonisation prolongée, à l'adaptation à des conditions variables liées au microbiote ambiant et à l'hôte. Notion de "fitness"

Comment ces déterminants sont-ils reliés à la disponibilité en nutriments ?

Quel recouvrement existe entre le pool de gènes nécessaire à optimiser la croissance *in vivo* et *in vitro* ?

Jusqu'à quel point la structure du microbiote influence-t-elle la colonisation ? S'agit-il d'un phénomène propre à chaque espèce ?

Quel est le rôle véritable de l'immunité de l'hôte dans la colonisation ?

Autres questions.....

# Mutagenèse du génome de *Lactobacillus casei*, construction d'une librairie "genome-wide", assemblage et criblage phénotypique: génomique fonctionnelle d'un symbionte

Hélène LICANDRO-SERAUT, Hélène SCORNEC,  
Jean-François CAVIN, Thierry PEDRON, Philippe  
SANSONETTI

Institut Pasteur, Paris, France.

UMRA, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne

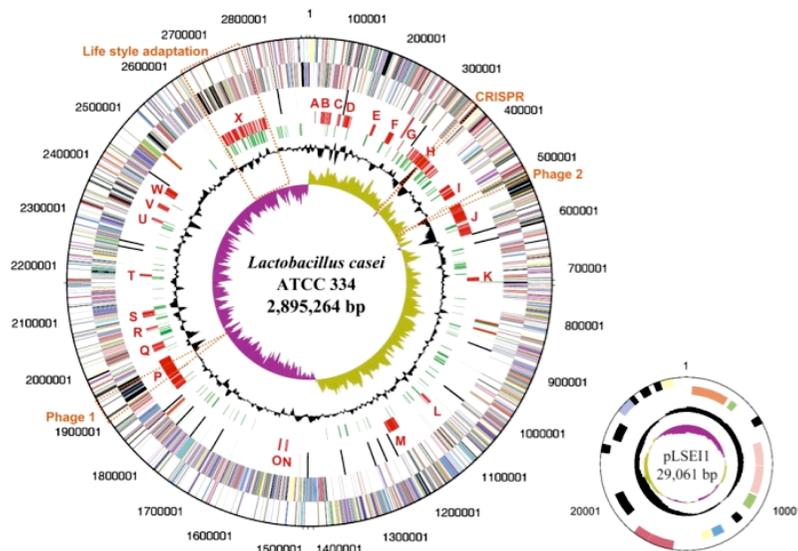
## Génome de *L. casei* ATCC 334

- 2,9 Mb, 2900 genes (10 – 20% essential ?)
- 26% des gènes sans prédiction de fonction.
- un plasmide: pLSEI1 (29 kbp)

## Limites d'une analyse génétique (génétique réverse):

- Très bas taux de transformation
- Fréquence de la résistance naturelle aux antibiotiques
- Incompatibilité avec des plasmides résidents

## Développement d'outils pour la mutagenèse: P<sub>junc</sub>-T<sub>paselS</sub><sub>1223</sub> system



Cai H et al. Genome Biol Evol 2009;1:239-257

Licandro-Seraut et al. 2012. Appl Environ Microbiol.

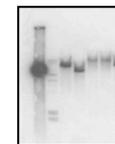
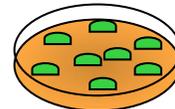
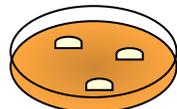
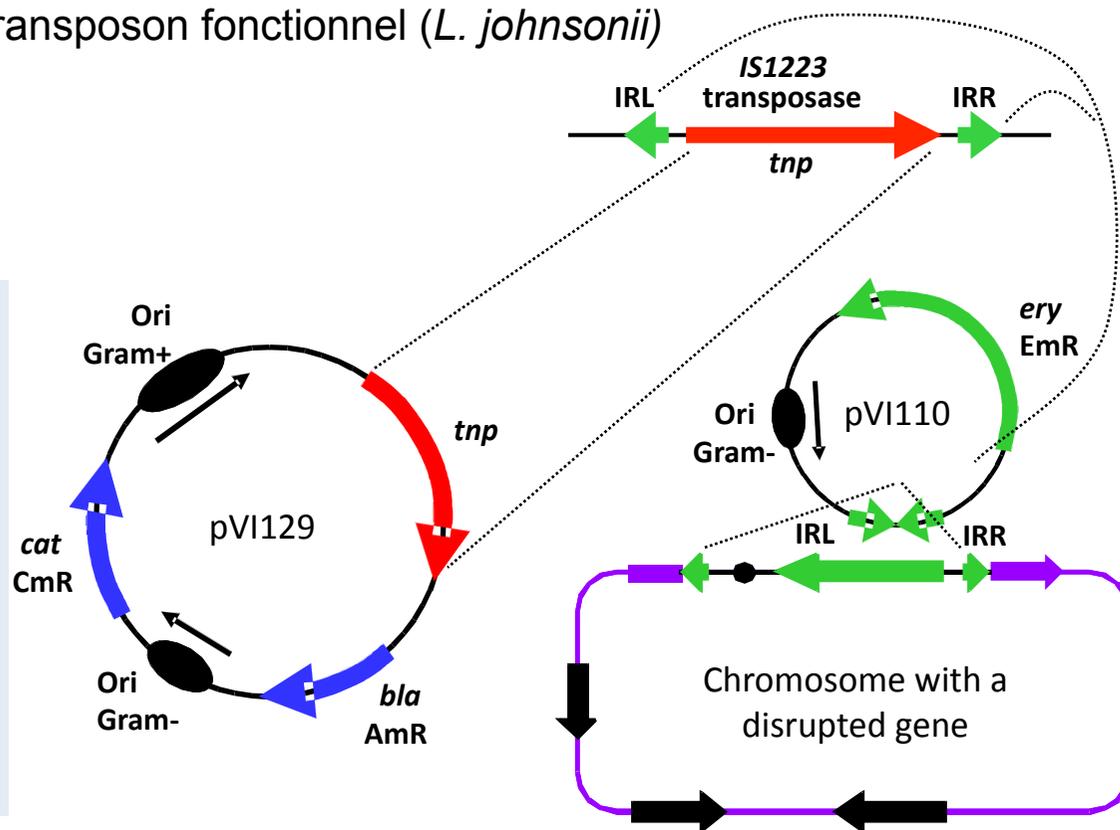
# Outils développés pour la mutagénèse de *L. casei*

(collaboration avec Pascale Serror, Unité BLPO, INRA, Jouy-en-Josas, France)

Transposase + **IRs** spécifiques = transposon fonctionnel (*L. johnsonii*)

➤ pVI129:  
Gram(-)/Gram(+) vecteur navette.  
Unstable in Gram(+).

➤ pVI110:  
Pas de gène *tnp* (stable chez *E. coli*).  
Suicide chez Gram(+)  
=> integration seulement avec pVI129.



Transformation / pVI129  
Expression de la transposase

Transformation / pVI110  
Environ 10.000 integrants aléatoires  
(tous transformants = integrants)

Croissance pendant 30 generations  
=> perte de pVI129.  
Vérification de la diversité des mutants

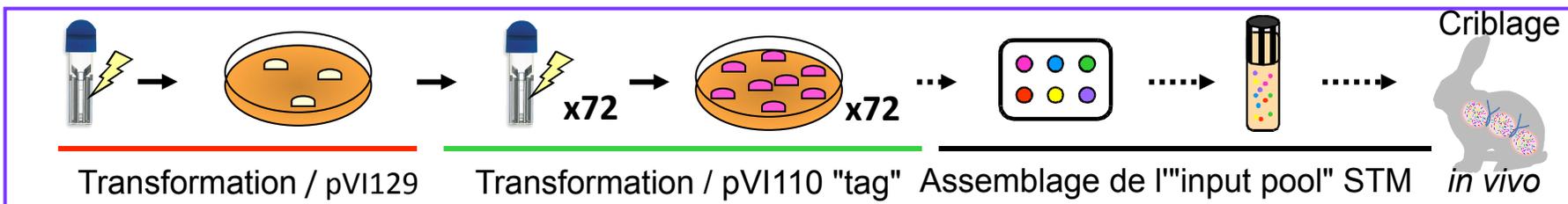
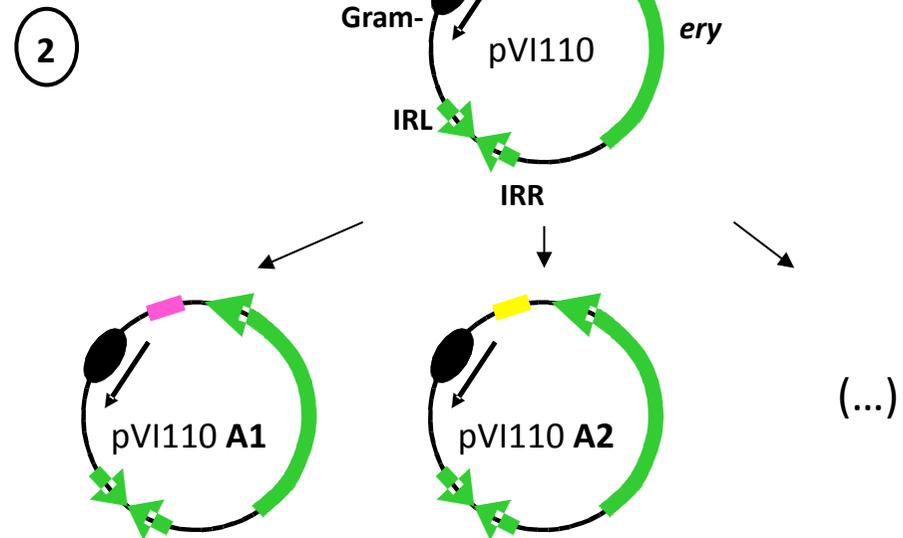
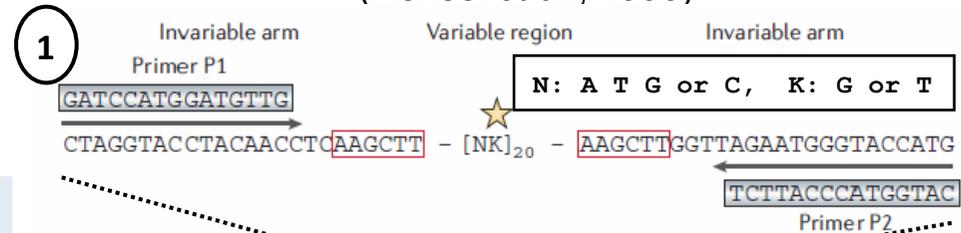
# "Signature Tagged Mutagenesis" (STM) chez *L. casei*

## Librairie STM

① 96 "tags" sans cross-hybridation  
(C. Tang and coll.)

② Clonage de chaque "tag" in pVI110 un par un

DNA "tags" (Chris Tang, CMMI, Imp. Coll. London)  
(Hensel *et al.*, 1995)



# Construction & assemblage d'une librairie "genome-wide" de mutants par transposition de *Lactobacillus casei* et analyse fonctionnelle *in vivo*



Hélène Licandro-S raut

Librairie de 9250 mutants "tagg s" aléatoires

Séquençage de toutes les cibles du Tn

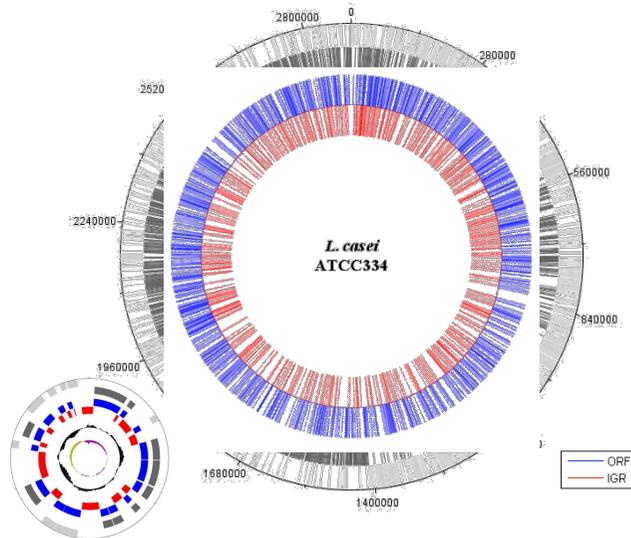
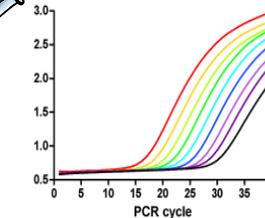
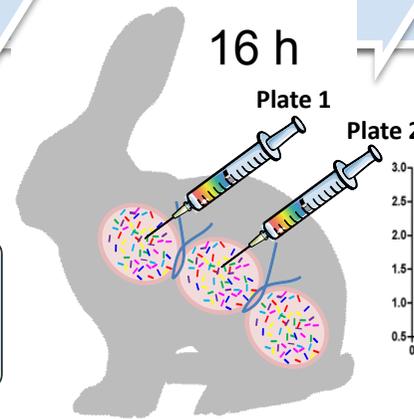
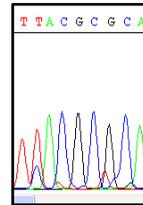
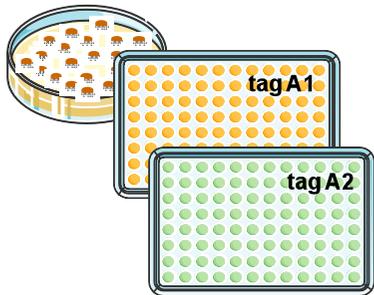
Sélection of 1110 unique mutants in ORFs

Challenge des pools de mutants, anse il ale ligatur e

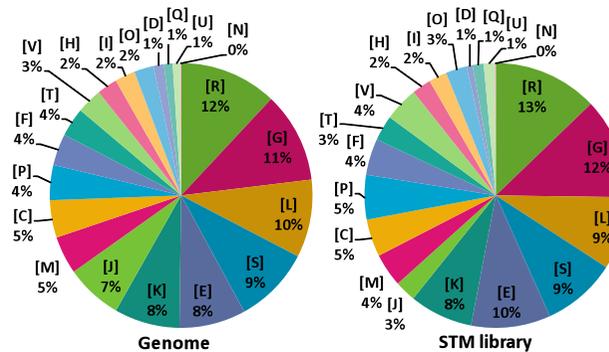
Quantification des mutants par qPCR

Sélection de mutants dont la quantité diminue d'au moins trois fois durant l'incubation de 16 h dans l'anse iléale

