



La relation hôte-microbiote dans le développement du diabète de type 2 : du mutualisme au parasitisme métabolique

Chantal Chabo

► To cite this version:

Chantal Chabo. La relation hôte-microbiote dans le développement du diabète de type 2 : du mutualisme au parasitisme métabolique . Endocrinologie et métabolisme. Université Paul Sabatier - Toulouse (France), 2012. Français. NNT: . tel-01215192

HAL Id: tel-01215192

<https://hal.science/tel-01215192>

Submitted on 13 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Biotechnologies, Pharmacologie*

Présentée et soutenue par *Chantal VERGELY CHABO*
Le 23 novembre 2012

Titre :

*La relation hôte-microbiote dans le développement du diabète de type 2 :
du mutualisme au parasitisme métabolique*

JURY

*Pr Gérard CAMPISTRON (Président du jury)
Dr Catherine POSTIC (Rapporteur)
Dr Muriel THOMAS (Rapporteur)
Pr Rémy BURCELIN (Examineur)
Dr Philippe LANGELLA (Examineur)
Pr Vassilia Theodorou (Examineur)*

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)*
Unité de recherche : *INSERM U1048 Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires*
Directeur(s) de Thèse : *Pr Rémy BURCELIN*
Rapporteurs : *Dr Catherine POSTIC, Dr Muriel THOMAS*

“Life is inherently infective and invasive”
(*Frantisek Baluska; Université de Bonn, Allemagne*)

ABREVIATIONS

A20 : TNF-alpha-induced protein 3

ADN : acide déoxyribonucléique

AGE : advanced glycation end-products

Akt : protein kinase B

Ang4 : angiogénine 4

ANGPTL4 : angiopoietin-like 4

APRIL : proliferation-inducing ligand

ARN : acide ribonucléique

ARNr 16S : acide ribonucléique ribosomique 16 Svedberg

AS160 : Akt substrate 160

ATP : adénosine triphosphate

BAFF : B-cell activating factor

CD14 : cluster de différenciation 14

cGMP : cyclic guanosine monophosphate

CO₂ : dioxyde de carbone

CRP : C-reactive protein

CXCL2 : C-X-C motif ligand 2

DAP : acide meso-diaminopimélique (agoniste de NOD1)

FIAF : fast induced adipocyte factor

FISH : fluorescent in situ hybridization

FITC : fluorescein isothiocyanate

Foxp3 : forkhead box p3

Galnt : UDP-N-acétyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases

Gcnt1 : beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotéine beta-1,6-N-acétylglucosaminyltransférase 1

GIP : gastric inhibitory peptide

GLP-1 : glucagon-like peptide-1

GLP-2 : glucagon-like peptide-2

Glut-4 : glucose transporter-4

GSK3 : glycogène synthase kinase GSK 3

H₂ : hydrogène

H₂S : sulfure d'hydrogène

HDL : high density lipoprotein

HSP : heat shock protein

IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN- γ : interferon gamma

IKK : I κ B kinase

IL-1 β : interleukin 1 beta

IL-1R : interleukin 1 receptor

IL-1RA : IL-1 receptor antagonist

IL-6 : interleukin-6

IL-10 : interleukin-10

IL-22 : interleukin-22

iNOS : inducible nitric oxide synthase (NOS2)

IRAK3 : interleukin-1 receptor-associated kinase 3

IRAK-M : interleukin-1 receptor-associated kinase-M

IRS-1 : insulin receptor substrate 1

Jnk : c-Jun N-terminal kinase

KC-1 : keratinocytes chemoattractant-1 (IL-8 chez l'homme)

LDL : low density lipoprotein

MAMP : microbe-associated molecular pattern

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MAT : mesenteric adipose tissue

MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)

MD2 : myeloid differentiation protein-2 ou lymphocyte antigen 96 (Ly-96)

MDP : muramyl dipeptide

MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

MLN : mesenteric lymph node

MONICA : Multinational MONItoring of Trends and Determinants in CArdiovascular Disease

Muc2 : mucine 2

MyD88 : myeloid differentiation primary response gene (88)

NF- κ B : nuclear factor kappa B

NHS-Biotine : Biotin 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt

NLR : nucleotide oligomerization domain-like receptor

NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3

NO : oxyde nitrique

N₂O : oxide nitreux

NOD1 : nucleotide-binding oligomerization domain protein 1

NOD2 : nucleotide-binding oligomerization domain protein 2

NOR : nitric oxide reductase

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate

PKC : protein kinase C

pNF- κ B : forme active de NF- κ B, phosphorylée en sérine536

PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor-alpha

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma

PRR : pathogen recognition receptor

PSA : polysaccharide A

RAGE : receptor for advanced glycation end-products

RIP2 : receptor interacting protein 2

RLR : retinoic acid-inducible gene 1-like receptor

SAA : serum amyloid A protein

SCFA : short-chain fatty acids (acides gras à chaînes courtes)

SFB : segmented filamentous bacteria

sIgA : immunoglobuline A sécrétoire

SIGIRR : single immunoglobulin interleukin 1-related receptor

SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3

SRB : sulfate-reducing bacteria

St3Gal1 : beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransférase 1

St6GalNac2 : (alpha-N-acétyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acétylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransférase 2

STAT5 : signal transducteur et activateur de la transcription 5

TFF3 : peptide trifolié 3

TGF- β : transforming growth factor-beta

TH2 : lymphocyte T helper 2

TH17 : lymphocyte T helper 17

TICAM1 : Toll-like receptor adaptor molecule 1

TLR2 : Toll-like receptor 2 (agoniste : acide lipo-teichoïque)

TLR4 : Toll-like receptor 4 (agoniste : lipide A)

TLR5 : Toll-like receptor 5 (agoniste : flagelline)

TLR9 : Toll-like receptor 9 (agoniste : ADN CpG non méthylé)

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TOLLIP : Toll-interacting protein

TSLP : thymic stromal lymphopoietin

Treg : lymphocytes T régulateurs

VASP : vasodilator-induced phosphoprotein

TABLE DES MATIERES

	Résumé.....	1
	Avant-propos.....	3
CHAPITRE 1	Recherche bibliographique.....	5
	A l'origine étaient les procaryotes.....	6
	<i>L'origine de la vie : une coévolution de la biochimie et de la géochimie.....</i>	<i>6</i>
	<i>L'alternance prédation/ symbiose comme dynamique de l'évolution.....</i>	<i>7</i>
	<i>Les grandes divisions du monde du vivant.....</i>	<i>10</i>
	Les interactions entre microbes et eucaryotes.....	12
	<i>La coévolution microbes-eucaryotes, « pour le meilleur et pour le pire ? ».....</i>	<i>12</i>
	<i>La microflore normale du corps humain.....</i>	<i>16</i>
	<i>Homéostasie de la relation hôte-microbiote au niveau de la muqueuse intestinale.....</i>	<i>27</i>
	<i>Perte de l'homéostasie hôte-microbiote intestinal et conséquences.....</i>	<i>38</i>
	<i>La translocation bactérienne : où se situe vraiment l'interface hôte-microbiote ?.....</i>	<i>42</i>
	<i>Potentiel thérapeutique de la manipulation du microbiote intestinal.....</i>	<i>45</i>
	Le diabète de type 2.....	48
	<i>Les coûts du diabète.....</i>	<i>49</i>
	<i>Le diabète de type 2 est une maladie inflammatoire.....</i>	<i>50</i>
	<i>Microbiote intestinal et diabète de type 2.....</i>	<i>56</i>
	<i>Potentiel thérapeutique de la manipulation du microbiote dans le diabète de type 2.....</i>	<i>59</i>
	Objectifs de la thèse.....	63
CHAPITRE 2	Adhérence et translocation bactériennes au cours du diabète.....	65
CHAPITRE 3	Microbiote tissulaire et intestinal au cours du diabète.....	99
CHAPITRE 4	Relation hôte-microbiote intestinal avant le diabète.....	163
CHAPITRE 5	Conclusion générale.....	213
	Annexe.....	219
	Bibliographie.....	224
	Remerciements.....	259
	Publications.....	260
	Abstract.....	261

RESUME

Le diabète de type 2 est associé à une inflammation chronique de bas niveau et nous avons pensé que la présence de bactéries pouvait alimenter cette inflammation. Après la découverte d'une infection physiologique, nous avons révélé une augmentation de la translocation de bactéries commensales dans le tissu adipeux et le sang, avant l'apparition d'un diabète induit par un régime gras chez la souris. Cette translocation bactérienne était prévenue chez des souris déficientes pour NOD1 ou CD14, mais au contraire augmentée chez les souris ob/ob ou déficientes pour MyD88. De plus, un traitement probiotique avec *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, ou *Lactococcus lactis* délivrant de la leptine active ont prévenu l'infection métabolique, l'inflammation et le diabète. Nous avons ensuite confirmé chez l'homme l'existence d'une bactériémie physiologique. L'ADN bactérien sanguin a été de plus identifié comme marqueur positif du diabète. L'étude du microbiote sanguin humain a montré une diminution des bactéries à Gram positif et une augmentation de celles à Gram négatif, ainsi qu'une présence accrue d'ADN codant pour des réductases du NO, chez les patients diabétiques. Ces résultats ont été confirmés chez la souris. De plus, le mucus était modifié dans l'iléon avant l'apparition du diabète, avec une baisse de l'expression des défensines, une perte de l'inflammation physiologique des entérocytes et une augmentation de la perméabilité transcellulaire. Un comportement parasite de la part de bactéries normalement commensales a été ainsi mis en lumière avant le développement du diabète chez la souris.

AVANT-PROPOS

A l'échelle des temps géologiques, le pouvoir structurant des flux d'énergie est à l'origine de l'augmentation progressive de la complexité biologique. Les flux d'énergie à travers les structures biologiques leur permettent de se reproduire, c'est-à-dire dupliquer leur ADN. L'information génétique stockée dans l'ADN s'ajoute ainsi à chaque génération à l'information accumulée au cours des générations précédentes via le filtre de la sélection naturelle. A l'échelle d'une vie humaine, les dysfonctionnements et la disparition des flux d'énergie sont à l'origine, respectivement, des maladies métaboliques complexes comme le diabète et plus généralement du vieillissement et de la fin de vie. Le flux d'énergie à travers notre organisme est assuré par les mitochondries, qui ont leur propre ADN, et produisent l'essentiel de l'énergie des cellules eucaryotes (à noyau vrai) sous forme d'ATP. Les mitochondries captent les calories issues de l'environnement pour les convertir en énergie utilisable par nos cellules et tissus, via la phosphorylation oxydative. Le catabolisme, ayant pour objet la destruction permanente de molécules, fournit l'énergie nécessaire pour l'anabolisme ou construction de nouvelles molécules. Les mitochondries sont des bactéries symbiotiques. Nos cellules en contiennent 10^{17} , alors que notre intestin héberge 10^{14} cellules bactériennes. L'origine procaryote (sans noyau) de la mitochondrie, met en lumière l'universalité des phénomènes de symbiose (association à bénéfice mutuel) impliquant les procaryotes, qui sont à l'origine même des cellules eucaryotes. Les premières formes de vie sur Terre étaient procaryotes. Les nouvelles contraintes énergétiques imposées aux êtres vivants par une oxygénation croissante de l'environnement terrestre il y a 2,4 milliards d'années, ont conduit à des processus successifs d'endosymbiose entre procaryotes, permettant l'adaptation des premières formes de vie à la respiration de l'oxygène et à l'avènement du métabolisme oxydatif grâce à la mise en place de la mitochondrie. Les bases énergétiques étaient ainsi posées pour une complexification croissante des organismes. Les associations symbiotiques entre procaryotes et eucaryotes au sein d'un organe dédié, l'intestin, ont ensuite permis l'explosion de la diversité des herbivores, grâce à l'adaptation à de nouvelles niches nutritionnelles. L'homme, en tant qu'hybride primate-procaryote, a co-évolué avec ses symbiotes procaryotes. L'intégration évolutive de cette dimension de méta-organisme s'avère aujourd'hui nécessaire pour mieux comprendre l'origine des pathologies humaines modernes comme les maladies métaboliques. L'innovation pharmacologique dans le domaine des maladies métaboliques pourrait ainsi résider dans le rétablissement de relations symbiotiques bénéfiques entre l'homme et son microbiote. La médecine préventive doit en fait se focaliser de manière générale sur le maintien de l'homéostasie des relations établies ancestralement entre l'homme et

son microbiote. Les thérapies futures devraient ainsi être individualisées pour restaurer des interactions entre un hôte particulier et son microbiote qui soient optimales pour sa santé[14].

Recherche bibliographique

A l'origine étaient les procaryotes

L'origine de la vie : une coévolution de la biochimie et de la géochimie

L'âge de notre planète est estimé entre 4,5 et 4,6 milliards d'années. Cependant, pendant les cent premiers millions d'années, les conditions sur Terre étaient beaucoup trop drastiques pour accueillir la moindre forme de vie. La première preuve directe d'une vie cellulaire prend la forme de microfossiles unicellulaires de 1 à 2 micromètres, dépourvus d'appendices externes ou de structure interne, ressemblant à certaines bactéries actuelles, comme notamment les cyanobactéries (autrefois appelées algues bleu-vert). Les bactéries sont des organismes procaryotes, du grec signifiant « avant le noyau », car dépourvues de noyau, organite sphérique caractéristique des cellules eucaryotes (à « vrai noyau »)[16]. Les plus anciens fossiles procaryotes ont été retrouvés à l'intérieur d'anciens stromatolithes, roches stratifiées se construisant par incorporation de sédiments minéraux dans des tapis microbiens, et ont été datés d'environ 3,5 milliards d'années[17].

Les premières cellules procaryotes devaient tirer leur énergie d'un environnement hostile (très peu d'oxygène, température et pression élevées). Ces bactéries primitives font partie du domaine des *Archaea* (anciennement *Archaebacteria*). Les premières archées à avoir été étudiées sont les archées méthanogènes, qui produisent du méthane à partir de dioxyde de carbone et d'hydrogène. Ce sont des bactéries anaérobies, pour lesquelles l'oxygène est toxique. Mais la grande majorité des procaryotes actuels font partie du domaine *Bacteria* (anciennement *Eubacteria* : bactéries vraies). Les bactéries ont une paroi épaisse contenant du peptidoglycane, alors que les archées en sont dépourvues. A l'image des plantes et des algues, certains membres du domaine *Bacteria* sont photosynthétiques. Ils transforment l'énergie solaire en énergie chimique et produisent de l'oxygène. Parmi les bactéries photosynthétiques, les cyanobactéries ont joué un rôle décisif dans l'augmentation de la teneur en oxygène atmosphérique de moins de 1% à 21% actuellement[16]. Cette élévation du taux d'oxygène, appelée la Grande Oxydation, a débuté il y a 2,4 milliards d'années et est à l'origine de l'expansion des formes actuelles de vie sur Terre [18]. La naissance des eucaryotes, l'explosion de la diversité animale au Cambrien et l'augmentation de la taille des organismes sont ainsi corrélées avec l'élévation de la teneur en oxygène[19-21].

L'alternance prédation/symbiose comme dynamique de l'évolution

La transition eucaryotique, en raison de l'augmentation de la taille et de la complexité des génomes, a nécessité un apport toujours croissant d'énergie[22]. Ainsi, l'émergence des eucaryotes a été possible par la mise en place d'un organite capable de produire efficacement de l'énergie : la mitochondrie[23]. Selon la théorie de l'endosymbiose (association à bénéfice mutuel entre deux entités dont l'une est à l'intérieur de l'autre), les mitochondries possèdent une origine monophylétique (à ancêtre unique). Une cellule eucaryote primitive (ou une archée) aurait intégré un endosymbiote procaryote il y a 1,5 à 2 milliards d'années, lorsque l'atmosphère primitive s'est enrichie en oxygène[24, 25]. La théorie endosymbiotique de l'origine des mitochondries, a été développée et argumentée par Lynn Margulis dès 1966[26], puis ensuite validée par des études phylogénétiques. Ces dernières indiquent que cet endosymbiote est apparenté aux α -protéobactéries, le plus proche parent de la mitochondrie connu actuellement étant *Rickettsia prowazekii*, un parasite intracellulaire obligatoire[24]. L'hypothèse selon laquelle la mitochondrie aurait été acquise par phagocytose, implique qu'un cytosquelette d'actine ait été déjà en place dans l'hôte proto-eucaryote[27]. La découverte de la présence d'un cytosquelette d'actine fonctionnel chez certaines archées actuelles rend plausible l'origine phagocytaire de la cellule eucaryote[28]. Néanmoins, l'observation de procaryotes vivant à l'intérieur d'autres procaryotes chez certains insectes notamment, démontre que la phagocytose n'est pas forcément un pré-requis[29]. Dans un article intitulé « Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes », Yaacov Davidov et ses collègues suggèrent qu'un comportement de prédation/parasitisme de la part de la petite α -protéobactérie aérobie vis-à-vis de la grande cellule archéenne anaérobie aurait présidé à l'eucaryogenèse (**Figure 1**)[8].

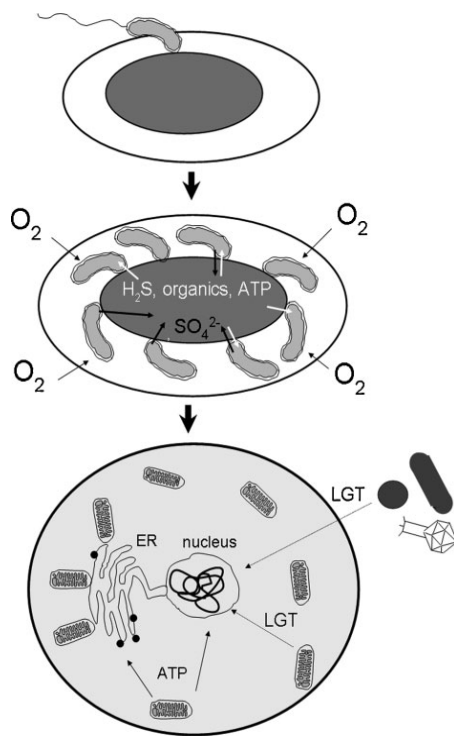


Figure 1 : Un comportement de prédation/parasitisme à l'origine des eucaryotes[8]

Haut : Un petit prédateur/parasite bactérien aérobic facultatif (α -protéobactérie) pénètre dans le périplasme d'un hôte archéen anaérobic.

Milieu : Le prédateur/parasite initial modifie son comportement pour finalement ne pas consommer sa proie, mais développe plutôt une interaction mutualiste qui lui permet de se développer à l'intérieur de son hôte. Ce mutualisme a pu se baser sur la détoxification de l'oxygène et le recyclage de composés soufrés, permettant à l'hôte de survivre dans un environnement de plus en plus riche en oxygène. En retour, l'hôte fournit au symbiote un abri, ainsi que des molécules organiques essentielles et des composés soufrés sous forme réduite.

Bas : La membrane cytoplasmique de l'hôte se transforme ensuite en membranes internes, y compris la membrane nucléaire, alors que la membrane externe devient la membrane cytoplasmique de la cellule. Parallèlement, le métabolisme de l'hôte (y compris au niveau des membranes) est totalement pris en charge par les fonctions de l'endosymbiote. L'ATP produit par ces proto-mitochondries a pu alors alimenter un accroissement de la taille et de la complexité de la cellule et de son génome. Le transfert latéral de gènes (LGT) depuis la mitochondrie mais aussi depuis d'autres bactéries et virus (flèches) a contribué à l'élaboration d'un répertoire génétique nucléaire toujours plus complexe.

Au-delà des origines de la mitochondrie, c'est l'ensemble du processus d'évolution biologique qui pourrait reposer sur l'alternance prédation/symbiose. La théorie darwinienne de l'évolution, basée sur le principe de la mutation aléatoire suivie de la sélection naturelle des organismes les mieux adaptés à leur environnement, ne suffit pas en effet à expliquer une évolution biologique vers toujours plus de complexité[8, 30, 31]. Selon Frantisek Baluska[30] c'est la combinaison de la théorie classique de Charles Darwin avec l'interaction dynamique de deux principes simples, "le principe de cruauté" (infection/prédation) et "le principe d'amour" (symbiose/coopération), qui permet d'expliquer une évolution cellulaire vers toujours plus de complexité. C'est la succession de processus endosymbiotiques distincts qui est en fait proposée comme force motrice de l'eucaryogenèse et de l'évolution vers la multicellularité[8], avec une transition entre parasitisme et mutualisme sous-tendue par des mécanismes de tolérance de la part de l'hôte, qui trouve finalement plus d'avantages que d'inconvénients dans le maintien de l'association[32].

Selon Lynn Margulis[4], c'est dans l'origine de la cellule bactérienne que se situe l'origine même de la vie, tandis que la théorie de l'endosymbiose en série décrit ensuite l'origine de la cellule nucléée par symbiogenèse (**Figure 2**).

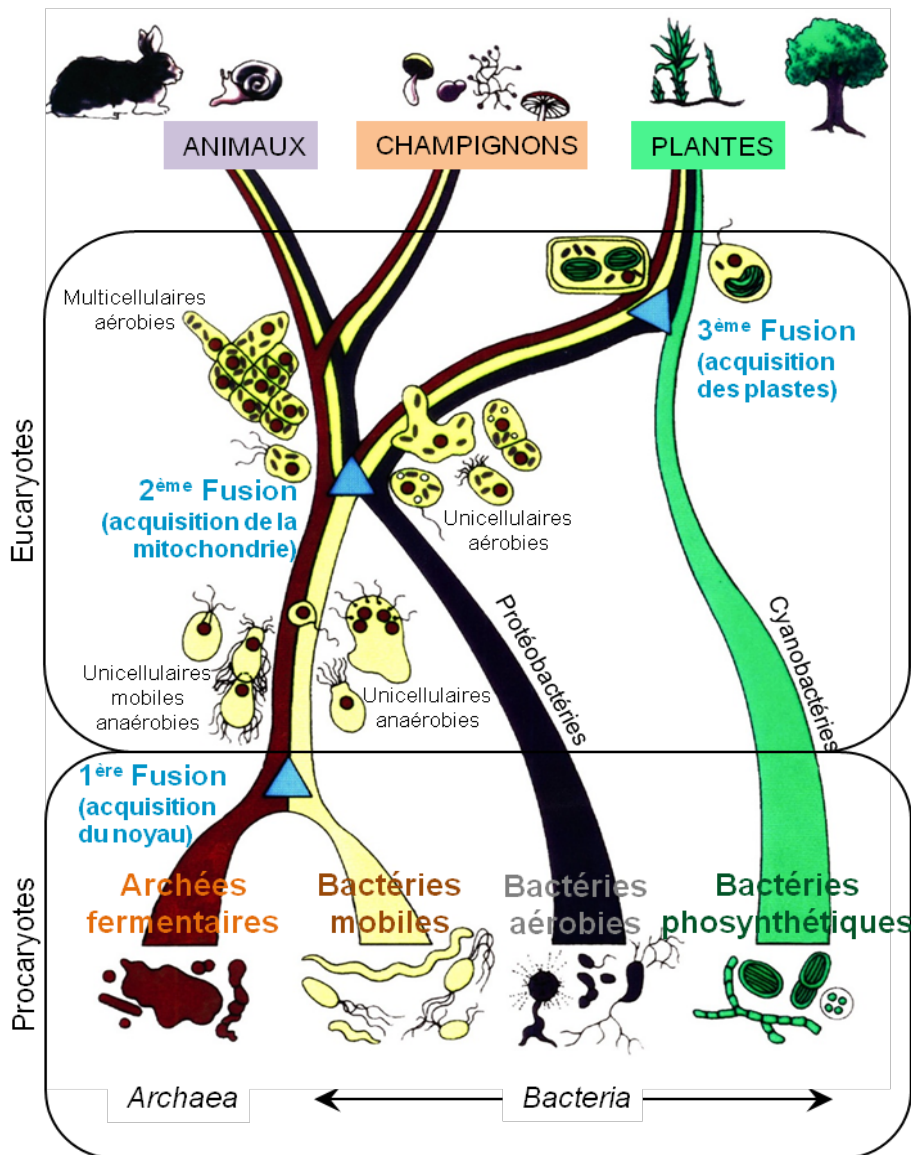


Figure 2 : La théorie de l'endosymbiose en série (traduit d'après[4])

- (1) Des bactéries mobiles ont fusionné avec des archées sulfureuses pour former les premières cellules nucléées qui étaient dépourvues de mitochondrie.
- (2) La seconde fusion avec des bactéries aérobies a produit les ancêtres des eucaryotes hétérotrophes.
- (3) L'ingestion de cyanobactéries finalement non digérées a conduit ensuite à la formation des algues puis des végétaux supérieurs lors de la troisième fusion. Tous les eucaryotes sont issus de fusions symbiotiques, tandis que les procaryotes n'ont pratiquement pas évolué.

Les grandes divisions du monde du vivant

En 1977, Carl R. Woese et ses collègues utilisèrent les séquences nucléotidiques des ARN de la petite sous-unité ribosomique pour déterminer que tous les organismes vivants appartiennent à l'un des trois domaines suivants : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya*[12]. L'arbre phylogénétique universel, tel que proposé par Norman Pace sur la base des travaux de Carl R. Woese[8], présente une racine, ou origine de la vie moderne, sur la branche bactérienne (**Figure 3**).

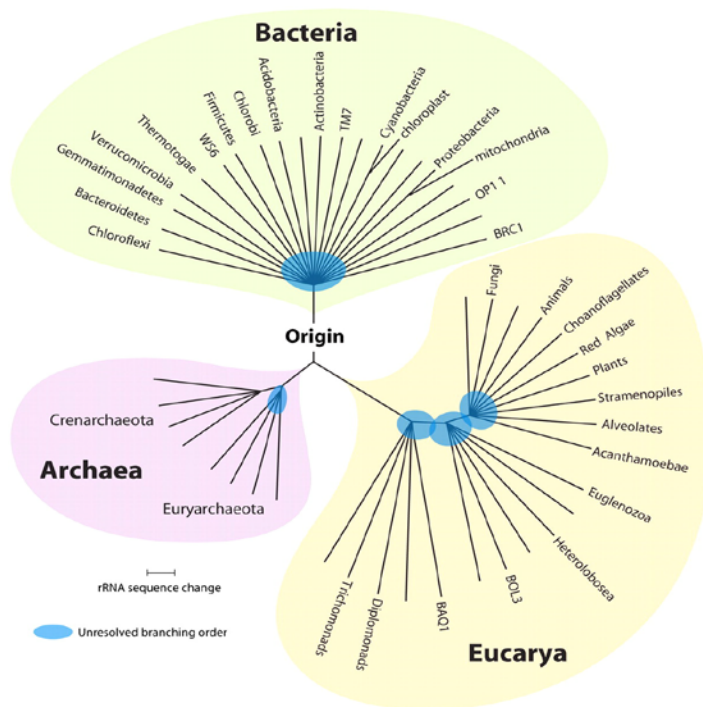


Figure 3 : Arbre phylogénétique de la vie[1].

Arbre phylogénétique de tous les organismes vivants, basé sur les séquences de l'ARNr 16S. A l'origine proposé par Carl Woese[12], il montre l'histoire évolutive des trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*).

La microbiologie concerne l'étude des micro-organismes, incluant des entités acellulaires (virus), aussi bien que des cellules procaryotes et eucaryotes. Les micro-organismes cellulaires se répartissent ainsi dans les trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*).

La taxinomie (ou science de la classification), repose classiquement en ce qui concerne les micro-organismes, sur l'analyse phénotypique (ou phénétique), basée sur les caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques, écologiques et génétiques. Les approches moléculaires d'identification et de classification s'appuient sur l'analyse des séquences nucléotidiques des ARN ribosomiaux (ARNr) (analyse phylogénétique ou phylétique), ou des génomes (analyse génotypique). En pratique la détermination du genre et de l'espèce d'un procaryote est basée sur la taxinomie polyphasique, incluant à la fois les caractères phénotypiques, phylogénétiques et génotypiques. Le rang taxinomique le plus élevé est le domaine, et tous les procaryotes

appartiennent soit au domaine des *Bacteria*, soit à celui des *Archaea*. Dans chaque domaine, chaque micro-organisme est placé (en descendant la classification) dans un phylum, une classe, un ordre, une famille, un genre et une espèce[16].

Le domaine *Bacteria* comprend plus de cinquante phyla, dont la moitié sont constitués uniquement de bactéries non cultivables (**Figure 4**)[11].

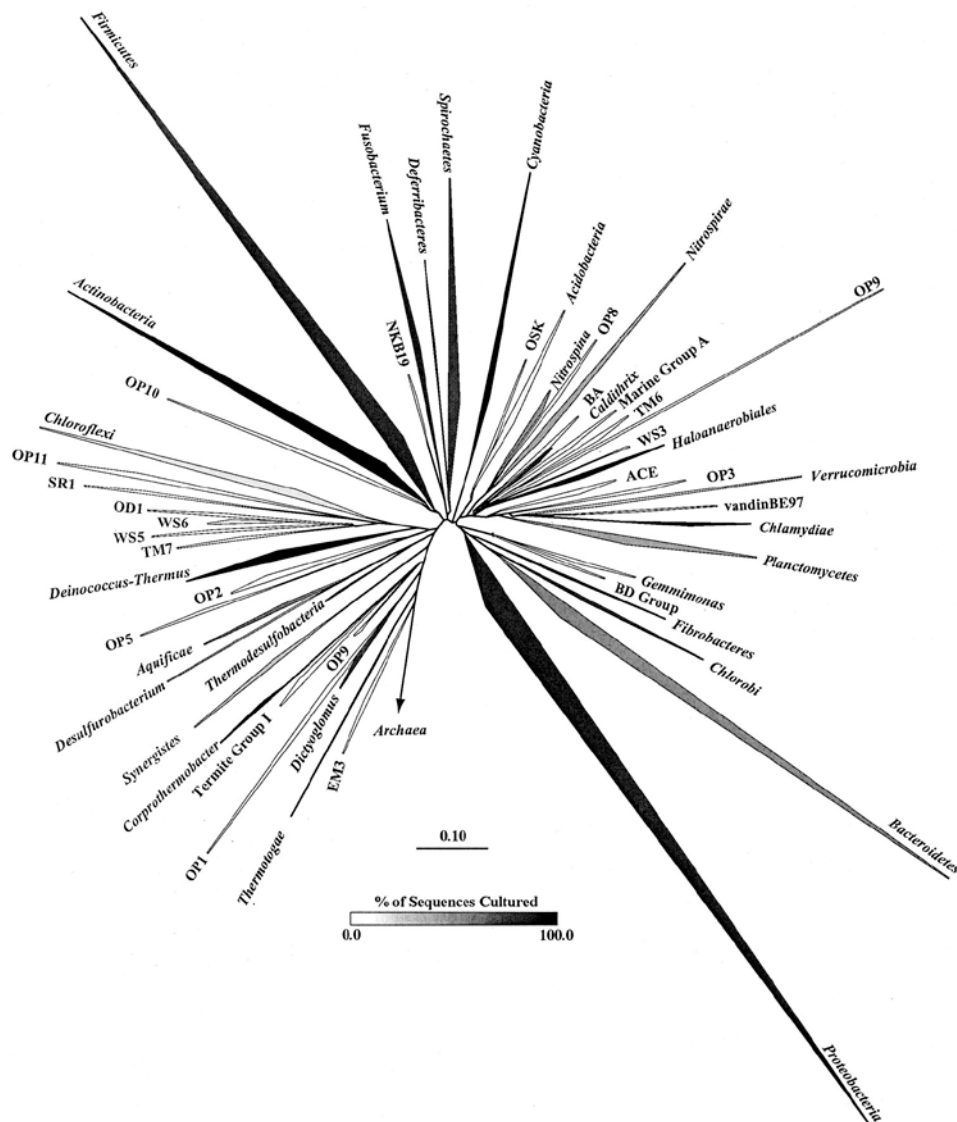


Figure 4 : Arbre phylogénétique du domaine *Bacteria* montrant les différents phyla établis ou candidats, construit à partir de 16964 séquences de plus de 1000 paires de bases (ARNr 16S)[11].

L'angle à la base des phyla est proportionnel à l'abondance relative des séquences, la longueur des segments à la base de chaque phylum indique la profondeur de branchement dans l'arbre. La densité de coloration correspond à la proportion de séquences obtenues à partir d'organismes cultivés. Aucun des phyla candidats n'a de représentant cultivé.

Les interactions entre microbes et eucaryotes

La coévolution microbes-eucaryotes « pour le meilleur et pour le pire ? »

Comme décrit plus haut, les relations symbiotiques impliquant des bactéries remontent à l'origine même des eucaryotes[26]. Durant les 500 derniers millions d'années, les lignées bactériennes ont mis en œuvre différents mécanismes d'entrée et de prolifération à l'intérieur même des tissus et cellules eucaryotes[33, 34]. Ces symbiotes ont des effets variés sur leurs hôtes, qui peuvent être bénéfiques ou bien délétères[35]. Les interactions symbiotiques positives comprennent le mutualisme (relation obligatoire bénéfique pour chacun des partenaires), la coopération (relation non obligatoire bénéfique pour chacun des partenaires) et le commensalisme (relation unidirectionnelle dans laquelle le symbiote, ou commensal, se nourrit aux dépens de son hôte, sans lui porter préjudice). Les interactions symbiotiques négatives sont la prédation (attaque et destruction d'une proie par une espèce prédatrice), le parasitisme (relation dans laquelle le parasite tire profit d'un hôte habituellement lésé), l'amensalisme (inhibition de la croissance d'une espèce par une autre) et la compétition (concurrence entre deux espèces pour occuper un même lieu ou consommer un aliment limitant)[16]. Si les relations symbiotiques parasitiques (pathogènes) ont été très largement étudiées au cours du siècle dernier, en raison de l'impact des infections bactériennes sur la santé publique, les recherches concernant les bactéries mutualistes (bénéfiques pour l'hôte) sont relativement récentes[36].

Des analyses phylogénétiques synthétisant les données d'interactions entre diverses bactéries et leurs hôtes eucaryotes identifient cinq transitions évolutionnistes majeures dans les symbioses bactériennes : l'origine des eucaryotes, l'établissement puis le maintien du mutualisme hôte-bactéries, la transmission verticale de symbiotes bénéfiques et la rupture évolutionniste du mutualisme bactérien[37]. Les associations symbiotiques ont émergé dans au moins onze phyla bactériens, particulièrement parmi les *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Firmicutes*, principalement par transmission horizontale à partir d'ancêtres environnementaux[36]. L'accès à des gènes mobiles dans le sol et les océans ainsi que le contact physique avec de nombreux hôtes ont pu favoriser l'émergence de ces associations, comme c'est le cas pour les *Proteobacteria*[34, 38]. La stabilisation des relations mutualistes a été ensuite permise par la transmission verticale des symbiotes (des parents à leur progéniture)[36]. Les associations mutualistes à visée nutritionnelle ont joué un rôle clé dans la diversification des vertébrés au Quaternaire, grâce à l'adaptation à de nouvelles niches alimentaires[39]. Les premiers mammifères, apparus au Jurassique étaient carnivores et l'adaptation à un régime alimentaire à base de plantes constitue une véritable percée

évolutionniste car 80% des mammifères actuels sont herbivores. Pour extraire les sucres de polysaccharides complexes d'origine végétale, diverses lignées de mammifères ont augmenté la durée de leur transit intestinal et agrandi certaines parties de leur intestin afin de permettre l'installation d'une communauté bactérienne aux capacités fermentaires[39, 40]. Les micro-organismes intestinaux ont ainsi joué un rôle clé dans l'émergence de la nutrition herbivore chez les mammifères et les oiseaux, en compensant un répertoire limité en glycosidases et polysaccharide lyases dans le génome des vertébrés[40, 41]. L'apport énergétique du métabolisme bactérien, à travers principalement l'approvisionnement en acides gras à chaînes courtes (SCFA), s'élève à 70% chez les ruminants, 20 à 30 % chez les animaux omnivores et 10% chez l'homme[42]. De manière générale, les communautés bactériennes se sont co-diversifiées avec leurs hôtes[43], si bien que les comparaisons phylogénétiques, basées sur l'ARNr 16S, révèlent de profondes différences entre les communautés microbiennes intestinales et celles prospérant librement dans l'environnement[39, 44]. La diversité du microbiote intestinal dépend de l'espèce, de la morphologie intestinale de l'hôte et aussi pour une part importante du régime alimentaire, avec une complexification croissante depuis les carnivores jusqu'aux omnivores et jusqu'aux herbivores, le microbiote intestinal de l'homme moderne étant typique de celui d'un primate omnivore[41]. L'homme peut être en fait considéré comme un super-organisme[45], avec un métagénome (ou hologénome) composé des gènes d'*Homo sapiens* et de l'ensemble des gènes présents dans le génome des microbes colonisant notre corps (microbiome)[46, 47].