Identification de gènes impliqués dans l'établissement de *L. casei* dans l'intestin



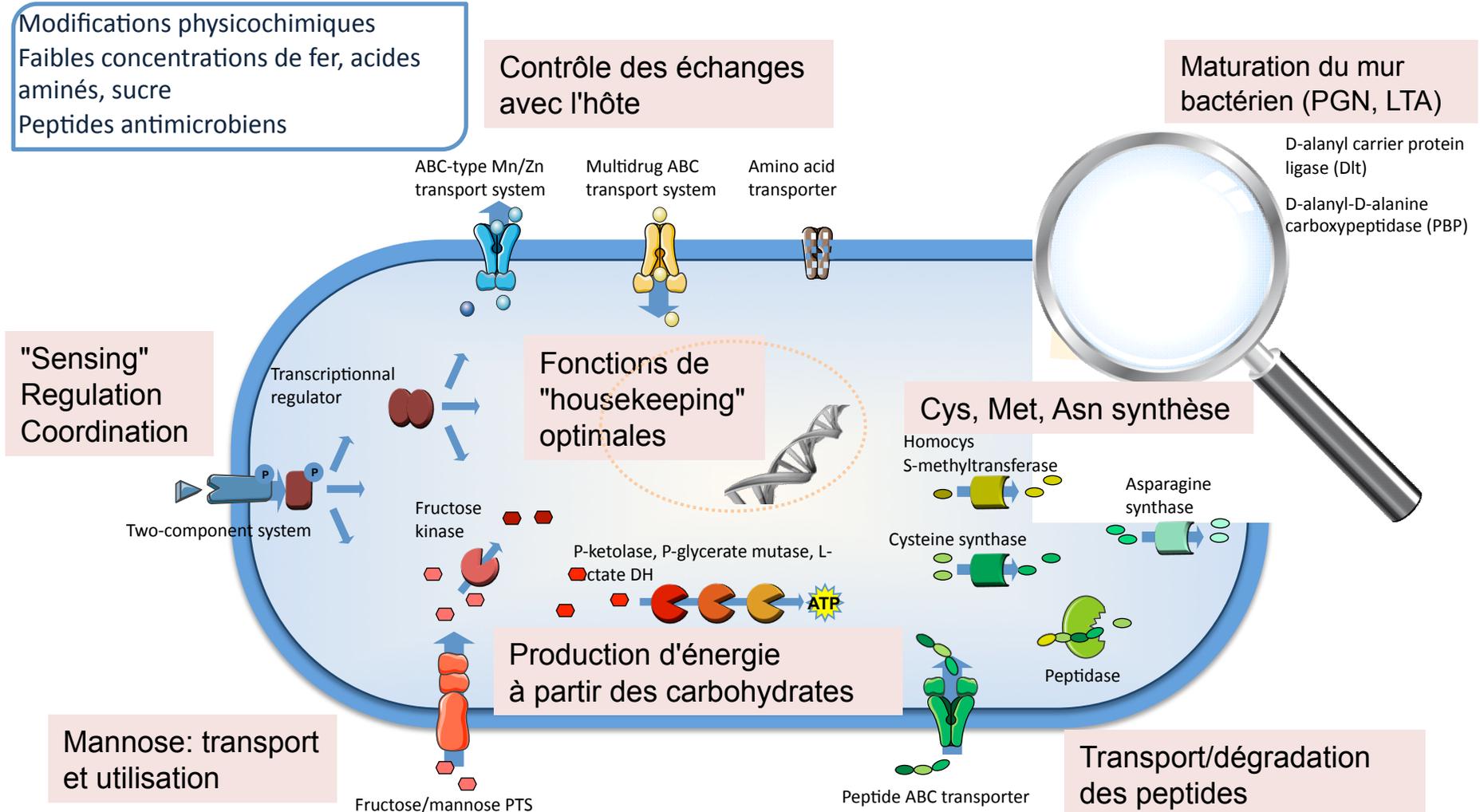
Distribution des sites d'insertion des transposons dans les 9250 mutants de *L. casei*



## Librairie de 1110 ORFs mutants:

- La distribution des fonctions inactivées est similaire au génome (except for translation functions [J]).
- Couverture de ~50% des gènes non essentiels
- Tn sites identifiés

# Fonctions essentielles nécessaires à l'établissement de *L. casei* dans l'intestin



- 64 gènes essentiels pour l'établissement dans l'intestin (mutants "perte de fonction")
- 3 gènes limitant l'établissement dans l'intestin (mutants "gain de fonction")

## *Bacteroides fragilis*

*Bacteroides* = un des genres Gram les plus abondants dans le microbiote intestinal des mammifères (Eckburg PB et al. 2005. Science)

Au sein du genre *Bacteroides*, plusieurs espèces sont engagées dans des activités mutualistes avec l'hôte:

- Glycosylation de l'épithélium intestinal (Bry L et al. 1996. Science)

- Production d'hydrolases qui digèrent les carbohydrates complexes assurant un apport nutritionnel à l'hôte (Xu J et al. 2003. Science)

- Maturation du système immunitaire = PSA (Mazmanian SK et al. 2005. Cell)

- Protection contre l'inflammation dans des modèles de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

et de sclérose en plaques (Mazmanian SK et al. 2008. Nature; Round JL & Mazmanian SK. 2010. PNAS; Ochoa-Reparaz J et al. 2010. J Immunol)

# Identification d'un facteur de colonisation chez *B. fragilis*

On connaît peu les mécanismes moléculaires qui permettent aux bactéries symbiotiques de coloniser l'hôte de façon stable.

Modèle : monocolonisation de l'intestin murin axénique par *B. fragilis*.

Identification d'un gène (*ccf* = commensal colonization factor)

La délétion de *ccf* diminue la capacité de colonisation et de transmission chez *B. fragilis*.

L'expression de *ccf* est augmentée lorsque la bactérie est présente dans l'intestin, en particulier à proximité de la surface épithéliale.

*B. fragilis* dans des conditions gnotoxéniques traverse la barrière de mucus et occupe le canal central des cryptes coliques.

Le mutant *ccf* est absent des cryptes.

Le système CCF est essentiel pour une colonisation efficace de *B. fragilis* suite à une rupture du microbiome suite à une infection par *Citrobacter rodentium*.

Crypte = niche pour une colonisation prolongée ?

# Rôle du régime alimentaire dans la structure et la fonction du microbiote

Les souris gnotobiotiques colonisées avec une flore humaine établissent une flore complexe permettant d'étudier l'effet de changements de régimes alimentaires (Turnbaugh et al. 2009. Sci Transl Med)

Le passage d'un régime pauvre en graisses (végétal) à un régime riche en graisses et en carbohydrates entraîne un changement rapide dans la composition du microbiote.

Ces modifications s'accompagnent de changements fonctionnels permettant de répondre aux modifications métaboliques imposées par le nouveau régime.

La présence de certains polysides du lait maternel a aussi un impact sur l'équilibre du microbiote (Zivkovic AM et al. 2011. PNAS).

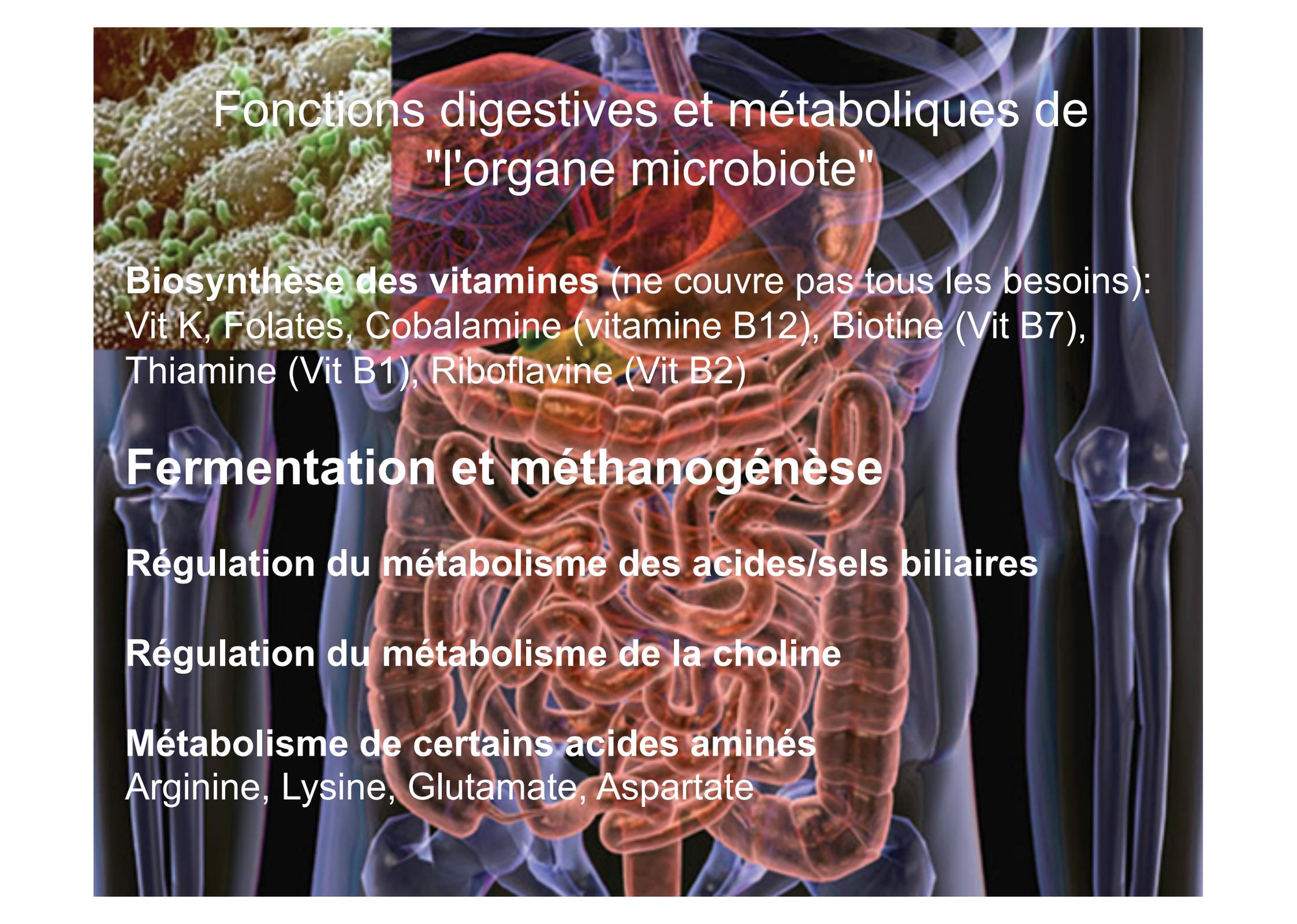
Validité chez l'homme où le microbiote semble plus résilient aux changements alimentaires, même drastiques ?

## Un exemple d'adaptation à la nécessité d'extraction énergétique

**Enfants africains**, mode de vie rural, consommant un régime riche en polysides végétaux: diminution de la représentation des Firmicutes et niveau augmenté des Bacteroidetes dans leur microbiote fécal (surtout *Prevotella* et *Xylanibacter*)

**Enfants italiens**: plus haut niveau d'Entérobactéries, principalement *Escherichia* (De Filippo C et al. 2010. PNAS).

*Prevotella* et *Xylanibacter* dégradent la cellulose et les xylanes, et sont associés à une concentration fécale plus élevée de SCFAs, suggérant que le microbiote des enfants africains vivant en milieu rural s'est adapté pour optimiser l'extraction d'énergie d'un régime riche en fibres végétales.



## Fonctions digestives et métaboliques de "l'organe microbiote"

**Biosynthèse des vitamines** (ne couvre pas tous les besoins):  
Vit K, Folates, Cobalamine (vitamine B12), Biotine (Vit B7),  
Thiamine (Vit B1), Riboflavine (Vit B2)

## Fermentation et méthanogénèse

Régulation du métabolisme des acides/sels biliaires

Régulation du métabolisme de la choline

**Métabolisme de certains acides aminés**  
Arginine, Lysine, Glutamate, Aspartate

# Substrats potentiels pour la fermentation par le microbiote colique

## **Hydrates de carbone**

Amidon

Fibres (polyosides végétaux: cellulose, pectine, hémi-cellulose)

Sucres non absorbés

Raffinose, stachyose

Polydextrose

## **Protéines**

Alimentaires

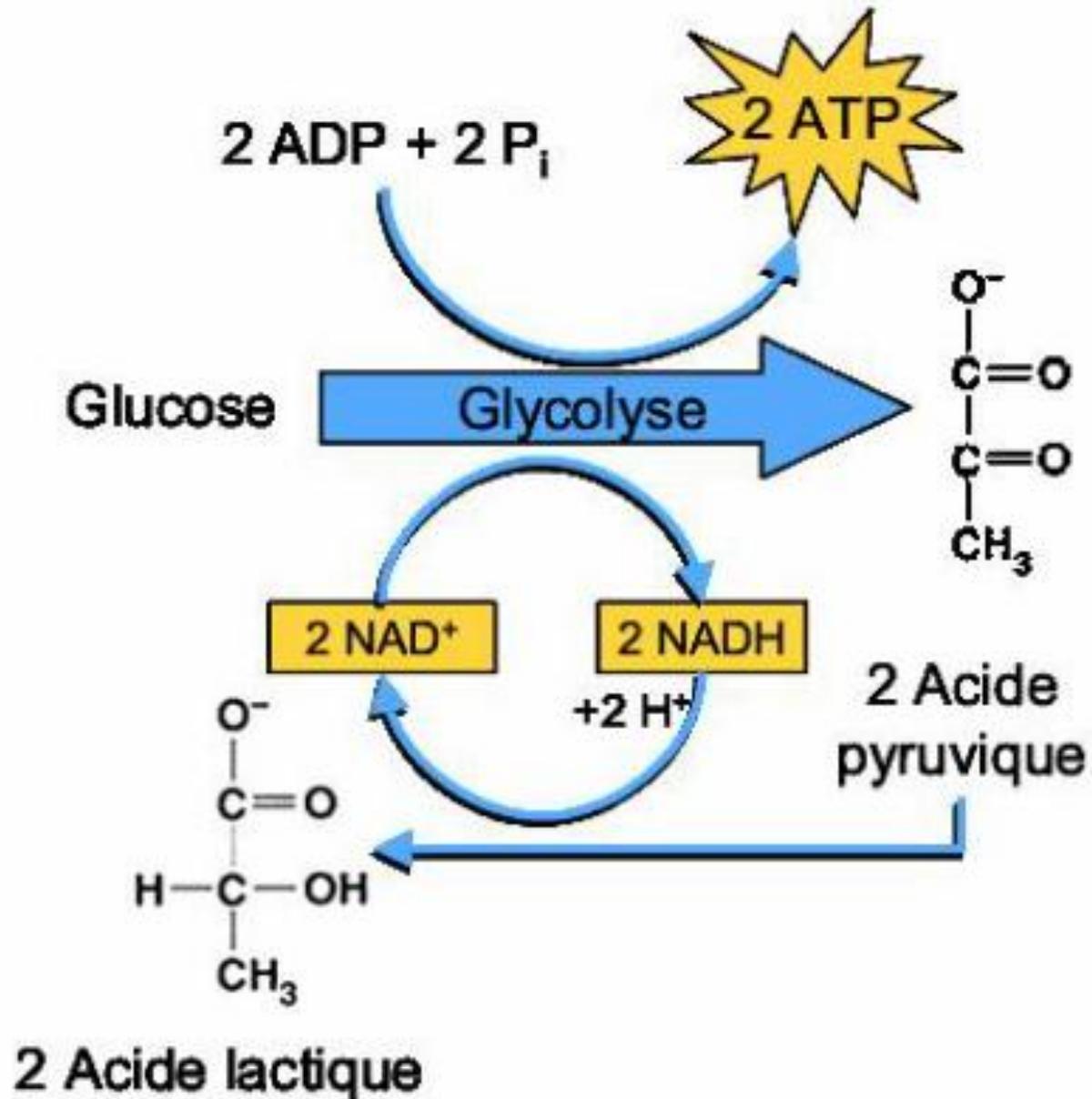
Endogènes (enzymes pancréatiques)

## **Autres**

Glycoprotéines intestinales

Mucopolyosides

# Fermentation lactique



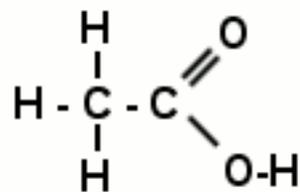
## Digestion des hydrates de carbone non digérés dans l'intestin grêle

La cellulose est un composant de l'alimentation (végétaux)  
Plusieurs espèces du microbiote expriment des **cellulases** qui digèrent le cellulose

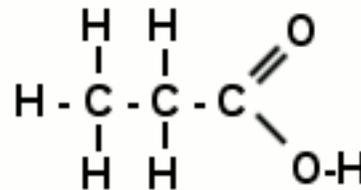
Les sucres issus de la dégradation de la cellulose et des autres hydrates de carbone – y compris les glycanes des mucines – sont fermentés par les enzymes de la flore anaérobie et des archéobactéries, donnant lieu à la formation de produits finaux:

**acides gras volatils:** SCFA (Acide acétique, propionique, butyrique) et **lactate** absorbés par l'épithélium intestinal

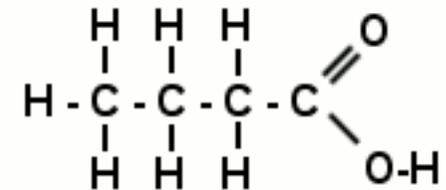
**gaz:** méthane, hydrogène, CO<sub>2</sub>



Acetic acid

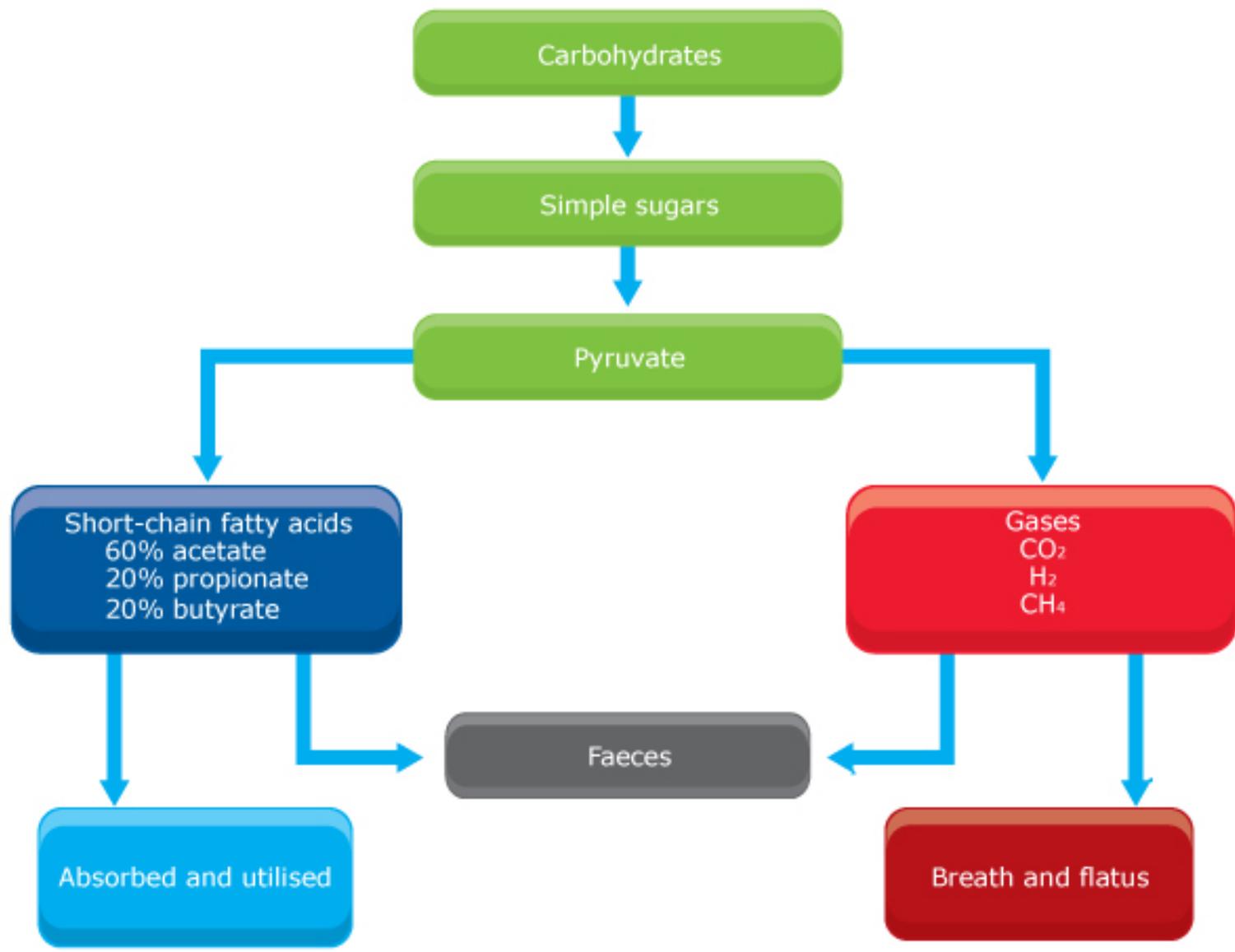


Propionic acid



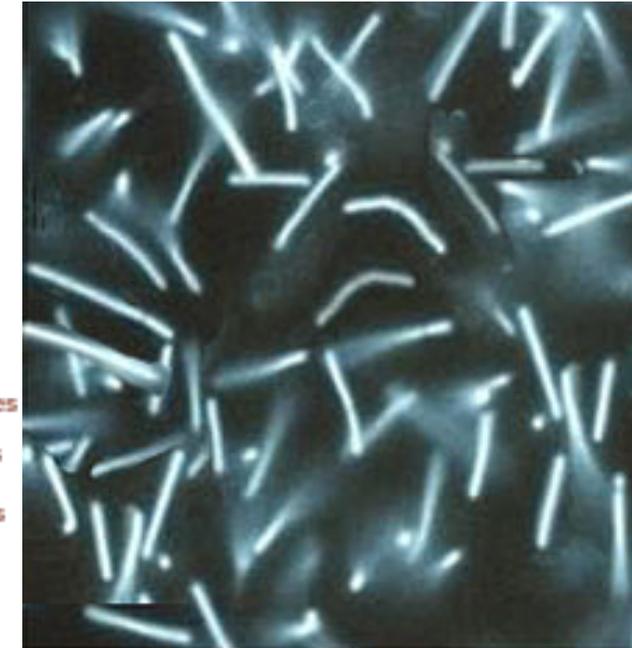
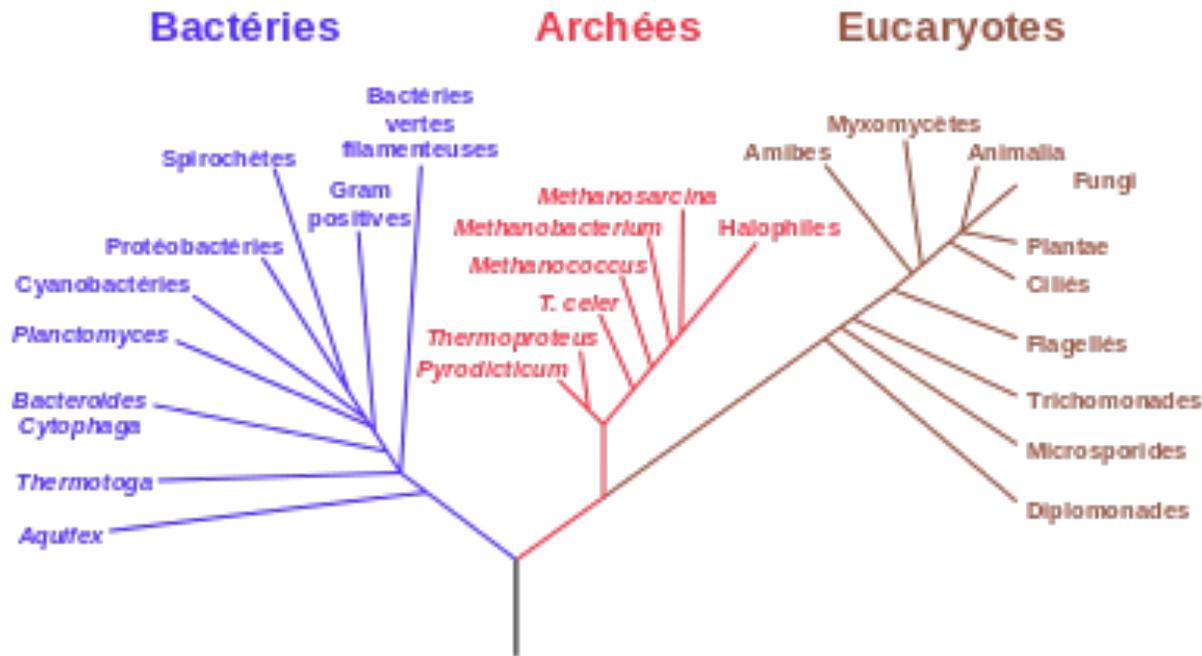
Butyric acid





# Arbre phylogénétique de la vie

## Archéobactéries

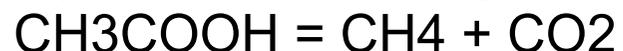


La méthanogénèse est assurée par des microorganismes anaérobies stricts appartenant au domaine des Archea. Cette dernière étape aboutit à la production de méthane. Elle est réalisée par deux voies possibles:

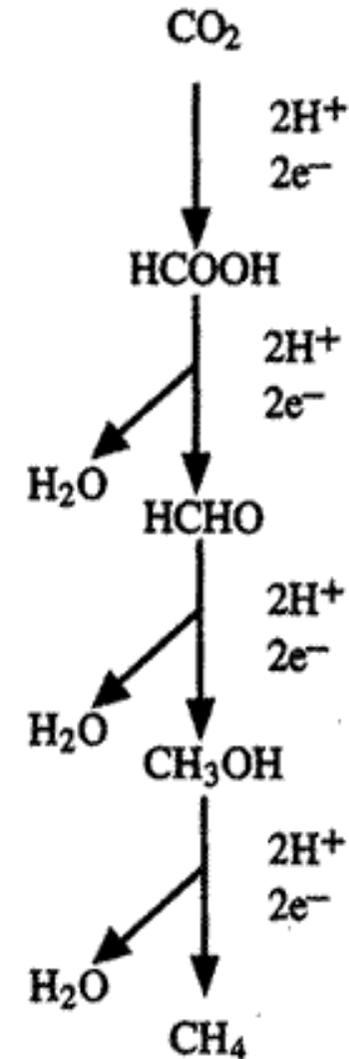
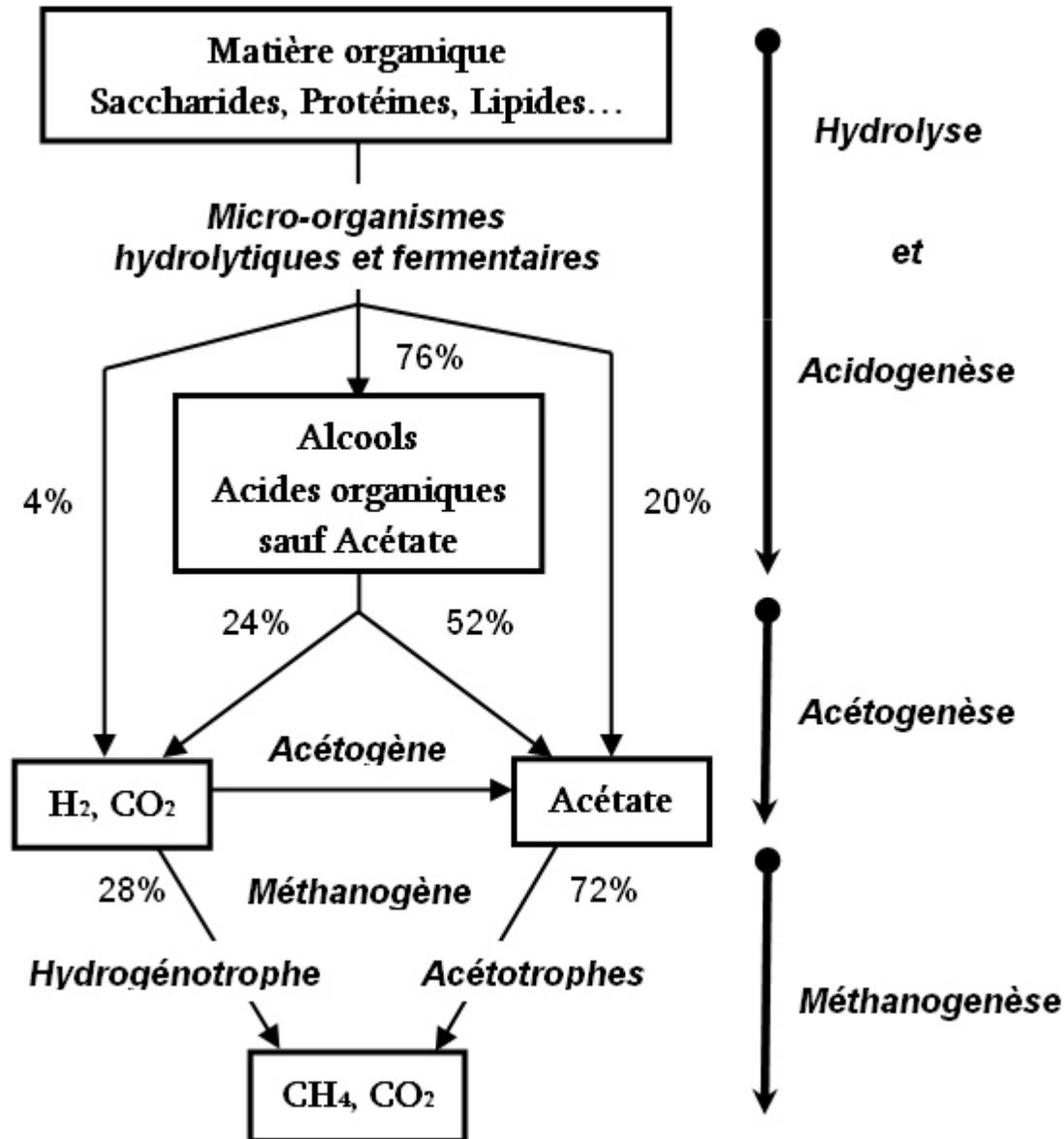
à partir de l'hydrogène et du CO<sub>2</sub> par les espèces **hydrogénotrophes**



à partir de l'acétate par les espèces **acétotrophes**:



# Méthanogénèse



Méthanogénèse par réduction du CO<sub>2</sub>

# Microbiote et métabolisme colique

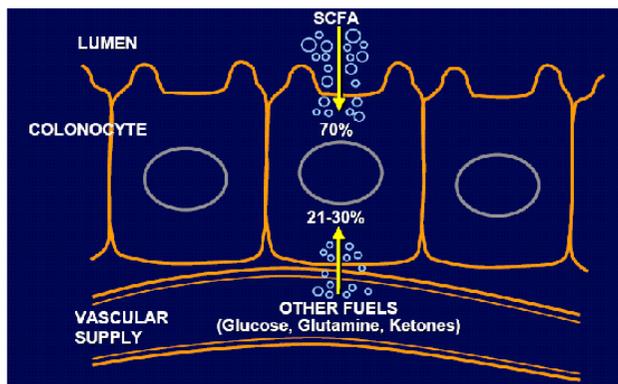
C'est au niveau de l'intestin, en particulier du colon, que l'interface hôte-microbiote est la plus importante, donc l'effet sur le métabolisme le plus notable.

Le microbiote exerce un effet spectaculaire sur le métabolisme du tissu colique en comparaison d'autres organes

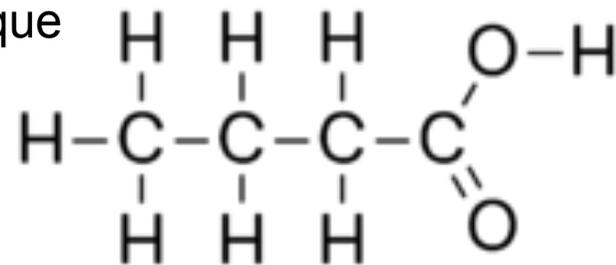
Cette spécificité métabolique tissulaire est largement due à la production d'acides gras à chaînes courtes, en particulier le butyrate, par le microbiote, en particulier de butyrate qui représente l'essentiel de la source de carbone/d'énergie des colonocytes.

Les colonocytes des souris axéniques sont dans un état d'insuffisance énergétique. Cette déprivation énergétique s'accompagne d'une augmentation nette de l'autophagie dans ces cellules.

Short chain fatty acids (SCFA) are main source of energy for colonic epithelial cells



Acide butyrique



Donohoe DR et al. 2011. Cell Metab

## Effet du microbiote sur le métabolisme systémique de l'hôte

Le microbiote intestinal métabolise des aliments ingérés par l'hôte et des éléments de l'hôte. Inversement, des produits du métabolisme microbien peuvent être convertis par l'hôte.

Le profil des métabolites présents dans l'intestin dépend donc de la combinaison du métabolisme eucaryote de l'hôte et du métabolisme procaryote du microbiote.

**Des différences importantes sont observées au niveau des produits du métabolisme intestinal des souris axéniques en comparaison de souris conventionnelles.**

L'administration d'antibiotiques peut aussi exercer un effet sur le profil métabolique de l'intestin, mais aussi sur le profil métabolique systémique de l'animal traité.

Le traitement de souris par la Streptomycine affecte les niveaux de 87% des métabolites identifiés dans les selles (Antunes LC et al. 2011. Antimicrob Agents Chemother). Des voies métaboliques importantes comme le métabolisme des sels biliaires, des lipides pro-inflammatoires, et des hormones stéroïdes sont affectés.

**Ces effets ne sont pas confinés aux selles.**

Le traitement de rats par une combinaison de Pénicilline et Streptomycine donne lieu à un changement des profils des métabolites dans les selles, mais aussi dans les urines, signant un effet systémique (Swann JR et al. J. Proteome Res)

# Souris axéniques

Poids inférieur de 30 % en comparaison des souris conventionnelles

Nécessitent une ration alimentaire supérieure (Backhed F et al. 2004)

Présentent un développement vasculaire insuffisant

Présentent une activité enzymatique digestive réduite

Présentent une diminution de l'épaisseur de la paroi intestinale

## Une observation pionnière... peu citée

Des rats Wistar, avéniques excrètent 87 % plus de calories dans leurs fèces que des rats conventionnels.

Perte calorique compensée par une augmentation de 18 % des apports alimentaires.

Les rats axéniques consomment 71,9 % de leur ration alimentaire contre 80 % pour les rats conventionnels.

# The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage

Fredrik Bäckhed<sup>\*†‡</sup>, Hao Ding<sup>§¶</sup>, Ting Wang<sup>||</sup>, Lora V. Hooper<sup>†\*\*</sup>, Gou Young Koh<sup>††</sup>, Andras Nagy<sup>§‡‡</sup>, Clay F. Semenkovich<sup>§§</sup>, and Jeffrey I. Gordon<sup>\*†¶¶</sup>

<sup>\*</sup>Center for Genome Sciences and Departments of <sup>†</sup>Molecular Biology and Pharmacology, <sup>||</sup>Genetics, and <sup>§§</sup>Medicine, Cell Biology, and Physiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110; <sup>§</sup>Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada M5G 1X5; <sup>††</sup>Biomedical Center, Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, 305-701, Republic of Korea; and <sup>†††</sup>Department of Medical Genetics and Microbiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S 1A8

Contributed by Jeffrey I. Gordon, September 24, 2004

New therapeutic targets for noncognitive reductions in energy intake, absorption, or storage are crucial given the worldwide epidemic of obesity. The gut microbial community (microbiota) is essential for processing dietary polysaccharides. We found that conventionalization of adult germ-free (GF) C57BL/6 mice with a normal microbiota harvested from the distal intestine (cecum) of conventionally raised animals produces a 60% increase in body fat content and insulin resistance within 14 days despite reduced food intake. Studies of GF and conventionalized mice revealed that the microbiota promotes absorption of monosaccharides from the gut lumen, with resulting induction of *de novo* hepatic lipogenesis. Fasting-induced adipocyte factor (Fiaf), a member of the angiotensin-like family of proteins, is selectively suppressed in the intestinal epithelium of normal mice by conventionalization. Analysis of GF and conventionalized, normal and *Fiaf* knockout mice established that Fiaf is a circulating lipoprotein lipase inhibitor and that its suppression is essential for the microbiota-induced deposition of triglycerides in adipocytes. Studies of *Rag1*<sup>-/-</sup> animals indicate that these host responses do not require mature lymphocytes. Our findings suggest that the gut microbiota is an important environmental factor that affects energy harvest from the diet and energy storage in the host.

promoting health. In the current study, we use normal and genetically engineered gnotobiotic mice to address the hypothesis that the microbiota acts through an integrated host signaling pathway to regulate energy storage in the host.

## Materials and Methods

**Animals.** C57BL/6J (B6) WT and *Rag1*<sup>-/-</sup> mice were purchased from The Jackson Laboratory. B6 peroxisome proliferator-activator receptor- $\alpha$  (*Ppara*)<sup>-/-</sup> mice were kindly provided by F. J. Gonzales (National Institutes of Health, Bethesda) (7). Fasting-induced adipocyte factor (*Fiaf*)<sup>+/-</sup> heterozygotes on a mixed B6:129/Sv background were generated as described below, and *Fiaf*<sup>+/+</sup>, *Fiaf*<sup>+/-</sup>, and *Fiaf*<sup>-/-</sup> littermates, obtained from crosses of *Fiaf*<sup>+/-</sup> heterozygotes were compared. Animals were genotyped by using PCR protocols outlined in *Supporting Materials and Methods*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

Conventionally raised (CONV-R) WT and knockout mice were rederived as germ-free (GF) as described (8). GF animals were maintained in gnotobiotic isolators (8), under a strict 12-h light cycle (lights on at 0600 hours), and fed an autoclaved chow diet (B & K Universal, East Yorkshire, U.K.) ad libitum. All manipulations of mice were performed by using protocols approved by the Wash-

## Microbiote et régulation du stockage de graisses

Les souris axéniques ont une adiposité réduite et requièrent un régime alimentaire accru pour atteindre le même poids que des souris conventionnelles.

Capacité réduite d'extraction d'énergie à partir d'un régime riche en hydrates de carbone (Backhed F et al. 2004. PNAS).

Les souris axéniques sont résistantes à un régime alimentaire de "type occidental", riche en graisses et en sucrose et quasiment sans hydrates de carbone (Backhed F et al. 2007. PNAS)

Le microbiote intestinal apparaît donc capable de moduler directement le métabolisme de l'hôte, en particulier lipidique.

En comparaison des souris conventionnelles, l'intestin grêle de souris axéniques montre une expression plus élevée de "angiopoietine-like protein 4 (ANGPTL4) ou Fasting-induced adipose factor (FIAP) qui induit l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique.

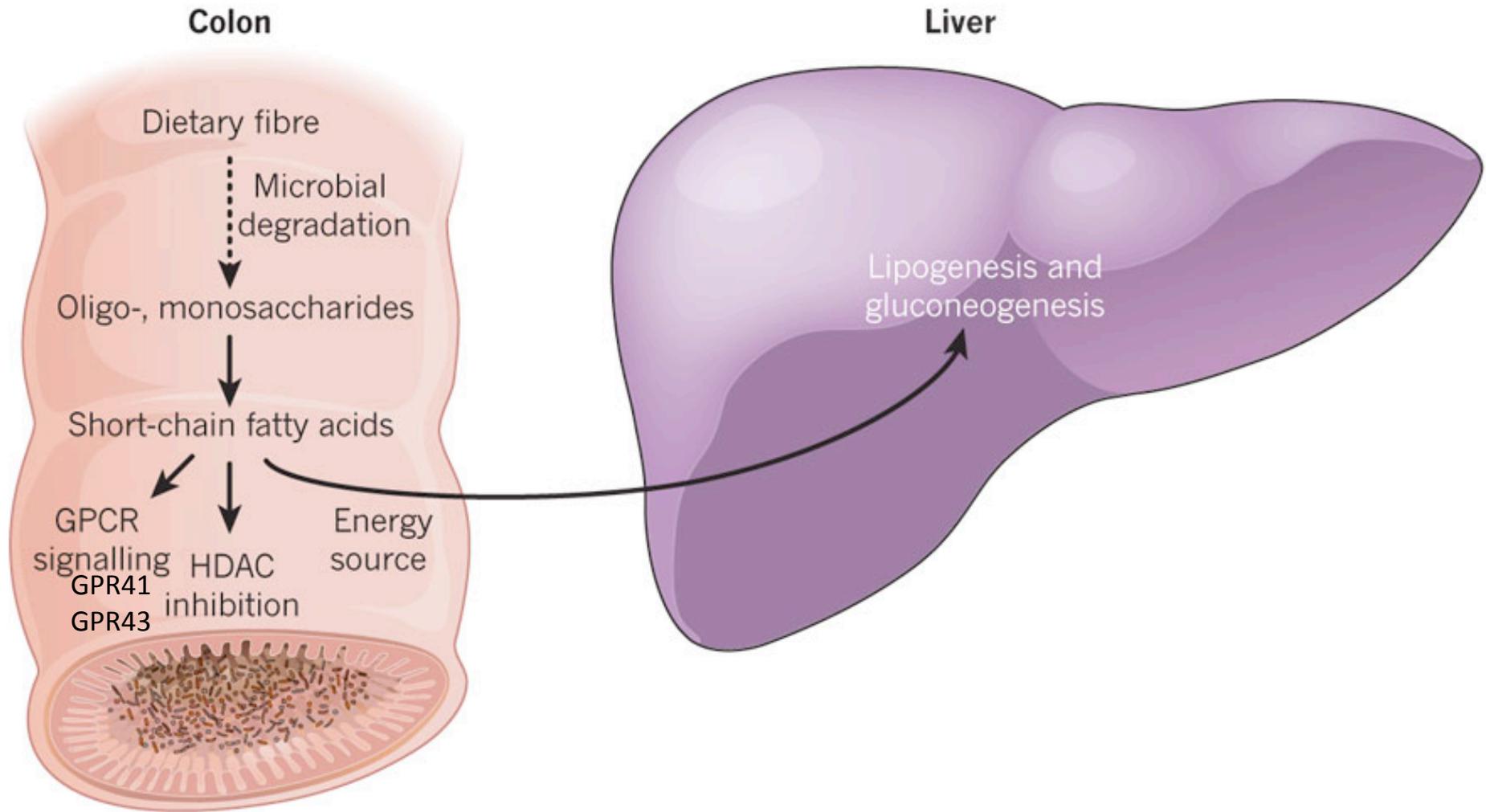
## Acides gras volatils et métabolisme périphérique