Par contre, l'établissement et le maintien de ces associations symbiotiques n'a pu se faire sans la mise en place d'un système de tolérance de la part de l'hôte[39, 48], matérialisé par diverses fonctions de barrière de la muqueuse intestinale indispensables au confinement luminal de la microflore intestinale. La fonction de barrière physique est assurée par les cellules épithéliales intestinales jointes étroitement sur leur côté apical par des jonctions serrées empêchant tout passage paracellulaire de bactéries, mais aussi en première ligne par les couches de mucus qui empêchent un contact direct entre les bactéries et l'épithélium[49]. Les barrières chimique et immunitaire sont constituées respectivement par les peptides antibactériens sécrétés par les cellules épithéliales et les immunoglobulines A sécrétoires (sIgA), tous séquestrés dans le mucus[49]. Le système immunitaire intestinal ne contrôle pas la composition du microbiote mais il ne l'ignore pas non plus. Ainsi, des tissus et cellules spécialisés capturent le contenu luminal et initient des réponses immunitaires très localisées qui aident à confiner le microbiote dans l'intestin[44]. Les micro-organismes sont donc en libre compétition dans l'intestin pour l'utilisation des ressources s'y trouvant et sont normalement empêchés d'exploiter l'hôte en vue

d'accéder à des ressources supplémentaires[50]. Dans une perspective microbienne, le microbiote représente une niche écologique complexe et dynamique, au sein duquel la distinction entre un hôte sain ou malade ne prend de l'importante que seulement si la santé du microbiote est aussi affectée[44]. Un changement dans l'alimentation de l'hôte, une altération de certaines populations microbiennes au sein du microbiote, ou le transfert vers un hôte différent peuvent conduire rapidement un symbiote non pathogène à envahir les tissus de son hôte[44]. La réponse du système immunitaire de l'hôte doit alors normalement éliminer l'infection, mais un taux élevé de mortalité microbienne impose une pression de sélection importante qui peut conduire certains individus à devenir capables d'échapper à une reconnaissance par le système immunitaire avec ainsi une transition possible du mutualisme vers le parasitisme[44]. Des données génomiques indiquent que les microbes mutualistes et parasites partagent en fait le même potentiel d'infection, de prolifération et de survie à l'intérieur de l'hôte[36]. Cette évolution vers la conservation de caractéristiques pathogènes chez les microbes mutualistes a en fait probablement permis avant tout le maintien de l'association avec l'hôte[51]. Les bactéries symbiotiques intestinales sont ainsi potentiellement capables de mettre en place leurs propres stratégies de suppression, subversion et évation du système immunitaire dans le but premier de survivre à l'intérieur de leur hôte, car elles ont perdu par ailleurs toute capacité de survie à l'état libre dans l'environnement[52]. Il n'y a donc pas de différence intrinsèque entre un organisme pathogène et non pathogène, mais seulement un changement de contexte[53].

Les rapides changements écologiques que nous vivons actuellement (perte de biodiversité, globalisation) ont contribué sans nul doute à la dernière transition évolutionniste identifiée par J. L. Sachs, c'est à dire à la rupture des associations mutualistes impliquant des micro-organismes[37]. D'une part, les symbiotes d'espèces disparues ou en voie d'extinction sont indéniablement voués à l'extinction, d'où une perte de la biodiversité microbienne[54]. D'autre part, les changements de civilisation et d'écologie humaines sont proposés comme ayant aussi un impact sur le microbiote et par voie de conséquence sur notre santé[55]. La globalisation tend à une homogénéisation des communautés microbiennes associées aux humains, effaçant ainsi l'histoire évolutive de nos microbiotes depuis l'époque où nous vivions en petits groupes de chasseurs-cueilleurs il y a environ 2 millions d'années[39]. L'hypothèse hygiéniste, qui postule que l'acquisition horizontale de micro-organismes environnementaux par la nourriture, l'air, l'eau ou le sol est fortement réduite dans nos sociétés modernes, a été avancée pour expliquer l'émergence des allergies et des maladies métaboliques dans les pays développés[56]. Mais c'est l'hypothèse de la disparition de nos micro-organismes ancestraux qui semble se révéler la plus à même

d'expliquer l'augmentation rapide de la prévalence de pathologies modernes comme l'asthme ou l'obésité[14, 53, 55]. Un environnement trop aseptisé ne permet plus de compenser horizontalement les altérations dans la transmission verticale et le maintien du microbiote, qui sont liées à l'augmentation des naissances par césarienne, à la diminution de l'allaitement maternel, à la plus faible taille des familles et à l'utilisation généralisée des antibiotiques[53].

La bactérie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) a ainsi progressivement disparu de notre niche gastrique[57]. Des études épidémiologiques révèlent que la disparition d'*H. pylori* dans les pays développés coïncide avec l'occurrence des risques d'asthme, de rhinite allergique et d'allergies cutanées chez l'enfant[58-60]. *H. pylori* protégerait du développement de l'asthme chez l'enfant grâce au recrutement de lymphocytes T régulateurs (Treg) dans l'estomac[61, 62].

Par ailleurs, les antibiotiques ont été largement utilisés depuis plus de cinquante ans à des doses sub-thérapeutiques en production animale, comme promoteurs de croissance car ils permettent une meilleure efficacité alimentaire. Des études phylogénétiques et métagénomiques (de l'ensemble des gènes du microbiote) démontrent que les antibiotiques à doses sub-thérapeutiques induisent rapidement chez le porc un enrichissement en protéobactéries (particulièrement *Escherichia coli*) et en gènes bactériens ayant pour fonction la production et la conversion de l'énergie[63]. Le même enrichissement en *Escherichia coli* (*E. coli*) est observé chez le poulet avec des données métagénomiques révélant de plus un accroissement en gènes codant pour les fimbriae (pili courts) de type I et les systèmes de sécrétion de type IV[64] ; deux facteurs de virulence associés respectivement à la formation de biofilms et à l'adhérence des *E. coli* pathogènes chez l'homme[65-67], et au pouvoir invasif et pathogène des bactéries à Gram négatif[68, 69]. Même si la médecine humaine utilise les antibiotiques plutôt à forte dose sur une courte durée, des déséquilibres de la flore intestinale sont observés, avec la sélection d'organismes résistants perdurant plusieurs années après l'arrêt du traitement[70, 71]. Comment ne pas faire alors le parallèle avec les effets sur l'efficacité alimentaire des doses sub-thérapeutiques utilisées en industrie de l'élevage ? Martin J. Blaser spécule ainsi que les traitements antibiotiques notamment chez les jeunes enfants a causé des altérations dans la structure de leur microbiote intestinal et donc aussi dans les signaux luminaux à destination de l'hôte avec pour conséquence une contribution au développement épidémique de l'obésité dans les pays développés[14].

L'évolution de l'écologie humaine associée aux progrès de la médecine ont affecté la structure de notre microbiote et ceci a déjà eu des conséquences sur notre physiologie et notre santé[14]. Ces altérations constituent une rupture des associations mutualistes établies ancestralement avec notre microbiote, que ce soit par perte d'anciens symbiotes particuliers comme dans le cas d'*H. pylori*,

avec alors un risque important de remplacement par un organisme d'autant plus virulent que le symbiote disparu était dominant[14], ou alors par transition directe vers le parasitisme, phénomène prédit par la plupart des modèles sur la stabilité du mutualisme[72-76]. Il est donc important de prendre en compte la structure du microbiote et les relations hôte-microbiote historiquement bénéfiques pour les intégrer dans notre définition actuelle de la santé humaine[14]. Mais dans les pays développés, les modifications de structure du microbiote humain impactent déjà notre physiologie et notre santé, il est donc urgent d'étudier le microbiote de personnes indigènes de régions en développement, qui de plus n'ont pas été en contact avec les antibiotiques, afin de définir notre microbiote historique et comprendre son évolution et son fonctionnement[15]. Le laboratoire de Jeffrey I. Gordon a ainsi récemment révélé une perte importante de diversité bactérienne intestinale chez des personnes vivant en zone métropolitaine des Etats-Unis d'Amérique comparée avec celle de populations très peu développées comme les Amérindiens du Vénézuéla ou les habitants de zones rurales du Malawi[77]. Un des premiers objectifs de la médecine, dans un but préventif, aurait du être d'éviter d'altérer l'homéostasie de la relation entre l'homme et son microbiote[78], mais la compréhension de notre fonctionnement en tant que méta-organisme symbiotique commence à peine.

Envisageons maintenant plus précisément les composantes de la relation hôte-microbiote intestinal à l'échelle d'une vie humaine.

La microflore normale du corps humain

La distribution des micro-organismes présents sur et dans le corps humain reflète les adaptations à la vie terrestre survenues il y a environ 400 millions d'année. Les vertébrés terrestres ont développé un épiderme, des poumons, la fécondation interne et des membranes protectrices autour de l'embryon. La peau est devenue relativement imperméable et les muqueuses ont été confinées dans des sites protégées. Comme les micro-organismes prospèrent généralement uniquement en milieu humide, l'adaptation à un environnement plutôt sec a contribué à l'abondance, la localisation et le phénotype des micro-organismes associés aux humains[44]. De plus, la composition qualitative du microbiote varie également selon la localisation anatomique[13, 79](**Figure 5**).

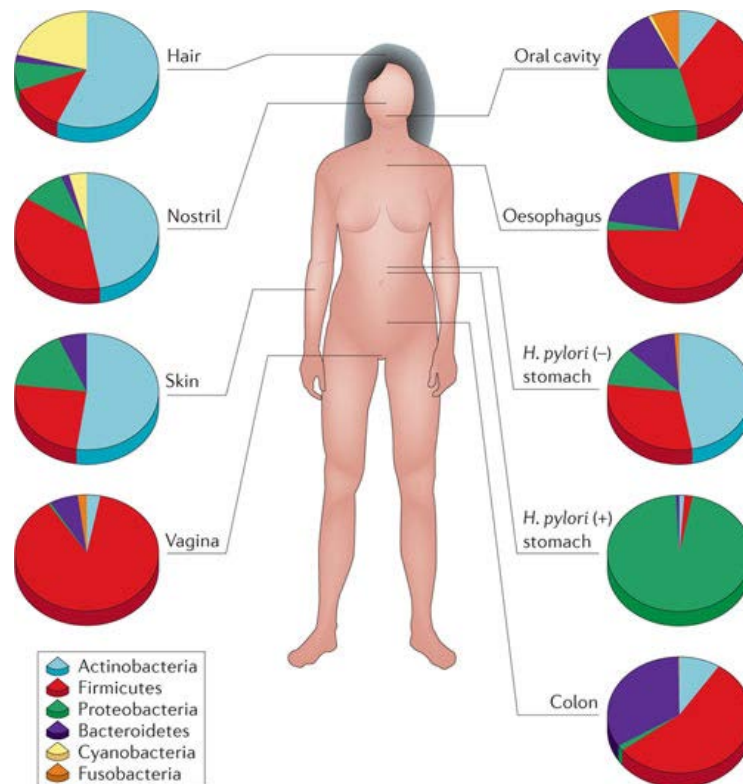


Figure 5 : Différences de composition qualitative du microbiote selon la localisation anatomique[13]. Le séquençage haut-débit révèle des différences intra-individuelles importantes dans la structure du microbiote selon le site anatomique, ainsi que des variations inter-individuelles pour un même site anatomique. Néanmoins, la structure taxonomique au niveau des phyla montre une stabilité longitudinale relativement stable pour un site anatomique. Ces différences anatomiques ainsi que la conservation de la structure du microbiote entre différents hôtes pour un même site, constituent une base importante pour déterminer l'importance biologique et pathologique d'un microbiote particulier. La figure présente les proportions relatives des séquences au niveau taxonomique du phylum pour huit sites anatomiques. Certains éléments, comme la présence (+) ou l'absence (-) d'*Helicobacter pylori*, peut conduire à des perturbations marquées et permanentes dans la composition de la communauté.

Pour ce qui concerne spécifiquement le microbiote intestinal humain, les premières analyses, basées sur des techniques de culture, suggéraient qu'il comprend au moins 400 espèces différentes, la plupart anaérobies strictes[80, 81]. Les principaux genres bactériens cultivés à partir du microbiote fécal de l'homme adulte sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*[80, 82]. Mais la description et l'identification de tous les membres du microbiote n'est pas possible par les techniques conventionnelles de culture car jusqu'à 80% d'entre eux ne sont pas cultivables[83-85]. Néanmoins les premiers résultats obtenus par des techniques

conventionnelles de culture ont été ensuite confirmés par les techniques moléculaires basées sur le séquençage de l'ARNr 16S, avec la prédominance de deux phyla principaux, *Firmicutes* et *Bacteroidetes*, associés à d'autres phyla plus minoritaires (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Cyanobacteria*)[86]. Le phylum *Firmicutes* est toujours largement représenté et comprend principalement le groupe *Eubacterium rectale*–*Clostridium coccoides* (14 à 31% des bactéries totales)[87-89], avec des espèces appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Butyrivibrio*. Le phylum *Firmicutes* comprend également le groupe *Clostridium leptum* avec les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (16 à 22% des bactéries totales)[89, 90]. Le phylum *Bacteroidetes*, avec les genres *Bacteroides* et *Prevotella*, est également toujours présent (9 à 42% des bactéries totales)[91]. La structure du microbiote est relativement conservée chez tous les mammifères pour les niveaux taxonomiques les plus élevés[41], mais la variabilité augmente si l'on se situe à des niveaux taxonomiques inférieurs[92]. Ainsi, les microbiotes intestinaux murin et humain sont très proches au niveau du phylum[44], mais au niveau du genre, 85% des séquences détectées dans l'intestin distal de souris ne sont pas détectés chez l'homme[93]. De même chez l'homme, l'analyse moléculaire du microbiote intestinal indique des variations inter-individuelles marquées au niveau de l'espèce[94], malgré une conservation des fonctions majeures du microbiote intestinal (codées par le microbiome), telles que la digestion anaérobie des fibres alimentaires[91, 95]. Quantitativement et selon un axe longitudinal, le nombre de bactéries trouvées dans la lumière du tractus gastrointestinal humain augmente de l'œsophage au côlon[96, 97]. Qualitativement, le microbiote luminal montre également des modifications selon un axe longitudinal, en fonction des conditions propres à chaque étage (**Figure 6**).

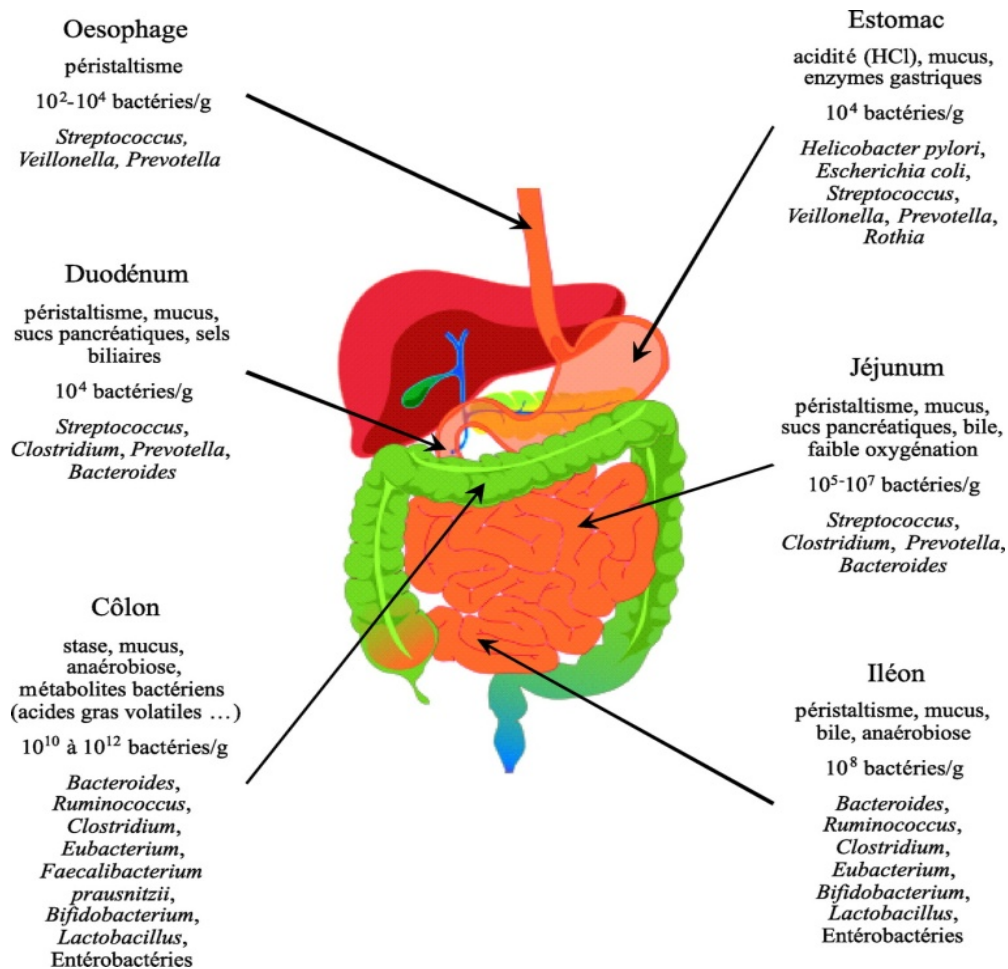


Figure 6 : Schéma du tractus gastro-intestinal et de la répartition de son microbiote[7]. Pour chaque partie du tractus digestif, les principaux stress physico-chimiques, la concentration bactérienne et les genres (ou espèces) constituant la flore sont indiqués.

De plus, le microbiote luminal du côlon proximal diffère substantiellement du microbiote fécal du côlon distal, ce dernier étant plus fourni et plus riche en bactéries anaérobies strictes[98]. Il existe aussi une distribution radiale du microbiote dans l'intestin, du centre de la lumière vers la surface de la muqueuse[99]. L'intérêt à étudier les bactéries associées à la muqueuse réside dans le fait qu'elles sont considérées comme autochtones (résidentes), alors que les bactéries situées dans la lumière intestinale sont allochtones, en transit avec la masse fécale[2]. En fait les populations bactériennes associées à la muqueuse sont distinctes morphologiquement et phylogénétiquement des communautés luminales[100-102] (**Figure 7**)[2].

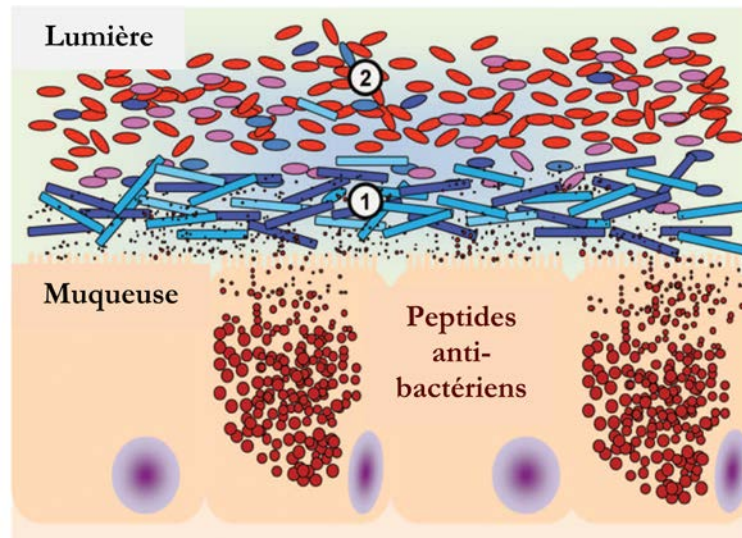


Figure 7 : Modèle d'interaction entre l'hôte et le microbiote dans l'intestin (modifié d'après[2]).

L'épithélium intestinal produit du mucus et des composés antibactériens qui forment des interactions électrostatiques dans la lumière intestinale. Cet ensemble constitue une niche où résident des bactéries autochtones (résidentes). Les bactéries autochtones (1) sont organisées en couches compactes de bactéries principalement fusiformes, proches de la surface apicale de l'épithélium colique. Ces communautés bactériennes sont distinctes, morphologiquement et phylogénétiquement, des bactéries allochtones transitoires (2), localisées au centre de la lumière intestinale avec le contenu fécal. Les communautés allochtones comprennent des bactéries en forme de coques et de bâtonnets, qui sont associées à des particules alimentaires non-digérées.

Contrairement à la flore bactérienne luminale, qui change de structure selon un axe longitudinal, la flore associée au mucus est constante de l'iléon au rectum chez un même individu et également très stable au cours du temps[103-105]. L'analyse des séquences d'ARNr 16S montre que la niche mucosale est enrichie en bactéries appartenant aux familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* (Figure 8)[2].

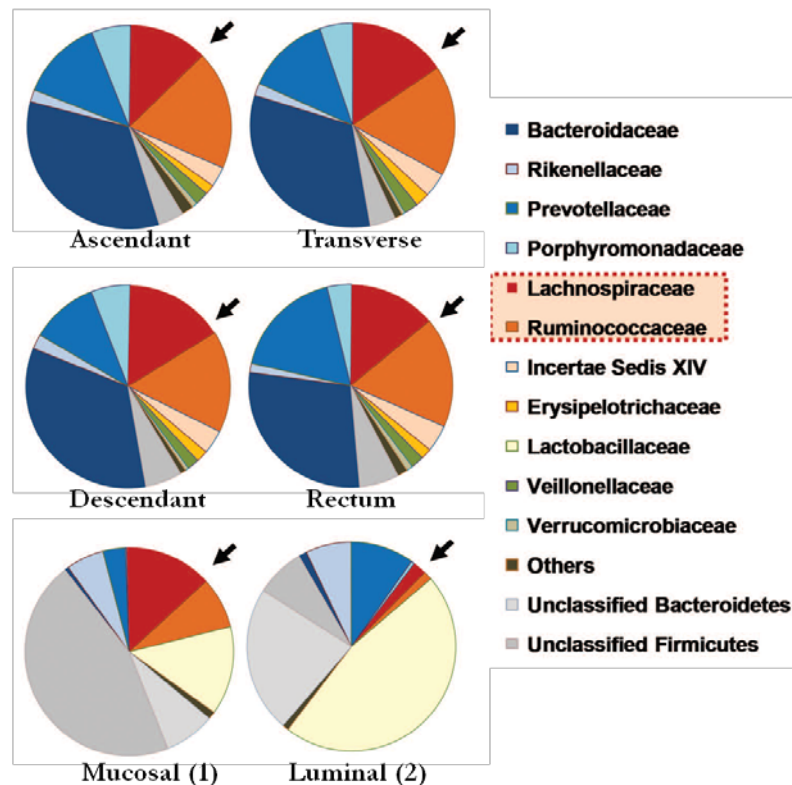


Figure 8 : Le microbiote autochtone associé à la muqueuse du côlon chez l'homme et la souris est enrichi en bactéries des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*[2, 3].

Chaque diagramme représente la composition taxonomique au niveau de la famille. Les données ont été obtenues par pyroséquençage de l'ARNr 16S à partir de biopsies de côlon humain (muqueuse) et de côlon de souris (muqueuse, 1) (lumière, 2). Il est à noter que l'enrichissement en *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* est observé également dans les biopsies d'humains sains pour lesquels l'intestin a été préalablement préparé pour l'examen.

Le microbiote humain se développe à partir d'un inoculum initial déterminé par le mode de délivrance[106]. Les enfants naissant par voie basse, acquièrent au moment de la délivrance, la flore vaginale et fécale de leur mère, dominée par les genres *Lactobacillus* et *Prevotella*[107], alors que les enfants naissant par Césarienne arborent une flore intestinale initiale très différente, avec des genres retrouvés à la surface de la peau (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*)[107, 108]. La diversité bactérienne intestinale est initialement très faible et augmente rapidement au cours de la première année, avec la diversification alimentaire et l'émergence des dents, pour converger vers une flore d'adulte vers l'âge de 2 ans et demi [109, 110]. Les premiers colonisateurs sont généralement aérotolérants, car l'intestin contient initialement de l'oxygène, puis ils sont remplacés par des organismes anaérobies, typiques d'un microbiote intestinal d'adulte[110]. Des études de la dynamique longitudinale du microbiote intestinal humain montrent que celui-ci est relativement stable chez un adulte sain au cours du temps[79].

Cependant cette stabilité temporelle ne se vérifie que si d'autres facteurs, comme l'alimentation, l'état de santé ou l'environnement restent constants[111]. La stabilité de l'écosystème bactérien intestinal, ou résilience, est notamment illustrée par une étude sur des jumeaux, chez lesquels les modifications observées dans le métatranscriptome (expression des gènes du microbiote) se limitent à la période d'ingestion journalière (pendant 7 semaines) d'un lait fermenté contenant 10^8 souches probiotiques des genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, le microbiote retrouvant sa structure et ses fonctions initiales, dès que le traitement est interrompu[112]. Chenhong Zhang et ses collègues ont aussi mis en évidence récemment, une forte résilience du microbiote intestinal chez la souris C57BL/6J adulte. Un régime riche en graisses modifie le microbiote, avec 77 phylotypes répondeurs, mais celui-ci retrouve sa structure initiale quand les animaux sont à nouveau nourris avec un régime normal[113]. La composition phylogénétique et fonctionnelle du microbiote, traditionnellement considérée comme relativement stable à l'âge adulte[114, 115], est en fait révélée par des études longitudinales comme étant relativement plastique en réponse aux modifications environnementales[116-119], en fonction du régime alimentaire[117, 120-122], en fonction de l'exposition aux bactéries environnementales[53] et en fonction de la situation géographique[77, 106, 123, 124]. Le microbiote d'un individu est en fait capable de s'adapter très rapidement (1 à 3 jours) à des changements de régime alimentaire[117, 121]. Chez des individus obèses, le microbiote intestinal adapte son profil phylogénétique en fonction de la composition de l'alimentation en fibres fermentescibles, avec une association positive entre la présence de fibres et les bactéries appartenant à la famille des *Ruminococcaceae*, au genre *Roseburia* et au groupe *Eubacterium rectale*[121]. Dans une autre étude dynamique chez des sujets maigres sous restriction alimentaire, une association significative entre la structure phylogénétique et fonctionnelle du microbiote intestinal et l'ingestion de protéines et de fibres est révélée[120]. Gary D. Wu et ses collègues ont de plus différencié les effets à long et à court terme des modifications nutritionnelles sur le microbiote intestinal humain[122]. L'étude des habitudes alimentaires à long terme, révèle au niveau du phylum, une augmentation des *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* et une diminution des *Firmicutes* et *Proteobacteria* en association avec une alimentation riche en graisses, alors qu'une alimentation riche en fibres est associée à la dynamique inverse (diminution des *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* et augmentation des *Firmicutes* et *Proteobacteria*). Par ailleurs, les protéines animales sont associées à l'entérotipe *Bacteroidetes* alors que les hydrates de carbone et sucres simples sont associés à l'entérotipe *Prevotella*. A court terme chez les mêmes sujets, les deux types de régime testés (riche en graisses et pauvre en fibres ou pauvre en graisses et riche en fibres) induisent des

modifications fonctionnelles significatives du microbiote au bout de deux jours seulement, confirmant les données d'Alan W. Walker[121]. Néanmoins, ces modifications alimentaires à court terme ne sont pas suffisantes pour effacer les variations inter-individuelles, qui restent importantes dans la composition du microbiote intestinal humain[119]. De manière intéressante, ces études comparatives révèlent que les groupes bactériens affectés par des modifications alimentaires à court terme sont différents de ceux qui sont affectés par des modifications à long terme, comme ceux formant les différents entérotypes (signatures bactériennes intestinales)[94]. Andrew L. Kau et ses collègues supposent que l'accroissement des apports caloriques via l'alimentation au cours des trente dernières années, a conduit à une diminution de la complexité phylogénétique et fonctionnelle du microbiote intestinal humain[117]. Le microbiote intestinal se modifie de manière continue en réponse aux changements d'habitudes alimentaires à court et long terme[125]. A travers la sélection d'une population bactérienne qui dégrade de manière optimale les substrats disponibles, ces fluctuations continues permettent à l'hôte de s'adapter aux changements alimentaires. A l'appui de cette hypothèse, Jan- Hendrik Hehemann et ses collègues rapportent la première évidence expérimentale montrant que la consommation d'aliments contenant des bactéries est très probablement le mécanisme permettant l'acquisition d'enzymes impliquées dans la dégradation des hydrates de carbone, par transfert latéral de gènes vers le microbiote intestinal[126].

L'impact de l'origine géographique sur la composition du microbiote intestinal a aussi été démontré[119]. Dans une étude comparative en Asie et aux USA, les profils bactériens forment des groupes en fonction du pays d'origine[124]. En particulier en abondance au niveau du phylum, la flore intestinale des Américains contient plus de *Firmicutes*, celle des Japonais plus d'*Actinobacteria*, alors que celle des Coréens et des Chinois est riche en *Bacteroidetes*. Une autre étude comparative chez des enfants européens et burkinabais montre des différences entre leurs communautés microbiennes fécales, avec un enrichissement en *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*, et une déplétion en *Firmicutes* et *Proteobacteria* chez les enfants africains[123]. Ces différences en fonction du pays peuvent résulter de facteurs environnementaux comme les habitudes alimentaires et le style de vie, aussi bien que du génome de l'hôte[119].

Le rôle du patrimoine génétique de l'hôte sur la structure de la microflore intestinale reste controversé. Selon Peter J. Turnbaugh et ses collègues, des jumeaux hétérozygotes ou monozygotes montrent le même degré de similarité entre leurs communautés microbiennes intestinales, ce qui laisse entendre que l'impact du génome de l'hôte est secondaire par rapport à l'impact de l'environnement[95]. Néanmoins, une autre étude montre une légère moindre

similarité entre les microbiotes intestinaux de jumeaux hétérozygotes comparé à ceux de jumeaux monozygotes[127]. De plus, 18 régions génomiques (loci) ont été identifiées chez la souris comme étant corrélées avec certains éléments du microbiote, avec notamment un lien entre le genre *Lactococcus* et la famille *Coriobacteriaceae* et une région qui contrôle les bactéries à Gram positif[128]. Cette région comprend les séquences codant IRAK3 (pour interleukin-1 receptor-associated kinase 3), qui module la réponse au peptidoglycane dépendante de MyD88 dans la voie TLR2[129], les lysozymes 1 et 2 (enzymes anti-bactériennes)[130], IFN- γ (interféron-gamma) et IL-22, cytokines qui jouent un rôle important dans l'immunité muqueuse, en permettant le développement des lymphocytes T ainsi que des réponses anti-bactériennes de la part des cellules épithéliales intestinales[131, 132].

Le vieillissement s'accompagne également de modifications du microbiote intestinal chez l'homme, avec au-delà de 65 ans, une plus grande proportion d'espèces du genre *Bacteroides* notamment[133]. Le changement de style de vie et de régime alimentaire à un âge avancé, ainsi que l'immunosénescence (vieillesse du système immunitaire), conduisent à une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de la motricité, impactant fortement le microbiote intestinal, en favorisant des pathobiontes (membres agressifs parmi les bactéries commensales) pro-inflammatoires (*Enterobacteriaceae*) au détriment de groupes bactériens immunomodulateurs (*Clostridium* groupes IV et XIVa, *Bifidobacterium*). Ce microbiote associé au vieillissement peut ainsi jouer un rôle dans la consolidation de l'inflammation chronique induisant le processus de vieillissement, en installant une boucle inflammatoire auto-stimulée délétère pour la santé de l'hôte[134, 135].

Le microbiote intestinal peut ainsi être considéré comme un facteur hérité d'abord verticalement de la mère, puis enrichi horizontalement à partir de l'environnement et enfin modulé également par les gènes de l'hôte[119].

L'une des fonctions principales du microbiote intestinal se rapporte à la digestion des hydrates de carbone indigestibles. Les hydrates de carbone sont primordiaux dans la nutrition des mammifères et de leur microbiote intestinal. Les mammifères absorbent les sucres simples (galactose et glucose) dans le jéjunum proximal, hydrolysent les disaccharides (sucrose, lactose et maltose) en monosaccharides et peuvent aussi dégrader les fibres en monosaccharides mais ne peuvent pas dégrader les autres polysaccharides[136]. En conséquence, les principaux substrats à disposition des bactéries dans le côlon sont des polysaccharides (cellulose, xylanes et pectines) qui n'ont pas été digérés dans l'intestin grêle ainsi que des fibres partiellement digérées[137, 138]. La fermentation des polysaccharides dans le côlon aboutit finalement à la production de SCFA

(acétate, propionate et butyrate) ainsi que du dioxyde de carbone (CO₂) et de l'hydrogène (H₂). Les protéines sont transformées en acides aminés et peptides, dont la fermentation résulte aussi en la formation de SCFA, CO₂ et H₂. La production journalière de SCFA est estimée à 400 millimoles et a une importance particulière pour l'hôte. Elle permet à celui-ci de récupérer l'énergie contenue dans les fibres alimentaires, qui serait sinon perdue. Les SCFA représentent également un substrat énergétique privilégié pour les cellules épithéliales coliques qui tirent 70% de leur énergie du butyrate[139]. Le butyrate est proposé comme diminuant le risque de cancer du côlon[140, 141]. Une incapacité à oxyder le butyrate est également rapportée dans les inflammations chroniques de la muqueuse intestinale, comme les colites ulcéreuses[142, 143]. Les mécanismes d'action du butyrate semblent impliquer des effets sur les médiateurs de l'inflammation. La diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, via l'inhibition de l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) est ainsi montrée dans les cellules immunitaires de la *lamina propria* de patients atteints de la maladie de Crohn[144] ou de colite ulcéreuse[145]. Au-delà de ces effets sur la cancérogenèse et l'inflammation, le butyrate contribue également au renforcement de la barrière mucosale[146], en stimulant la migration des cellules épithéliales[147], en augmentant l'expression des mucines[148, 149], du peptide trifolié 3 (TFF3)[150], de cathélicidines (peptides antimicrobiens)[151], de protéines de choc thermique (HSP)[152] et en augmentant l'activité transglutaminase[153]. Les bactéries du genre *Bacteroides*, particulièrement abondantes dans le côlon distal humain, peuvent dégrader et fermenter une grande variété de polysaccharides alimentaires[136].

Le mucus produit par l'hôte ainsi que les cellules perdues par l'épithélium intestinal constituent également des substrats potentiels pour les bactéries intestinales. Les mucines sont des glycoprotéines de très haut poids moléculaire, hautement glycosylées, qui contribuent au maintien de l'intégrité de la barrière mucosale intestinale[138]. Les bactéries commensales intestinales sont équipées d'enzymes permettant la dégradation et l'utilisation des chaînes d'oligosaccharides des mucines et certaines bactéries des genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium* peuvent dégrader totalement ces chaînes d'oligosaccharides[138].

Les protéines alimentaires ainsi que les enzymes pancréatiques et les sécrétions gastro-intestinales contribuent aussi à la fourniture de substrats pour les bactéries intestinales[154]. Alors que la fermentation des hydrates de carbone se produit dans le côlon proximal, la fermentation des protéines prend place dans le côlon distal et génère certains composés qui ont un effet négatif sur la santé : l'ammoniaque, les nitrosamines, le *p*-crésol, le *p*-nitrosophénol et la *p*-diazquinone sont tous carcinogènes[155-158]. Par ailleurs, la dégradation des acides aminés soufrés (cystéine,

méthionine) par les bactéries, résulte en la formation de sulfure d'hydrogène (H₂S), molécule toxique qui inhibe l'oxydation du butyrate par les colonocytes[159]. Les bactéries réduisant les sulfates (SRB pour sulfate-reducing bacteria) constituent une autre source importante d'H₂S ; ce sont principalement des espèces du genre *Desulfovibrio*[160].

Les graisses alimentaires sont absorbées dans l'intestin grêle proximal, suite à une émulsification par les acides biliaires. Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles, synthétisées dans le foie à partir du cholestérol, sous forme d'acides biliaires primaires (acide cholique et acide chenodeoxycholique)[138]. Les bactéries intestinales sont également responsables de la déconjugaison et de la transformation des acides biliaires en acides biliaires secondaires qui sont impliqués dans des processus de cancérogenèse[161].

Les bactéries intestinales sont aussi impliquées dans la transformation des médicaments et des xénobiotiques[162], mais également dans l'activation ou l'inactivation de certains composés comme les isoflavones[163, 164] ou les lignanes, qui présentent une activité œstrogénique et anti-oxydante[165, 166].

Par ailleurs, l'induction de la maturation du système immunitaire de l'hôte par ses bactéries intestinales, constitue un aspect important du mutualisme hôte-microbiote. Les interactions constantes entre le microbiote intestinal et les bactéries de l'environnement tout au long de la vie, sont également primordiales pour le bon fonctionnement de nos fonctions immunitaires[118, 167-169]. En particulier, les grandes fluctuations de la structure du microbiote en réponse aux microbes de l'environnement dans la petite enfance, sont fondamentales pour le développement adéquat et l'éducation du système immunitaire[53, 170, 171]. Des études chez la souris, démontrent un rôle sur la programmation des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs et la différenciation des lymphocytes B, pour des groupes bactériens spécifiques, comme les bactéries segmentées filamenteuses (SFB pour segmented filamentous bacteria), symbiotes apparentés au genre *Clostridium*[172], ou comme les bactéries des groupes *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoides*[167, 172, 173]. Ces bactéries programment notre système immunitaire depuis le début de la vie, en orchestrant la différenciation des lymphocytes T en diverses sous-populations pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, comme les lymphocytes T helper 2 (Th2), Th17 et les Treg[167, 168, 173].

Le rôle du microbiote dans le développement du système immunitaire intestinal concerne aussi les composantes adaptatives de celui-ci. Par exemple, l'induction de l'expression d'angiogénine 4 (Ang4) par les cellules de Paneth pendant le sevrage chez la souris, requiert la présence du

microbiote, car les souris axéniques ne l'expriment jamais, sauf en cas de colonisation bactérienne intestinale[174]. Bien que l'Ang4 appartienne à une famille de protéines aux fonctions angiogéniques[175], les angiogénines présentent aussi des propriétés bactéricides[176].

Le microbiote intestinal produit également des signaux inducteurs du développement de la vascularisation intestinale, via les cellules de Paneth mais les mécanismes impliqués ne sont pas clairement élucidés[174].

La modulation du répertoire des glycoconjugués est également sous la dépendance du microbiote intestinal. Les souris élevées conventionnellement, commencent leur vie avec des glycanes se terminant par de l'acide sialique au niveau de l'épithélium intestinal[177], alors qu'au cours du sevrage les acides sialiques sont remplacés par du fucose. Par contre ce changement n'est pas observé chez des souris axéniques, ce qui suggère ici aussi un rôle du microbiote[178, 179].

De plus, la communauté bactérienne qui peuple notre intestin constitue une barrière contre l'infection, ou résistance à la colonisation, qui prévient l'implantation des pathogènes[180]. Ainsi, l'absence de microbiote chez des souris axéniques ou après un traitement antibiotique chez des souris conventionnelles, augmente de manière significative la vulnérabilité à la colonisation et aux infections entériques à *Salmonella* spp., *Streptococcus mutans*, *Clostridium difficile* et *Shigella flexneri*[180]. Ce phénomène de résistance à la colonisation est multifactoriel. Les mécanismes contributeurs sont la compétition pour l'espace et les sites et récepteurs d'adhérence mucosale, la compétition pour les nutriments, la production de bactériocines[181], la production de composés qui régulent l'expression de facteurs de virulence[35], la stimulation des défenses de l'hôte (motricité intestinale, sécrétion de peptides antimicrobiens, induction de la production de mucines)[182] et la production de métabolites (SCFA) qui réduisent la croissance des pathogènes directement ou indirectement comme par exemple le butyrate qui peut induire la production d'un peptide antimicrobien qui protège contre les infections à *Shigella*[183].

Le prochain sous-chapitre décrit les relations complexes qui sous-tendent le mutualisme hôte-microbiote intestinal.

Homéostasie de la relation hôte-microbiote au niveau de la muqueuse intestinale

L'épithélium intestinal est un épithélium monostratifié, dont les entérocytes constituent la population majoritaire. Les cellules épithéliales constituent une barrière physique contre la plupart des infections. La cohésion épithéliale est assurée par les jonctions serrées intercellulaires qui constituent une barrière physique, excluant l'entrée de bactéries par une voie paracellulaire. Pour

ce qui concerne la perméabilité épithéliale transcellulaire, la plupart des bactéries commensales sont séparées de la surface de l'épithélium par une couche de mucus et ne sont pas internalisées par les cellules épithéliales[49]. De plus une couche de mucus protège la surface de l'épithélium en assurant la capture et l'élimination des micro-organismes par péristaltisme. Il contient également des peptides antimicrobiens, des molécules cytoprotectrices et des sIgA. L'intestin grêle est organisé en cryptes et villosités qui accroissent la surface disponible pour l'absorption des nutriments, alors que dans le côlon il n'y a pas de villosités et la surface de l'épithélium y est plate[184]. L'épithélium intestinal est entièrement renouvelé approximativement tous les cinq jours chez l'homme, grâce à la prolifération et la différenciation de cellules souches pluripotentes situées dans les cryptes de Lieberkühn (cryptes), qui en migrant vers le haut, deviennent des entérocytes, des cellules entéroendocrines ou des cellules caliciformes productrices de mucus[185]. De plus dans l'intestin grêle, les cellules souches qui migrent vers le fond des cryptes se différencient en cellules de Paneth, qui produisent une variété de facteurs antimicrobiens protégeant les cellules de la crypte contre les bactéries[186]. En haut des villosités, se produit une apoptose physiologique de l'épithélium et une extrusion cellulaire qui ne compromet pas les fonctions de barrière de l'épithélium[187, 188]. Néanmoins, une mort excessive des cellules épithéliales, causée par des microbes pathogènes[189, 190], un stress métabolique[191, 192], des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des agents acides ou enzymatiques[193, 194], peuvent conduire à une perte de surface villositaire et donc aussi d'étanchéité, si la prolifération cryptique et la migration des entérocytes ne sont pas suffisantes pour colmater la zone affectée[49]. Par contre, une vitesse élevée de prolifération et une résistance à l'apoptose cellulaire sont connues en tant que facteurs déterminants de la carcinogenèse colorectale[195]. Ainsi, l'équilibre entre la mort cellulaire et la prolifération des cellules épithéliales, constitue un élément-clé de l'homéostasie intestinale[49]. Le tissu mucosal situé directement en-dessous de l'épithélium intestinal est la *lamina propria*, et contient des lymphocytes B produisant des sIgA, des lymphocytes T, des cellules stromales et des cellules présentatrices d'antigènes, comme les macrophages et les cellules dendritiques. De plus, l'épithélium contient des lymphocytes intraépithéliaux[184].

Les interactions entre les bactéries et l'épithélium intestinal diffèrent selon que l'on se situe dans l'intestin grêle ou le côlon, en raison de différences anatomiques et de couverture de l'épithélium par la couche de mucus[184]. Le mucus colique est composé de deux strates recouvrant l'épithélium d'une épaisseur totale de 150 micromètres, avec une strate interne très dense et dépourvue de bactéries et une strate externe moins dense et colonisée par des bactéries[196]. L'épaisseur de la couche de mucus augmente de l'estomac au côlon[197]. Ce qui n'est pas connu,

par contre, c'est si le mucus dans l'intestin grêle est également constitué de deux strates et couvre entièrement la surface importante constituée par les villosités. Les cellules caliciformes sécrètent une grande quantité de mucines (3 litres/jour chez l'homme), qui forment une couche épaisse (400 à 500 nanomètres) de glycoprotéines chargées négativement, dont certaines sont ancrées dans la membrane, et préviennent le contact direct des bactéries avec l'apex des cellules épithéliales[198]. La mucine sécrétée dominante est Muc2. Trois fonctions principales peuvent être définies pour le mucus. Premièrement, il constitue une couche protectrice, résistante à l'action des protéases, et protège ainsi physiquement la surface de l'épithélium[199]. Deuxièmement, le mucus capture les bactéries grâce au mimétisme de ses structures avec les motifs des récepteurs membranaires, et le mouvement péristaltique de l'intestin élimine ensuite les microbes ainsi piégés[200, 201]. Enfin, le mucus constitue une matrice qui enrobe les peptides antimicrobiens produits par l'épithélium, les agents cytoprotecteurs (TFF) et les sIgA[202]. Ainsi, la couche de mucus permet non seulement la compartimentalisation physique du microbiote, mais constitue aussi une zone de communication où sont échangés les signaux moléculaires nécessaires au dialogue entre l'épithélium et le microbiote[172].

La détection des pathogènes par l'hôte est accomplie grâce à des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR pour pathogen recognition receptor) qui reconnaissent des structures moléculaires conservées ou PAMP (pathogen-associated molecular patterns), et induisent la production de molécules effectrices innées[184]. Etant donné que les structures reconnues par les PRR sont communes aux microbes pathogènes et non pathogènes le terme de MAMP (microbe-associated molecular patterns) est mieux approprié, en particulier dans le contexte d'interactions avec les organismes commensaux. Les PRR reconnaissent aussi des signaux du type DAMP (damage-associated molecular patterns) qui sont des molécules intracellulaires produites par l'hôte en réponse à un traumatisme ou un stress[203]. Les PRR sont exprimés par les cellules épithéliales et comprennent trois familles : les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1)-like et les récepteurs intracellulaires NOD (nucleotide oligomerization domain)-like (NLR). Les TLR sont localisés dans les membranes cytoplasmique et endosomale et reconnaissent ainsi des MAMP à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule. La plupart des TLR sont exprimés au niveau de l'ARN messager dans le côlon et l'intestin grêle chez l'homme, mais la connaissance de leur distribution spatiale et de leurs fonctions dans les différentes parties de l'intestin reste incomplète[204, 205]. Des techniques immunohistochimiques montrent que TLR2 et TLR4, reconnaissant respectivement les acides lipoteichoïques et les lipopolysaccharides (LPS), sont peu exprimés par les cellules épithéliales

intestinales du côlon humain normal et principalement par les cellules des cryptes[206-209]. Cette compartimentalisation de TLR4 dans les cryptes coloniques a aussi été rapportée chez la souris[210]. Dans l'intestin grêle de souris, TLR2, TLR4 et TLR5 (récepteur de la flagelline), sont localisés dans les follicules associés à l'épithélium, les cryptes et les villosités, mais l'expression de TLR4 est relativement faible[211]. L'expression de TLR2 et TLR9 (récepteur de l'ADN CpG non méthylé), est observée sur les faces apicale et basolatérale des follicules associés à l'épithélium, mais seulement sur la membrane basale des cellules épithéliales intestinales dans l'intestin grêle de l'homme et de la souris[184]. La signalisation par TLR4 est initiée au niveau de la membrane cytoplasmique après la fixation du LPS au complexe MD2-TLR4, mais aussi à l'intérieur de la cellule car TLR4 a été retrouvé dans l'appareil de Golgi en association avec du LPS[212]. L'internalisation du LPS a d'ailleurs été démontrée comme nécessaire à l'induction de la production de la chimiokine CXCL2 (C-X-C motif ligand 2), suggérant que la signalisation intracellulaire via TLR4 est requise pour l'activation de NF- κ B dans l'épithélium[213]. Les RLR par contre, sont des protéines cytoplasmiques (hélicases de l'ARN) qui reconnaissent l'ARN viral et induisent l'activation de voies pro-inflammatoires antivirales[214]. Les NLR reconnaissent par ailleurs, un large panel de ligands bactériens, toxines, et DAMP[215]. La signalisation par les protéines NLR permet l'activation de diverses voies moléculaires, comme celle des caspases, du facteur de transcription NF- κ B, ainsi que la mort cellulaire, et conduit à l'expression de cytokines, chimiokines et défensines. Dans l'intestin, seules les fonctions de NOD1 et NOD2 ont été caractérisées. NOD1 répond à l'acide meso-diaminopimélique (DAP), qui est un motif plus largement trouvé dans le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif, alors que NOD2 répond au muramyl dipeptide (MDP), qui est commun au peptidoglycane de toutes les bactéries[184, 216]. NOD2 est très exprimé dans les monocytes et les cellules de Paneth dans l'intestin grêle[203], et joue un rôle crucial dans la colonisation et la composition du microbiote intestinal au cours du développement précoce chez la souris. Chez les souris n'exprimant pas NOD2, les communautés bactériennes intestinales sont en effet affectées quantitativement et qualitativement, avec une présence anormale de bactéries du phylum *Bacteroidetes* à des stades très précoces de développement[217], résultat s'expliquant par une inaptitude de ces animaux à détruire les bactéries en l'absence de NOD2[218-221]. NOD1 est par contre exprimé par les cellules épithéliales intestinales et est nécessaire à la reconnaissance des bactéries invasives à Gram négatif[222, 223]. La genèse des tissus lymphoïdes associés à l'intestin, dans le côlon, l'estomac, l'œsophage, l'appendice et les plaques de Peyer, est activée par la seule présence de bactéries commensales à Gram négatif, via une signalisation par NOD1[224]. NOD1 a été

également impliqué dans la protection contre la bactérie à Gram positif *Clostridium difficile* avec, chez les souris n'exprimant pas NOD1, une plus grande mortalité, un moindre recrutement des neutrophiles et une incapacité à détruire le pathogène, contrairement aux souris sauvages[225].

Voyons maintenant quelles sont les conséquences de l'activation des PRR.

Après fixation de leurs ligands, les TLR recrutent des protéines adaptatrices et des kinases cellulaires qui conduisent à l'activation de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) et de la voie NF- κ B. En conséquence, NF- κ B est transloqué dans le noyau, où il stimule l'expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. NOD1 et NOD2 activent l'assemblage de complexes de signalisation multicomposants, qui activent finalement NF- κ B via des interactions avec RIP2 (receptor interacting protein 2) et une kinase sérine/thréonine[215]. Afin de ne pas provoquer une inflammation chronique de la muqueuse intestinale via l'activation des PRR par le microbiote résident, tout en maintenant la capacité de répondre à une agression par des pathogènes, la polarisation des cellules épithéliales intestinales joue un rôle primordial. Il a ainsi été démontré que l'activation de TLR9 induit des réponses transcriptionnelles différentes suivant la localisation apicale ou basolatérale du récepteur. L'activation apicale de TLR9 induit une tolérance, tandis qu'une stimulation basale entraîne la dégradation d'I κ B et l'activation de la voie canonique de NF- κ B[226]. De plus, un certain nombre d'inhibiteurs de la signalisation des TLR dans les cellules épithéliales intestinales, comme IRAK-M (interleukin-1 receptor-associated kinase-M), TOLLIP (Toll-interacting protein), SIGIRR (single immunoglobulin interleukin 1-related receptor), A20 (TNF-alpha-induced protein 3) et PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), empêchent que la réponse des TLR aux MAMP ne se traduise par une inflammation chronique et potentiellement destructrice[227]. Mais il est évident par ailleurs, qu'une signalisation via les PRR est nécessaire au maintien d'une homéostasie intestinale. Des souris déficientes en TLR9, TLR4, TLR2 ou MyD88, montrent ainsi une susceptibilité accrue à l'induction d'une colite[226, 228]. Des souris axéniques, ainsi que des souris conventionnelles traitées avec des antibiotiques afin de réduire le contenu bactérien de l'intestin, sont également plus susceptibles à la colite, et peuvent être protégées après administration d'agonistes de TLR2 et TLR4[228]. Les cellules épithéliales, au-delà de leur rôle dans la digestion et l'absorption des nutriments, contribuent en fait à la fonction de barrière intestinale en produisant toute une gamme de facteurs antimicrobiens, comme les défensines, les cathélicidines, la calprotectine ainsi que les polypeptides antimicrobiens RegIII γ et RegIII β chez la souris[186, 205]. Ainsi, une délétion de TLR4, NOD1 ou MyD88, spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales, compromet la résistance aux infections bactériennes[229, 230]. Une délétion de TLR5, provoque

par ailleurs le développement spontané d'une colite chez la souris, avec une augmentation de l'association des bactéries à la muqueuse du côlon et une translocation accrue des bactéries vers le foie et la rate. De plus, le polymorphisme de NOD2 chez les patients atteints de la maladie de Crohn, est associé avec une immunité innée défaillante, une réduction de l'expression de peptides antimicrobiens et une dérégulation de la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal[231, 232]. Les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes dans l'intestin grêle, montrent une concentration maximale dans l'iléon distal[203]. Ce sont des producteurs importants de protéines antimicrobiennes dans l'intestin grêle (lysozyme, défensines alpha, phospholipase A2, lectine RegIIIγ). Les bactéries commensales activent la production de ces protéines antimicrobiennes en réponse à une signalisation par les TLR dépendante de MyD88. Ce mécanisme permet de limiter la croissance des bactéries commensales et pathogènes dans les cryptes de l'intestin grêle, avec une implication de la lectine antibactérienne RegIIIγ dans la ségrégation spatiale entre les bactéries et l'hôte[233]. De la même manière, les cellules épithéliales intestinales répondent à des motifs bactériens agonistes de TLR2 et TLR4, pour activer la production de défensines beta[234]. La capture d'antigènes bactériens au niveau de la muqueuse intestinale implique des structures et cellules immunitaires spécialisées. Dans l'intestin grêle, des agrégats de follicules lymphoïdes forment des structures spécialisées ou plaques de Peyer[235]. Des follicules lymphoïdes isolés sont aussi présents tout au long de l'intestin y compris dans le côlon. L'épithélium recouvrant les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés contient des cellules spécialisées dans la capture d'antigènes par endocytose, ce sont les cellules M (pour microfold) car elles sont dépourvues de longues villosités. Les cellules M ne contiennent pas de lysosomes et les antigènes capturés sont donc transportés sous forme intacte dans les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques), situées à proximité de la membrane basale épithéliale[236]. Les antigènes sont aussi captés directement par les cellules dendritiques qui étendent leur dendrites entre les cellules épithéliales[212, 213, 237], sans perte d'intégrité de la barrière épithéliale, car les cellules dendritiques créent des complexes similaires à ceux des jonctions serrées[238]. Cette capture dynamique des bactéries par les cellules dendritiques est induite par l'engagement des TLR dans une réponse dépendante de MyD88, au niveau des cellules épithéliales intestinales[239]. Les bactéries peuvent aussi traverser l'épithélium de manière autonome pour être ensuite phagocytées par des macrophages de la *lamina propria*[240]. Par ailleurs, il a été récemment démontré que les cellules caliciformes constituent également une voie de passage, apte à transporter des antigènes depuis la lumière intestinale vers des cellules dendritiques CD103⁺ localisées juste en-dessous dans la *lamina propria*[241, 242].

Après leur sensibilisation, les lymphocytes T et B naïfs évoluent respectivement en lymphocytes T mémoires et lymphocytes B effecteurs. Ils migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN pour mesenteric lymph nodes) via la circulation lymphatique efférente, puis vers la circulation sanguine via le canal thoracique, pour atteindre finalement les sites mucosaux effecteurs tels que la *lamina propria*[243]. Une fois revenus dans la *lamina propria*, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes producteurs de sIgA qui, après sécrétion dans la lumière intestinale, contribuent aux défenses immunitaires locales, en limitant le contact des bactéries avec l'épithélium et l'invasion des cellules de l'hôte[184]. Les cellules épithéliales produisent des facteurs comme APRIL (proliferation-inducing ligand) et BAFF (B-cell activating factor), qui stimulent le recrutement de lymphocytes B dans la *lamina propria* et la commutation de classe des lymphocytes B, en réponse à une signalisation par les TLR[205]. Ainsi, la reconnaissance des bactéries intestinales est inextricablement liée à la production de sIgA et à l'exclusion immune des bactéries[244]. Malgré l'existence de plusieurs mécanismes évitant un contact intime de l'épithélium avec les bactéries intestinales, la *lamina propria* présente un tonus immunosuppresseur évitant une réponse incontrôlée vis-à-vis du microbiote commensal. Ce mécanisme de tolérance orale dépend largement du développement de Treg dans les ganglions lymphatiques. D'autres mécanismes, comme la compartimentalisation des TLR, explique également la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. Pour ce concerne les LPS en particulier, leur potentiel de signalisation est atténué par trois facteurs : une faible expression de TLR4 et de ses molécules co-activatrices à la surface de l'épithélium, une tolérisation post-natale de l'épithélium intestinal vis-à-vis du lipide A[245] et la sécrétion par les cellules épithéliales intestinales d'une phosphatase alcaline capable de déphosphoryler et ainsi d'inactiver le lipide A luminal[246]. De plus, l'activation de la voie NF- κ B, suite à la détection des bactéries commensales par les TLR sur le versant luminal, conduit les cellules épithéliales intestinales à produire les cytokines TSLP (thymic stromal lymphopoietin) et TGF- β (transforming growth factor-beta), ainsi que d'autres facteurs, qui abolissent la capacité des cellules dendritiques à produire des cytokines pro-inflammatoires et permettent l'induction de Treg dans les MLN[247] (**Figure 9**).

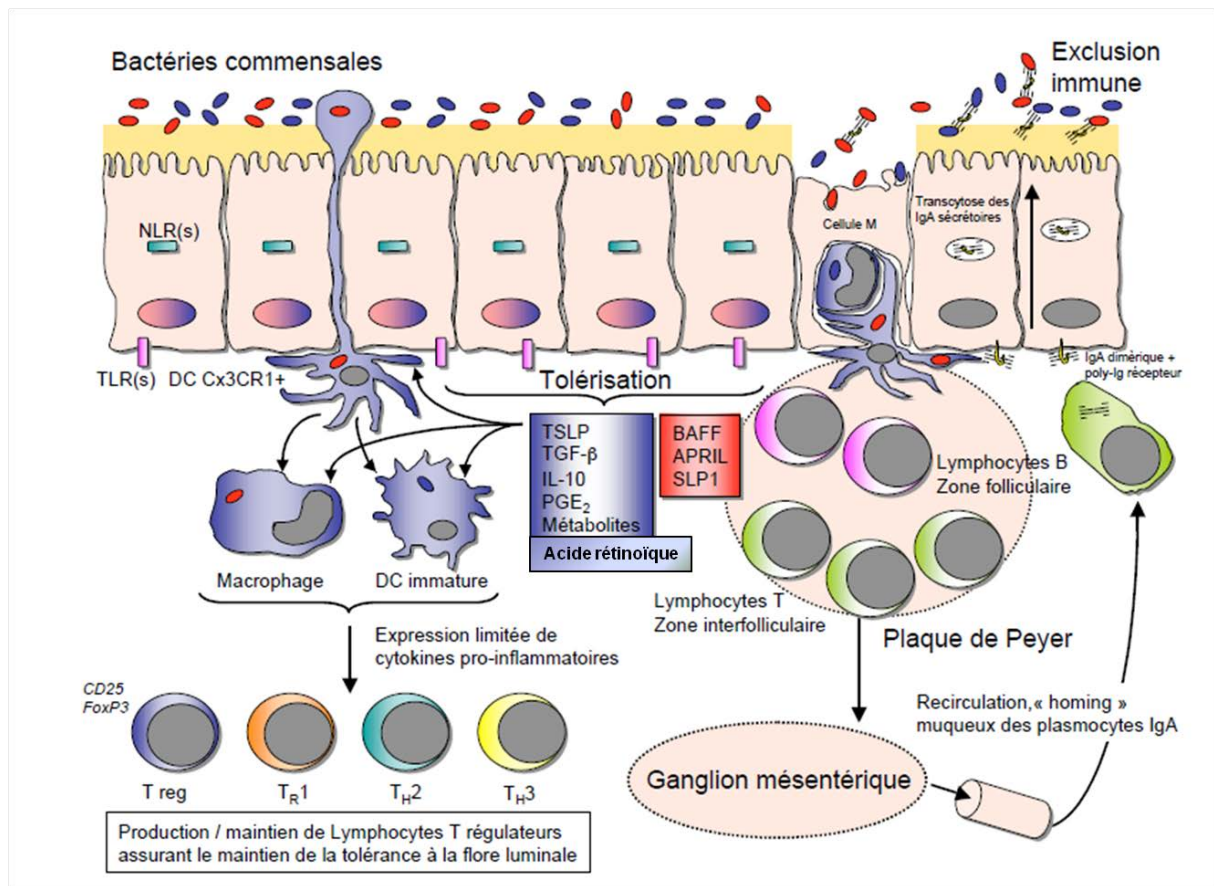


Figure 9 : Mécanismes de la tolérance envers les bactéries intestinales commensales (d'après[5]).

Comme déjà évoqué plus haut au sujet du développement du système immunitaire intestinal après la naissance, certaines bactéries ont été identifiées comme ayant un rôle spécifique dans l'induction de la tolérance orale tout au long de la vie. Les bactéries du genre *Clostridium* permettent l'augmentation du nombre de Treg Foxp3⁺ (forkhead box p3) sécrétant de l'IL-10 (interleukin-10), grâce à l'induction de la production de TGF-β et d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les cellules épithéliales[173]. La flore altérée de Schaedler a été développée pour coloniser les souris axéniques, et contient huit espèces bactériennes : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Bacteroides distasonis*, quatre bactéries fusiformes anaérobies apparentées au genre *Clostridium* et une bactérie spiralée apparentée au genre *Flexistipes*[248]. Cette flore simplifiée stimule la génération de Treg intestinaux via une activation des TLR selon une voie dépendante de MyD88 et TICAM1 (Toll-like receptor adaptor molecule 1)[249]. Par ailleurs, le polysaccharide A (PSA) de *Bacteroides fragilis* promeut, via une activation de TLR2, une augmentation du nombre de Treg Foxp3⁺ qui sécrètent de l'IL-10 dans le côlon[250]. Mais les bactéries commensales n'ont pas toutes des propriétés anti-inflammatoires. Certaines espèces,

trouvées en grande quantité dans l'intestin de l'homme et de la souris, présentent clairement un potentiel pro-inflammatoire[172]. Comme déjà évoqué, les SFB jouent un rôle prépondérant dans la maturation post-natale du système immunitaire intestinal[251]. Ces bactéries, apparentées au genre *Clostridium*, induisent la différenciation de lymphocytes Th17, via une régulation positive de la sécrétion de SAA (serum amyloid A protein) et une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires[252]. Un nouveau paradigme a ainsi émergé récemment, selon lequel un groupe limité d'espèces présentes dans le microbiote, stimule des réponses immunitaires innées et contribue à maintenir un état de vigilance, ou inflammation physiologique, permettant une réponse rapide et appropriée face à une infection[172]. La distinction entre micro-organismes pathogènes et symbiotiques est ainsi devenue plus complexe, car parmi les bactéries bénéfiques, on peut trouver des organismes totalement inoffensifs et d'autres « raisonnablement » virulents. Malgré que la plupart des associations soient de nature symbiotique, commensale ou mutualiste, certains membres du microbiote intestinal ont donc le potentiel de causer des maladies, en cas de défaillance immunitaire ou de dysbiose majeure. Ces commensaux particuliers, comme les SFB ou *Helicobacter hepaticus*[253] ont ainsi reçu le nom de pathobiontes. Leur capacité à stimuler des composantes pro-inflammatoires de la réponse innée mucosale peut être attribuée largement à leur capacité à interagir physiquement avec l'apex épithélial[172]. Ainsi le paradigme classique de Janeway reposant sur la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques du monde procaryote (PAMP) par des récepteurs dédiés (PRR), n'est pas suffisant pour discriminer les procaryotes pathogènes des procaryotes symbiotiques, et doit s'enrichir de l'intégration de la notion de perception de danger par l'hôte, qui dépend largement de la localisation des micro-organismes dans l'intestin[172] et aussi de leur viabilité[10]. La couche de mucus constitue une zone tampon, dans laquelle certaines bactéries comme les SFB, peuvent s'aventurer et établir un contact étroit avec l'apex épithélial. Leur activité et leur présence est alors détectée quantitativement par l'émission de PAMP (LPS, muropeptides, flagelline) ainsi que d'autres marqueurs de prolifération et de viabilité comme des auto-inducteurs de *quorum sensing*[172] ou des ARN messagers, qui sont alors appelés des vita-PAMP[10]. La proximité excessive par rapport à l'épithélium intestinal ainsi que la surcroissance bactérienne, conduisent à une augmentation de la concentration de composés procaryotes, jusqu'au franchissement d'un seuil déclenchant de la part des cellules épithéliales une transition d'un comportement tolérogène vers une inflammation physiologique[172].

Pour ce qui concerne par contre les bactéries pathogènes, leur interaction avec l'hôte provoque la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales intestinales. Ces chimiokines sont perçues

comme des signaux de danger qui conduisent à la maturation des cellules dendritiques, et au développement d'une réponse pro-inflammatoire au niveau des muqueuses[205]. L'irruption d'un micro-organisme pathogène au sein des tissus et organes de l'hôte représente un danger en réponse duquel s'est développé le système immunitaire. La réponse à ce danger infectieux s'exprime principalement sous forme d'inflammation en réponse d'une part, à l'activation de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires propres au monde microbien, et en réponse d'autre part, à des molécules de l'hôte produites en situation de danger. La réponse immunitaire adaptative, spécifique d'antigènes exprimés par les pathogènes, permet de finaliser le processus d'éradication de l'agent infectieux initié par la réponse innée, et de protéger l'hôte vis-à-vis d'une nouvelle infection par le même agent. De la qualité et de l'intensité de la réponse immunitaire innée va dépendre l'orientation et l'efficacité de la réponse immunitaire adaptative.

La virulence des micro-organismes pathogènes a été jusqu'à présent largement analysée sous l'angle du dialogue moléculaire engagé par les facteurs de pathogénicité microbiens avec les cellules de l'hôte, aboutissant à la subversion des grandes barrières de l'organisme capables de faire obstacle à la progression du micro-organisme agresseur : adhésion, invasion, mort cellulaire.

Les pathogènes disposent en effet d'un arsenal de facteurs de virulence leur permettant d'atteindre la surface de l'épithélium de l'hôte, d'y adhérer, d'envahir les cellules, et d'y injecter des toxines via des systèmes de sécrétion dédiés. Ainsi, les signaux microbiens associés à la pathogénicité sont divers. Ils alertent l'hôte sur la croissance bactérienne (fragments de recyclage du peptidoglycane, pyrophosphates bactériens, autoinducteurs de *quorum sensing*), sur la viabilité ou la mort bactérienne (ARN et ADN), sur la colonisation de la surface de l'épithélium par les bactéries (augmentation de la concentration de PAMP perçus), sur l'adhérence à la muqueuse (formation de céramides), sur l'introduction de PAMP dans le cytoplasme cellulaire, sur l'altération des membranes cellulaires et sur l'entrée de micro-organismes dans les cellules[254, 255]. La **figure 10** résume ci-après les différents niveaux d'interaction entre l'hôte et le microbiote intestinal.

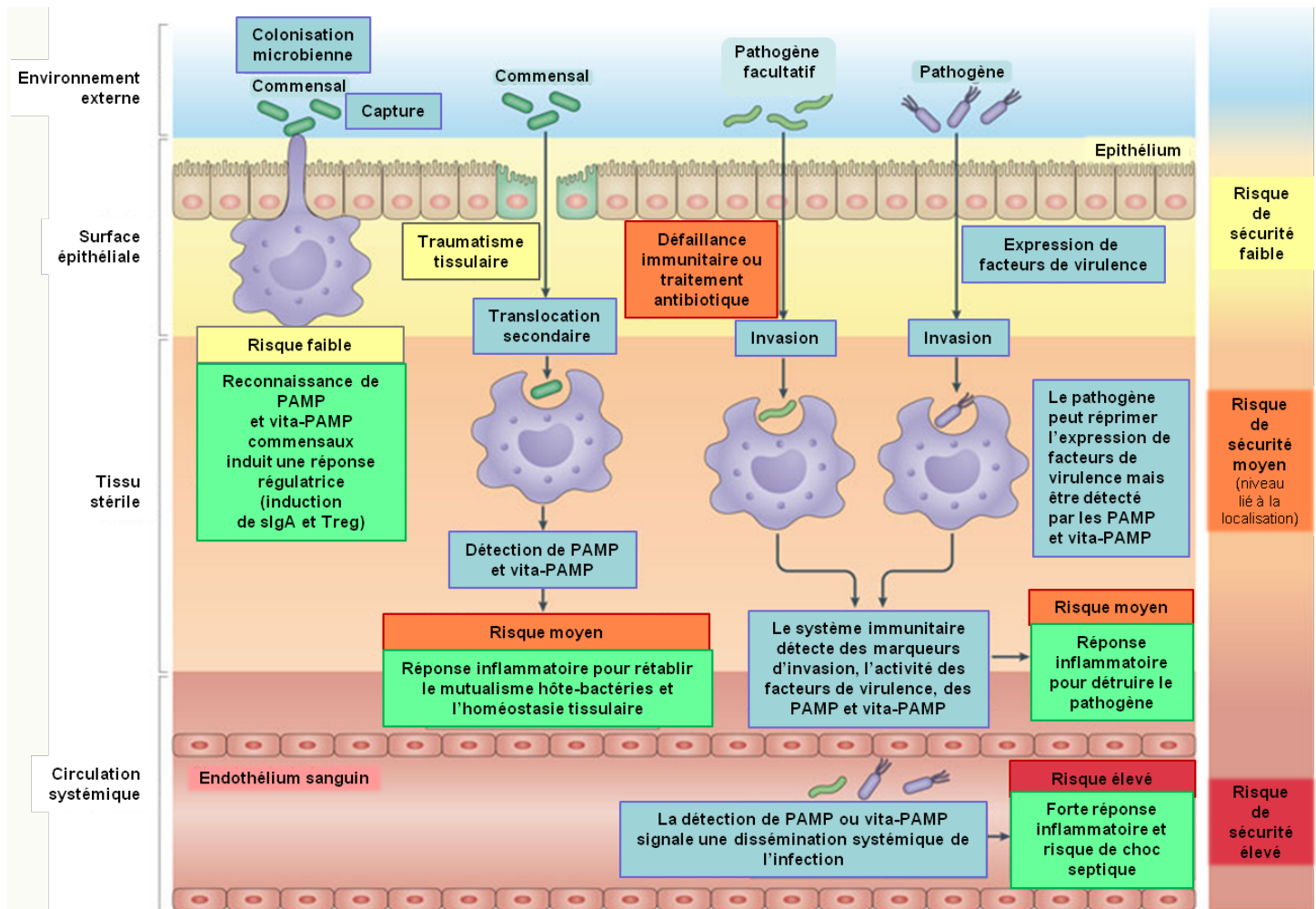


Figure 10 (traduit d'après[10]) : Différents tissus de l'hôte sont représentés, avec la surface de l'épithélium en haut en jaune, le tissu sous-jacent stérile au milieu en orange et la circulation systémique en bas en rouge. Le monde microbien est représenté en bleu et les cadres verts décrivent les réponses immunitaires associées. A chaque niveau de sécurité, plusieurs points de contrôle doivent être franchis avant que le micro-organisme puisse accéder à la circulation systémique. Les PAMP et vita-PAMP des bactéries commensales stimulent des fonctions immunitaires régulatrices qui restaurent le mutualisme hôte-bactéries commensales dans la muqueuse intestinale. Les PAMP de bactéries commensales qui transloquent accidentellement dans le tissu sous-jacent déclenchent des réponses inflammatoires visant à détruire les micro-organismes envahisseurs. Une détection simultanée de vita-PAMP informe de la viabilité du micro-organisme et provoque une réponse inflammatoire de plus forte intensité. La détection de PAMP dans un contexte d'activité invasive ou d'expression de facteurs de virulence se produit uniquement en réponse à des pathogènes viables (facultatifs ou non) et conduit à une réponse inflammatoire importante. Une fois dans les tissus, les pathogènes peuvent réprimer l'expression de leurs facteurs de virulence, et leur détection en tant que danger potentiel repose alors sur la détection initiale de vita-PAMP. La détection de PAMP seuls, sans vita-PAMP, informe sur le succès de la réponse. Par contre, la détection de PAMP ou de vita-PAMP dans la circulation, signifie une dissémination systémique, qui constitue un danger potentiel important pour l'hôte. Une forte réponse inflammatoire systémique est alors déclenchée, même si cette réponse peut conduire à un choc septique. La mobilisation du système immunitaire adaptatif n'est pas décrite, mais sa durée et son intensité augmente en même temps que la réponse innée.