Les SCFAs sont un substrat énergétique pour l'épithélium colique (butyrate) **et** les tissus périphériques, surtout le foie (acétate, propionate) (Bergman EN et al. 1990. *Physiol Rev*)

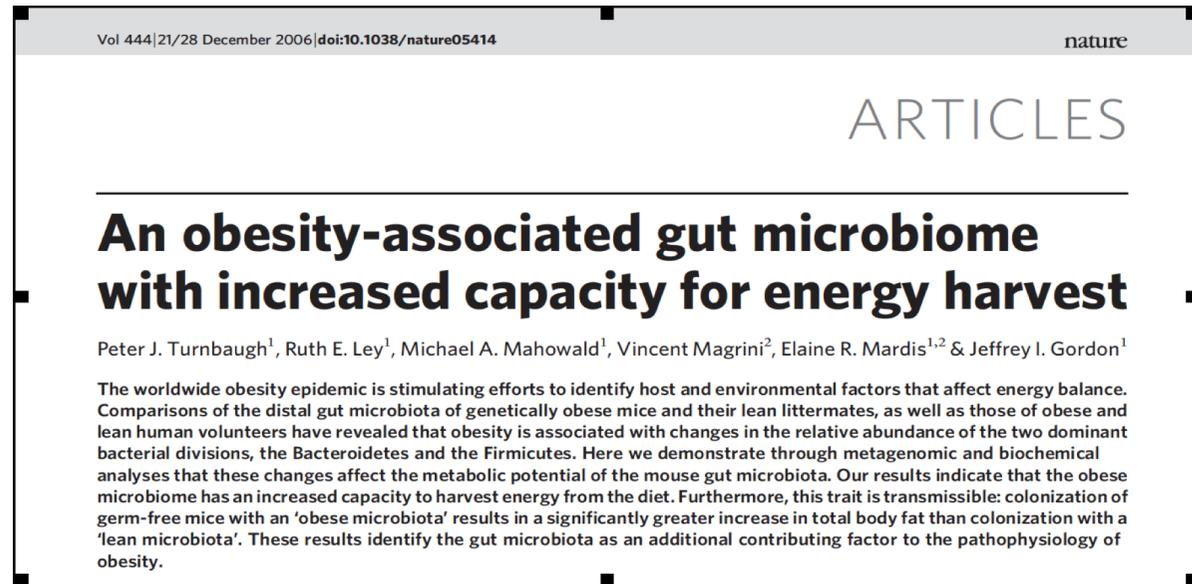
Les profils de fermentation intestinale, les types et quantités de SCFAs produits sont déterminés par la quantité d'hydrates de carbone consommés et la composition du microbiote.

La fermentation des fructanes alimentaires augmente lorsque des souris gnotobiotiques colonisées par *Bacteroides thetaiotamicron* et sont co-colonisées par *Methanobrevibacter smithii*. *B. thetaiotamicron* produit plus d'acétate et de formate et *M. smithii* utilise cet excès de formate pour la méthanogénèse. Cette interaction entraîne un accroissement de la fermentation des hydrates de carbone, un accroissement de l'absorption d'énergie au niveau intestinal qui résulte en une augmentation de l'adiposité ("energy harvesting") (Samuel BS & Gordon JI. 2006. *PNAS*)

# Conséquences métaboliques de la fermentation des polyosides



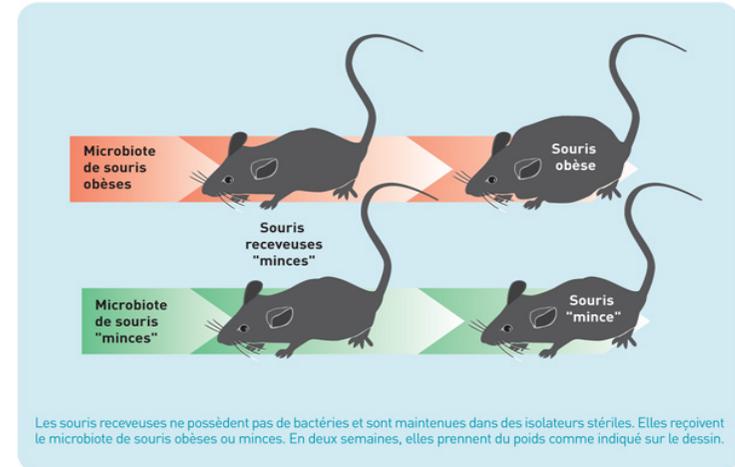
# Microbiote & Obésité



Bien que les généticiens continuent à chercher des traits chez l'hôte pouvant rendre compte de risques de survenue de l'obésité, des données s'accumulent sur un rôle significatif du microbiote.



FIGURE 1 : LE TRANSFERT DU MICROBIOTE DE SOURIS OBÈSES INDUIT UNE OBÉSITÉ CHEZ LES SOURIS "MINCES"



# Microbiote et obésité

Les souris axéniques ont une adiposité réduite en comparaison de souris conventionnelles.

Leur adiposité est restaurée lorsqu'elles sont recolonisées pendant au moins 14 jours par une flore conventionnelle (Caesar R et al. 2012. Gut)

La "collecte" excessive d'énergie par le microbiote au cours de l'obésité a été étudiée/démontrée chez des souris conventionnelles génétiquement obèses ob/ob qui présentent une augmentation de SCFAs dans leur caecum et une diminution de la quantité d'énergie dans leurs selles en comparaison de souris conventionnelles wild type.

L'analyse métagénomique du microbiote caecal a montré un enrichissement en gènes/fonctions en rapport avec la dégradation des polysides alimentaires chez les souris ob/ob.

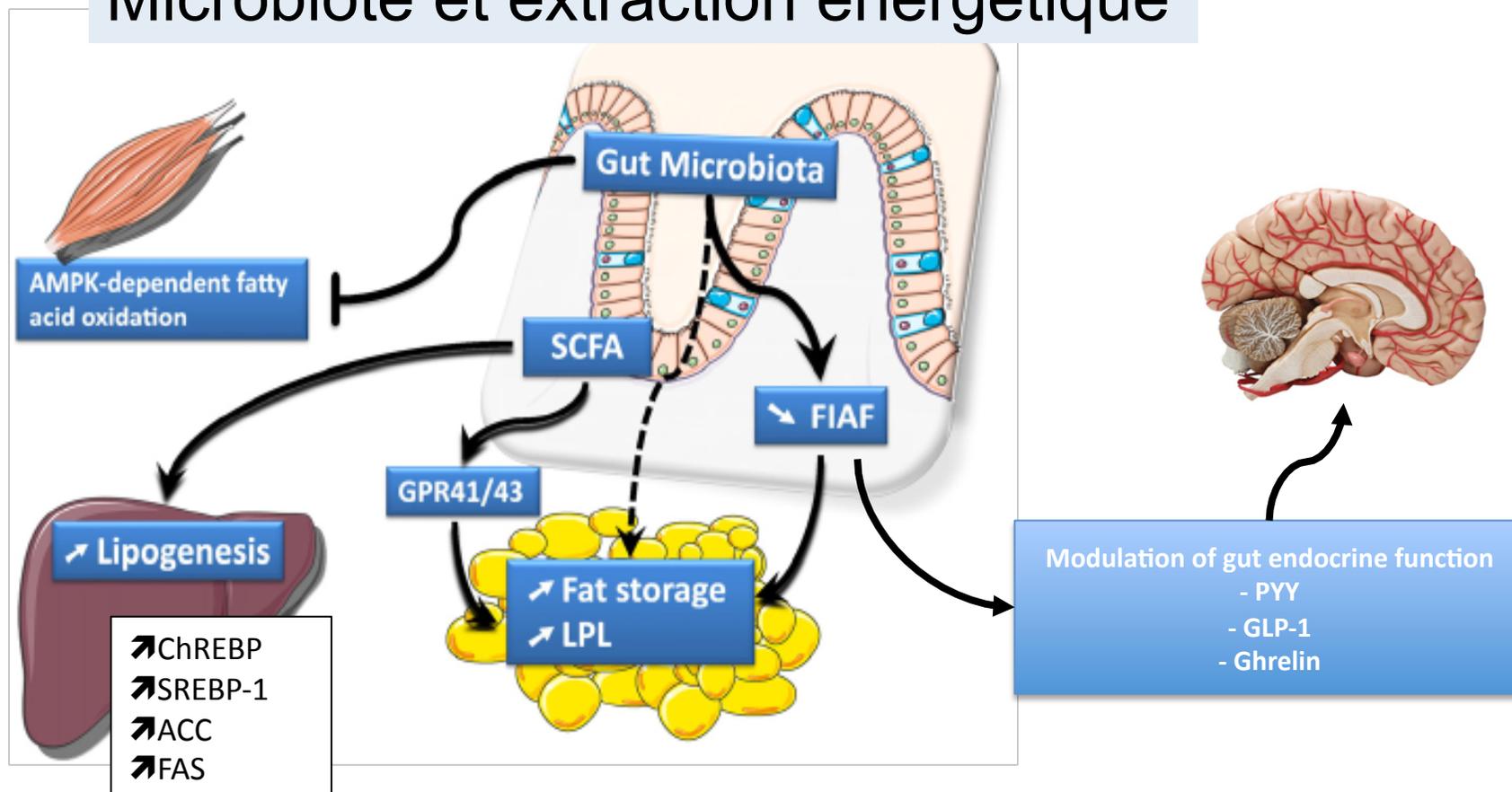
Le phénotype "obèse" a pu être transmis par la transplantation de microbiote. Les souris axéniques transplantées avec le microbiote de donneuses "obèses" gagnent deux fois plus de poids que celles colonisées avec le microbiote de souris minces ("lean") (Turnbaugh et al. 2006. Nature)

Chez l'homme, le microbiote fécal d'individus obèses montre une capacité accrue d'extraire l'énergie (Turnbaugh PJ et al. 2009. Nature)

# Microbiote et obésité

- Observation princeps: souris obèses, etc...
- Les souris Tlr5<sup>-/-</sup> développent un tableau de syndrome métabolique(adiposité, résistance à l'insuline, hypertension, hyperlipidémie) et leur microbiote est altéré par rapport à des animaux wt. Le microbiote de souris Tlr5<sup>-/-</sup>, lorsque transféré à des souris wt axéniques récapitule chez ces animaux les symptômes du syndrome métabolique (Vijay-Kumar M et al. 2010. Science).
- Le microbiote des sujets obèses est significativement différent du microbiote des sujets de poids normal et présente une capacité d'extraction énergétique supérieure (Turnbaugh PJ et al. 2006. Nature)

# Microbiote et extraction énergétique



Les altérations de la composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal dans l'obésité stimulent l'adiposité et influencent les processus métaboliques dans les organes périphériques: contrôle de la satiété dans le cerveau, libération d'hormones intestinales (PYY & GLP1), synthèse, stockage et métabolisme des lipides dans le tissu adipeux, le foie et les muscles.

Adapté de Cani et al. 2011. Pharmacol Therap

# Microbiote, nutrition et métabolisme: des souris ET des hommes ?

Le rôle du microbiote intestinal dans l'extraction d'énergie à partir de l'alimentation et dans l'augmentation de l'adiposité a été clairement démontré chez la souris.