Le sous-chapitre suivant aborde les conséquences pathologiques de la rupture de l'homéostasie mucoale.

Perte de l'homéostasie hôte-microbiote intestinal et conséquences

Alors que la première cause de mortalité dans les pays sous-développés reste les maladies infectieuses, ce sont les maladies cardiovasculaires et le cancer qui tuent le plus de personnes dans le monde développé[256]. Mais l'accroissement de la prévalence de désordres chroniques, comme les allergies, l'arthrite ainsi que d'autres pathologies inflammatoires et autoimmunes, font aujourd'hui de ces maladies également une cause de mortalité non négligeable[257, 258]. Les bactéries, ainsi que leurs fragments et métabolites, sont clairement responsables des mécanismes immunomodulateurs impliqués dans les maladies inflammatoires et autoimmunes[259]. Dans certains cas, une altération de la barrière intestinale conduit à une augmentation de la quantité d'anticorps circulants dirigés contre des antigènes présents dans l'intestin. L'apparition de ces anticorps a d'ailleurs une valeur prédictive du développement des maladies inflammatoires et autoimmunes[260, 261]. Une des hypothèses pouvant expliquer comment des composés infectieux peuvent déclencher une réaction autoimmune, est basée sur le concept de réactivité croisée, connu aussi sous le nom de mimétisme moléculaire, qui consiste en une similarité entre les épitopes des autoantigènes et les épitopes d'antigènes environnementaux[262, 263]. L'homéostasie de la muqueuse intestinale peut être altérée, soit par l'agression de l'intestin par des micro-organismes pathogènes et des toxines, soit à cause d'une immunodéficience ou d'une dérégulation du système immunitaire mucoal en réponse aux composés alimentaires ou bactériens[264, 265]. Les études montrant des variations du microbiote intestinal en relation avec un état pathologique sont potentiellement intéressantes, mais la variabilité interindividuelle de la composition du microbiote intestinal chez l'homme représente un facteur confondant difficile à surmonter[256].

La pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) implique des interactions entre des facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires, conduisant à l'induction d'une inflammation, puis au développement de lésions mucoales. Un dérèglement de la fonction des Treg et une altération de la réponse immune mucoale vis-à-vis de la flore bactérienne normale, jouent un rôle crucial dans la pathogenèse des MICI, avec probablement une perte de la tolérance orale vis-à-vis des antigènes luminaux[266-269]. La participation de composés microbiens a été d'ailleurs confirmée dans le développement de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse chez l'homme[270].

Par ailleurs, une étude récente chez des patients souffrant du syndrome du côlon irritable, rapporte une augmentation de la quantité de bactéries associées à la muqueuse du rectum par rapport aux contrôles. Ce sont principalement des bactéries appartenant au genre *Bacteroides* et au groupe *Clostridium coccoides*–*Eubacterium rectale* qui sont responsables de cette colonisation de la muqueuse[271].

La maladie cœliaque est par ailleurs une entéropathie immune chronique, pour laquelle une dysfonction de la barrière mucosale intestinale a été démontrée chez l'homme[272, 273]. Un accroissement des lymphocytes épithéliaux, une hyperplasie cryptique et un raccourcissement des villosités dans la muqueuse du jéjunum ont été de plus mis en évidence dans un modèle de maladie cœliaque chez le rat[274].

Le diabète de type 1, l'une des maladies autoimmunes les mieux étudiées, se développe suite à la destruction sélective des cellules beta productrices d'insuline dans les îlots de Langerhans. Son incidence rapide dans les pays développés a suggéré le rôle de facteurs environnementaux dans sa pathogenèse. Ces facteurs environnementaux comprennent des composés alimentaires et microbiens, ainsi qu'une perméabilité de la muqueuse intestinale[275]. Chez la souris non obèse diabétique (NOD), des conditions d'hébergement très « propres » accroissent l'incidence de la maladie, alors que les infections la diminuent[276]. Une incidence élevée de diabète de type 1 a été également montrée chez des souris axéniques, avec l'implication de mécanismes immunitaires innés, conférant ainsi au microbiote commensal un effet protecteur vis-à-vis du diabète[277]. Une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi que des signes d'activation du système immunitaire intestinal, précèdent le développement du diabète de type 1 chez l'enfant[275]. Le rôle causal des dysfonctions de la barrière mucosale sur le développement du diabète de type 1 a par ailleurs été confirmé chez le rat[278].

Un lien a été également révélé entre des altérations de la barrière intestinale, les bactéries et certains désordres neurologiques comme la sclérose en plaques, qui consiste en une démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau, de la moelle épinière et du nerf optique[256]. L'implication des bactéries dans l'étiologie de la sclérose en plaques a été suggérée par la découverte de peptidoglycane dans des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) dans le cerveau de patients atteints et pas chez les contrôles[279]. Il a en fait été mis en évidence un mimétisme moléculaire entre des peptides encéphalitogéniques et des peptides retrouvés dans des bactéries commensales intestinales (*Bifidobacterium longum*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides* spp., *Chlamidophila pneumoniae*)[262].

Des modifications de la charge antigénique dues à une altération de la barrière épithéliale intestinale sont également suggérées comme facteurs déclenchants dans l'autisme[280].

Par ailleurs, l'arthrite rhumatoïde est aussi associée à des anomalies de perméabilité intestinale chez le jeune adulte en particulier[281]. Des infections par des bactéries intestinales, appartenant aux genres *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia*, précèdent le développement de l'arthrite. Ces infections peuvent provoquer des réactions autoimmunes au niveau des articulations[282]. De plus, des altérations dans la composition du microbiote intestinal ont été rapportées chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, avec moins de bactéries du genre *Bifidobacterium*, du groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, du sous-groupe *Bacteroides fragilis* et du groupe *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides*, dans la flore fécale[283].

Par ailleurs, des infections à *Chlamydia* ou *Helicobacter pylori*, augmentent les risques de maladies cardiovasculaires[258, 284]. Une augmentation de la perméabilité intestinale et également une présence accrue de biofilms bactériens ont été démontrées chez des patients souffrant de défaillance cardiaque chronique, rendant plausible un rôle de la flore bactérienne intestinale dans ces pathologies[285]. La possible contribution du microbiote buccal et intestinal dans la formation des plaques d'athérome a par ailleurs été suggérée par l'équipe de Fredrik Bäckhed, qui a retrouvé dans ces plaques des bactéries buccales et intestinales, avec de plus une corrélation entre certains membres du microbiote intestinal (famille *Lachnospiraceae*) et des marqueurs d'athérosclérose (cholestérol et LDL cholestérol)[286].

Pour ce qui concerne les allergies, l'accroissement de son incidence dans les pays développés depuis quelques années, suggère également l'implication de facteurs environnementaux[257, 287]. L'hypothèse hygiéniste est ici largement avancée. L'excès d'hygiène dans ces pays a conduit à la diminution des stimuli infectieux d'origine environnementale, perturbant le développement de sous populations de lymphocytes, particulièrement celle des Treg[56, 259, 288].

L'implication des infections dans l'étiologie du cancer a aussi attiré l'attention des chercheurs ces dernières années. Environ un quart des cancers montrent des associations avec des agents infectieux viraux ou bactériens[289]. Ces infections établissent en fait des conditions inflammatoires altérant les réponses immunitaires locales, et en conséquence l'homéostasie des tissus. Un microenvironnement inflammatoire contribue à la prolifération et à la survie des cellules malignes, promeut l'angiogenèse et les métastases, subvertit les réponses immunitaires adaptatives, et altère les réponses aux hormones et aux agents chimiothérapeutiques[290]. Les infections chroniques de la muqueuse gastrique par *H. pylori* activent des voies cellulaires qui conduisent à des changements dans la production de Muc2 et dans la structure de l'épithélium

(métaplasie et prolifération)[291]. Les relations entre le microbiote et l'épithélium mucosal évoluent ainsi progressivement en raison de changements d'adhérence et d'intégrité de la barrière mucosale. Certaines bactéries sont capables de modifier la perméabilité mucosale, ce qui facilite la translocation de bactéries et de toxines bactériennes (LPS). Les réponses inflammatoires induites peuvent alors accélérer la progression du cancer[292]. L'implication de la flore intestinale dans la carcinogenèse colorectale a été confirmée chez le rat, qui développe moins de tumeurs et des tumeurs plus petites en conditions d'axénicité. Les rats qui ne développent pas de cancer présentent également une meilleure réponse immunitaire anticancéreuse. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse qu'une plus faible charge antigénique et l'absence d'inflammation physiologique, peut améliorer les performances des rats axéniques à développer des réponses immunitaires antitumorales plus efficaces[293].

Dans certaines conditions, des facteurs environnementaux parmi lesquels l'alimentation, ainsi que des facteurs endogènes, comme l'inflammation chronique[294, 295] ou le vieillissement[133, 134], peuvent induire au niveau du microbiote intestinal une orientation vers un profil pathogénique, généralement caractérisé par un appauvrissement de la diversité phylogénétique et fonctionnelle[119].

Le déséquilibre de la flore intestinale observé chez les individus obèses[95], ainsi que la disparition progressive de groupes bactériens dominants dans les pays développés[117], constituent deux exemples remarquables de perturbations du mutualisme hôte-microbiote causées par un stress environnemental. L'absorption accrue de matières grasses peut avoir un impact dramatique sur les communautés bactériennes intestinales. Selon les travaux de Peter J. Turnbaugh et ses collègues, la flore intestinale d'individus obèses, quand elle est comparée à celle d'individus maigres, est moins diverse et caractérisée par une augmentation de l'abondance des phyla *Firmicutes* et *Actinobacteria* et une diminution de l'abondance du phylum *Bacteroidetes*[95]. Néanmoins, une autre étude a révélé qu'aucune relation n'existait entre l'abondance du phylum *Bacteroidetes* dans les fèces et l'obésité[296]. Et par ailleurs, une autre étude a mis en évidence au contraire, une diminution du ratio *Firmicutes* sur *Bacteroidetes* chez des sujets obèses ou en surpoids[297]. Ce manque de consensus pouvait suggérer que le lien entre le microbiote et l'obésité doit être envisagé au-delà du simple ratio entre les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, en prenant en compte plutôt le microbiome. Cette hypothèse a été récemment confirmée par une étude comparative entre les microbiomes de maigres et d'obèses[298]. En réponse à une moindre diversité environnementale, le microbiome de type obèse serait enrichi en gènes impliqués dans le métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des acides aminés, démontrant une

augmentation des capacités fermentaires[299]. La régulation de la production intestinale du facteur FIAF (pour fast induced adipocyte factor) par le microbiote intestinal, a aussi été avancée comme contrôlant la lipoprotéine synthase circulante et favorisant ainsi le stockage des triglycérides dans le foie[300]. En outre, la transplantation d'une flore de souris obèse dans une souris axénique, conduit à une augmentation de masse grasse plus importante qu'après la transplantation de la flore d'une souris maigre, démontrant que le microbiote intestinal associé à l'obésité peut contribuer significativement à la sévérité de la maladie en optimisant l'extraction d'énergie à partir de l'alimentation[301]. Néanmoins, ces résultats ont été ensuite contredits. L'absence de microbiote intestinal chez des souris axéniques ne constitue pas, en effet, une protection envers l'induction nutritionnelle de l'obésité, et la production intestinale des facteurs FIAF et ANGPTL4 (pour angiopoietin-like 4) ne joue pas de rôle causal dans la prise de poids[302], contrairement à ce qui a été publié précédemment par Fredrik Bäckhed[300]. Par ailleurs, une autre étude rapporte une augmentation significative du phylum *Firmicutes* seulement chez des souris nourries avec un régime gras, mais pas chez des souris ob/ob. Ces changements de microbiote sont de plus totalement dissociés de marqueurs d'extraction de l'énergie par les bactéries (SCFA), et reflètent uniquement l'impact du changement de régime alimentaire[303], comme par ailleurs déjà démontré dans une autre étude où un régime gras détermine la composition du microbiote intestinal chez la souris indépendamment du développement de l'obésité[304]. La pandémie d'obésité dans les pays développés reflète ainsi l'impact de changements environnementaux et de style de vie, associés à des facteurs alimentaires qui jouent un rôle primordial[305-308]. Dans ce scénario, ce sont les changements du microbiote liés à l'alimentation, qui sont probablement impliqués dans l'étiologie et la sévérité de l'obésité[95, 299, 309, 310].

Le sous-chapitre suivant décrit plus précisément une des conséquences de la perte de l'homéostasie mucosale intestinale : la translocation bactérienne. Ce processus revêt en effet une importance primordiale dans l'ensemble de mes travaux de thèse.

La translocation bactérienne : où se situe vraiment l'interface hôte-microbiote ?

La translocation bactérienne est définie initialement comme le passage de bactéries viables depuis l'intestin vers des sites extraintestinaux, comme les MLN, le foie, la rate, les reins et le sang circulant. Ce processus ne concerne pas seulement des bactéries vivantes et peut être étendu à la translocation de composants bactériens pro-inflammatoires (PAMP) comme les LPS[311].

Toutes les espèces bactériennes ne sont pas concernées au même titre par la translocation. Les espèces *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ainsi que d'autres membres de la famille *Enterobacteriaceae*, ou des genres *Enterococcus* et *Streptococcus* sont les plus aptes à transloquer de la lumière intestinale vers les MLN[312]. Les espèces anaérobies dominent largement les espèces aéro-anaérobies dans le microbiote intestinal. Néanmoins, les espèces anaérobies ne transloquent qu'en cas de lésions muqueuses importantes ou de déficits immunitaires majeurs (neutropénie, lymphopénies thérapeutique ou infectieuse)[313]. Les espèces anaérobies sont plutôt impliquées dans le mécanisme de résistance à la colonisation à la surface mucosale. Elles exercent un « effet de barrière » limitant la croissance et la colonisation par des espèces susceptibles de translocation efficace. Ainsi, l'élimination sélective des espèces anaérobies facilite la surcroissance, la colonisation et la translocation des espèces aéro-anaérobies[314].

La surcroissance bactérienne est la cause principale de translocation bactérienne. Chez la souris, une corrélation directe existe ainsi entre l'importance numérique des espèces présentes dans la lumière intestinale et le nombre de bactéries vivantes appartenant à ces espèces présentes dans les MLN[312], particulièrement s'il s'agit de bactéries adhérentes[315].

On considère généralement que le cæcum et le côlon sont les sites majeurs de translocation car la densité bactérienne y est maximale. Cependant l'épithélium colique est très bien défendu contre les bactéries, avec une couche de mucus très épaisse et des jonctions serrées « très serrées »[5]. En fait, l'inoculation en concentrations équivalentes d'*E. coli* dans l'intestin grêle et dans le côlon, montre que les bactéries transloquent préférentiellement dans l'intestin grêle[316]. Des études cliniques confirment que la surcroissance bactérienne dans l'intestin grêle, est associée avec une accentuation de la translocation bactérienne et de la morbidité chez des patients en soins intensifs[317].

Suivant la voie initiale de translocation, le cheminement des bactéries est ensuite différent. Dans des modèles où la perméabilité des jonctions serrées est augmentée ou en cas d'atteinte physique de la muqueuse épithéliale, les bactéries transloquent par une voie intercellulaire (paracellulaire) entre les cellules épithéliales pour atteindre directement le sang circulant. Le passage de bactéries par voie paracellulaire a été décrit dans certaines situations pathologiques, de colite et d'obstruction expérimentales[318-320]. Une augmentation de la perméabilité paracellulaire a été également démontrée *in vitro* avec des cellules épithéliales humaines challengées avec du LPS[190]. Par contre, dans des modèles où l'intégrité physique de la barrière intestinale n'est pas altérée, les bactéries transloquent par une voie intracellulaire (transcellulaire) à travers les cellules épithéliales intestinales pour ensuite atteindre les MLN via la circulation lymphatique[83]. Une augmentation

de la translocation de bactéries non pathogènes par voie transcellulaire a été rapportée dans les cellules épithéliales intestinales, dans des conditions inflammatoires ou de stress métabolique : faible dose d'IFN- γ [321], faible dose de TNF- α au cours d'une carence en glutamine[321], découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale[322, 323], faible dose d'oxyde nitrique[324, 325] et hypoxie[326]. D'autres études ont rapporté l'internalisation de LPS et sa fixation à des récepteurs intracellulaires dans des entérocytes murins en culture[49]. Par ailleurs, le pathogène *Campylobacter jejuni* pénètre dans les cellules épithéliales et entraîne l'internalisation et la translocation d'*E. coli* non pathogène selon un mécanisme impliquant des radeaux lipidiques[327]. La comparaison des deux modes de translocation a conduit finalement à conclure que la voie transcellulaire semble être privilégiée[5]. Chez l'homme, la positivité des cultures de sang portal n'a en effet pas de valeur prédictive pour la survenue d'un dysfonctionnement multi-organes[328]. Par contre, les complications septiques observées chez des patients opérés pour infection abdominale, sont plus fréquentes chez ceux dont les MLN sont positifs[329]. Ainsi, les MLN semblent être le site principal de collecte des bactéries suivant leur translocation, impliquant le réseau lymphatique entérique comme trajectoire principale de dissémination après translocation bactérienne[330].

Par ailleurs, la translocation bactérienne est aussi un phénomène physiologique. Elle peut survenir chez des sujets en bonne santé et est sans doute un événement physiologique sans conséquences délétères, reflétant le mutualisme établi par la co-évolution homme-microbes. Des bactéries peuvent ainsi être cultivées à partir des MLN chez l'homme sain, dans 5 à 10% des cas[331]. La translocation de LPS et de peptidoglycane jusque dans les MLN, représente d'ailleurs un stimulus physiologique nécessaire au développement du système immunitaire et à l'établissement d'une inflammation physiologique, indispensable au maintien d'un état de vigilance mucosal, ainsi que déjà décrit plus haut. Dans des conditions physiologiques, même si les bactéries peuvent traverser la barrière épithéliale intestinale, elles doivent être détruites par les phagocytes avant de pouvoir atteindre la circulation. Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin ainsi que les phagocytes recrutés, jouent alors un rôle majeur dans le contrôle de la translocation bactérienne. Les MLN ont ainsi un rôle clé dans la protection ultime contre la dissémination systémique des bactéries[5]. Et la véritable frontière entre les tissus stériles et non stériles, en dehors de tout état pathologique, se situe alors dans un site extraintestinal : les MLN.

Examinons maintenant le potentiel thérapeutique de stratégies visant à manipuler le microbiote, pour une homéostasie mucosale intestinale.

Potentiel thérapeutique de la manipulation du microbiote intestinal

L'intérêt croissant pour les effets du microbiote sur la santé humaine a conduit à essayer d'optimiser sa composition par des mesures nutritionnelles ou avec des probiotiques, prébiotiques ou les deux (synbiotiques)[332]. Les effets des probiotiques dépendent des espèces et des souches utilisées. Ce sont principalement des bactéries lactiques (*Lactobacillus* spp. et *Bifidobacterium* spp.), mais aussi des espèces de la famille des *Enterococcaceae* ou l'espèce *E. coli* ainsi que des levures. Les prébiotiques sont des composés qui contribuent à la prolifération des bactéries bénéfiques dans l'intestin et comprennent quelques oligosaccharides ou polysaccharides à chaînes courtes comme l'inuline. Les probiotiques influencent favorablement le développement et la stabilité du microbiote, inhibent la colonisation par les pathogènes, renforcent la barrière intestinale par des effets trophiques, protègent envers un stress physiologique et stimulent des composantes spécifiques et non spécifiques du système immunitaire[184, 333-339]. Bien que les effets des probiotiques et prébiotiques soient largement étudiés, les études cliniques bien contrôlées qui démontrent des effets thérapeutiques ou préventifs des probiotiques sont rares. Néanmoins des effets sont bien documentés dans les thérapies de la pochte, de la diarrhée, du syndrome du côlon irritable et de l'entérite à rotavirus[256]. Une diminution des symptômes dans le cadre du syndrome du côlon irritable a été obtenue chez l'homme, par ailleurs, avec différentes souches probiotiques[340-342]. Les effets des probiotiques ont été largement étudiés dans la thérapie de l'allergie mais sans résultats concluants[343]. Un effet préventif à long terme des probiotiques, a néanmoins été démontré vis-à-vis du développement de l'allergie[344]. Par contre, les effets des probiotiques sur les maladies autoimmunes et le cancer ont été beaucoup moins étudiés que dans le domaine de l'allergie et des maladies intestinales[345, 346].

Dans le cadre de l'obésité, la chirurgie bariatrique permet une perte de poids importante ainsi qu'une amélioration du statut métabolique et inflammatoire[347]. La composition du microbiote intestinal est également modifiée par cette chirurgie. Avant la chirurgie, la flore contient une grande quantité de bactéries de la famille *Prevotellaceae* qui sont productrices d'hydrogène, en association avec un grand nombre d'*Archea* méthanogènes qui utilisent l'hydrogène[348]. Le transfert d'hydrogène entre les deux types de bactéries augmente la captation d'énergie par l'intestin car plus de SCFA sont présents[349]. Après la chirurgie, la quantité de ces deux types de bactéries est diminuée. Ainsi, les interventions chirurgicales de ce type ont un effet important sur la composition du microbiote intestinal et en particulier sur la présence de SCFA. Néanmoins, le statut de malnutrition induit par un bypass gastrique surpasse les effets subtils du microbiote dans

la réversion de l'obésité et du diabète de type 2[350]. Par contre, les études concernant l'effet de probiotiques sur l'obésité chez l'homme sont rares. L'une d'elles rapporte de manière intéressante, une diminution du développement de l'obésité chez des enfants dont les mères ont été traitées avec le probiotique *Lactobacillus gasseri* pendant quatre semaines avant la naissance, puis pendant six mois après[351]. Une efficacité thérapeutique de *Lactobacillus gasseri* a également été démontrée chez des adultes obèses, qui montrent une réduction de leur masse grasse abdominale et sous-cutanée en comparaison avec les patients ayant reçu un placebo constitué du même lait fermenté mais ne contenant pas le probiotique[352]. Par contre, les études expérimentales et cliniques sur l'effet des prébiotiques sur l'obésité sont plus nombreuses. Chez des souris nourries d'un régime gras complémenté en fructanes du type inuline (oligofructose), l'augmentation du nombre de *Bifidobacterium* spp. dans l'intestin est corrélée négativement avec la masse grasse, l'intolérance au glucose et l'endotoxémie[353]. La même équipe a précédemment démontré que ce type de prébiotique augmente le nombre de cellules L entéroendocrines dans le jéjunum et le côlon ainsi que la sécrétion de GLP-1 (glucagon-like peptide-1) et GLP-2 (glucagon-like peptide-2) dans la veine porte[354]. Le GLP-1 contribue ainsi aux effets prébiotiques en diminuant l'appétit, la masse grasse et la résistance à l'insuline hépatique, alors que le GLP-2 permet une réduction de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie qui sont associées à l'obésité[355, 356]. De plus, l'inuline augmente chez l'homme sain la sécrétion post-prandiale de GLP-1 et de GIP (gastric inhibitory peptide) après deux semaines de traitement[357]. Une autre étude clinique, menée cette fois sur des patients obèses recevant une complémentation en oligofructose pendant douze semaines, montre une perte de poids chez les patients traités en comparaison avec ceux recevant de la maltodextrine comme placebo[358].

Les mécanismes moléculaires des effets des probiotiques commencent à être élucidés chez l'homme grâce à l'analyse des changements induits dans le transcriptome. Une étude réalisée au niveau de la muqueuse du duodénum chez l'homme sain, montre une modulation des voies dépendantes de NF- κ B avec une corrélation avec l'établissement d'une tolérance immune vis-à-vis des bactéries commensales, après la consommation de *Lactobacillus plantarum*[359].

Par ailleurs les bactéries lactiques (*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp.), utilisées depuis des millénaires dans la production d'aliments fermentés, sont de bonnes candidates pour le développement de nouvelles stratégies de vectorisation orale et constituent des alternatives attractives aux stratégies vaccinales basées sur des bactéries pathogènes atténuées dont l'utilisation présente des risques sanitaires. De plus, ce mode de délivrance mucosal permet d'augmenter la disponibilité des molécules pour les cellules cibles[360] ainsi que l'efficacité des

antigènes sur l'induction de la tolérance[361], ce qui permet de diminuer la dose efficace ainsi que la quantité d'antigène à purifier. L'équipe de Philippe Langella a ainsi démontré avec succès le potentiel thérapeutique de souches de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) recombinantes dans différents modèles animaux, avec une régression de tumeurs induites par le papillomavirus humain de type 16 chez la souris après un challenge nasal avec *L. lactis* délivrant l'antigène E7 du papillomavirus, avec une prévention partielle de l'allergie à la beta-lactoglobuline chez la souris après immunisation orale ou intranasale via *L. Lactis*, ou avec encore une régulation du poids et de la prise alimentaire chez la souris ob/ob challengée avec *L. lactis* délivrant de la leptine humaine[361]. Des effets intéressants ont été également observés dans un modèle de colite chez la souris avec l'utilisation orale de *L. Lactis* sécrétant de l'IL-10[362], des peptides trifoliés qui sont impliqués dans la protection et la réparation mucosales[363] ou encore des anticorps anti-TNF[362].

L'utilisation de bactéries probiotiques recombinantes exprimant des molécules biologiquement actives, comme des allergènes pouvant induire une tolérance et inhiber des réponses allergiques, ou des molécules efficaces dans le cadre de l'obésité ou des maladies inflammatoires intestinales, représente ainsi une voie thérapeutique innovante[364, 365]. Le recours thérapeutique à des synbiotiques s'avère également prometteur dans divers domaines médicaux. Il reste néanmoins nécessaire, au préalable, de déterminer plus précisément le rôle du microbiote intestinal dans l'étiologie des maladies humaines, afin de choisir les souches probiotiques et leurs compléments prébiotiques les plus efficaces[366].

Le dernier chapitre de cette introduction bibliographique aborde maintenant le diabète de type 2 .

Le diabète de type 2

L'élément central de l'environnement d'un organisme vivant réside dans les flux d'énergie. L'environnement énergétique d'un système biologique est constitué par l'équilibre entre l'énergie disponible et les besoins nécessaires pour la survie et la reproduction de ce système[367]. De nos jours, la source primaire d'énergie sur Terre provient du flux de photons à haute énergie émis par le Soleil. Ces photons sont collectés par les chloroplastes des plantes, descendants de cyanobactéries symbiotiques, et permettent la fixation du carbone pour générer du glucose et des hydrates de carbone complexes. Les animaux mangent les plantes, décomposent les hydrates de carbone en composés qui entrent dans les mitochondries, descendants d'alpha-protéobactéries symbiotiques, où ils sont transformés en énergie[368]. Toutes les activités cellulaires comme les biosynthèses, le transport d'ions et de molécules à travers les membranes cellulaires, les mouvements intracellulaires (migration des chromosomes lors des divisions cellulaires, transport de molécules au sein de la cellule) ou les mouvements des cellules elles-mêmes lors de la contraction musculaire, nécessitent de l'énergie. Les cellules utilisent presque exclusivement l'énergie chimique de l'adénosine triphosphate (ATP). Le principal substrat dans la production d'ATP étant le glucose, les cellules de notre organisme ont besoin d'un approvisionnement continu en glucose. Ainsi, malgré les fluctuations des apports alimentaires dans la journée, le taux sanguin de glucose (glycémie) varie dans des limites compatibles avec la vie. Le maintien de l'homéostasie glucidique met en jeu un ensemble de mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires dont le but est d'ajuster la glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L. Le diabète résulte d'une anomalie de l'homéostasie glucidique et se définit par deux mesures d'une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L.

Le diabète de type 1, anciennement appelé diabète insulino-dépendant est habituellement découvert chez les sujets jeunes et se développe suite à la destruction sélective des cellules bêta productrices d'insuline dans les îlots de Langerhans. Cette pathologie nécessite un suivi quotidien de la glycémie et l'injection d'insuline à action rapide et prolongée. Quant au diabète de type 2, il apparaît classiquement chez l'adulte, mais aussi chez l'enfant obèse, et requiert une perte de poids, un traitement anti-diabétique oral, avec une évolution qui peut nécessiter des injections d'insuline. Néanmoins, les stratégies thérapeutiques actuelles ne parviennent pas à enrayer la progression continue de cette pathologie. De nouvelles cibles sont alors à envisager.

Evoquons dans un premier temps l'impact économique et humain des diabètes.

Les coûts du diabète

Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse d'augmenter et ceci dans tous les pays. En 2011, 366 millions de personnes présentaient un diabète et ce chiffre devrait atteindre 552 millions en 2030 si aucune mesure urgente n'est mise en œuvre d'ici là. De plus, 280 millions de personnes étaient diagnostiquées comme intolérantes au glucose en 2011, l'estimation pour 2030 s'élevant à 398 millions[369]. Le diabète a causé en 2011, la mort de 4,6 millions de personnes entre 20 et 79 ans, ce qui représente 8,2% de toutes les causes de mortalité pour cette tranche d'âge. De plus, 183 millions de cas de diabète n'ont pas été diagnostiqués en 2011, soit 50% des cas recensés. Traditionnellement considéré comme une maladie de pays riches, les estimations de prévalence pour l'année 2011 montrent que 80% des diabétiques vivent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire, avec un lourd tribut payé notamment par la Chine et l'Inde[370].

Le diabète de type 2 représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde et son impact économique est du surtout à ses complications : maladies cardiovasculaires, rétinopathie, défaillance rénale et pied diabétique. Ainsi, la réduction de l'impact du diabète, doit passer par des mesures de prévention hygiéno-diététiques, un diagnostic ciblé précoce du diabète de type 2, avec un suivi et un traitement de qualité pour retarder l'apparition des complications[371].

Selon les estimations d'une étude récente de la London School of Economics[372], la prévalence du diabète de type 2 en France était de 8,4% en 2007, puis de 9,4% en 2010, causant la mort de 30168 personnes en 2007 et 30427 en 2010[373] [374].

Entre 2000 et 2008, les dépenses totales de santé ont augmenté de 49% en France. Elles représentaient 216 milliards d'euros en 2008, soit 11% du PIB.

Les coûts directs du diabète, comprenant principalement les dépenses d'hospitalisation et de soins ambulatoires, atteignaient 12,9 milliards d'euros en 2010, avec 37,2% en frais d'hospitalisation (4,2 milliards d'euros), 36% en soins ambulatoires (4,6 milliards d'euros) et 26,8% en médicaments (3,5 milliards d'euros)[372].

Par contre, l'évaluation exhaustive des coûts indirects du diabète est difficile car les informations sont incomplètes. Néanmoins, Panos Kanavos et ses collègues[372], ont pu estimer le coût indirect du diabète dans l'Europe des 5 (Allemagne, France, Grande-Bretagne, Espagne, Italie) à 98,4 milliards d'euros en 2010, dont 12,6 milliards en France. Ces coûts couvrent l'absentéisme du à la maladie, le retrait prématuré de la vie active et les prestations sociales associées.

L'installation d'une réaction inflammatoire chronique de faible intensité est l'un des mécanismes cellulaires impliqués dans l'initiation du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 est une maladie inflammatoire

Le diabète de type 2 commence par une résistance à l'insuline, c'est-à-dire une réponse à l'insuline altérée de la part de ses tissus cibles[375].

L'insuline régule le métabolisme énergétique dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux[376]. Avant le repas, la libération de glucose par le foie permet de maintenir la concentration sanguine en glucose à un niveau normal. Le foie produit du glucose par glycogénolyse et gluconéogenèse. Après le repas, l'intestin devient la source principale de glucose et l'arrivée de glucose dans le pancréas y stimule la sécrétion d'insuline. Cette hormone régule le transport et le métabolisme du glucose dans ses tissus cibles qui sont le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. L'insuline supprime la production hépatique de glucose en inhibant la gluconéogenèse et la glycogénolyse tout en augmentant la synthèse de glycogène. Par ailleurs, l'effet le plus important de l'insuline sur le muscle squelettique est une augmentation de la capture et de l'utilisation du glucose. De plus, l'insuline inhibe la lipolyse et stimule la lipogenèse dans le tissu adipeux[6].

Sur un plan moléculaire, la fixation de l'insuline à son récepteur provoque l'autophosphorylation de celui-ci ainsi que la phosphorylation en tyrosine de substrats en aval, dont les substrats du récepteur de l'insuline (IRS). Cette dernière étape est importante pour la fixation des IRS au domaine SH-2 (sarcoma-homology 2) de la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Cette fixation active la sous-unité de la PI3K, qui catalyse ensuite la formation de phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3). La fixation de PIP3 à des protéines qui contiennent des domaines PH (pleckstrin-homology) conduit ensuite à leur activation. Puis l'activation de la protéine kinase dépendante du 3-phosphoinositide (PDK) 1, conduit à l'activation d'Akt (PKB), qui est une protéine kinase ciblant plusieurs protéines en aval. Akt phosphoryle les petites GTPases Rab et inactive AS160 (Akt substrate 160), ce qui initie une réorganisation du cytosquelette et conduit à la translocation de Glut-4 (glucose transporter-4) dans la membrane cytoplasmique et à l'entrée du glucose dans la cellule[6]. Une autre action d'Akt est la phosphorylation et la désactivation de la glycogène synthase kinase (GSK) 3, ce qui conduit à l'activation de la glycogène synthase et donc à la synthèse de glycogène. Akt contrôle également la transcription de gènes impliqués dans la gluconéogenèse et la lipogenèse[377]. Ainsi, l'effet global de la signalisation de l'insuline est une augmentation de l'entrée du glucose dans les cellules, une augmentation du flux de glucose dans les voies métaboliques intracellulaires dans le muscle et le tissu adipeux ainsi qu'une diminution de la gluconéogenèse hépatique[6].

La résistance à l'insuline se traduit par des dysfonctionnements dans la suppression de la production hépatique de glucose, dans la fourniture de glucose au muscle squelettique et également dans l'inhibition de la lipolyse. Ce qui se traduit par une hyperglycémie relative et une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés[378]. En réponse à une hyperglycémie relative, les cellules beta pancréatiques compensent en sécrétant d'avantage d'insuline. L'hyperinsulinémie augmente ainsi la capture de glucose par le muscle squelettique et inhibe la production hépatique de glucose afin de maintenir la glycémie à un niveau normal. Les individus présentant une résistance à l'insuline régulent leur glycémie en surproduisant de l'insuline. Mais à long terme, la résistance à l'insuline ainsi que son hypersécrétion peuvent conduire à une dégénérescence des cellules beta du pancréas. Cette défaillance des cellules beta se traduit d'abord par une intolérance au glucose qui peut évoluer vers une hyperglycémie avérée et un diabète de type 2[379].

Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans la résistance à l'insuline. Par exemple, la régulation négative au niveau protéique, du récepteur de l'insuline dans l'obésité[377], ou des IRS[6], peut résulter en une résistance à l'insuline. L'hyperinsulinémie elle-même, peut réduire la quantité d'IRS au niveau transcriptionnel. De plus, les cytokines pro-inflammatoires altèrent la signalisation de l'insuline dans les tissus sensibles (**Figure 11**). Par exemple, SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), molécule agissant en aval de la signalisation de l'IL-6, peut bloquer l'interaction entre le récepteur de l'insuline et les IRS[380]. La phosphorylation des IRS sur des résidus sérine, par le biais de la signalisation des acides gras saturés et des cytokines[381], ainsi que par l'activation de voies inflammatoires dépendantes de NF- κ B[382], est aussi connue pour induire une résistance à l'insuline. SOCS1 et SOCS3 sont également connus comme pouvant conduire à la dégradation des IRS[383]. Par ailleurs, une surexpression de la sous-unité régulatrice de la PI3K est aussi associée à une résistance à l'insuline[384].

Les causes de la résistance à l'insuline et du diabète sont génétiques ou acquises. Néanmoins, le génome n'expliquant que 10 à 20% de la maladie, les facteurs environnementaux comme l'alimentation et l'hygiène de vie semblent avoir un impact majeur[385]. Les mécanismes avancés majoritairement pour expliquer la résistance à l'insuline et le dysfonctionnement des cellules beta pancréatiques, sont le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique, les dépôts amyloïdes dans le pancréas, les dépôts graisseux ectopiques dans le muscle, le foie et le pancréas, ainsi que la lipotoxicité et la glucotoxicité[386]. Tous ces stress peuvent être provoqués par des excès alimentaires[387-391]. Chacun de ces stress cellulaires est susceptible d'induire une réponse inflammatoire, d'être exacerbé par une inflammation ou d'y être associé[392-395], ce qui confère

à l'inflammation un rôle prépondérant dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.

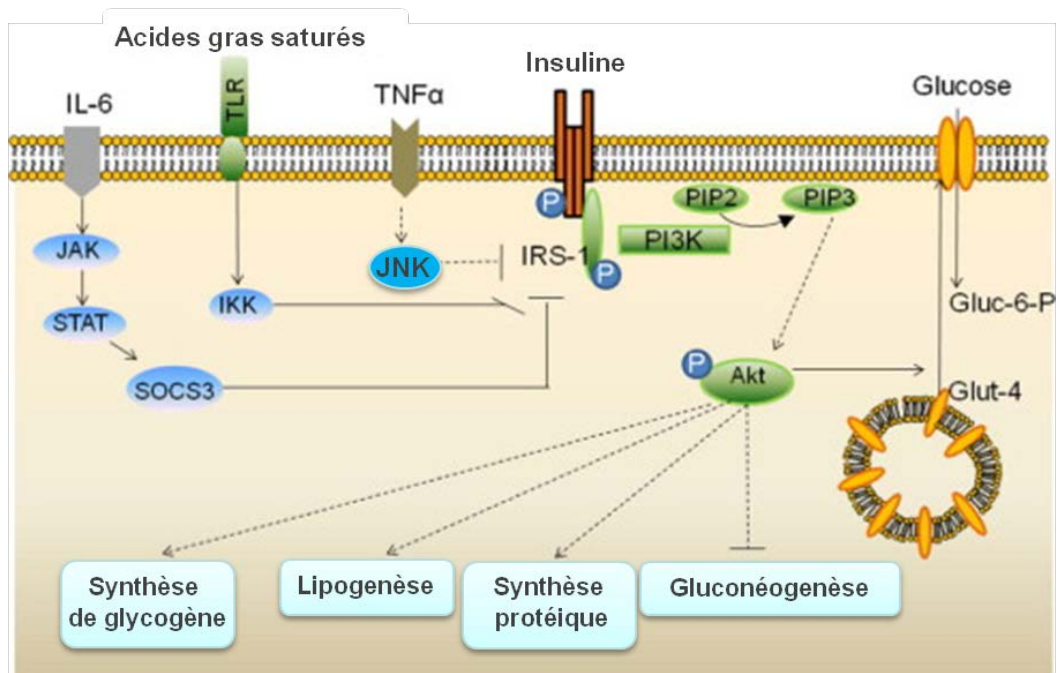


Figure 11 : Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline[6]. L'insuline se lie à son récepteur, ce qui induit l'autophosphorylation de celui-ci sur des résidus tyrosine. Ceci déclenche une cascade de signalisation qui finalement active la phosphorylation et l'activation d'Akt (proteine kinase B), ce qui inhibe la gluconéogenèse et stimule la synthèse de glycogène, de protéines et de lipides. Les cytokines pro-inflammatoires et les acides gras saturés activent des sérine/thréonine kinases intracellulaires, telles que JNK (c-Jun N-terminal kinase) et IKK (I κ B kinase), qui inactivent IRS-1 (insulin receptor substrate-1) en le phosphorylant sur des résidus sérine. SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) inhibe aussi l'activation d'IRS-1, altérant ainsi la signalisation normale de l'insuline.

Les évidences associant diabète et inflammation sont nombreuses et remontent au début du siècle dernier. La première indication que le diabète pouvait être associé à une inflammation chronique de bas niveau remonte à l'observation d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose par un traitement anti-inflammatoire à base de salicylates[396]. Il fut montré par la suite que les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , inhibent la réponse à l'insuline dans les adipocytes, ce qui a permis de faire le lien entre l'inflammation et les voies du métabolisme énergétique[397-399]. Ensuite, des niveaux circulants élevés pour des protéines de phase aiguë, comme la CRP (C-reactive protein), l'haptoglobuline, le fibrinogène, PAI (plasminogen activator inhibitor), SAA (serum amyloid A), l'acide sialique, ainsi que pour des cytokines et chimiokines, ont été révélés chez des patients atteints de diabète de type 2[400-403].

De plus, des niveaux élevés en IL-1 β , IL-6 et CRP dans le plasma humain, sont prédictifs du diabète de type 2[401-404]. Ainsi, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont maintenant reconnus en tant que maladies chroniques inflammatoires.

La plupart des stress métaboliques qui conduisent à une résistance à l'insuline, activent également les kinases IKK β et JNK. IKK β active ensuite le facteur de transcription NF- κ B et conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-1 β), qui peuvent promouvoir une résistance à l'insuline dans le foie et le tissu adipeux, et être transportées par la circulation vers d'autres sites comme la paroi des vaisseaux, les muscles squelettiques et cardiaque, les reins et les leucocytes circulants[382, 405, 406]. En fait, le TNF- α et l'IL-1 β , produits en réponse à l'activation de NF- κ B, activent aussi JNK et NF- κ B. Par ailleurs, les acides gras libres ainsi que les AGE (advanced glycation end-products) activent des voies convergeant aussi vers IKK β -NF- κ B et JNK, via respectivement des récepteurs du type TLR et RAGE (receptor for advanced glycation end-products)[407]. Dans le foie et le tissu adipeux, ce sont les leucocytes qui comptent le plus dans la production de cytokines[386].

La voie NF- κ B est aussi activée dans les cellules beta des îlots de Langerhans à travers l'action du glucose et de l'IL-1 β . Ainsi, l'inhibition de NF- κ B protège les cellules beta des effets de la glucotoxicité et de la streptozotocine (agent chimique toxique pour les cellules beta)[408, 409]. Les peptides amyloïdes dans le pancréas induisent la sécrétion des chimiokines MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) et CXCL1 [chemokine (C-X-C motif) ligand 1] qui permettent le recrutement de macrophages dans les îlots de Langerhans selon une voie dépendante du récepteur de l'IL-1 (IL-1R) et de MyD88[410]. L'inflammation est ensuite aggravée par l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3). Alors que l'inflammation des îlots est due à une réaction autoimmune dans le diabète de type 1, elle résulte ainsi d'une autoinflammation dans le diabète de type 2, avec la voie de l'IL-1 β qui est commune aux deux types de diabète[386]. La susceptibilité particulière des cellules beta à l'IL-1 β dans le diabète de type 2 est due en partie à un manque de mécanismes anti-inflammatoires, avec notamment une diminution de l'expression de l'IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) dans les îlots de patients diabétiques qui serait induite par la leptine[411]. L'inflammation des îlots pancréatiques est un phénomène précoce dans le développement du diabète de type 2, qui se produit au moment où la fonction des cellules beta décline, l'augmentation de leur masse totale permettant de compenser ce phénomène[412].

Dans le tissu adipeux, bien que les adipocytes ainsi que les macrophages recrutés contribuent à l'inflammation responsable de la résistance à l'insuline[405], ce sont les macrophages qui

contribuent majoritairement à l'augmentation de la production de facteurs pro-inflammatoires dans l'obésité[413, 414], leur nombre étant corrélé positivement avec le degré d'obésité[386]. Il a été constaté chez la souris nourrie d'un régime gras, que les macrophages récemment recrutés dans le tissu adipeux en expansion, présentent un phénotype activé pro-inflammatoire, dit M1, et produisent du $\text{TNF-}\alpha$ et de l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) alors que les macrophages résidants dans le tissu adipeux des souris maigres ont un phénotype plutôt anti-inflammatoire, dit M2, et produisent notamment de l'IL-10[415]. A l'état physiologique, chez la souris mais également chez l'homme, le tissu adipeux renferme une population de macrophages de type M2 maintenue grâce à la présence de cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) sécrétées par différents types cellulaires (lymphocytes, éosinophiles et adipocytes). Les acides gras polyinsaturés oméga-3 contribuent également à l'induction de cette réponse anti-inflammatoire. Dans le cadre de l'obésité, par contre, les adipocytes sont stressés et produisent des médiateurs pro-inflammatoires (MCP1, $\text{TNF-}\alpha$ et acides gras saturés) qui induisent le recrutement de macrophages M1 qui produisent, via l'activation du facteur de transcription NF- κ B, du $\text{TNF-}\alpha$ et de l'IL-1 β qui activent une voie dépendante de JNK dans les adipocytes pour y induire une résistance à l'insuline[416].

Le foie est également affecté par l'obésité avec le développement d'une stéatose qui peut évoluer vers une hépatite stéatosique non alcoolique, une fibrose et une cirrhose, l'inflammation jouant un rôle majeur dans ce processus. Une augmentation de l'adiposité est corrélée positivement avec l'expression de gènes pro-inflammatoires dans le foie[382]. Ceci suggère que l'accumulation de lipides dans les hépatocytes (stéatose) induit une réponse inflammatoire subaigüe à l'image de ce qui se passe dans le tissu adipeux suite à l'accumulation de lipides. Par ailleurs, des agents pro-inflammatoires issus du tissu adipeux viscéral (cytokines et acides gras libres), arrivant par la veine porte, peuvent initier une inflammation au niveau du foie[405]. Contrairement au tissu adipeux, où le nombre de macrophages augmente avec l'expansion du tissu adipeux, le foie est peuplé à l'état physiologique d'une population dense de cellules de Kupffer, qui sont activées en cas de stéatose hépatique[382]. Dans le foie, d'autres cellules immunitaires peuvent potentiellement jouer un rôle dans l'inflammation conduisant à la résistance à l'insuline : les lymphocytes T et B, les lymphocytes NK (natural killer), les cellules dendritiques[417]. Les lymphocytes NK semblent d'ailleurs avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la stéatose hépatique et de l'intolérance au glucose chez la souris ob/ob[418].

Le muscle est aussi un site majeur de résistance à l'insuline au cours du diabète de type 2. Néanmoins, le muscle squelettique ne semble pas constituer un site d'initiation d'une inflammation menant à une résistance à l'insuline, mais plutôt une cible[405].

Au niveau de l'organisme, l'augmentation de la masse grasse conduit à l'activation de réponses pro-inflammatoires dans le tissu adipeux et le foie, avec la production associée de cytokines et chimiokines. Des cellules immunitaires (monocytes et macrophages) sont recrutées et/ou activées, ce qui conduit à une résistance à l'insuline locale. L'arrivée d'acides gras et de cytokines en provenance du tissu adipeux viscéral, dans le foie via le système porte, contribue également à l'inflammation et à la résistance à l'insuline hépatique. Des médiateurs pro-inflammatoires sont ainsi produits dans le foie, le tissu adipeux et les cellules immunitaires associées, et disséminés dans la circulation systémique, pour promouvoir une résistance à l'insuline dans les tissus comme le muscle squelettique ou les reins[405] (**Figure 12**).

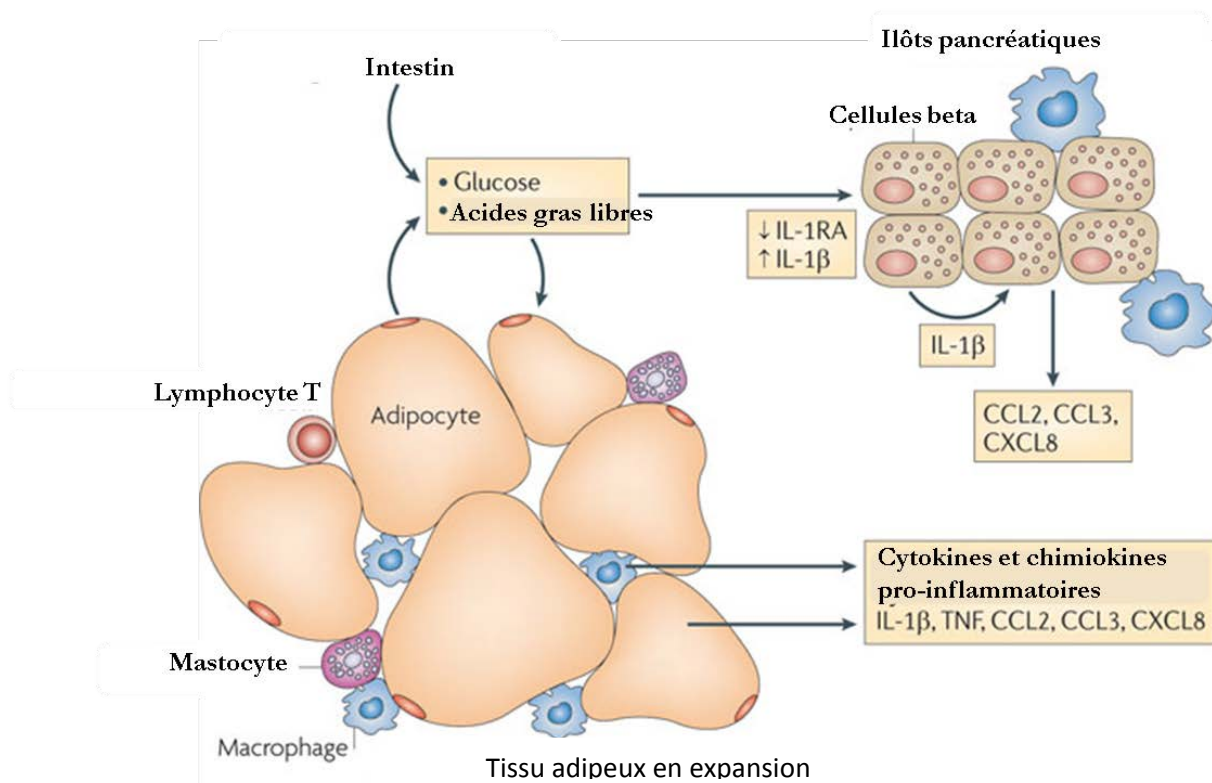


Figure 12 : Développement de l'inflammation dans le diabète de type 2 (d'après[394]). Un excès de nutriments, glucose et acides gras libres, provoquent un stress dans les îlots pancréatiques et les tissus sensibles à l'insuline comme le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique, conduisant à la production et sécrétion locale de cytokines et chimiokines. De plus, la production d'IL-1RA par les cellules beta est diminuée. Ce qui résulte en un recrutement de cellules immunitaires qui contribuent à l'inflammation du tissu. La libération de cytokines et chimiokines dans la circulation par le tissu adipeux, provoque l'inflammation d'autres tissus, y compris les îlots de Langerhans.

Evaluons maintenant quelle peut-être l'implication du microbiote intestinal dans l'inflammation métabolique à l'origine de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.

Microbiote intestinal et diabète de type 2

Une activation du système immunitaire ainsi qu'une inflammation systémique de bas niveau caractérisent le diabète de type 2, ainsi que l'obésité et l'athérosclérose[419-421]. Par ailleurs, un lien avec la composition du microbiote intestinal est mis en évidence dans ces pathologies. Bien que le diabète de type 2 soit très souvent étudié en tant que conséquence de l'obésité, nous ne reviendrons pas ici sur le rôle du microbiote intestinal dans le stockage énergétique et l'obésité, point qui a été déjà discuté plus haut. Nous allons plutôt nous intéresser au possible impact du microbiote intestinal sur l'initiation de l'inflammation métabolique, à l'origine de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.

Des composés provenant de la flore bactérienne intestinale, comme les LPS, l'acide lipoteichoïque, le peptidoglycane, la flagelline ainsi que l'ADN bactérien, peuvent activer le système immunitaire inné. Parmi eux, les LPS induisent une réponse inflammatoire majeure, ce qui a suggéré leur rôle dans les maladies métaboliques[353, 422-424]. La translocation de LPS de la lumière intestinale vers le système circulatoire était initialement considérée comme étant efficacement bloquée par l'épithélium intestinal. Néanmoins, des LPS sont détectés dans le sang d'animaux sains[425] ainsi que dans le plasma humain, en dehors de toute situation pathologique, à des concentrations comprises entre 1 et 200 pg/mL[426-428]. Par contre, les patients atteints de diabète présentent des taux circulants de LPS plus élevés que les individus sains[429, 430]. Dans ce contexte, l'ingestion accrue de matières grasses est considérée comme l'un des facteurs conduisant à l'augmentation de l'endotoxémie[428, 431, 432]. Les LPS, de part leur fraction insoluble (lipide A) et leur structure, peuvent être incorporés dans des micelles, absorbés et intégrés dans les chylomicrons après un repas[425], ce mode de transport pouvant constituer un avantage physiologique car il favorise la clairance hépatique des LPS[433]. Néanmoins, une formation excessive de chylomicrons suite à une alimentation riche en graisses, augmente le risque d'une exposition extra-hépatique aux LPS[425].

Le récepteur des LPS, TLR4, est présent à la surface des cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules de Kupffer) et d'autres cellules (adipocytes, hépatocytes, cellules endothéliales). La signalisation des LPS conduit finalement à l'activation de la MAPK et du facteur de transcription NF- κ B, ce dernier activant l'expression de gènes codant pour des

protéines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, iNOS, MCP1). Les voies de signalisation activées par la MAPK peuvent induire une résistance à l'insuline via divers mécanismes[9, 434]. Par ailleurs, l'administration de faibles doses de LPS à des souris se traduit par une inflammation de bas niveau et une hyperglycémie[422]. Chez l'homme, l'administration de LPS altère également la sensibilité à l'insuline[435, 436].

Les mécanismes potentiels reliant l'absorption de graisses à une augmentation de l'endotoxémie sont divers. Une alimentation riche en graisses peut augmenter la perméabilité intestinale chez la souris[437] et de plus, une réduction de l'expression de protéines des jonctions serrées a été rapportée chez des rats sous régime gras[438, 439]. Une autre conséquence de la consommation d'un régime riche en graisses est l'augmentation de la production de bile[439]. La bile possède des effets antibactériens et il est évident que certaines bactéries sont capables d'y résister, comme par exemple les *Lactobacillus* spp.[440] ou les *Bacteroides* spp.[441], et que certains pathogènes expriment des facteurs de virulence en réponse à la présence d'acides biliaires, comme *Salmonella typhimurium*[442, 443]. Un accroissement de la sécrétion de bile peut ainsi induire des mécanismes de résistance de la part des bactéries intestinales qui peut en fait se traduire par une surcroissance bactérienne dans l'intestin grêle et conduire finalement à une augmentation de la translocation bactérienne et de l'endotoxémie[444]. L'endotoxémie peut également résulter d'un effet direct de la bile sur la perméabilité intestinale[445].

Un régime diabétogène très riche en graisses (49,5%) induit également des modifications dans la composition du microbiote intestinal, avec une réduction des *Bifidobacterium* spp., du groupe *Clostridium coccoides*-*Eubacterium rectale* et des *Bacteroides* spp. (technique semi-quantitative de FISH). Dans cette étude, une corrélation négative a de plus été révélée entre les *Bifidobacterium* spp. et l'endotoxémie[353]. Il est par ailleurs établi qu'un régime gras peut induire des modifications du microbiote intestinal indépendamment du développement de l'obésité. Ainsi chez le rat, un régime gras entraîne une réduction du nombre total de bactéries dans le cæcum avec une augmentation de la proportion relative des bactéries appartenant aux ordres *Bacteroidales* et *Clostridiales*[438]. Chez l'homme, des patients atteints de diabète de type 2 montrent dans leur microbiote fécal, une diminution de la proportion de bactéries appartenant au phylum *Firmicutes* et plus particulièrement à la classe *Clostridia*, avec de plus, un ratio *Bacteroidetes* sur *Firmicutes* corrélé positivement avec la glycémie mais pas avec l'index de masse corporelle[446]. Une étude humaine à grande échelle a récemment révélé dans la flore fécale de patients atteints de diabète de type 2, une diminution de la proportion de bactéries productrices de butyrate (*Clostridiales*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium praunitzii*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivorans*) et une

augmentation de la présence de pathogènes opportunistes[447]. Le butyrate contribue au renforcement de la barrière mucoale[146], notamment en stimulant la migration des cellules épithéliales[147] et en augmentant l'expression des mucines[148, 149]. La diminution de la quantité de bactéries produisant du butyrate peut ainsi conduire à une altération de la fonction de barrière mucoale et faciliter le passage d'agents bactériens pro-inflammatoires comme les LPS pour alimenter une inflammation métabolique.

Ainsi, le rôle des graisses alimentaires dans l'endotoxémie métabolique revêt une importance particulière, et pourrait en partie expliquer la prévalence des maladies chroniques dans les pays occidentaux[448, 449].

Un régime alimentaire riche en graisses modifie la composition du microbiote intestinal, augmente la perméabilité intestinale et diminue la clairance des LPS, favorisant une endotoxémie métabolique pouvant conduire à une résistance à l'insuline (**Figure 13**). Des concentrations accrues en LPS circulants, peuvent résulter d'une dysbiose du microbiote intestinal, d'une infection de l'épithélium et/ou d'une perméabilité intestinale augmentée. Les LPS circulants contribuent à l'inflammation du tissu adipeux, caractérisée par l'infiltration de macrophages et la production d'IL-6, d'IL-1 β et de TNF, qui conduisent à une résistance à l'insuline locale dans le tissu adipeux, une résistance à l'insuline hépatique, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une hypertriglycéridémie. Les LPS circulants pourraient aussi contribuer à l'auto-inflammation des îlots de Langerhans dans le pancréas, avec l'expression accrue d'IL-1 β qui altère la sécrétion d'insuline. Finalement, les cellules beta ne peuvent plus soutenir une hyperinsulinémie compensatrice capable de contrôler la production hépatique de glucose et ainsi, le diabète s'installe[3, 9] .

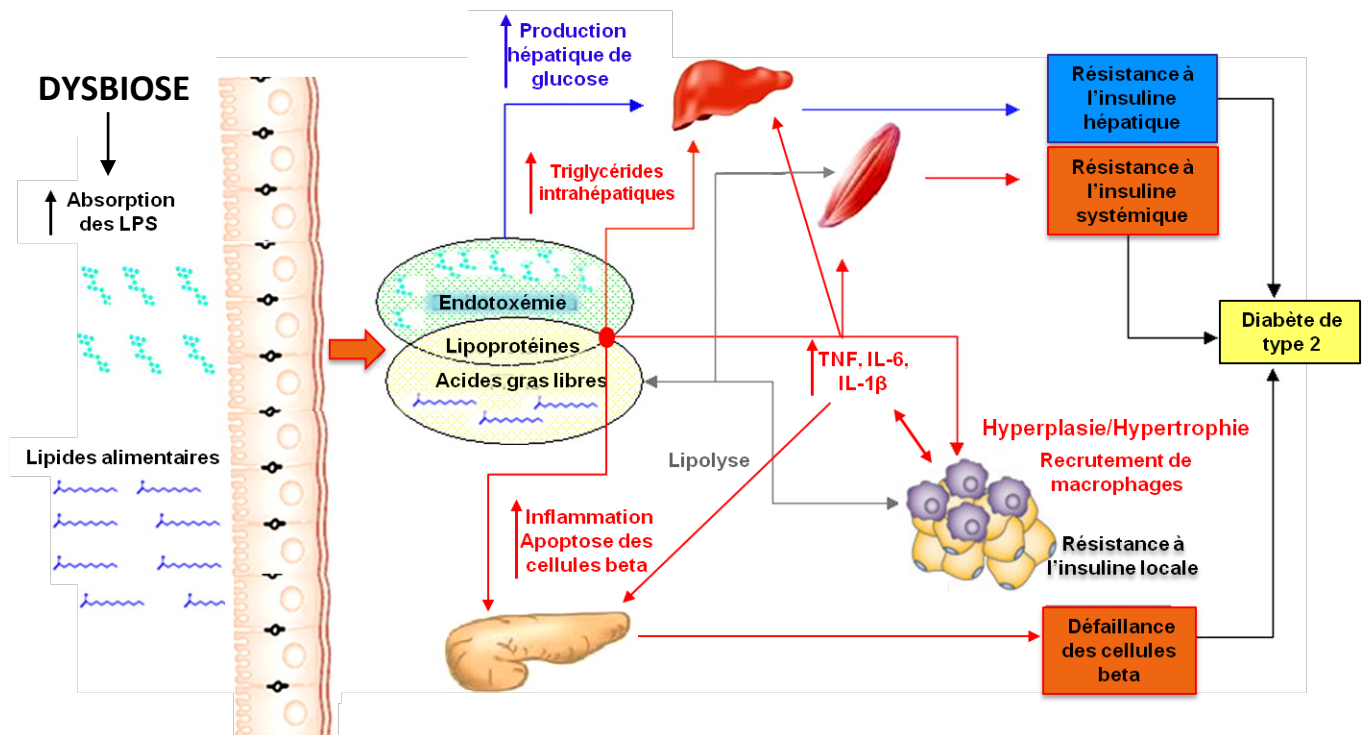


Figure 13 : Contribution des LPS et des lipides alimentaires dans la pathogenèse du diabète de type 2 (d'après[9]). Les lignes rouges indiquent les voies communes aux LPS et aux lipides, les lignes bleues indiquent les voies où les LPS semblent prévaloir et les lignes grises indiquent les voies induites par les acides gras libres.

Le microbiote intestinal constitue ainsi une cible thérapeutique potentielle pour rétablir une homéostasie intestinale limitant la translocation de LPS vers la circulation générale.

Potentiel thérapeutique de la manipulation du microbiote dans le diabète de type 2

Les prébiotiques ont montré des effets intéressants sur le métabolisme, en réduisant notamment le statut inflammatoire induit par un régime gras. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* et dans certains cas également du genre *Lactobacillus*, sont connues pour être favorisées en réponse à l'administration de certains prébiotiques[450, 451]. En conditions physiologiques, les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont d'ailleurs capables de diminuer l'endotoxémie[422, 451]. L'administration d'oligofructoses chez l'homme améliore la tolérance au glucose et augmente la satiété[357, 358]. De plus, ces effets ont été démontrés chez la souris

comme étant dépendants de l'action du polypeptide anorexigène GLP-1[355]. Mais les tentatives pour transposer ces observations chez l'homme sont ambiguës, notamment en ce qui concerne les effets sur la satiété[452, 453]. Des évidences émergent ainsi supportant l'hypothèse que les prébiotiques peuvent influencer la composition du microbiote et ainsi impacter bénéfiquement le métabolisme. Mais le nombre de ces évidences est limité et nécessite des essais cliniques randomisés à plus grande échelle[350].

Les probiotiques par contre, contiennent des bactéries vivantes qui, si elles sont administrées de manière adéquate, affectent seulement de manière transitoire le microbiote[454]. De plus, certaines données suggèrent que les probiotiques influencent seulement le microbiote luminal mais pas mucosal[455]. Les études à propos de l'effet des probiotiques sur les caractéristiques du diabète de type 2 ont été principalement menées chez l'animal, et rapportent les bénéfices de diverses souches du genre *Lactobacillus*[456-458]. Une étude plus récente décrit les effets antidiabétiques et anti-inflammatoires de *Lactobacillus casei* chez des souris nourries d'un régime gras[459]. Même si les résultats sont encourageants chez l'animal, leur possible transposition chez l'homme reste incertaine. En effet, aucune des études citées ci-dessus ne montre de relation entre les effets métaboliques observés et la composition du microbiote. De plus, les *Lactobacillus* spp. sont largement utilisées dans l'industrie de l'élevage avicole notamment, et résultent en une prise de poids des animaux[460, 461]. Cet effet a été confirmé chez l'enfant et chez l'homme adulte[462-464].

Les synbiotiques par ailleurs, allient des souches probiotiques avec des prébiotiques. La part prébiotique étant sélectionnée sur la base de sa capacité à stimuler la croissance du probiotique, le synbiotique est alors plus efficace[350]. Une étude randomisée menée en double aveugle chez des patients diabétiques entre 50 et 60 ans, a montré une augmentation significative du taux de cholestérol HDL ainsi qu'une réduction significative de la glycémie à jeun suite à la consommation d'un mélange synbiotique contenant *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et de l'oligofructose, en comparaison avec le groupe placebo[465]. Une publication récente, rapporte dans un modèle d'induction du diabète par la streptozotocine chez le rat, une diminution de la triglycéridémie et une augmentation du taux de cholestérol HDL en réponse à un traitement avec un mélange de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) et de bactéries probiotiques (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus*). Par contre, ce synbiotique n'a pas diminué la glycémie des rats[466]. Le potentiel thérapeutique de mélanges synbiotiques dans le diabète de type 2 demande aujourd'hui à être plus amplement exploré.

Les antibiotiques, par ailleurs, impactent largement le microbiote intestinal. Ils sont normalement prescrits pour détruire ou prévenir une colonisation bactérienne, sans ciblage spécifique de certaines bactéries. La destruction des bactéries intestinales suite à l'usage d'antibiotiques cause des altérations dans différentes voies métaboliques induites par les bactéries. La tétracycline permet ainsi une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les rats diabétiques et les souris obèses[467-469]. Par ailleurs, l'ampicilline et la norfloxacine entraînent une normalisation de la glycémie et une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez la souris ob/ob. Par contre, il semble que l'obésité ne soit pas un facteur contributeur à cet effet car ces résultats étaient indépendants de toute modification du poids[470]. Un des mécanismes possiblement impliqués concerne une réduction de l'inflammation. L'endotoxémie et le niveau d'expression de TNF- α corrélaient en effet négativement avec la sensibilité à l'insuline[470]. De plus, un traitement antibiotique permet de diminuer l'endotoxémie chez le rat[471] et chez la souris, avec une inhibition du développement des désordres métaboliques chez la souris[437]. Une étude récente chez la souris C57Bl/6 nourrie d'un régime gras, rapporte un effet bénéfique de l'ampicilline sur l'amélioration de la tolérance au glucose, sans modification du poids ni du nombre de Treg, de lymphocytes Th1 et de cellules dendritiques tolérogènes dans la muqueuse de l'intestin[472]. Mais par ailleurs, l'exposition précoce aux antibiotiques oraux est associée à un surpoids chez l'enfant[473]. De manière encore plus intéressante, une association a été révélée entre une administration intraveineuse de vancomycine et un gain de poids chez l'homme adulte, probablement via une voie médiée par des *Lactobacillus* spp., puisque celles-ci sont résistantes à la vancomycine[474].

La transplantation fécale, par ailleurs, est utilisée avec succès en cas de colite pseudomembraneuse chez l'homme[475]. Une étude clinique randomisée en double aveugle, consistant à étudier les effets thérapeutiques d'une infusion de fèces de donneurs maigres sur la résistance à l'insuline de patients avec un syndrome métabolique, a permis d'améliorer le statut métabolique des patients[350]. Cette voie thérapeutique mérite donc également plus d'attention.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux présentés dans le premier article intitulé « Adhérence et translocation bactériennes au cours du diabète » vont nous permettre de préciser la nature bactérienne et l'origine intestinale des agents inflammatoires pouvant conduire à une résistance à l'insuline, avec la mise en lumière d'un mécanisme original dans le domaine du diabète de type 2 : la translocation bactérienne.

Dans le cadre d'un second article intitulé « Microbiote tissulaire et intestinal au cours du diabète » nous allons ensuite étendre nos observations à l'homme et étudier plus précisément la nature des bactéries tissulaires. Un modèle animal de pré-diabète nous permettra de plus, de préciser les fonctions possibles de ce microbiote tissulaire dans l'initiation de la résistance à l'insuline. Une première approche de la diversité du microbiote intestinal fera également l'objet de cet article.

Enfin, les travaux présentés dans le troisième article intitulé « Relation hôte-microbiote intestinal avant le diabète » consisteront à aborder les mécanismes pouvant conduire à l'adhérence et à la translocation de bactéries, en nous focalisant sur la relation hôte-microbiote dans l'intestin dans le cadre du développement de la résistance à l'insuline sous régime gras chez la souris.

Les conclusions et hypothèses émanant de ces travaux nous permettront finalement de proposer des stratégies d'innovation pharmacologique dans le domaine des maladies métaboliques.

ARTICLE 1

Adhérence et translocation bactériennes au cours du diabète

(travaux publiés en septembre 2011 dans EMBO Molecular Medicine)[476]

INTRODUCTION

L'humanité fait face à une véritable épidémie de maladies métaboliques, que les stratégies pharmacologiques classiques n'arrivent pas à enrayer. Aussi, de nouveaux paradigmes sont requis. Un changement des habitudes alimentaires, avec notamment un accroissement des apports lipidiques, a été suggéré comme étant responsable de l'augmentation dramatique de la prévalence des maladies métaboliques, à travers des mécanismes inflammatoires chroniques de faible intensité[405, 407, 477]. Les cytokines pro-inflammatoires, comme le $\text{TNF-}\alpha$, libérées en continu par le tissu adipeux des individus obèses, activent la PKC, favorisant la phosphorylation d'IRS-1 sur le résidu sérine en position 307, ce qui conduit à l'inactivation d'IRS-1 et à une résistance à l'insuline[478]. Néanmoins, l'origine des antigènes responsables de cette inflammation "métabolique" restait inconnue.

Parallèlement, une implication du microbiote intestinal dans le contrôle du métabolisme énergétique de l'hôte a été démontrée, avec une prise de poids plus importante chez des souris axéniques colonisées avec une flore intestinale de souris génétiquement obèses (ob/ob) par rapport à celles colonisées avec une flore de souris maigres[93, 300, 301, 479, 480] [46]. Mais les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal pourrait impacter spécifiquement l'inflammation du tissu adipeux restaient à identifier. A ce propos, il était connu que les bactéries commensales peuvent traverser l'épithélium intestinal de manière passive, ou être captées directement dans la lumière intestinale par des cellules dendritiques, pour être phagocytées et détruites à l'intérieur de lysosomes par les macrophages ou les cellules dendritiques[240]. Ce processus de translocation bactérienne, établissant un lien cellulaire direct entre la flore intestinale et le milieu intérieur, nécessite des récepteurs aux antigènes bactériens, comme les TLR[481] [482] et les NLR[483], via lesquels des bactéries viables et non viables ainsi que leurs fragments initient l'activation des cellules immunitaires innées. De plus, il était également connu que des cellules immunitaires innées, comme les macrophages, infiltrent de manière plus importante le tissu adipeux dans le contexte des maladies métaboliques[413, 484]. Des données préliminaires générées au sein de mon équipe d'accueil par Patrice D. Cani avant le début de ma thèse, montraient qu'un régime riche en graisses augmente la concentration plasmatique en LPS bactériens, initie une inflammation de faible intensité dans le tissu adipeux, une résistance à l'insuline et un diabète de type 2 chez la souris[422, 437].