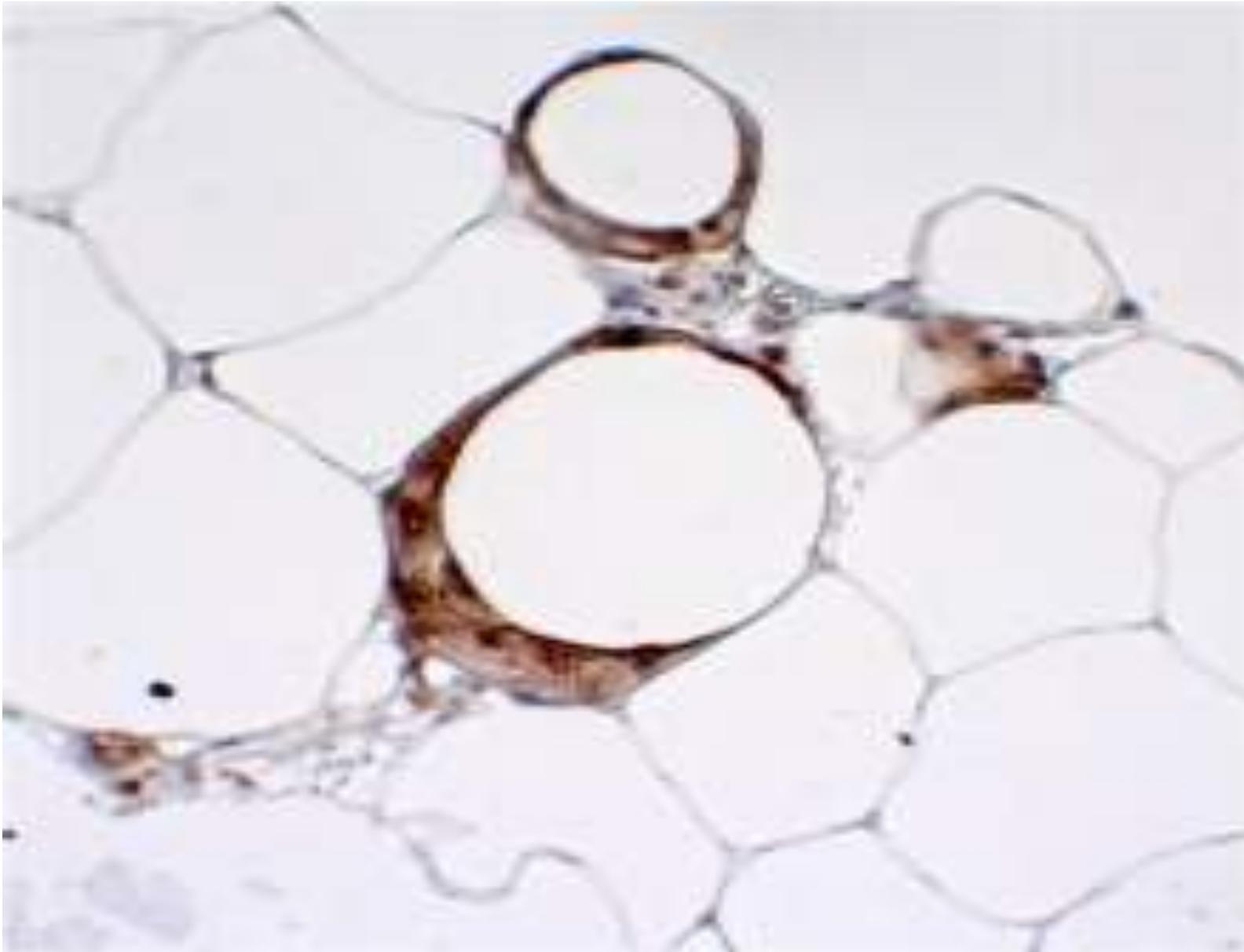
Chez l'homme, les évidences demeurent généralement indirectes et corrélatives. Les individus obèses présentent un niveau supérieur d'éthanol dans leur perspiration par rapport aux individus de poids normal (Nair S et al. 2001. Am J Gastroenterol), reflétant une augmentation des activités de fermentation par le microbiote (Schwartz A et al. 2010. Obesity)

Etudes métagénomiques: différence de composition entre le microbiote des sujets obèses et des sujets de poids normal, mais les résultats demeurent dans l'ensemble relativement conflictuels (Ley RE. 2010. Curr Opin Gastroenterol)

Les individus obèses ont un microbiote altéré avec une nette réduction de la diversité des espèces présentes, sans que la signification précise de cette observation soit comprise (Ley RE et al. 2005. PNAS; Turnbaugh PJ. 2008. Nature; Ley RE et al. 2006. Nature)

Le microbiote intestinal est altéré chez des individus chinois obèses. Sur une cohorte de taille limitée, la composition du microbiote est prédictive de la survenue d'un diabète de type II (Qin J et al. 2012. Nature)

# Obésité, maladie inflammatoire chronique ?



# Syndrome métabolique

## Obésité

## Désordres majeurs de l'homéostasie du glucose

- Augmentation de la glycémie à jeun
- Intolérance au glucose
- Résistance à l'insuline
- Diabète de type 2

## Désordres de l'homéostasie des lipides/dyslipidémies

## Augmentation des risques de maladie cardiovasculaire

- Hypertension artérielle
- Aggravation des lésions d'athérosclérose, anomalies de la fibrinolyse

# Endotoxémie, résistance à l'insuline, obésité, diabète

Le microbiote intestinal est un facteur environnemental qui régule l'adiposité.

L'hypothèse dominante est celle de l'augmentation de l'énergie extraite de l'alimentation.

Le microbiote intestinal entraîne aussi la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 en causant une inflammation de faible niveau (Cani PD et al. 2007. Diabetes)

L'inflammation de faible niveau doit maintenant être incluse dans le syndrome métabolique (Burcelin R et al. 2012. Semin Immunol).

LPS (PGN ?) et translocation bactérienne = deux paramètres clés liant microbiote intestinal, inflammation de faible niveau et syndrome métabolique (Cani PD et al. 2007. Diabetologia; Amar J et al. 2011. EMBO Mol Med)

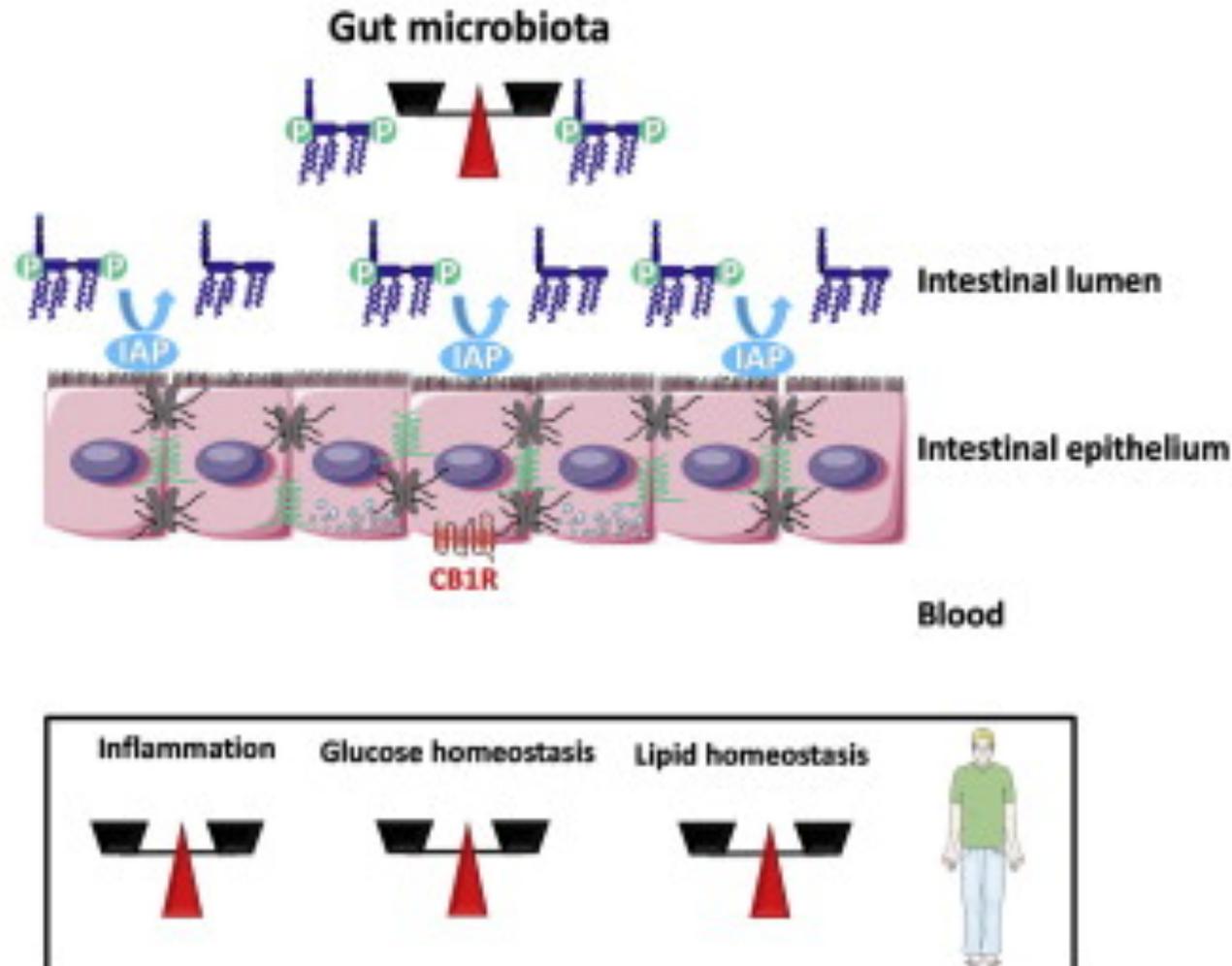
Modèle murin: une alimentation riche en graisse entraîne une augmentation de 2-5 fois de l'endotoxémie métabolique (Cani PD et al. 2007. Diabetes)

## Endotoxémie, résistance à l'insuline, obésité, diabète

Dans une cohorte de 3280 sujets, la concentration sérique d'ADN codant l'ARNr 16S et la concentration d'endotoxine métabolique sont plus élevées chez les individus ayant débuté un diabète de type 2

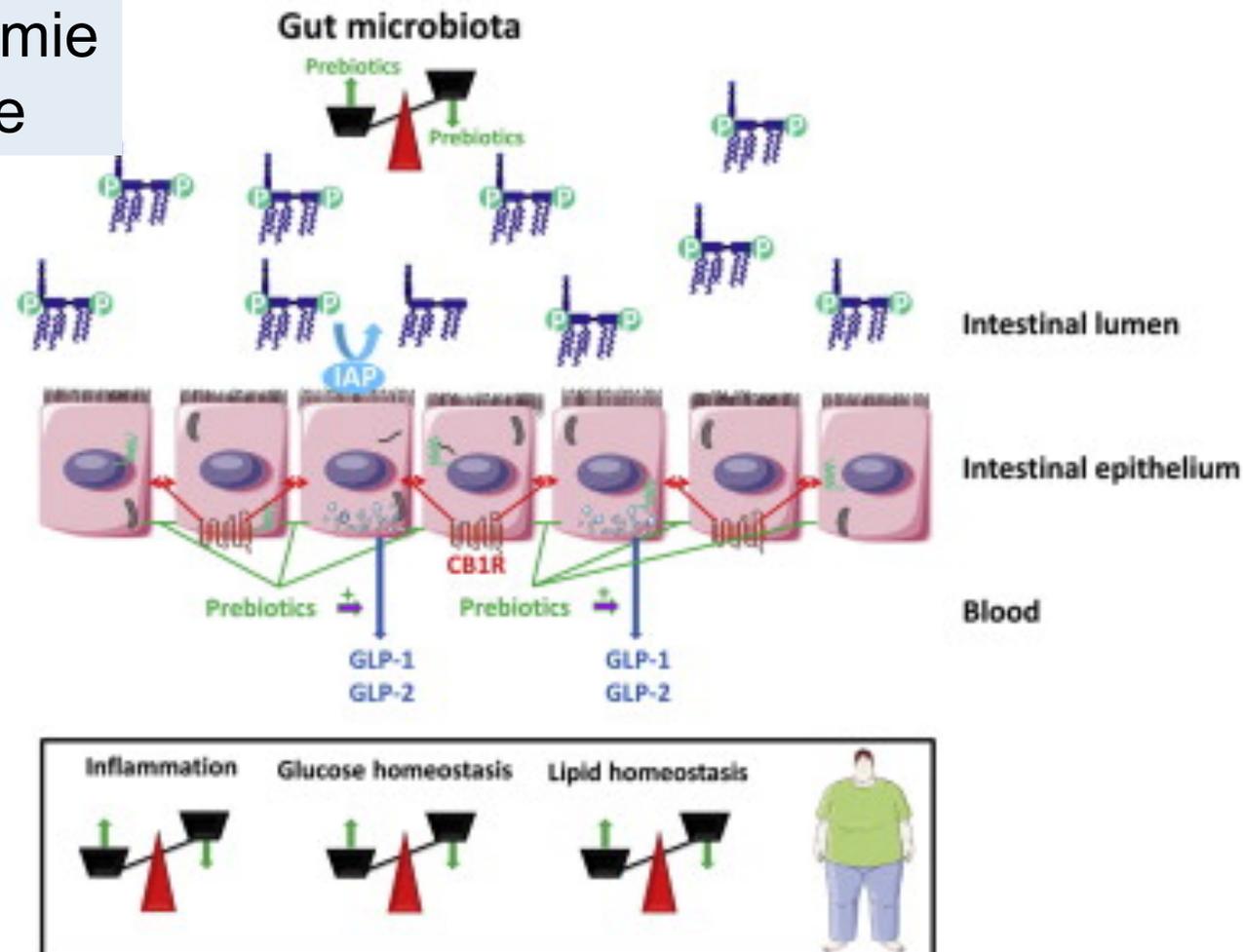
Endotoxine métabolique = biomarqueur d'anticipation de la survenue d'un diabète ?

Corrélation inverse avec la présence d'espèces bactériennes "antiinflammatoires" comme *Faecalibacterium prauznitzii*



Conditions physiologiques, composition/activité du microbiote intestinal stable.  
 Fonction/continence de la barrière épithéliale intestinale maintenue: localisation/organisation appropriées des protéines jonctionnelles (Claudine, Occludine, ZO-1).  
 Système endocannabinoïde normal  
 Détoxification de l'endotoxine (LPS) luminale par la phosphatase alcaline apicale de l'épithélium. Maintien des conditions assurant l'homéostasie du niveau énergétique, du métabolisme des lipides et de l'inflammation.