Sur la base de ces données ainsi que de l'état de l'art, nous avons alors suggéré que des bactéries commensales intestinales pourraient transloquer de manière pathologique lors du développement du diabète sous régime gras, atteindre les tissus comme le tissu adipeux, sous forme viable ou non

viable (à l'état de fragments), pour y alimenter une inflammation locale, notamment via les LPS, pouvant conduire de part sa chronicité à une résistance à l'insuline systémique et à un diabète de type 2.

Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment

Jacques Amar^{1,2**†}, Chantal Chabo^{3†}, Aurélie Waget³, Pascale Klopp³, Christelle Vachoux³, Luis G. Bermúdez-Humarán⁴, Natalia Smirnova³, Mathieu Bergé^{5,6}, Thierry Sulpice⁷, Sampo Lahtinen⁸, Arthur Ouwehand⁸, Philippe Langella⁴, Nina Rautonen⁸, Philippe J. Sansonetti⁹, Rémy Burcelin^{3*}

Keywords: *Bifidobacterium lactis* 420; diabetes; inflammation; obesity; pathogen-associated molecular pattern receptors

DOI 10.1002/emmm.201100159

Received February 02, 2011

Revised May 25, 2011

Accepted June 20, 2011

A fat-enriched diet modifies intestinal microbiota and initiates a low-grade inflammation, insulin resistance and type-2 diabetes. Here, we demonstrate that before the onset of diabetes, after only one week of a high-fat diet (HFD), live commensal intestinal bacteria are present in large numbers in the adipose tissue and the blood where they can induce inflammation. This translocation is prevented in mice lacking the microbial pattern recognition receptors Nod1 or CD14, but overtly increased in Myd88 knockout and *ob/ob* mouse. This 'metabolic bacteremia' is characterized by an increased co-localization with dendritic cells from the intestinal lamina propria and by an augmented intestinal mucosal adherence of non-pathogenic *Escherichia coli*. The bacterial translocation process from intestine towards tissue can be reversed by six weeks of treatment with the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 420, which improves the animals' overall inflammatory and metabolic status. Altogether, these data demonstrate that the early onset of HFD-induced hyperglycemia is characterized by an increased bacterial translocation from intestine towards tissues, fuelling a continuous metabolic bacteremia, which could represent new therapeutic targets.

(1) Rangueil Hospital, Department of Therapeutics, Toulouse, France

(2) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U558, Toulouse, France

(3) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institut de Recherche sur les Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Rangueil (I2MC), Toulouse, France

(4) Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, Jouy en Josas Cedex, France

(5) Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Toulouse, France

(6) Centre National de la Recherche Scientifique, LMGM-UMR5100, Toulouse, France

(7) Physiogenex SAS, Prologue Biotech, Labège Innopole, France

(8) Danisco Health & Nutrition, Kantvik, Finland

(9) Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire and Unité INSERM 786, Institut Pasteur, Paris Cedex 15, France

***Corresponding author:** Tel: +33 5 61 32 56 14, Fax: +33 561 325 621;

E-mail: remy.burcelin@inserm.fr

****Corresponding author:** Tel: +33 5 61 32 30 72, Fax: +33 5 61 32 27 10;

E-mail: amar.j@chu-toulouse.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

INTRODUCTION

Over the last decades, the incidence of diabetes and obesity has risen dramatically and this unabated increase can be justly described as a world-wide epidemic. A dramatic change in dietary habits, characterized by an increased intake of lipids, has been suggested to be mainly responsible for the dramatic rise in metabolic diseases through mechanisms, which induce low grade inflammation (Hotamisligil, 2006; Shi et al, 2006; Shoelson et al, 2006). TNF- α continuously released by the adipose tissue during obesity has been shown to activate protein kinase C (PKC) and to increase the phosphorylation of insulin receptor substrates on serine residues such as Ser-307, leading to the inactivation of this insulin signalling molecule and hence to insulin resistance (Tanti et al, 2004). However, the origin of the antigens responsible for the inflammatory process has not been described. Recently, the causal role of the intestinal microbiota in weight gain has been demonstrated in experiments in which germ-free mice colonized with the intestinal microbiota from genetically obese *ob/ob* mice gained more weight than their counterparts colonized with microbiota from lean animals. Hence, obesity could be transferred by the intestinal microbiota (Backhed et al, 2004, 2005; Ley et al, 2005, 2006; Turnbaugh et al, 2006, 2007). Altogether, these data demonstrated that the intestinal microbiota and the interactions between the host and the microbiota are involved in the control of energy metabolism. A key question is to understand the mechanism through which the intestinal microflora could specifically affect tissue inflammation. An important observation in this respect is that intestinal phagocytes such as dendritic cells and macrophages capture bacterial intestinal antigens and transfer them into lysosomes for degradation (Sansonetti & Di Santo, 2007), thereby providing a direct cellular link between the intestinal microbiota and the host, named bacterial translocation. This process requires bacterial antigen receptors such as toll-like receptors (TLR) (Keita et al, 2008; Neal et al, 2006) and nod-like receptors (NLR) (Kufer et al, 2008), through which viable and dead bacteria and their components initiate the activation of innate immune cells. Furthermore, cells from the innate immune system infiltrate the adipose depots during metabolic diseases (Weisberg et al, 2003, 2006). Therefore, we suggest that during high-fat diet-induced diabetes, commensal intestinal bacteria translocate in a pathological manner from the intestine towards the tissues where they trigger a local inflammation.

The present data show for the first time that during the early onset of high-fat diet-induced diabetes, bacteria from the intestine are actively translocated into the mesenteric adipose tissue (MAT) and the blood. This translocation initiates a 'low grade bacteremia' which depends on CD14, Nod1, but not Nod2. It is further regulated by leptin, which identifies a new function for this hormone. This metabolic bacteremia was reversed by a treatment using the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 420, which reduced the mucosal adherence and bacterial translocation of gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* group. Consequently, adipose tissue inflammation and several features characteristic of diabetes were normalized. Therefore, the control of intestinal bacterial

translocation and mucosal dysbiosis could be considered as a new therapeutic strategy for the control of high-fat diet-induced diabetes and metabolic syndrome.

RESULTS

High-fat feeding increases the translocation of live gram-negative bacteria through intestinal mucosa to blood and mesenteric adipose tissue

To determine which tissues are targeted by the bacterial translocation, we first quantified the bacterial 16S rRNA DNA concentration in different tissues. The data show that bacterial DNA is detectable in the blood of normal chow fed mice (Fig 1A and D, Supporting information Fig S1A and C). However, there was roughly 1000 and 2000–10,000 times less bacterial DNA in MAT and blood, respectively, when compared to caecal content (Supporting information Fig S1A). The overall microbial population was also evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis, and the number of bands showed that microbiota is less diverse in tissues than in the gut (Supporting information Fig S1B and C).

To follow the bacterial translocation from intestine, a possible mechanism for the existence of bacterial DNA of intestinal origin found in tissues, we generated a fluorescently labelled, ampicillin-resistant *Escherichia coli* (GFP-*E. coli*) from a mouse *E. coli*. After only 1 week of a high-fat diet (HFD), GFP-*E. coli* was gavaged to mice. As a result, the colony forming units (cfu) equivalent of fluorescent *E. coli* (as quantified by RT-qPCR) was increased in blood, 2 h after gavage, when compared with normal chow (NC)-fed mice (Supporting information Fig S2C). This was similar to what was observed for wild-type *E. coli* DNA quantified by specific *E. coli* 16S qPCR already present in blood (Supporting information Fig S2B), total gram-negative bacteria DNA (Supporting information Fig S2A), and for total bacteria (Fig 1A).

After 4 weeks of HFD, when the diabetic state is established (Cani et al, 2008, 2009), the amounts of total bacterial DNA (Fig 1A), gram-negative bacterial DNA (Supporting information Fig S2A), and *E. coli* DNA (Supporting information Fig S2B) were still increasing in blood. We also quantified total bacterial DNA in MAT and in the corresponding mesenteric lymph nodes (MLN), since innate immune cells, which were suspected to have phagocytosed translocated intestinal bacteria, could accumulate in this tissue. After 1 week of HFD, the amount of bacterial DNA was increased in MAT but not in MLN (Fig 1B and C), and a similar observation was made in regard to the cfu quantification from ampicillin-resistant *E. coli* in these tissues 2 h after gavage (Supporting information Fig S2D). Once the diabetic state was established (4 weeks HFD), the amount of bacterial DNA was increased in both MAT and MLN (Fig 1B and C).

Translocation of intestinal bacteria, glucose metabolism and body weight are regulated by Nod1, leptin, Myd88 and CD14

We analysed first whether Nod1 and Nod2 were involved in the accumulation of tissue bacteria during HFD. When the Nod1^{-/-} mice were fed with HFD for 1 month, fasting glycemia and glucose tolerance (Fig 2A and C), fat mass (Fig 2D) and body

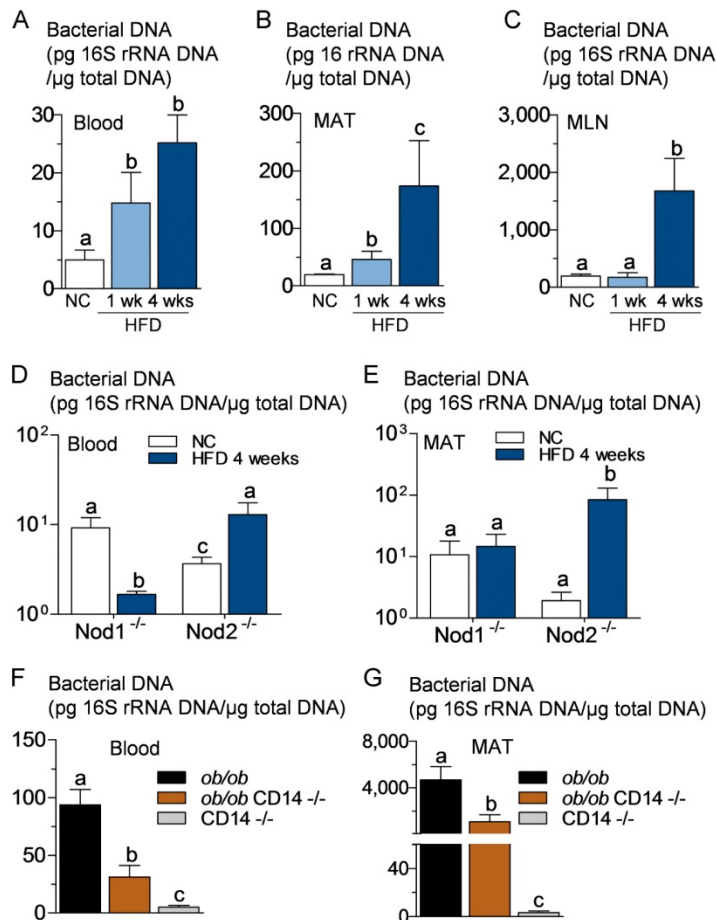


Figure 1. High-fat diet increases the concentration of bacterial DNA in blood, mesenteric adipose tissue (MAT), and corresponding lymph nodes (MLN) before the onset of diabetes. The pathogen recognition receptors Nod1 and CD14, but not Nod2, control high-fat diet-induced bacterial DNA accumulation in tissues. The regulatory role of leptin.

16S rRNA DNA concentration (pg/μg total DNA; qPCR):

A,B,C. From total bacteria in blood (A), MAT (B) and MLN (C) of normal chow (NC)-fed, prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks) (mean ± SEM; *n* = 8).

D,E. From total bacteria in blood (D), and MAT (E) of Nod1-deficient mice (Nod1^{-/-}), and Nod2-deficient mice (Nod2^{-/-}), after 4 weeks of a normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD 4 weeks) (mean ± SEM; *n* = 11).

F,G. From total bacteria in blood (F), and MAT (G), of ob/ob, ob/obCD14^{-/-}, and CD14^{-/-} mice (all NC-fed) (mean ± SEM; *n* = 8).

Data with identical superscript letters (A–G) do not differ from each other with *p* > 0.05.

weight (Supporting information Fig S3A), fasted plasma insulin concentration (Fig 2E), and whole body insulin-sensitive glucose turnover rate (Fig 2F) were strictly similar between NC- and HFD-fed Nod1^{-/-} mice as well as wild-type (WT) mice fed a normal chow, while WT mice fed a HFD were clearly sensitive to the dietary treatment for all parameters (Fig 2A, C, D, E and F, Supporting information Fig S3A). Conversely, Nod2^{-/-} mice were still sensitive to HFD for all parameters studied (Fig 2B–F, Supporting information Fig S3A).

We also previously showed that CD14^{-/-} mice resist the diabetic and obese phenotypes in response to HFD (Cani et al, 2008). We therefore mated leptin-deficient mice with CD14^{-/-} mice, as described (Cani et al, 2008). In the double mutant mice, fasted glycemia and glucose tolerance (Fig 2G and H) as well as the fat mass percentage and whole body weight (Fig 2I, Supporting information Fig S3B) were improved when compared to the single mutant ob/ob mice.

Myd88 is one of the major signalling molecules involved in TLR activation (except activation of TLR3). Therefore, we

compared the corresponding mutant mice with WT mice and showed that fasted glycemia and glucose intolerance (Fig 3A), body weight (Fig 3B), fat mass (Fig 3C), plasma insulin (Fig 3D) and insulin resistance (Fig 3E) were increased when compared to the corresponding WT mice.

Total bacterial DNA concentration, in blood and MAT, was unchanged or even reduced in Nod1^{-/-} mice after HFD treatment, whereas it was conversely increased in Nod2^{-/-} mice (Fig 1D and E, and compare with wild-type mice Fig 1A and B). The absence of leptin increased the total amount of bacterial DNA in blood (Fig 1F compared with Fig 1A) and MAT (Fig 1G compared with Fig 1B). A similar observation was made when GFP-*E. coli* was quantified in MAT 2 h following the gavage (Supporting information Fig S2E). In addition, the absence of CD14 in leptin-deficient mice decreased the bacterial DNA content in blood and MAT (Fig 1F and G), as well as the cfu count of GFP-*E. coli* in MAT 2 h after gavage (Supporting information Fig S2E) compared with ob/ob mice. In Myd88-deleted mice, the translocation of living *E. coli* (Fig 3F) and the

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

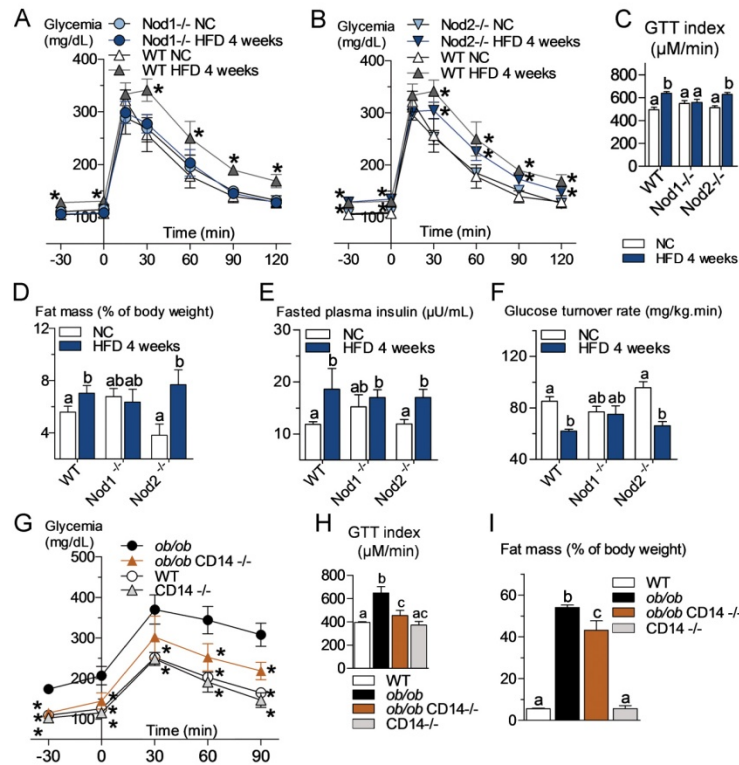


Figure 2. The pathogen recognition receptors Nod1 and CD14, but not Nod2, control high-fat diet-induced glucose intolerance, diabetes and fat mass gain. The regulatory role of leptin.

A,B,C. Oral glucose tolerance test (OGTT) (1.5 g/kg) in *Nod1*^{-/-} mice (A), *Nod2*^{-/-} mice (B) and their corresponding wild-type controls (WT) after 4 weeks of a normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD) and corresponding index (μM/min) from 15 to 120 min after glucose administration (C) (mean ± SEM; *n* = 11; **p* < 0.05; data with identical superscript letters do not differ from each other with *p* > 0.05).

D,E,F. Fat mass (% of body weight; EchoMRI) (D), fasted plasma insulin (μU/ml) (E) and insulin sensitivity (glucose turnover rate in mg/kg min) (F), in *Nod1*^{-/-} or *Nod2*^{-/-} mice and their corresponding WT controls after 4 weeks of a NC or a HFD (mean ± SEM; *n* = 11 (D); 8 (E); or 5 (F); data with identical superscript letters do not differ from each other with *p* > 0.05).

G. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) (1 g/kg) in WT, *ob/ob*, *ob/ob*CD14^{-/-} and CD14^{-/-} mice (all NC-fed) (mean ± SEM; *n* = 8; **p* < 0.05 versus *ob/ob*).

H. IPGTT corresponding index (μM/min) from 30 min before to 90 min after glucose administration (mean ± SEM; *n* = 8; data with identical superscript letters do not differ from each other with *p* > 0.05).

I. Fat mass (% of body weight; EchoMRI) in WT, *ob/ob*, *ob/ob*CD14^{-/-} and CD14^{-/-} mice (all NC-fed) (mean ± SEM; *n* = 8; data with identical superscript letters do not differ from each other with *p* > 0.05).

total content of bacterial DNA (Fig 3G) were dramatically increased in MAT compared with WT mice.

High-fat feeding increases the adherence of a gram-negative bacteria species to intestinal mucosa and its co-localization with dendritic cells in lamina propria and mesenteric lymph nodes

Two hours after gavage with GFP-*E. coli*, adherence of the bacteria to mucosal surface of duodenum, jejunum, ileum and cæcum was increased in mice fed with a HFD for only 1 week, when compared with normal chow-fed mice (Fig 4A), while after 5 h the difference was more evident in cæcum (Supporting

information Fig S4A). Importantly, 1 week of HFD is not sufficient to induce diabetes showing that bacterial translocation precedes the occurrence of diabetes. This increased adherence of GFP-*E. coli* to mucosa persisted significantly in ileum and cæcum until the 4th week of HFD (Fig 4A), by which time HFD-fed mice have developed diabetes. In addition, examination by fluorescence microscopy of ileal mucosa obtained by scraping 2 h after the oral gavage, confirmed the presence of fluorescent *E. coli* mainly in ileal mucosa of HFD-fed mice (Fig 4B and C). This was similar, although to a lower extent, after 5 h (Supporting information Fig S4B and C). Fluorescent bacteria could also be detected in sections of ileum, inside lamina propria, 2 h post-gavage (Fig 4D)

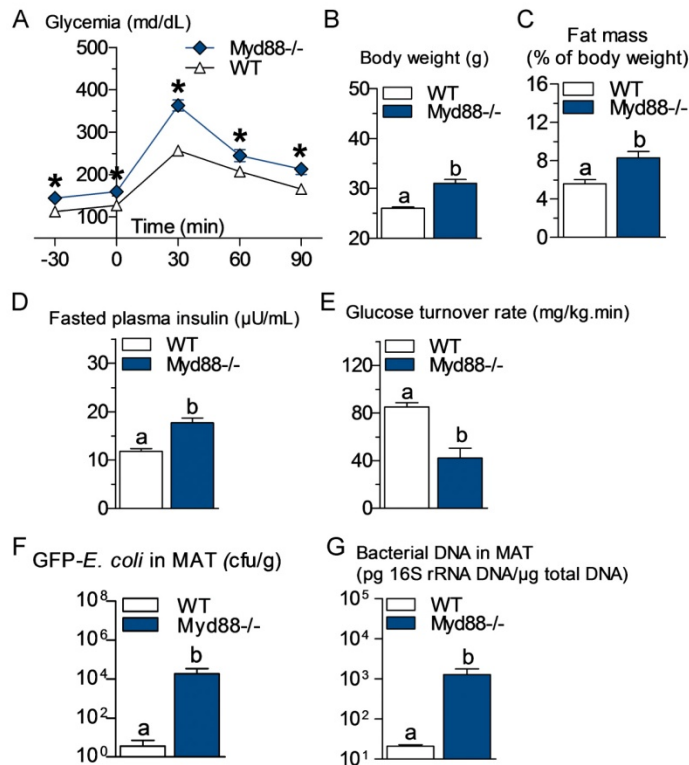


Figure 3. Metabolic disturbances and increased bacterial translocation to mesenteric adipose tissue (MAT) in Myd88 knockout mice.

A. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) (1 g/kg) in Myd88-deficient mice (Myd88^{-/-}) and their corresponding wild-type controls (WT) fed a normal chow (NC) diet (mean ± SEM; $n = 7$; $p < 0.05$ versus controls).

B,C,D,E. Body weight (B), fat mass (% of body weight; EchoMRI) (C), fasted plasma insulin (μU/ml) (D) and insulin sensitivity (glucose turnover rate in mg/kg min) (E), in Myd88^{-/-} mice and their corresponding WT controls fed a NC diet (mean ± SEM; $n = 5$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

F. Number of GFP-*E. coli* cfu per g of MAT in Myd88^{-/-} mice and their corresponding WT controls fed a NC diet, 2 h post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli* (mean ± SEM; $n = 7$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

G. 16S rRNA DNA concentration (pg/μg total DNA; qPCR) from total bacteria in MAT of Myd88^{-/-} mice and their corresponding WT controls fed a NC diet (mean ± SEM; $n = 7$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

and inside submucosa 5 h post-gavage (Supporting information Fig S4D). The number of transmucosal GFP-*E. coli* was estimated to be 5–10 times higher, 2 and 5 h post-gavage in HFD-fed mice compared to normal chow-fed mice (Fig 4E, Supporting information Fig S4E).

After 4 weeks of HFD, when the diabetic state is established (Burcelin et al, 2002; Cook et al, 2004), we were able to detect co-localization of fluorescent bacteria with dendritic cells (DC) in the lamina propria. In normal chow-fed mice, DC were restricted inside the lamina propria, whereas after 4 weeks of HFD, DC were also seen between enterocytes, extending large dendrites towards the intestinal lumen. Importantly, fluorescent *E. coli* could be co-localized with CD11c-positive cells, i.e. DC, on the luminal side of villi and in lamina propria. These co-localizations were detected in HFD-fed mice only (Fig 4F). The percentage of DC that co-localized with fluorescent *E. coli* was estimated to be between 5 and 10% of all DC in lamina propria 2 h post-gavage in HFD-fed mice, whereas no co-localization was detectable in normal chow-fed controls (Fig 4G).

Interestingly, fluorescent *E. coli* also co-localized with DC in MLN, although to a lower extent than what was observed in the lamina propria (Fig 4H). The percentage of DC co-localizing with fluorescent *E. coli* in MLN was also estimated to be between 5 and 10% 2 h post-gavage in HFD-fed mice, while they were undetectable in normal chow-fed animals (Fig 4I).

To analyse whether there was a differential distribution of intestinal microbiota in the intestine, we quantified the mucosal and luminal bacterial DNA content by qPCR and showed that 1 week of HFD increased the microbial population in the lumen and the mucosa (Fig 5A). This was further reinforced in the mucosa after 4 weeks of HFD. The expression of markers of inflammation was quantified in MAT and showed a moderate, but significant increase after 4 weeks of HFD for TNF-α and IFN-γ (Fig 5B). Moreover, MAT TNF-α mRNA concentration was the only marker, which positively correlated with the luminal and mucosal bacterial content (Fig 5C and D).

Intestinal leptin delivery regulates intestinal bacterial adherence, translocation and metabolism

An increased bacterial translocation was characteristic for the *ob/ob* mice. To determine whether leptin regulates bacterial translocation, we administered a probiotic, which produces and releases leptin (*Lactococcus lactis* leptin) aiming to target intestinal metabolism. We treated HFD and *ob/ob* mice for 8 weeks. In the leptin-deficient mice, the circulating leptin concentration remained undetectable suggesting only a possible local effect of the leptin-producing probiotic. Body weight gain (Fig 6A) and fat mass gain (Fig 6B) were reduced over the time course of the treatment. Glucose intolerance (Fig 6C and D) was slightly reduced although fasted plasma insulin concentration

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

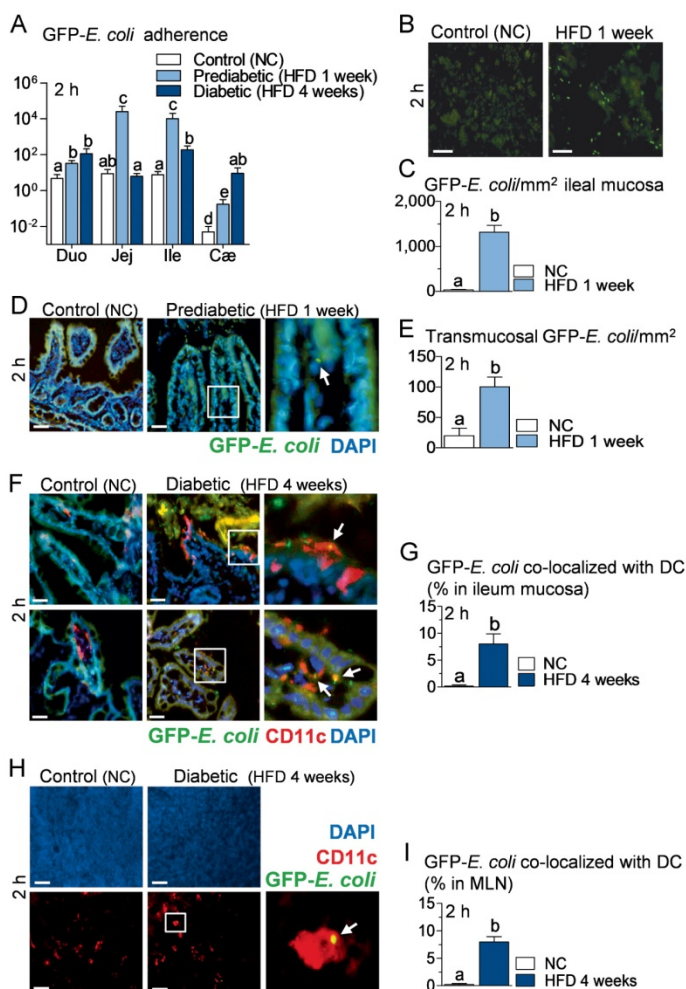


Figure 4. Intestinal mucosal adherence and transmucosal passage of bacteria are increased during high-fat diet (HFD) treatment before the onset of diabetes, and intestinal bacteria co-localize with dendritic cells of lamina propria and mesenteric lymph nodes (MLN).

A. Bacterial adherence (GFP-*E. coli* cfu per cm of mucosa/GFP-*E. coli* cfu per cm of lumen) in normal chow (NC)-fed (Control NC), prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks), 2 h after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli* (Duo, duodenum; Jej, jejunum; Ile, ileum; Cæ, cæcum) (mean $\pm$ SEM; $n = 10-12$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

B. Fluorescence microscopy of scrapped ileal mucosa from NC-fed (Control NC) and prediabetic mice (HFD 1 week), 2 h after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. Bars = 20 μ m.

C. Corresponding number of GFP-*E. coli*/mm² of scrapped ileal mucosa (fluorescence microscopy) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

D. Fluorescence microscopy of DAPI-counterstained cryosections of ileum from NC-fed (Control NC) and prediabetic mice (HFD 1 week), 2 h after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. Right panel corresponds to magnification of surrounded region. Bars = 20 μ m.

E. Corresponding number of transmucosal GFP-*E. coli*/mm² of ileum section (fluorescence microscopy) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

F,H. Immunofluorescent labelling of CD11c-positive cells [dendritic cells (DC) in red] and co-localization with fluorescent GFP-*E. coli* (green) on DAPI-counterstained (nuclei in blue) cryosections of ileum (F), and MLN (H), from NC-fed (Control NC), and diabetic mice (HFD 4 weeks), 2 h after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. Arrows point co-localizations (yellow). Right panels correspond to magnification of surrounded regions. Bars = 20 μ m.

G,I. Corresponding quantification of CD11c-positive cells co-localized with GFP-*E. coli* (% of total DC) in ileum (G) and MLN (I) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

(Fig 6E) remained mostly unchanged. This was associated with a dramatic reduction in the mucosal/lumen ratio of adherent GFP-*E. coli* in the ileum only, whereas no change in the cæcum were observed (Fig 6F). Bacterial translocation of live bacteria was reduced by the leptin treatment (Fig 6G) while total dead and live bacteria remained unaffected (Fig 6H). This was associated with a modest reduction of adipose tissue inflammation as shown by the reduction of the concentration of some cytokine mRNAs (Fig 6I). In a second set of experiments, *ob/ob* mice were treated similarly. Body weight gain (Fig 7A) and fat mass gain (Fig 7B), fasted glycemia (Fig 7C), glucose intolerance (Fig 7C and D), and fasted plasma insulin concentration (Fig 7E) were reduced by the leptin treatment. The mucosal bacterial adherence (Fig 7F), the content of live GFP-*E. coli* in MAT (Fig 7G), and bacterial mRNA (Fig 7I) were reduced by the leptin

treatment, whereas the total bacterial content remained the same in MAT (Fig 7H). The mRNA concentration of some (PAI-1, IL-6), but not all (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), inflammatory markers was reduced in the mesenteric adipose depot of mice treated with leptin (Fig 7J).

A probiotic treatment reduces mucosal dysbiosis, bacterial translocation and improves glucose metabolism

To determine if a change in bacterial translocation could affect HFD-induced diabetes, we treated mice with the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 420 (B420) (Supporting information Fig S5A), previously shown to bind to and exclude pathogenic bacteria from intestinal mucosa *in vitro* (Collado et al, 2007; Collado & Sanz, 2007). A 1-month daily treatment of HFD-induced diabetic mice with 10^9 cfu of B420 effectively

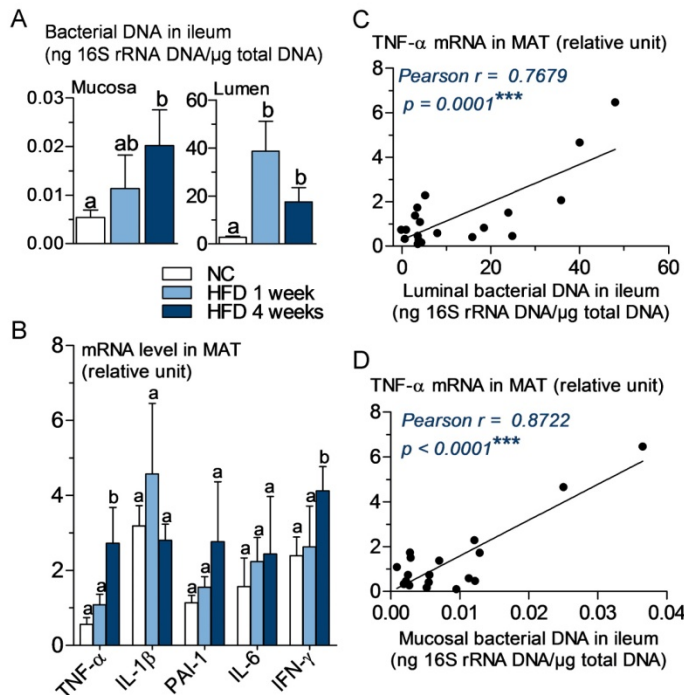


Figure 5. TNF- α expression in mesenteric adipose tissue (MAT) correlates positively with bacterial DNA concentration in ileum before the onset of high-fat diet-induced diabetes.

A. 16S rRNA DNA concentration (ng/ μ g total DNA; qPCR) from total bacteria in mucosa and lumen of ileum, in normal chow (NC)-fed, prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

B. Concentration of mRNA coding for the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , PAI-1, IL-6 and IFN- γ in MAT of normal chow (NC)-fed, prediabetic and diabetic mice (RT-qPCR) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$; expressions of the different markers were not compared between themselves).

C,D. Correlations between TNF- α expression in MAT and bacterial concentration (ng 16S rRNA DNA/ μ g total DNA; qPCR), of ileal lumen (C), and ileal mucosa (D), in NC-fed, prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks).

reduced the number of GFP-*E. coli* in different segments of small intestine mucosa (Fig 8A and B). Concomitantly, the quantity of *Bifidobacterium* spp. was slightly, although not significantly, increased in ileal mucosa (Supporting information Fig S5B). We further analysed some of the major bacterial groups in MAT and showed that the number of *Enterobacteriaceae*, which was strongly increased in mice fed with a HFD when compared to normal chow-fed controls, was decreased by the probiotic treatment whereas the other groups were mostly unaffected (Fig 8C). *Bifidobacterium* spp. was not detected in MAT at any time point. In addition, the expression of the major pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , PAI-1 and IL-6, was reduced in MAT, liver and muscle of treated HFD-fed mice when compared with untreated HFD-fed control mice (Fig 8D, Supporting information Fig S5C and D). The probiotic treatment also impacted on the overall metabolism since glucose intolerance was moderately blunted although fasting glycemia remained unaffected (Supporting information Fig S5E). In addition, insulin sensitivity and fasting hyperinsulinemia were completely normalized by the probiotic treatment (Fig 8E, Supporting information Fig S5F).

DISCUSSION

We have identified for the first time that adipose tissue and blood from diabetic mice fed with HFD contain live bacteria, which originate from intestine and are linked to low-grade

inflammation. Nod1, CD14 and Myd88 are required for this process. Furthermore, leptin inhibits mucosal bacterial adherence and the translocation of live bacteria from the intestine towards tissues. At the early onset of diabetes, we further showed that intestinal bacteria from the lumen reach the mucosal layer where dendritic cells may phagocytose the bacteria, which then may migrate inside the body towards metabolically active tissues. Importantly, a probiotic treatment, which prevents bacterial adherence and translocation, protects also against HFD-induced inflammation, insulin resistance and diabetes.

It is now well accepted that HFD-induced metabolic diseases are associated with a low-grade inflammation occurring, among other tissues, in adipose depots. This inflammatory process is characterized by an increased production of cytokines and infiltration of macrophages (Weisberg et al, 2003, 2006). Furthermore, the genetic deletion of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Timp3), which is a natural inhibitor of tumour necrosis factor- α -converting enzyme (TACE) (Serino et al, 2007), has been recently shown to catalyse HFD-induced metabolic diseases (Federici et al, 2005; Menghini et al, 2009). Therefore, these data reinforce the role of inflammation as an early factor responsible for insulin resistance before the onset of obesity. The nature of antigens present in adipose depots and responsible for the inflammatory process is not fully understood. In light of the recently increasing amount of data showing the role of intestinal microflora in the control of metabolic diseases, we determined here the microbial content of

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

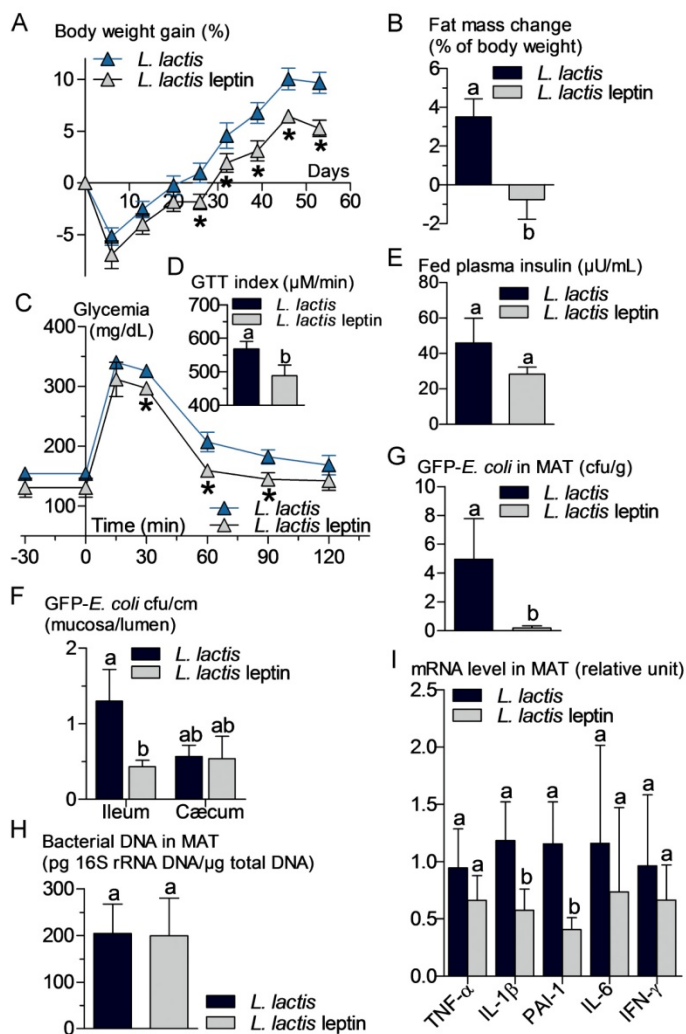


Figure 6. Probiotic-mediated intestinal leptin delivery reverses high-fat diet (HFD)-metabolic disturbances, bacterial adherence and translocation, and mesenteric adipose tissue (MAT) inflammation. HFD-fed WT mice were orally treated with 10^9 cfu/day of leptin-producing *Lactococcus lactis* (*L. lactis* leptin) and their corresponding controls orally treated with 10^9 cfu/day of *Lactococcus lactis* (*L. lactis*).

A,B. Body weight gain (% of initial weight) (A), fat mass change during treatment in % of body weight (EchoMRI) (B) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; * $p < 0.05$ versus controls (A); data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$ (B)).

C,D. Oral glucose tolerance test (OGTT) (1.5 g/kg) (C), and corresponding index ($\mu\text{M}/\text{min}$) from 30 min before to 120 min after glucose administration (D) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; * $p < 0.05$ versus controls (C); data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$ (D)).

E,F,G,H. Fed plasma insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$) (E), GFP-*E. coli* adherence (GFP-*E. coli* cfu per cm of mucosa/GFP-*E. coli* cfu per cm of lumen) in ileum and caecum, 2 h post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli* (F), number of GFP-*E. coli* cfu per g of MAT, 2 h post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli* (G), and 16S rRNA DNA concentration (pg/ μg total DNA; qPCR) from total bacteria in MAT (H) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

I. Concentration of mRNA coding for the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , PAI-1, IL-6 and IFN- γ in MAT (RT-qPCR) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$; expressions of the different markers were not compared between themselves).

the adipose depot. To this aim, we have isolated a commensal *E. coli* from mouse intestinal microbiota and labelled it with a fluorophore and an ampicillin reporter gene. As quickly as 2 h after gavage with fluorescent *E. coli* this commensal bacterium dramatically accumulated in mucosa of the different segments of intestine of HFD-fed mice only. This was also true for the overall bacterial content, suggesting that the intestinal mucosa from HFD-fed mice exhibits properties, which are different from the mucosa of normal chow-fed mice and which facilitate the bacterial adherence. Indeed, leptin resistance could lead to an impaired intestinal barrier function since the hormone modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (El Homsy et al, 2007).

Although the mechanism of mucosal adherence remains to be elucidated, the accumulation of bacteria close to the mucosa could certainly facilitate their translocation through the epithelium. We analysed this last hypothesis and showed that HFD led to an increase in the *E. coli* co-localization with DC in the intestinal lamina propria. The bacteria, probably remaining inside DC, then rapidly disseminated into MAT and corresponding MLN where again the fluorescent *E. coli* co-localized with DC. The putative rate-limiting role of DC cannot be fully and causally explored in this model of bacterial translocation. However, their role in the control of glucose metabolism has been demonstrated elsewhere (Macia et al, 2006; Nguyen et al, 2007) by means of the secretion of CXCL14 required for the regulatory role of DC on lymphocytes (Hara & Nakayama, 2009) and for other inflammatory diseases such as inflammatory

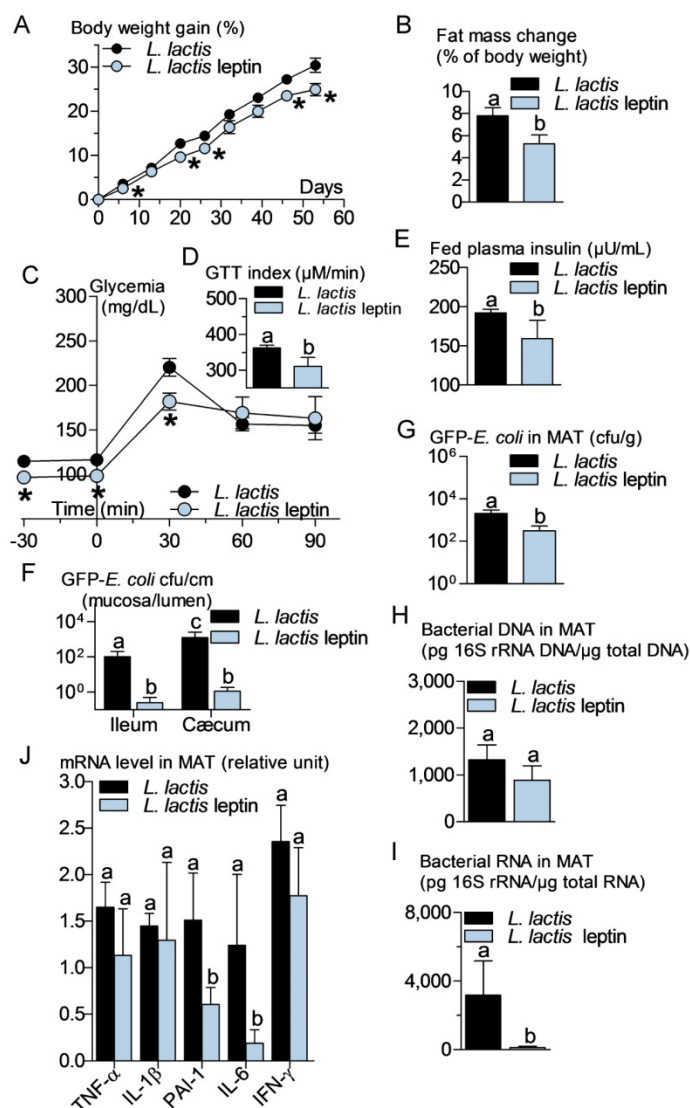


Figure 7. Probiotic-mediated intestinal leptin delivery reverses metabolic disturbances, bacterial adherence and translocation, and mesenteric adipose tissue (MAT) inflammation in *ob/ob* mice. *ob/ob* mice were orally treated with 10^9 cfu/day of leptin-producing *Lactococcus lactis* (*L. lactis* leptin) and their corresponding controls orally treated with 10^9 cfu/day of *Lactococcus lactis* (*L. lactis*).

A,B. Body weight gain (% of initial weight) (A), fat mass change during treatment time course (% of body weight; EchoMRI) (B) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; * $p < 0.05$ versus controls (A); data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$ (B)).

C,D. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) (1 g/kg) (C), and corresponding index ($\mu\text{M}/\text{min}$) from 30 min before to 90 min after glucose administration (D) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; * $p < 0.05$ versus controls (C); data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$ (D)).

E,F,G,H,I. Fed plasma insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$) (E), GFP-*E. coli* adherence (GFP-*E. coli* cfu per cm of mucosa/GFP-*E. coli* cfu per cm of lumen) in ileum and caecum, 2 h post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli* (F), number of GFP-*E. coli* cfu per g of MAT, 2 h post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli* (G), 16S rRNA DNA concentration (pg/ μg total DNA; qPCR) from total bacteria in MAT (H), 16S rRNA concentration (pg/ μg total RNA; RT-qPCR) from total bacteria in MAT (I) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

J. Concentration of mRNA coding for the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , PAI-1, IL-6 and IFN- γ in MAT (RT-qPCR, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$; expressions of the different markers were not compared between themselves).

bowel diseases (Niess, 2008). Interestingly, our data show that the presence of various bacteria in MAT and the corresponding MLN represents a physiological mechanism that is exacerbated during HFD-induced metabolic diseases. It is noteworthy that HFD increases the accumulation of gram-negative bacteria that produce lipopolysaccharides (LPS), which are highly inflammatory molecules. Therefore, our data show that this metabolic translocation of gram-negative bacteria and LPS provides a rationale for HFD-induced inflammation and insulin resistance. We previously documented that in humans and mice, an increased proportion of fat in the diet moderately augmented, by two to three times, the plasma concentration of

gram-negative bacteria cell wall components LPS (Amar et al, 2008; Cani et al, 2007a). Hence, we described this increase in plasma LPS as 'metabolic endotoxemia'. In addition, we showed that antibiotics and dietary fibres, most likely acting by changing the intestinal microbiota of HFD-fed mice, can reduce metabolic endotoxemia, inflammation, and improve the overall impaired metabolism (Cani et al, 2007b, 2008; Membrez et al, 2008).

The mechanisms through which bacterial factors could reach adipose tissue are unknown but there could be several hypotheses. Firstly, we initially suggested that a HFD is associated with an increased intestinal tight junction permeability (Cani et al, 2008, 2009) by which bacterial fragments

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

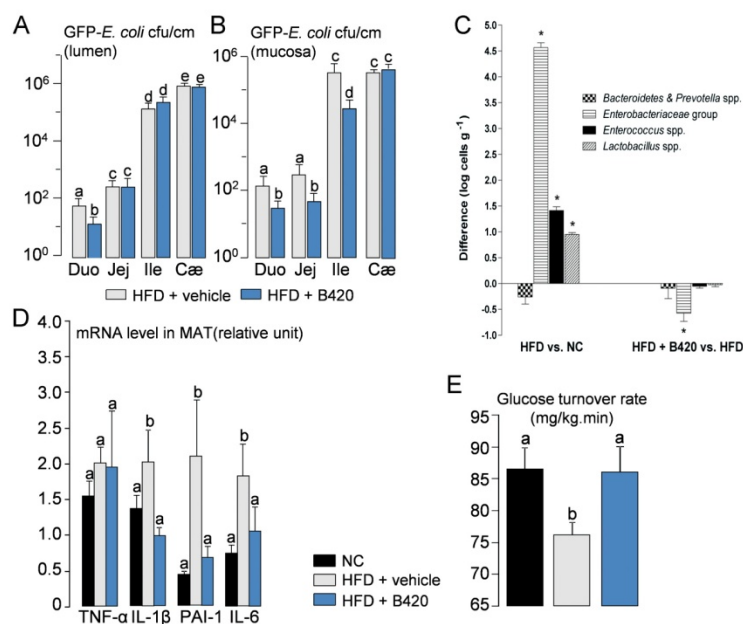


Figure 8. A probiotic treatment with *Bifidobacterium lactis* 420 reverses high-fat diet (HFD)-induced bacterial adherence and translocation, adipose tissue (MAT) inflammation and insulin resistance.

A,B. Luminal (A) and mucosal (B) number of colony forming units (cfu) per cm of duodenum (Duo), jejunum (Jej), ileum (Ile), and caecum (Cæ), 2 h following oral gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. (mean $\pm$ SEM; $n = 8$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$).

C. Difference in major groups of bacteria in MAT (qPCR), between HFD and NC groups (left panel), and HFD + B420 and HFD groups (right panel) (mean $\pm$ SEM; $n = 8$; * $p < 0.05$).

D. Concentration of mRNA coding for the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , PAI-1 and IL-6 in MAT (RT-qPCR) (mean $\pm$ SEM; $n = 8-10$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$; expressions of the different markers were not compared between themselves).

E. Insulin sensitivity (glucose turnover rate in mg/kg min). (mean $\pm$ SEM; $n = 8-10$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$).

could diffuse. Secondly, here we suggest that a translocation of intestinal bacteria through the intestinal epithelium could be exacerbated during the development of metabolic diseases. Similarly, commensal bacteria have been proposed to translocate into the host mammary glands via MLN and Peyer's patches in lactating mice (Hase et al, 2009; Perez et al, 2007; Sansonetti & Phalipon, 1999).

Intraluminal microbial detection requires the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs) that are distributed on the cell surface and within the cytosol of innate immune cells. Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-like receptor (NLRs) families function as extracellular and intracellular PRR, respectively, that trigger innate immune responses (Kufer & Sansonetti, 2007; Lundin et al, 2008). Therefore, molecular signalling during the bacterial translocation process could involve both the LPS receptors CD14/TLR4 and intracellular receptors for various other antigens such as Nod1 and Nod2 (Fritz et al, 2007; Kufer & Sansonetti, 2007). In this study, we showed that in absence of Nod1 but not Nod2, a HFD could no longer induce glucose intolerance and diabetes, suggesting that Nod1, which detects

D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (meso-DAP)-containing peptidoglycan (PGN) found principally in gram-negative bacteria, was required for the control of metabolic diseases. The bacterial translocation process was reduced accordingly. Similar results were obtained in CD14 knockout mice. In agreement with other reports (Paulos et al, 2007), the internalization of gram-negative bacteria through intestinal epithelium *in vivo* and their transport towards MAT and MLN was significantly lower in mice with the LPS co-receptor CD14 deletion when compared with wild-type (WT) mice. Our data demonstrate that the recognition of bacterial fragments by specialized cells is mandatory for the induction of inflammation and the triggering of metabolic disease. Furthermore, the fact that both CD14 and Nod1 were necessary for the induction of diabetes in response to the fat-enriched diet suggests that a crosstalk between the two non-redundant pathways might be involved, which synergizes for a full inflammatory response to the translocated gram-negative bacteria. Myd88 is a good candidate; however, surprisingly the intolerance to glucose as well as the fasted glycemia were higher in the knock-out model than in wild-type mice. This phenotype was associated with an increased bacterial translocation. This last set of data suggests

that a bacterial receptor linked to Myd88 signalling would be protecting from HFD-induced metabolic diseases. Our data suggest that conversely to Nod1, Nod2 could be associated with this protective function and hence the ablation of Myd88 would prevent the protecting role of Nod2.

Other antigen receptors such as the nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 (Nlrp3) inflammasome, belonging to the NLR family, could also be involved in bacterial translocation. Nlrp3 inflammasome senses lipotoxicity-associated increases in intracellular ceramide to induce caspase-1 cleavage in macrophages and adipose tissue (Stienstra et al, 2010; Vandanmagsar et al, 2011). Therefore, complex lipids of bacterial origin could trigger inflammation through the binding of Nlrp3. Hence, our data sets the scene for the discovery of numerous other receptors involved in the triggering of inflammation in response to a fat-enriched diet.

Our data support a similar conclusion regarding body weight gain. This conclusion is further reinforced by the fact that obese/diabetic *ob/ob* mice are also characterized by an increased bacterial translocation as described here. Therefore, this mechanism does not seem to be restricted to HFD but more widely distributed in different animal models. Furthermore, deletion of CD14 within *ob/ob* mice reduced bacterial translocation and improved the metabolic and inflammatory phenotypes as previously described (Cani et al, 2008). These data also demonstrate a new role for leptin: the control of intestinal bacterial translocation. Importantly, leptin regulates the translocation of live bacteria into the tissues since the local intestinal leptin treatment did not reduce the total tissue content of whole bacteria. Our data also suggest that the role of leptin on intestinal bacterial adherence and translocation is directed to the intestine. The treatment using the leptin-producing probiotic did not modify the circulating leptin concentration, suggesting that the hormone had a role on the intestinal metabolism. However, we cannot rule out that this original role of leptin might be indirect through its effect on body weight or other of the many aspects regulated by leptin included that of the immune system.

To further validate the role of bacterial translocation on the control of glucose metabolism, we took advantage of a treatment with the probiotic strain *Bifidobacterium lactis* 420, which has been shown to exclude other bacteria from the mucosa (Collado et al, 2007) and to improve the integrity of the epithelial cell layer (Putaalaa et al, 2008). Hence, we expected to reduce the bacterial translocation process by the probiotic treatment. A one-month treatment markedly reduced the gram-negative bacteria *E. coli* adherence to intestinal mucosa and the translocation of *Enterobacteriaceae*, the bacterial group to which *E. coli* belongs, in particular into MAT. Accordingly, inflammation, insulin sensitivity, and fasted hyperinsulinemia were almost completely normalized. This impacted the overall glycemic control since glucose intolerance was reduced, although moderately, in the probiotic-treated HFD-fed mice when compared with non-treated HFD-fed mice. Our data suggest that the reversal of diabetes by probiotic treatment required first a normalization of mucosal dysbiosis, which was followed by reduced bacterial translocation,

tissue inflammation, insulin resistance, and secondarily glycemia. Our results further validate the conclusion that a reduction in bacterial translocation and mucosal dysbiosis helps to control the development of metabolic diseases and opens the way to a new probiotic strategy for the treatment of diabetes and obesity. However, we did not observe a dramatic increase in the concentration of *Bifidobacterium* spp. in the mucosa of HFD-fed treated mice when compared with non-treated mice. This was expected since we previously described that fat-diet strongly reduces the amount of the *Bifidobacterium* genus (Cani et al, 2008). Therefore, the mechanisms through which the probiotic regulates glucose metabolism do not seem to be related to an increased mucosal concentration of the probiotic and hence remain yet to be discovered. Recent data showed that some *Bifidobacterium* species can increase production of acetate and inhibit the translocation of the pathogenic *E. coli* O157:H7 Shiga toxin from the gut lumen to the blood (Fukuda et al, 2011). Our data here show that the bacterial translocation of commensal bacteria is indeed reduced by the probiotic treatment arguing for a similar mechanism, which has been described in other instances (Fukuda et al, 2011). We cannot rule out that an acute administration of probiotic could have a direct impact on inflammation, therefore a similar reasoning could be made with regards to the gavage of *E. coli*. However, we do not have any evidence for this assumption.

In conclusion, we have discovered that a fat-enriched diet induces a low-grade infection before the onset of diabetes. This infection targets the MAT through a mechanism described as bacterial translocation. This mechanism requires the recognition of PAMPs by CD14, signalling through Myd88 and is leptin-regulated. Therefore, our data demonstrate that the increased bacterial translocation of gram-negative bacteria into the adipose tissue is mostly responsible for the continuous fuelling of inflammatory antigens thus characterizing the origin of the low-grade inflammation during diabetes and obesity. This concept opens up avenues for the treatment of metabolic diseases using probiotic strategies.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

C57bl6, *ob/ob*, *CD14^{-/-}*, *ob/obxCD14^{-/-}*, *Myd88^{-/-}*, *Nod1^{-/-}* or *Nod2^{-/-}* mice were fed with either a normal chow diet (NC) or a HFD (Safe, Augy, France) and the diabetic phenotype studied. This diet was previously demonstrated to generate fasting hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance following one month of feeding (Bucelin et al, 2002; Riant et al, 2009). All of the animal experimental procedures were validated by the local ethical committee of the Rangueil Hospital.

Generation of ampicillin-resistant GFP-*E. coli*

An *Escherichia coli* was isolated from mouse caecum (Inserm U1048) and transformed with the plasmid pZE1R-GFP (gift from J. Oberto, CNRS UMR8621, Orsay, France) to induce the expression of green fluorescent protein (GFP) and β -lactamase conferring resistance to 100 μ g/ml of ampicillin.

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

The paper explained

PROBLEM:

We are facing an epidemic of metabolic diseases, which the classical pharmacological strategies have failed to overcome. Hence, new paradigms are required. We have previously shown that bacterial fragments such as lipopolysaccharides (LPS) are present in increased amounts in the blood of diabetic mice, and induce adipose tissue inflammation, which is the first step leading to insulin resistance and adipose tissue expansion, resulting in obesity. Our previous data suggested that targeting mechanisms involved in the recognition of bacterial fragments could be an original therapeutic strategy to overcome the low-grade inflammation and the development of metabolic diseases. Here, we aimed at identifying such mechanisms.

RESULTS:

We show that at the early onset of HFD-induced diabetes and obesity, the mucosal adherence of commensal bacteria is increased dramatically in the mouse intestine. This is accompanied by an augmentation of the translocation of these bacteria into the adipose tissue. These living bacteria then co-localized with dendritic cells of the intestinal lamina propria and the

mesenteric lymph nodes when diabetes is established. Importantly, we demonstrate that this mechanism requires CD14 and Nod1, which are receptors that recognize different fragments of gram-negative bacteria. Furthermore, leptin reduces intestinal mucosal adherence and translocation of bacteria, since in the absence of the hormone, the mice are dramatically obese and inflamed. Finally, to overcome the bacterial translocation, we used a probiotic treatment and showed that glucose metabolism was indeed improved, demonstrating the importance of the control of intestinal adherence and translocation of commensal bacteria in the regulation of metabolic diseases.

IMPACT:

We thus propose a new paradigm for the treatment of metabolic disease. We suggest that targeting intestinal bacterial adherence, bacterial translocation, or receptors of bacterial fragments would be an original and novel strategy to prevent or reverse the occurrence of metabolic diseases. Therefore, new probiotics, which aim to target this function, can be defined.

Generation and preparation of *L. lactis* leptin and *L. lactis*

The bacterium strain *Lactococcus lactis* leptin (*L. lactis* leptin), expressing and secreting active human leptin, was generated by Bermúdez-Humarán and colleagues (INRA, Jouy en Josas, France) as previously described (Bermudez-Humaran et al, 2007). Briefly, the food-grade lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* strain NZ9000 was transformed with a plasmid allowing the expression of mature human leptin under the control of inducible promoter (P_{HISA}). As a negative control, the same *L. lactis* strain was transformed with the same plasmid lacking only the leptin-coding sequence.

Lactococcus lactis and *L. Lactis* leptin were grown in M17 (Sigma-Aldrich, France) supplemented with 1% glucose at 30°C without shaking. Mice were orally treated with 10^9 cfu/day of *L. Lactis* leptin or *L. Lactis* resuspended in sterile PBS.

Quantification of GFP-*E. coli* translocation towards mesenteric adipose tissue and mesenteric lymph nodes and adherence to intestinal mucosa

Two or five hours after gavage with 10^9 GFP-*E. coli*, mice were sacrificed. Mesenteric adipose tissue (MAT) and corresponding lymph nodes (MLN) were harvested, luminal and mucosal contents of each intestinal segment were separated. Tissues were then homogenized in Luria Broth (LB), plated onto ampicillin-supplemented (100 µg/ml) LB agar, and yellow colonies were enumerated after overnight incubation at 37°C.

Quantification of bacterial DNA in intestine, blood and mesenteric adipose tissue by qPCR

Genomic DNA was isolated from blood, MAT, MLN or intestine (contents and mucosa). All bacterial DNA was quantified by

quantitative real-time PCR targeting conserved regions of the 16S rRNA gene, with bacterial DNA as standard template for absolute quantification (for details see Supporting information).

Quantification of pro-inflammatory markers expression by RT-qPCR

Total RNAs from liver, muscle (*vast lateralis*) and MAT were prepared, reverse transcribed, and submitted to qPCR targeting *TNF-α*, *IL-1β*, *PAI-1*, *IFN-γ* and *IL-6* genes, with *RPL19* as house-keeping gene for relative quantification (for details see Supporting information).

Statistical analysis

Data were analysed by using Prism GraphPad version 5.01 (GraphPad Software Inc., California, USA). All data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). For comparison of two groups, Student's *t*-test was used. For comparison of more than two groups, ANOVA was performed followed by posthoc with Bonferroni's multiple comparison test to determine significance between groups. For linear regression analysis, significance of the correlation was determined by Pearson's test. Statistical difference was considered significant when $p < 0.05$.

Author contribution

AW, PK, CV, NS and MB performed the experiments. LGBH, PL, TS, AO and NR contributed to discussion. PJS designed the experiments and analysed the data. RB, SL and JA designed the experiments, analysed the data, contributed to discussion and

wrote the paper. CC designed and performed the experiments, analysed the data, contributed to discussion, wrote and edited the paper.

Acknowledgements

We would like to thank Jacques Oberto (Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud), Sandra Handgraaf and Jason Iacovoni for their useful contribution, Ivo G. Boneca (Institut Pasteur, France) for providing Nod1 and Nod2 knockout mice and John Woodley for editing the manuscript. We also thank Jaana Larsson-Leskelä and Sofia Forssten (Danisco, Kantvik, Finland) for skilful technical assistance. RB is the recipient of grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR Floradip, Transflora, & Vaiomer), and the coordinator of the seventh framework program F7P (Florinash). This work was supported in part by the European Commission's Seventh Framework programme under grant agreement N° 241913 (FLORINASH).

Supporting information is available at EMBO Molecular Medicine online.

Conflict of interest statement: Sampo Lahtinen, Arthur Ouwehand and Nina Rautonen are employees of Danisco and have a conflict of interest. Thierry Sulpice is an employee of Physiogenex and has a conflict of interest.

References

- Amar J, Burcelin R, Ruidavets J, Cani P, Fauvel J, Alessi M, Chamontin B, Ferrières J (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 87: 1219-1223
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15718-15723
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-1920
- Bermudez-Humaran LG, Nouaille S, Zilberfarb V, Corthier G, Gruss A, Langella P, Issad T (2007) Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl Environ Microbiol* 73: 5300-5307
- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B (2002) Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E834-E842
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C *et al* (2007a) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481
- Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM (2007b) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50: 2374-2383
- Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck AM, Lambert DM *et al* (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091-1103
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 45: 454-460
- Collado MC, Sanz Y (2007) Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* 103: 1147-1157
- Cook S, Hugli O, Egli M, Menard B, Thalmann S, Sartori C, Perrin C, Nicod P, Thorens B, Vollenweider P *et al* (2004) Partial gene deletion of endothelial nitric oxide synthase predisposes to exaggerated high-fat diet-induced insulin resistance and arterial hypertension. *Diabetes* 53: 2067-2072
- El Homsy M, Ducroc R, Claustre J, Jourdan G, Gertler A, Estienne M, Bado A, Scoazec JY, Plaisancie P (2007) Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G365-G373
- Federici M, Hribal ML, Menghini R, Kanno H, Marchetti V, Porzio O, Sunnarborg SW, Rizza S, Serino M, Cunsolo V *et al* (2005) Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF- α . *J Clin Invest* 115: 3494-3505
- Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, Collins C, Viala J, Ferrero RL, Girardin SE *et al* (2007) Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 26: 445-459
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T *et al* (2011) *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469: 543-547
- Hara T, Nakayama Y (2009) CXCL14 and insulin action. *Vitam Horm* 80: 107-123
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S *et al* (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: 226-230
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867
- Keita AV, Salim SY, Jiang T, Yang PC, Franzen L, Soderkvist P, Magnusson KE, Soderholm JD (2008) Increased uptake of non-pathogenic *E. coli* via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease. *J Pathol* 215: 135-144
- Kufer TA, Kremmer E, Adam AC, Philpott DJ, Sansonetti PJ (2008) The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol* 10: 477-486
- Kufer TA, Sansonetti PJ (2007) Sensing of bacteria: NOD a lonely job. *Curr Opin Microbiol* 10: 62-69
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11070-11075
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124: 837-848
- Lundin A, Bok CM, Aronsson L, Bjorkholm B, Gustafsson JA, Pott S, Arulampalam V, Hibberd M, Rafter J, Pettersson S (2008) Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol* 10: 1093-1103
- Macia L, Delacre M, Abboud G, Ouk TS, Delanoye A, Verwaerde C, Saule P, Wolowczuk I (2006) Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. *J Immunol* 177: 5997-6006
- Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, Corthesy I, Mace K, Chou CJ (2008) Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *Faseb J* 22: 2416-2426
- Menghini R, Menini S, Amoroso R, Fiorentino L, Casagrande V, Marzano V, Tornei F, Bertucci P, Iacobini C, Serino M *et al* (2009) Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. *Gastroenterology* 136: 663-672
- Neal MD, Leapheart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, Li J, Cetin S, Ford H, Schreiber A *et al* (2006) Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and

Research Article

Bacterial translocation during diabetes

- translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 176: 3070-3079
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM (2007) A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282: 35279-35292
- Niess JH (2008) Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 5138-5148
- Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, Hinrichs CS, Chieppa M, Cassard L, Palmer DC, Boni A, Muranski P, Yu Z *et al* (2007) Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest* 117: 2197-2204
- Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119: e724-e732
- Putala H, Salusjarvi T, Nordstrom M, Saarinen M, Ouwehand AC, Bech Hansen E, Rautonen N (2008) Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. *Res Microbiol* 159: 692-698
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150: 2109-2117
- Sansonetti P, Di Santo J (2007) Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity* 26: 149-161
- Sansonetti PJ, Phalipon A (1999) M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 11: 193-203
- Serino M, Menghini R, Fiorentino L, Amoruso R, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Hribal ML, Lauro R, Federici M (2007) Mice heterozygous for tumor necrosis factor- α converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes. *Diabetes* 56: 2541-2546
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-3025
- Shoelson S, Lee J, Goldfine A (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801
- Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A *et al* (2010) The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 12: 593-605
- Tanti J, Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, Barres R, Le Marchand-Brustel Y (2004) Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol* 65: 43-48
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project. *Nature* 449: 804-810
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031
- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD (2011) The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17: 179-188
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808

Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment

Jacques AMAR, Chantal CHABO, Aurélie WAGET, Pascale KLOPP, Christelle VACHOUX, Luis G. BERMÚDEZ-HUMARÁN, Natalia SMIRNOVA, Mathieu BERGE, Thierry SULPICE, Sampo LAHTINEN, Arthur OUWEHAND, Philippe LANGELLA, Nina RAUTONEN, Philippe J. SANSONETTI, Rémy BURCELIN

Supplementary Figures

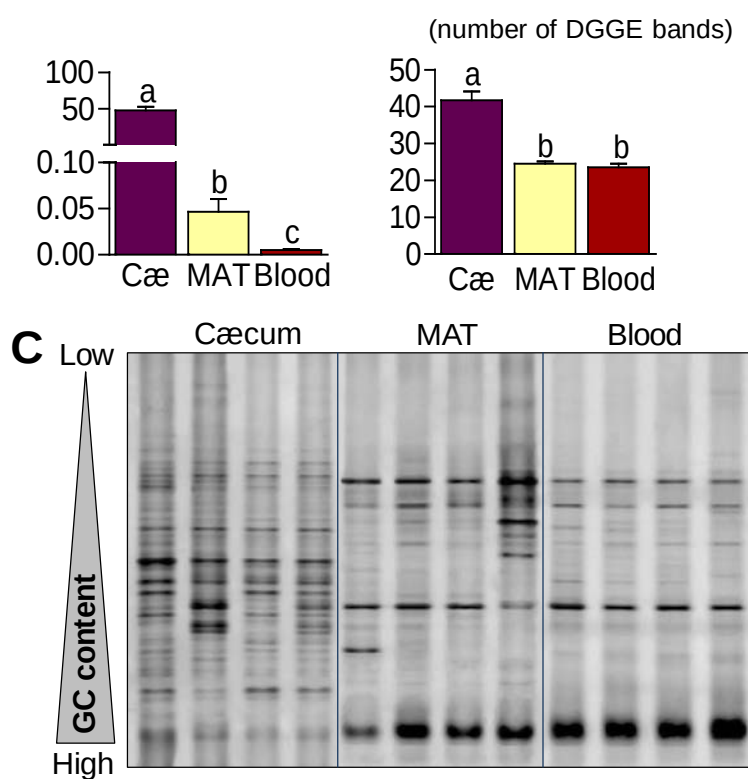


Figure S1. Bacterial DNA is present in mesenteric adipose tissue (MAT) and blood of healthy mice: a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis.

A. Concentration of 16S rRNA DNA (ng/ g total DNA; qPCR) from all bacteria in c cum, MAT, and blood of mice under normal chow diet. (mean $\pm$ SEM; $n = 4$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **B.** Number of DGGE bands detected by ImageQuant TL software. (mean $\pm$ SEM; $n = 4$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **C.** Comparative 16S rRNA (V3)-targeted PCR-DGGE of bacteria from c cum, MAT and blood of the same normal chow-fed mice ($n = 4$).

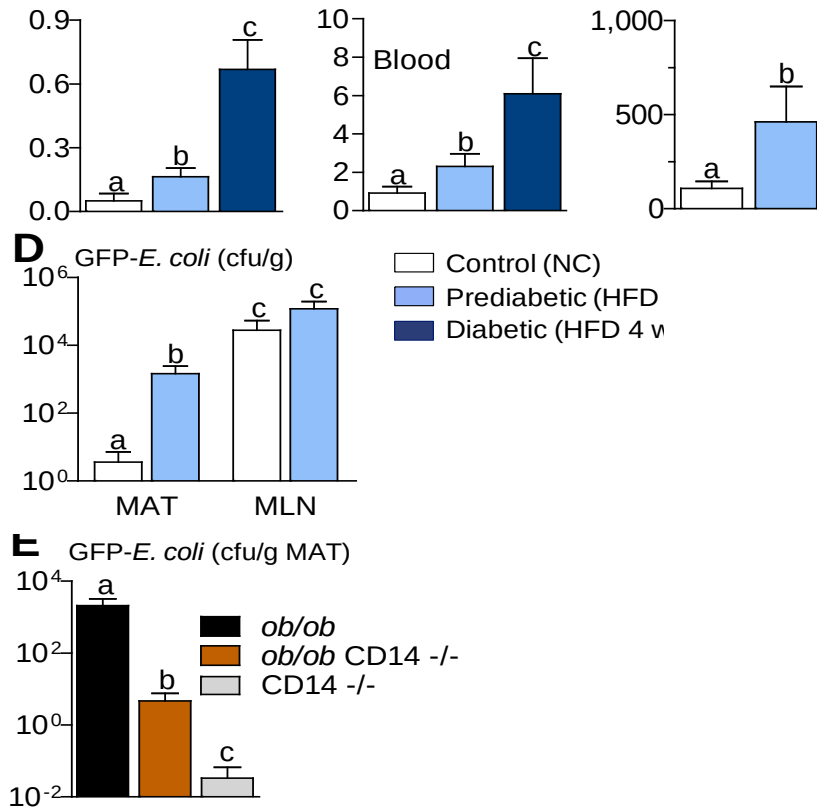


Figure S2. High-fat feeding increases the early onset translocation of gram-negative bacteria from intestine to blood and mesenteric adipose tissue (MAT). The pathogen recognition receptor CD14 modulates bacterial translocation induced by leptin deficiency.

A. Gram-negative bacteria DNA concentration (pg LpxB DNA/μg total DNA; qPCR) in blood of normal chow (NC)-fed (Control NC), prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks). (mean ± SEM; $n = 8$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **B.** 16S rRNA DNA concentration (pg/μg total DNA; qPCR) from total *Escherichia coli* (*E. coli*) in blood of NC-fed (Control NC), prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks). (mean ± SEM; $n = 8$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **C.** Number of colony forming units (cfu) equivalent to fluorescent GFP-*E. coli* (RT-qPCR) per mL of blood in NC-fed (Control NC), and prediabetic mice (HFD 1 week), 2 hours post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. (mean ± SEM; $n = 8$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **D.** Number of GFP-*E. coli* cfu per g of MAT or MLN in NC-fed (Control NC), and prediabetic mice (HFD 1 week), 2 hours post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. (mean ± SEM; $n = 8$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **E.** Number of GFP-*E. coli* cfu per g of MAT in wild-type (WT), *ob/ob*, *ob/ob*CD14^{-/-}, and CD14^{-/-} mice (all NC-fed), 2 hours post-gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. (mean ± SEM; $n = 8$ to 10; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

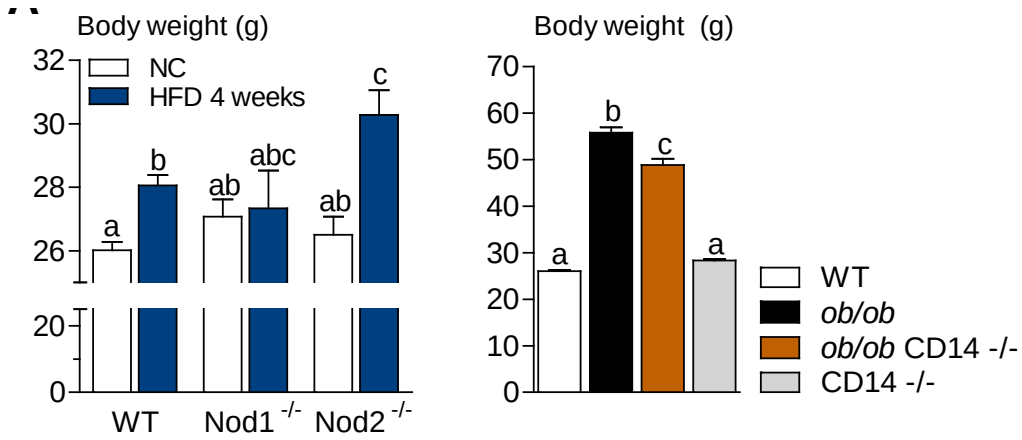


Figure S3. The pathogen recognition receptors Nod1 and CD14, but not Nod2, control body weight gain.