## Endotoxémie métabolique



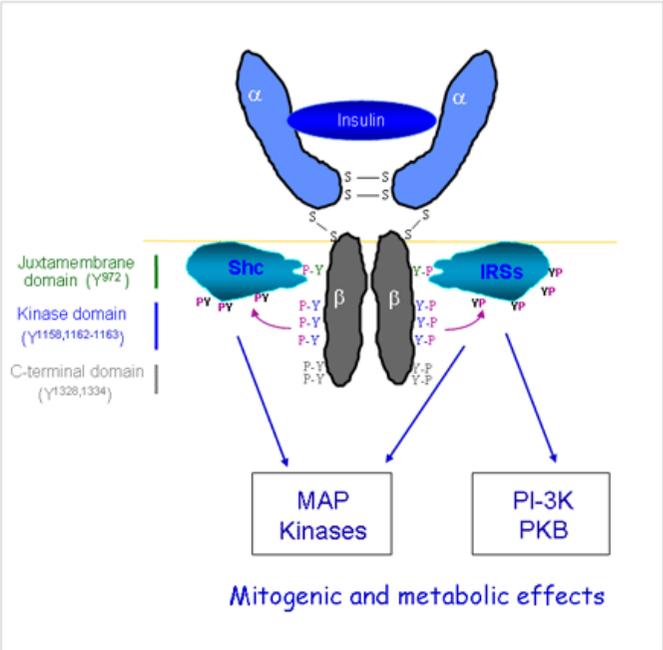
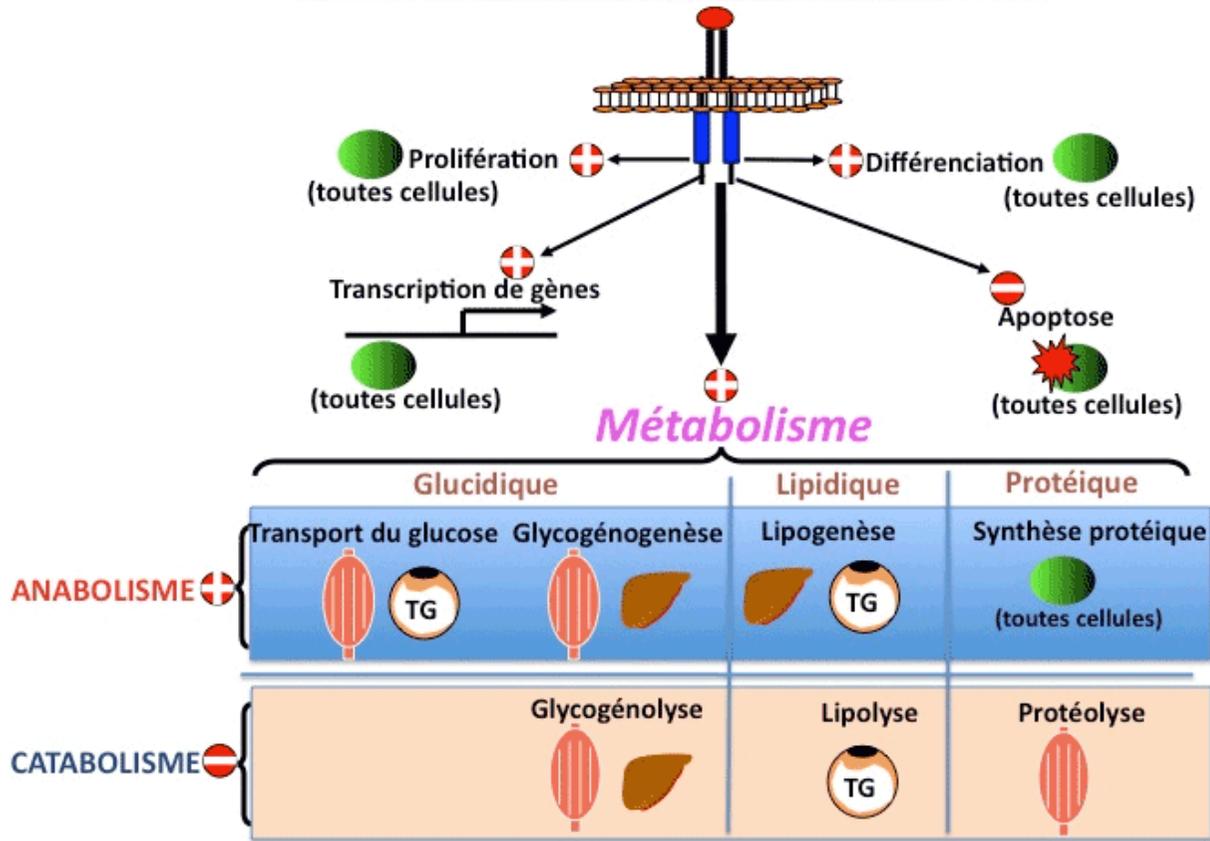
Obésité et diabète de type 2: altérations de la barrière épithéliale intestinale avec rupture de l'équilibre symbiotique entre microbiote intestinal et hôte.

Causes de l'augmentation de la perméabilité intestinale:

Altérations de composition du microbiote et de son activité, altération de l'expression/localisation/assemblage des protéines jonctionnelles entraînant une augmentation de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium suractivation du récepteur CB1, diminution de l'activité phosphatase alcaline avec déficit de détoxification du LPS

# Insuline

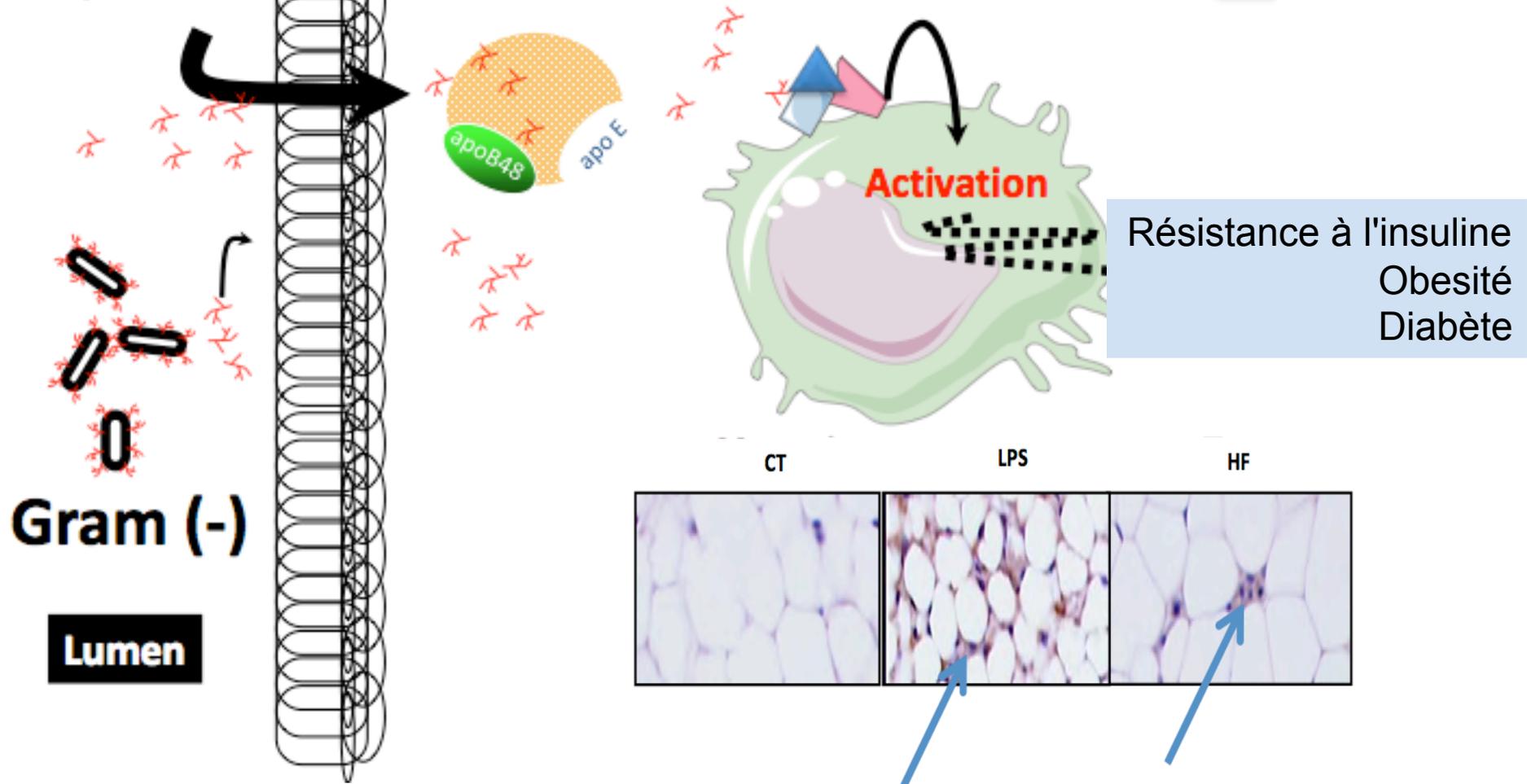
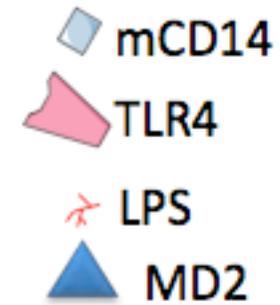
## EFFETS PLEIOTROPIQUES DE L'INSULINE



# Microbiote, barrière épithéliale, inflammation, adiposité

Lipides

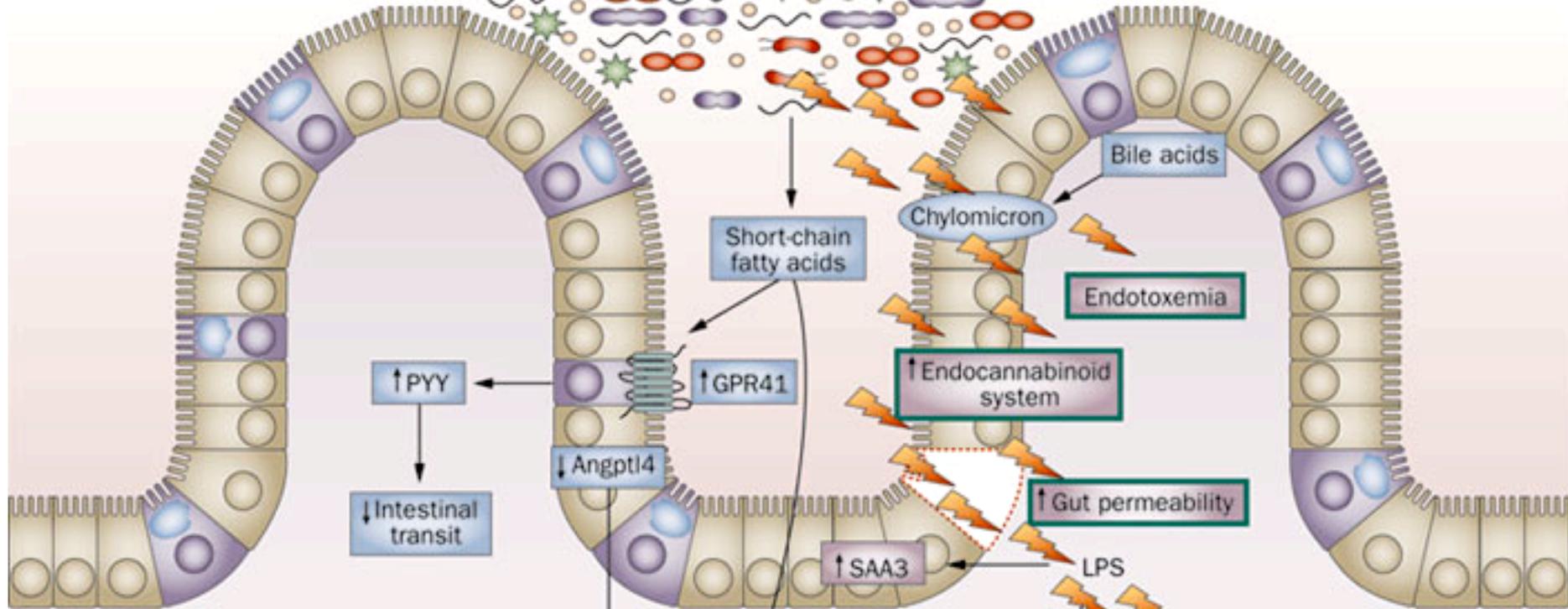
Absorption ?



Adapté de Burcelin R et al.  
Amar et al. 2011.EMBO Mol. Med., 2011

Intestinal lumen

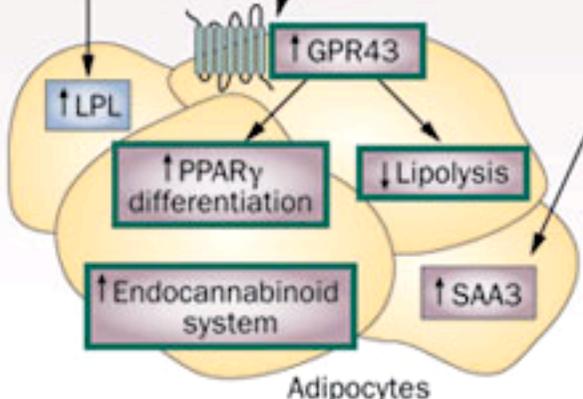
Gut microbes



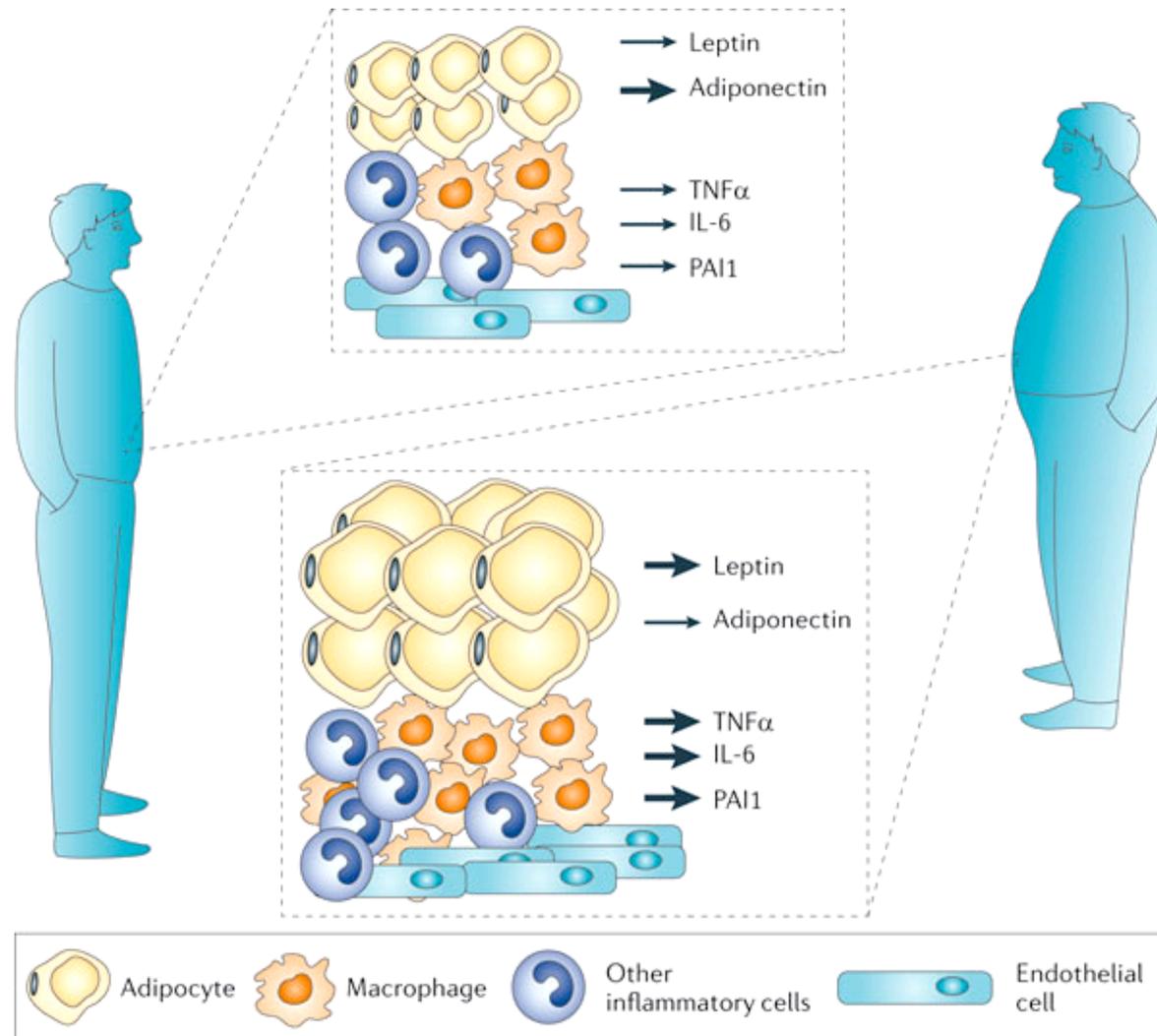
Intestinal epithelium

Adipocytes

- Effects linked to colonization
- Effects linked to high-fat-diet/obesity
- Effects counteracted by prebiotics



# Obésité, maladie inflammatoire chronique ?

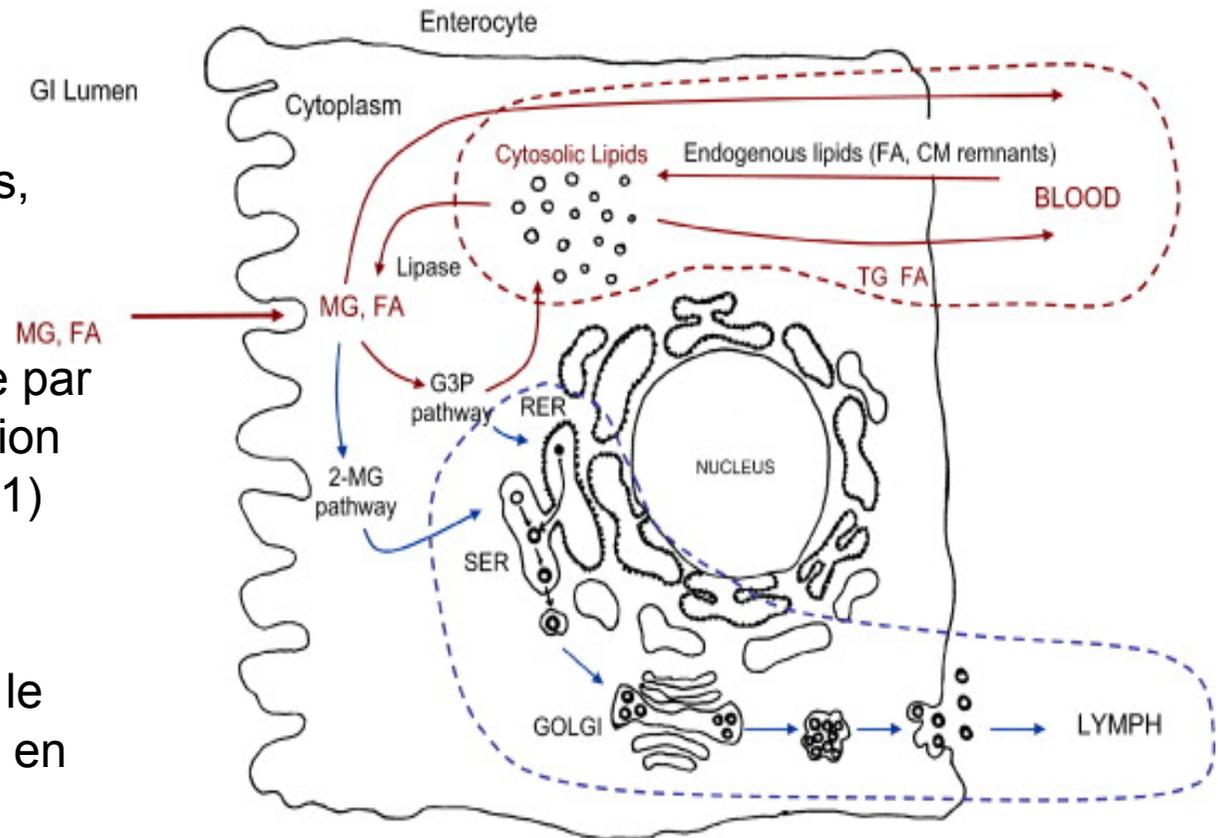


Nature Reviews | **Cancer**

Khandekar MJ et al. 2011. Nat Rev Cancer

# Microbiote et transport transépithélial des lipides: une nouvelle frontière ?

- Emulsification des triglycérides (TG) par les acides biliaires
- Digestion par la lipase pancréatique en acides gras, mono- et di-glycérides
- Capture/endocytose apicale par la bordure en brosse (diffusion passive, CD36/FAT, NCP1L1)
- Transfert polarisé et modification chimique dans le RE et Golgi (réestérification en TG)
- Sécrétion basale sous forme de chylomicrons

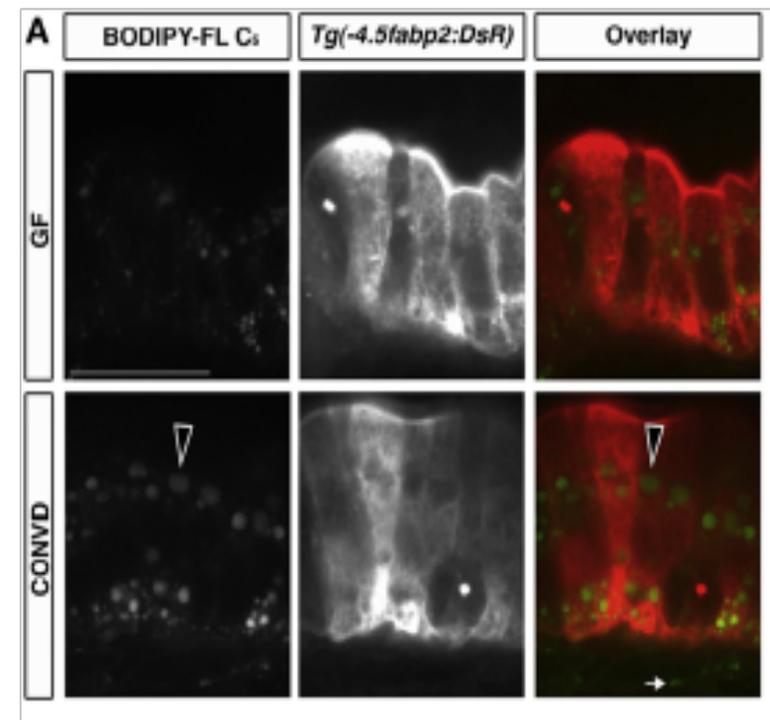


# Microbiota Regulate Intestinal Absorption and Metabolism of Fatty Acids in the Zebrafish

Ivana Semova,<sup>1</sup> Juliana D. Carten,<sup>2</sup> Vesse Stombaugh,<sup>1</sup> Lantz C. Mackey,<sup>1</sup> Rob Knight,<sup>1,4</sup> Steven A. Farber,<sup>3</sup> and John F. Rawls<sup>1,4\*</sup>

Semova I et al. 2012. Cell Host Microbe

- Le microbiote stimule l'accumulation d'acides gras dans l'épithélium intestinal et accroît les gouttelettes lipidiques dans le tissu intestinal et le foie.
- Monoassociation:
  - Les Firmicutes entraînent une augmentation des gouttelettes lipidique et leur transport vers le foie
  - Des populations n'appartenant pas aux Firmicutes entraînent une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques dans les entérocytes



# Faible diversité du microbiome comme biomarqueur d'états pathologiques: obésité

**Faible nombre de gènes/diversité = mauvaise évolution/pronostic**

## **Cohorte de sujets Danois obèses (OB Pederson, Copenhague)**

Faible diversité du microbiote indicatrice de:

- Plus fort gain de poids avec la temps
- Contexte inflammatoire plus marqué et nombre plus élevé de facteurs de comorbidité

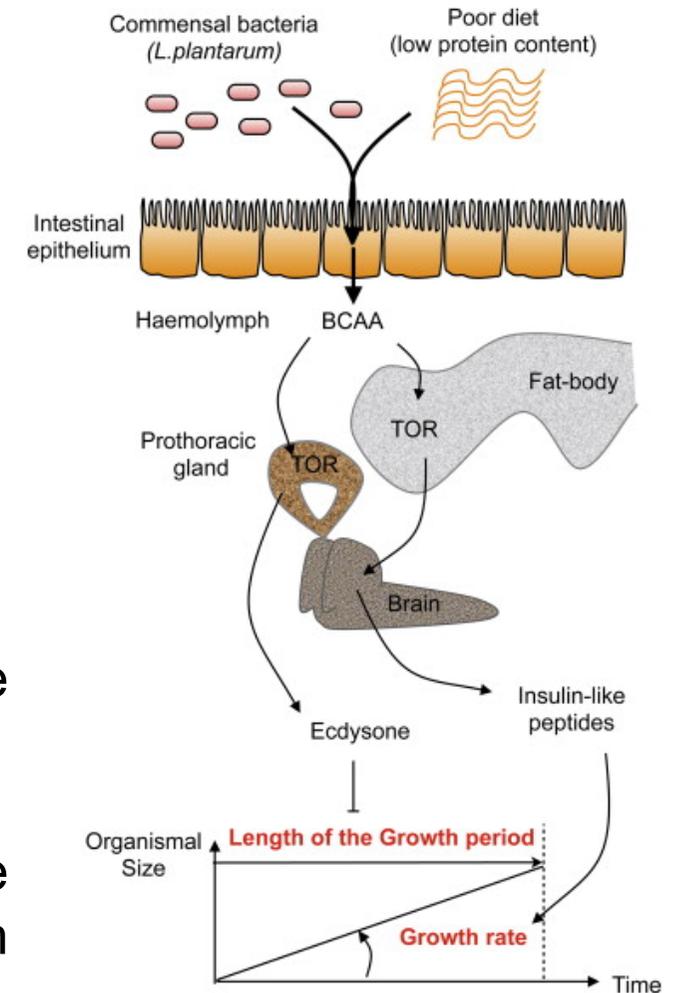
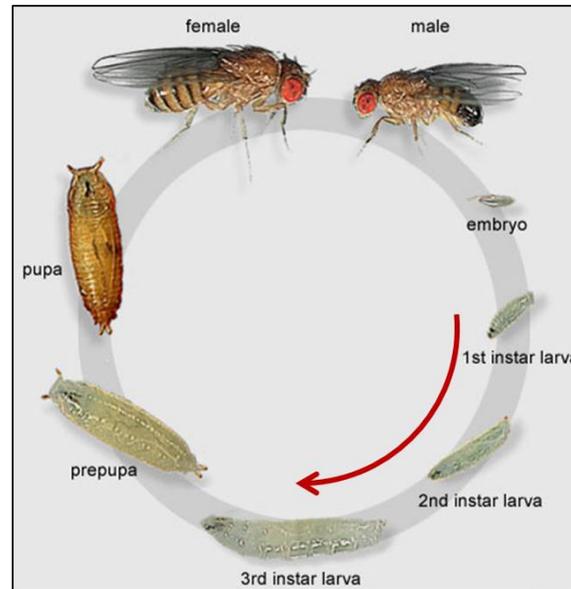
## **Cohorte de sujets Français obèses (K Clément, Paris)**

Faible diversité du microbiote indicatrice de:

- Contexte inflammatoire plus marqué et nombre plus élevé de facteurs de comorbidité
- Plus mauvaise réponse à la restriction calorique en termes de perte de poids, de diminution d'adiposité, d'amélioration du degré d'inflammation et des paramètres biologiques.

*Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing

Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. 2001. *Cell Metab*



Chez *Drosophila melanogaster* le microbiote stimule la croissance larvaire dans des conditions d'apports alimentaires insuffisants, en particulier en protides. *Lactobacillus plantarum* seul agit sur la croissance larvaire via TOR, une voie de signalisation impliquant la perception du niveau nutritionnel. Cette voie contrôle la signalisation hormonale (ectysone) qui stimule la croissance larvaire.