A. Body weight in Nod1-deficient mice (Nod1^{-/-}), Nod2-deficient mice (Nod2^{-/-}), and their corresponding wild-type controls (WT), after 4 weeks of a normal chow (NC) or a high-fat diet (HFD 4 weeks). (mean $\pm$ SEM; $n = 11$; data with identical superscripts do not differ with $p > 0.05$). **B.** Body weight in ob/ob, ob/obxCD14^{-/-}, and CD14^{-/-} mice (all NC-fed). (mean $\pm$ SEM; $n = 8$ to 10; data with identical superscripts do not differ with $p > 0.05$).

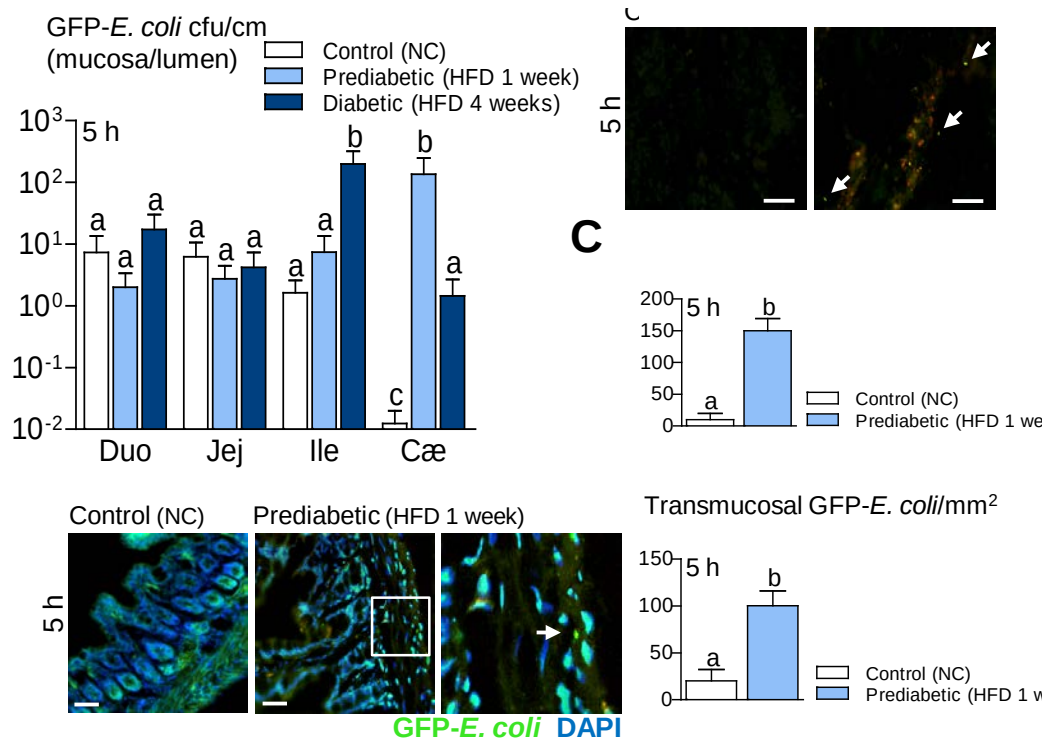


Figure S4. Adherence of bacteria to intestinal mucosa and corresponding transmucosal transport across the intestine are increased before the onset of high-fat diet (HFD)-induced diabetes.

A. Bacterial adherence (GFP-*E. coli* cfu per cm of mucosa/GFP-*E. coli* cfu/cm of lumen) in normal chow (NC)-fed (Control NC), prediabetic (HFD 1 week), and diabetic mice (HFD 4 weeks), 5 hours after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. (Duo=duodenum; Jej=jejunum; Ile=ileum; Cæ=cæcum). (mean $\pm$ SEM; $n = 10$ to 12 ; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **B.** Fluorescence microscopy of scrapped ileal mucosa from NC-fed (Control NC), and prediabetic (HFD 1 week), 5 hours after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. Bars = $20 \mu\text{m}$. **C.** Corresponding number of GFP-*E. coli*/mm² of scrapped ileal mucosa (fluorescence microscopy). (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$). **D.** Fluorescence microscopy of DAPI-counterstained cryosections of ileum from NC-fed (Control NC), and prediabetic mice (HFD 1 week), 5 hours after gavage with 10^9 cfu of GFP-*E. coli*. Right panel corresponds to magnification of surrounded region. Bars = $20 \mu\text{m}$. **E.** Corresponding number of transmucosal GFP-*E. coli*/mm² of ileum section (fluorescence microscopy). (mean $\pm$ SEM; $n = 6$; data with identical superscript letters do not differ from each other with $p > 0.05$).

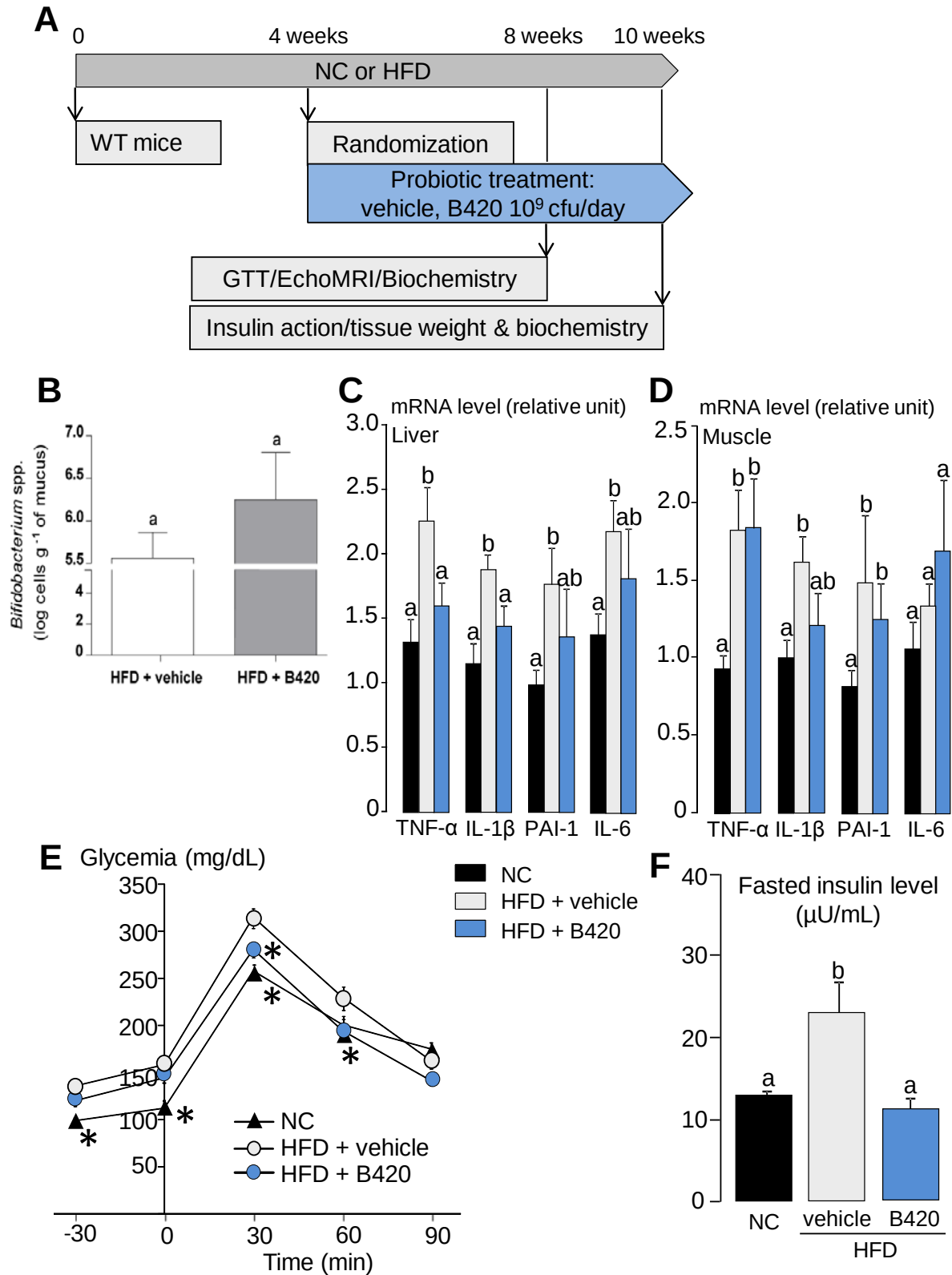


Figure S5. A probiotic treatment with *Bifidobacterium lactis* 420 (B420) reverses high-fat diet (HFD)-induced tissue inflammation, glucose intolerance and fasted hyperinsulinemia.

A. Experimental design for the treatment of HFD-induced diabetic mice with B420. Briefly, wild-type mice (WT) were fed a HFD for 4 weeks, then randomized and treated daily with the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 420 (B420, DSM 22089, 10^9 cfu/day, Danisco) or the vehicle, for 4 weeks. **B.** Concentration of *Bifidobacterium* spp. in ileal mucus quantified by qPCR (log cells/g of mucus). (mean $\pm$ SEM; $n = 8$; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$). **C, D.** Concentration of mRNA coding for the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , PAI-1, and IL-6 in liver (C), and muscle (D), as quantified by RT-qPCR. (mean $\pm$ SEM; $n = 8$ to 10; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$; cytokines expression were not compared between themselves). **E.** Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT; 1 g/kg). (mean $\pm$ SEM; $n = 8$; *: $p < 0.05$ vs HFD + vehicle). **F.** Fasted plasma insulin (μ U/mL). (mean $\pm$ SEM; $n = 8$ to 10; data with identical superscript letters do not differ with $p > 0.05$).

Supplementary Materials and Methods

Animals and diets

Mice were from Charles River (C57bl6, ob/ob, CD14^{-/-}), from our colony as previously described[437] (ob/obxCD14^{-/-}), from CNRS UMR6218 (Orléans, France) (Myd88^{-/-}) or from INSERM U389 (Paris, France) (Nod1^{-/-}, Nod2^{-/-}). They were fed with either a normal chow diet (NC) or a high-fat diet (HFD) (Safe, Augy, France), already demonstrated to induce fasting hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance following one month of feeding[485] [486]. The diabetic phenotype was assessed by intraperitoneal or oral glucose tolerance tests, and fat mass quantified with the EchoMRI 3-in-1 Composition Analyzer (Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA). All of the animal experimental procedures were validated by the local ethical committee of the Rangueil Hospital.

Microscopic visualization and quantification of GFP-*E. coli* in ileal mucosa

Two or five hours after gavage with 10⁹ GFP-*E. coli*, ileal mucosa was scrapped off, spread onto glass slides and observed by fluorescence microscopy for image acquisition (Microscope Zeiss Axio Observer Z1 with AxioVision 4.7.2 acquisition software, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). GFP-*E. coli* were enumerated in 10 different fields per mouse.

Histological localization of GFP-*E. coli* in ileum

Two or five hours after gavage with 10⁹ GFP-*E. coli*, a piece of ileum was formalin-fixed and frozen. Cryostat sections (8  m) were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (200 ng/mL, Sigma-Aldrich, France), mounted and observed by fluorescence microscopy (Zeiss Axio Observer Z1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Images were collected using a Zeiss AxioCam MRm digital camera and AxioVision 4.7.2 acquisition software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany), and merged with Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc., California, USA). Transmucosal GFP-*E. coli*, *i.e.* not localized in the lumen, were enumerated in 10 different fields per mouse.

Immunodetection of dendritic cells in ileum and mesenteric lymph nodes

Two hours after gavage with 10^9 GFP-*E. coli*, mesenteric lymph nodes (MLN) and a segment of ileum were formalin-fixed and frozen. Cryostat sections (8µm) were incubated with hamster anti-mouse CD11c as primary antibody (clone HL3; BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 1/1,000, overnight, room temperature), biotin mouse anti-hamster IgG as secondary antibody (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 1/1,000, 1h 30 min, room temperature), then with Texas Red dye-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pennsylvania, USA, 1/1,000, 30 min in the dark at room temperature) and finally counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (200 ng/mL, Sigma-Aldrich, France). Slides were then observed by using a Zeiss Axio Observer Z1 fluorescence microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Images were collected by using a Zeiss AxioCam MRm digital camera and AxioVision 4.7.2 acquisition software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) and merged with Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc., California, USA). GFP-*E. coli* appear in green, cell nuclei in blue, and CD11c-positive cells in red. CD11c-positive cells co-localized with GFP-*E. coli* are yellow. CD11c-positive cells co-localized with GFP-*E. coli* in ileum and MLN, were enumerated in 10 different fields per mouse.

Quantification of GFP-*E. coli* in blood by RT-qPCR

Blood was collected from the inferior vena cava 2 hours after gavage with 10^9 GFP-*E. coli*. Blood cells were first mechanically disrupted by mini-beads vibrating at 30 hertz for 2 x 3 min on a Retsch Tissue Lyser II (Qiagen GmbH, Germany) with 200 mg of acid-washed glass beads ($\varnothing < 106 \mu\text{m}$; Sigma-Aldrich, France) in Tripure isolation reagent before total mRNAs were extracted according to manufacturer's procedure (Roche Applied Science, Germany). Contaminating DNA was eliminated by DNase I (RNase-free, Ambion Ltd, UK) and the DNase I was removed by a second phenol/chloroform extraction with Tripure, prior to reverse transcription using eAMV-RT (Sigma-Aldrich, France). Primers specific for GFP were designed for this study and were as follows: GFP forward, 5'-CTACCTGTTCCATGGCCAAC-3'; GFP reverse: 5'-AGGGTATCACCTTCAAACCTTGACT-3'. The qPCR assay was performed from the cDNAs with a Stepone Plus Real-Time PCR System and Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA). Data were analyzed by absolute quantification using a standard curve of cDNA synthesized from RNA obtained from a pure culture of GFP-*E. coli*, in order to express the results as cfu-equivalent/mL blood.

Quantification of bacterial DNA in intestine, blood and mesenteric adipose tissue by qPCR

Genomic DNA was isolated from blood, mesenteric adipose tissue (MAT), mesenteric lymph nodes (MLN) or intestine (contents and mucosa), using Tripure isolation reagent (Roche Applied Science, Germany). Briefly, tissues were first homogenized in Tripure and then the cells were mechanically disrupted by mini-beads vibrating at 30 hertz for 2 x 3 min on a Retsch Tissue Lyser II (Qiagen GmbH, Germany) with 200 mg of acid-washed glass beads ($\varnothing < 106 \mu\text{m}$; Sigma-Aldrich, France), before DNA was extracted according to manufacturer's procedure (Roche Applied Science, Germany). Total bacterial DNA was quantified using the following 16S rRNA universal primers: EUBAC-F, 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'; EUBAC-R, 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'[487]. *E. coli* DNA was quantified using the following 16S-23S rRNA primers: IEC-F, 5'-CAATTTTCGTGTCCCCITTCG-3'; IEC-R, 5'-GTTAATGATAGTGTGTCGAAAC-3'[488]. To quantify all gram-negative bacteria, primers targeting the Lipid A disaccharide synthase (LpxB) gene were designed and were as follows: LpxB-F, 5'-GAAGCNTGGTANGANATGGAAG-3' with N6 (degenerated nucleotide in 6th position from 5') = 90%C + 10%T, N12 = 60%C + 40%T and N15 = 60%A + 40%G; LpxB-R, 5'-GGNGCNTCNATNCCNACNAANACATCNGG-3' with N3 = 50%C + 50%G, N6 = 70%C + 30%T, N9 = 90%A + 10%G, N12 = 50%A + 15%C + 35%T, N15 = 60%A + 10%C + 30%G, N18 = 90%A + 10%G, N21 = 45%A + 10%C + 45%G and N27 = 10%A + 10%C + 40%G + 40%T. These LpxB primers were validated for their ability to produce the expected PCR product. To this aim, based upon the *E. coli* LpxB gene sequence[489], non-degenerated primers were designed, used with *E. coli* DNA in a final point PCR reaction and the PCR product was visualized on 6% acrylamide gel after ethidium bromide (EtBr) staining. Quantitative PCR for total bacteria, *E. coli* and gram-negative bacteria were carried out with a Power SYBR Green PCR Master Mix and Stepone Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA). Data were analyzed by absolute quantification using DNA standard curves obtained from a pure culture of *E. coli*.

Quantification of bacterial RNA in mesenteric adipose tissue by RT-qPCR

Mesenteric adipose tissue (MAT) samples were processed for mRNAs extraction as described for blood, with additional homogenization in Tripure isolation reagent with Ultra-Turrax before cells

disrupting by mini-beads vibrating. Contaminating DNA was eliminated by DNase I (RNase-free, Ambion Ltd, UK) and DNase I was removed by a second phenol/chloroform extraction with Tripure, prior to reverse transcription using eAMV-RT (Sigma-Aldrich, France). Total bacterial RNA was quantified from synthesized cDNAs, using EUBAC 16S rRNA universal primers already described above for total bacterial DNA quantification. Data were analyzed by absolute quantification using a standard curve of cDNA synthesized from RNA obtained from a pure culture of GFP-*E. coli*.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of bacteria in c cum, blood and mesenteric adipose tissue

Genomic DNA was isolated from c cal contents, blood, or mesenteric adipose tissue (MAT), using Tripure isolation reagent (Roche Applied Science, Germany) as described above for bacterial DNA quantification by qPCR in the same tissues. The variable V3 region of the 16S rRNA gene was amplified by final point PCR with primers amplifying the conserved V3 surrounding region. The nucleotide sequences of the primers are as follows: HDA1-GC, 5'-**CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG**CCTACGGGAGGCA GCAG-3' (GC clamp in bold); HDA-2, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'. PCR amplification was done with the thermal cycler VWR Unocycler (VWR International, Belgium). The samples were first incubated for 5 min at 94 C to denature the DNA template and subsequently cooled down to 80 C, at which point 0.35 U of Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) was added: this hot start technique minimizes non-specific annealing of primers to non-target DNA. Twenty cycles were then carried out as follows: 94 C for 30 sec, annealing for 45 sec and 72 C for 1 min. The annealing temperature started 10 C above the expected annealing temperature and was decreased by 1 C every second cycle until a touchdown at 55 C, this procedure reducing the formation of spurious by-products during the amplification process. Ten more cycles were then carried out at 55 C as annealing temperature and the final primer extension was carried out at 72 C for 30 min. Amplification products were first analyzed by electrophoresis in 6% acrylamide gels and EtBr staining to check for the presence of the 233bp expected product. DGGE was performed with a DGGE-2401 system (CBS Scientific Company, California, USA). Electrophoresis was carried out with 0.75mm-thick 8% polyacrylamide gels (ratio of acrylamide to bisacrylamide, 37.5:1) submerged in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA; pH 7.4) at 60 C. The electrophoresis was run for 16 h at 60 V in a

linear 35 to 55% denaturing gradient with 100% denaturant defined as 7 M urea and 40% deionized formamide. The gels were stained for 1 h in TAE buffer with Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen, Eugène, USA), visualized by using a Typhoon 9400 variable mode imager fluorescent scanner and analyzed with ImageQuant TL software (v2003; Amersham Biosciences, Little Chalfont, England).

Quantification of bacterial groups in mesenteric adipose tissue and ileal mucosa by qPCR

Bacterial DNA was extracted from mesenteric adipose tissue (MAT) and ileal mucosa by first disrupting tissues and cells by milling with ceramic (ϕ 1.4 mm) and glass beads (ϕ 0.1 mm) (6800 rpm, 3×30 s; Precellys 24, Bertin Technologies, Montigny, France), followed by extraction and purification of DNA with the QIAamp Stool kit (Qiagen, Leiden, The Netherlands) according to manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR (Applied Biosystems Fast 7500; Foster City, CA, USA) was used to quantify *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* group[490], genus *Enterococcus*[490], *Enterobacteriaceae* group[491] and genus *Lactobacillus*[492] from MAT and the genus *Bifidobacterium*[492] from ileal mucus as previously described.

Surgical procedures, infusions, and isotope measurements

Insulin sensitivity was assessed by the euglycemic-hyperinsulinemic clamp method as already described[486]. Briefly, 6h-fasted mice, indwelled with an intrafemoral catheter, were infused with insulin at a rate of $18 \text{ mU.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ for 3 hours. For glucose turnover measurements, D-(^3H)3-glucose (Perkin-Elmer, Boston, MA) was simultaneously infused at a rate of $30 \text{ }\mu\text{Ci.kg}^{-1}$. D-(^3H)3-glucose enrichments were determined from total blood after deproteinization by a Zn(OH)_2 precipitation[486].

Fasted plasma insulin concentration

Plasma insulin concentrations were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Mercodia, Upssala, Sweden) at completion of the fasting period (6 h) in $10 \text{ }\mu\text{L}$ of plasma collected from tail blood.

Quantification of pro-inflammatory markers expression by RT-qPCR

Total RNAs from liver, muscle (*vast lateralis*) and mesenteric adipose tissue (MAT) were prepared using the Tripure isolation reagent (Roche Applied Science, Germany). cDNA was synthesized using a high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and qPCRs were carried out with a Stepone Plus Real-Time PCR System and Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA). Primer sequences for the targeted mouse genes were the following: forward tumor necrosis factor- α (TNF- α), 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'; reverse TNF- α , 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'; forward interleukin-1 β (IL-1 β), 5'-TCGCTCAGGGTCACAAGAAA-3'; reverse IL-1 β , 5'-CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC-3'; forward plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), 5'-ACAGCCTTTGTCATCTCAGCC-3'; reverse PAI-1, 5'-CCGAACCACAAAGAGAAAGGA-3'; forward interferon- γ (IFN- γ), 5'-TTGGCTTTGCAGCTCTTCCT-3'; reverse IFN- γ , 5'-TGACTGTGCCGTGGCAGTA-3'; forward interleukin-6 (IL-6), 5'-ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT-3'; reverse IL-6, 5'-TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC-3'; forward ribosomal protein L19 (RPL19), 5'-GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA-3'; reverse RPL19, 5'-CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT-3'. The relative amount of each mRNA studied was normalized to RPL19 rRNA levels as housekeeping gene, and the data were analyzed according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

CONCLUSION

Nous avons de manière originale, tout d'abord mis en évidence la présence de bactéries dans le sang et le tissu adipeux de souris saines. Sous régime gras diabétogène, nous avons de plus montré chez ces souris, une augmentation de l'adhérence bactérienne à la muqueuse intestinale, avant l'installation de la pathologie. Une augmentation de la translocation de bactéries viables à Gram négatif vers le sang et le tissu adipeux mésentérique, caractérisait également cet état prédiabétique. La présence plus importante d'antigènes pro-inflammatoires tels que les LPS pourrait ainsi alimenter une inflammation métabolique du tissu adipeux, et conduire à une résistance à l'insuline prédisposant au diabète de type 2[422]. Nous avons de plus établi, que l'augmentation de la translocation bactérienne vers le tissu adipeux mésentérique ainsi que l'installation de désordres métaboliques, tels que prise de poids, accumulation de masse grasse, résistance à l'insuline, hyperglycémie à jeun et intolérance au glucose, induits par un régime riche en graisses, nécessitaient la présence des récepteurs CD14 et NOD1, qui reconnaissent des éléments de la paroi des bactéries à Gram négatif, respectivement les LPS et le DAP. Par ailleurs, en l'absence de leptine chez la souris génétiquement obèse et diabétique (ob/ob), nous avons observé à l'état basal, une exacerbation des phénomènes d'adhérence et de translocation bactériennes vers le tissu adipeux mésentérique, conférant à la leptine un potentiel rôle protecteur au niveau de la muqueuse intestinale. Cet effet a été confirmé chez des souris sous régime gras diabétogène ou des souris ob/ob qui, traitées avec le probiotique *Lactococcus lactis* sécrétant de la leptine, ont montré une amélioration de leurs statuts métabolique et inflammatoire. La leptine, au niveau de la lumière intestinale, contribue à la production de mucines sécrétée (Muc2) ou associées à la membrane (Muc3, Muc4), via l'activation des récepteurs de la leptine et l'activation de voies dépendantes de la PKC, de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) et de la MAP (mitogen-activated protein) kinase (MAPK) au niveau des cellules épithéliales intestinales[493, 494]. Nous suggérons ainsi que la leptine pourrait contribuer au renforcement de la barrière intestinale en rétablissant une barrière de mucus protectrice entre l'épithélium et la lumière intestinale. Mais d'autres mécanismes potentiels permettant à la leptine de protéger l'intestin vis-à-vis des infections ont été avancés[495]. Il s'agit notamment du renforcement des jonctions serrées, de l'induction de voies anti-apoptotiques, de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales, de la sécrétion de peptides antimicrobiens ou de l'altération du microbiote intestinal[93, 301]. De plus, au-delà d'effets sur les fonctions de défense des cellules épithéliales intestinales, l'activation du récepteur de la leptine dans l'intestin peut conduire à la production et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui permettent

l'attraction et l'infiltration de cellules immunitaires comme les neutrophiles et les lymphocytes T ainsi que la différenciation des lymphocytes en lymphocytes Th17[495]. Au-delà du renforcement de la barrière de mucus, celui de l'immunité innée intestinale, avec principalement la sécrétion de peptides antimicrobiens au sein du gel de mucus, peut être ainsi également avancé pour expliquer les effets que nous avons observés avec la leptine. Nous avons par ailleurs confirmé l'importance de la protéine adaptatrice MyD88 dans la prévention du diabète[496], en associant de plus ce diabète à l'état basal avec une importante translocation bactérienne vers le tissu adipeux mésentérique chez la souris déficiente en MyD88, translocation qui était quantitativement équivalente à celle observée chez la souris ob/ob. MyD88 étant impliquée dans l'activation des voies inflammatoires en réponse aux récepteurs Toll, nos résultats ont confirmé l'importance des voies de signalisation des motifs bactériens via les TLR pour le maintien de la fonction de barrière intestinale[497] et la résistance à l'infection[498], et positionnent de plus l'homéostasie intestinale en tant qu'élément-clé du maintien de l'homéostasie énergétique. En particulier, les souris déficientes en MyD88 n'expriment pas la lectine antibactérienne RegIIIγ[499], qui est nécessaire à la ségrégation spatiale entre le microbiote et l'hôte dans l'intestin[500] et de manière intéressante, des souris déplétées en MyD88 spécifiquement dans la muqueuse intestinale montrent aussi une diminution de l'expression des défensines alpha par les cellules de Paneth, ainsi qu'une augmentation de la translocation de bactéries commensales[497]. L'importante translocation bactérienne que nous avons quantifiée chez les souris déficientes en MyD88 pourrait alors résulter de l'absence de composés antibactériens notamment dans la lumière des cryptes. Finalement, nous avons utilisé un traitement probiotique avec la souche *Bifidobacterium animalis* sous-espèce *lactis* B420, qui a permis de limiter l'adhérence et la translocation vers le tissu adipeux mésentérique de bactéries principalement de la famille des *Enterobacteriaceae* et d'améliorer le statut inflammatoire et métabolique des souris nourries d'un régime gras, confirmant l'importance du contrôle de l'adhérence intestinale et de la translocation de bactéries commensales dans la régulation des maladies métaboliques. Trois mécanismes généraux sont proposés pour expliquer les effets des probiotiques contre les infections intestinales : l'antagonisme direct, l'immunomodulation et l'exclusion[501]. L'antagonisme direct consiste premièrement en la production directe par les souches probiotiques de peptides et petites molécules antimicrobiennes, aptes à prévenir la translocation et la dissémination systémique de l'infection[181]. Parmi les effets antagonistes vis-à-vis des pathogènes, les probiotiques peuvent aussi réguler négativement des facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence[502, 503] ou dans la production de toxines[504, 505]. Pour ce qui concerne les effets immunomodulateurs, des

effets opposés sont relatés suivant les souches probiotiques concernées, parfois pro-inflammatoires[506, 507], et parfois anti-inflammatoires[508-511], avec des mécanismes sous-jacents qui restent en grande partie inconnus[501]. L'exclusion englobe par ailleurs des mécanismes qui conduisent à un environnement moins hospitalier pour les pathogènes : altération du microbiote résident, diminution du pH, amélioration de l'intégrité de la barrière épithéliale, interférences avec l'adhésion des pathogènes et stimulation de la production de facteurs de défense, comme les mucines et les défensines[501]. Pour ce qui concerne spécifiquement les souches du genre *Bifidobacterium*, la protection contre l'infection est rapportée uniquement chez celles qui expriment suffisamment de transporteurs des hydrates de carbone et produisent ainsi suffisamment d'acétate, *in fine* responsable du renforcement de la barrière épithéliale intestinale[512]. Néanmoins, nous n'avons pas démontré une augmentation significative de la quantité de *Bifidobacterium* spp. dans la muqueuse intestinale, mais seulement une tendance. Nous ne pouvons donc pas attribuer formellement les effets observés à la présence du probiotique dans la muqueuse intestinale. Mais de manière intéressante, la leptine et les probiotiques peuvent contribuer au renforcement de la barrière mucosale intestinale selon des mécanismes communs, à savoir la production de mucines et de défensines.

Par ailleurs, et bien que nous ne l'ayons pas mesuré, l'absence d'hydrates de carbone et donc de fibres dans le régime gras que nous avons utilisé doit avoir pour conséquence un déficit de SCFA dans la lumière intestinale. Or, comme nous l'avons déjà abordé au cours de l'introduction bibliographique, la production de SCFA par le microbiote intestinal à partir de fibres non digestibles est nécessaire au maintien de l'homéostasie mucosale. Les cellules épithéliales intestinales tirent en effet 70% de leur énergie du butyrate[139] et au-delà de ses effets protecteurs vis-à-vis de la cancérogenèse et de l'inflammation intestinale, le butyrate contribue au renforcement de la barrière mucosale[146], en stimulant la migration des cellules épithéliales[147], en augmentant l'expression des mucines[148, 149], de TFF3[150] et des cathélicidines (peptides antimicrobiens)[151]. De plus, l'effet protecteur des souches du genre *Bifidobacterium* contre l'infection est attribué à l'action de l'acétate, *in fine* responsable du renforcement de la barrière épithéliale intestinale[512]. Ainsi, plusieurs niveaux de la fonction de barrière intestinale pourrait revêtir une importance particulière dans la prévention du développement des maladies métaboliques.

Nous proposons ainsi un nouveau paradigme pour la compréhension de l'origine des maladies métaboliques, avec la mise en évidence d'une « infection métabolique » au moins en partie

d'origine intestinale, pouvant alimenter au sein même du tissu adipeux l'inflammation métabolique à l'origine de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Le ciblage de l'adhérence bactérienne intestinale, de la translocation bactérienne, ou des récepteurs aux motifs bactériens impliqués au niveau des tissus, pourraient constituer ainsi des approches originales pour prévenir ou guérir les maladies métaboliques. Dans cette optique, nous avons démontré le potentiel thérapeutique du probiotique *Lactococcus lactis* délivrant de la leptine active dans la lumière intestinale. Dans l'avenir, d'autres molécules bioactives pouvant par exemple, prévenir l'adhérence et la translocation de bactéries commensales, pourraient aussi être vectorisées au niveau de la muqueuse intestinale par le biais de souches probiotiques. Nos travaux ont aussi permis de révéler l'efficacité du probiotique *Bifidobacterium animalis* sous-espèce *lactis* dans la prévention des désordres métaboliques induits par un régime riche en graisses, bien que les effets observés ne puissent pas être formellement attribués à la bactérie utilisée. Par ailleurs, les stratégies utilisant des probiotiques ou prébiotiques ont pour l'instant été développées sans tenir compte de critères écologiques ou évolutionnistes. Ainsi, les bactéries intestinales commensales procurent elles-mêmes des effets bénéfiques sur la fonction de barrière de la muqueuse intestinale, donc des effets probiotiques, en entretenant une inflammation physiologique. Via l'activation des TLR (TLR2 et TLR4), les bactéries commensales induisent ainsi la production de cytokines protectrices, comme l'IL-6 et KC-1 (keratinocytes chemoattractant-1), qui médient une régénération cellulaire épithéliale et une inhibition de l'apoptose[228]. Dans le futur, la sélection de probiotiques ou des cibles de prébiotiques devrait donc concerner des symbiotes, ou même des communautés bactériennes, qui ont co-évolué avec l'homme, car ce sont celles qui sont les mieux adaptées à conférer des bénéfices[15].

Le second article relate des travaux encore non publiés, qui explorent principalement chez l'homme puis chez la souris, la composition du microbiote tissulaire en relation avec le développement du diabète.

ARTICLE 2

Microbiote tissulaire et intestinal au cours du diabète

(manuscrit non soumis)

INTRODUCTION

Suite à l'identification des LPS en tant qu'initiateurs de l'inflammation métabolique conduisant au diabète[422], nous avons décrit dans le premier article la présence d'un microbiote dans le sang et le tissu adipeux[476]. Afin de préciser les possibles interactions moléculaires entre l'hôte et son microbiote, nous avons pensé à analyser la diversité du microbiote tissulaire, ainsi que certains éléments du microbiome en relation avec la synthèse des LPS, ou la régulation de certaines molécules à l'interface du métabolisme, des fonctions vasculaires, des défenses immunitaires et de l'inflammation, telles que le NO[513-518]. Après une étude chez l'homme, nous avons étendu nos analyses au même modèle murin de pré-diabète et diabète induits par un régime riche en graisses et déjà utilisé dans le premier article. La dynamique du microbiote intestinal a été également caractérisée chez la souris, au cours du développement du diabète. En effet, le rôle causal du microbiote intestinal dans le contrôle des maladies métaboliques avait jusqu'alors été démontré principalement pour l'obésité, par transfert chez la souris[301] et évoqué également chez l'homme[93], avec des mécanismes impliquant une efficacité accrue de l'extraction d'énergie à partir des fibres alimentaires[300, 301], ou la régulation de la production intestinale de la molécule FIAF (pour fast induced adipocyte factor) qui contrôle la lipoprotéine lipase et favorise le stockage des triglycérides dans le foie[519]. Néanmoins, ces résultats ont été ensuite contredits. L'absence de microbiote intestinal chez des souris axéniques ne constitue pas, en effet, une protection envers l'induction nutritionnelle de l'obésité, et la production intestinale des facteurs FIAF et ANGPTL4 (angiopoietin-like 4) ne joue pas de rôle causal dans la prise de poids[302]. Par ailleurs, les changements de composition du microbiote sont dissociés de marqueurs d'extraction de l'énergie par les bactéries (SCFA) et reflètent uniquement l'impact du changement de régime alimentaire[303, 304]. Au moment de la réalisation de ces travaux, en 2009 et 2010, le rôle du microbiote était ainsi largement controversé dans le cadre de l'obésité et par ailleurs les études du microbiote dans le cadre strict du diabète de type 2 étaient rares, celui-ci étant généralement étudié en tant que conséquence de l'obésité[446]. Les travaux de Nadja Larsen rapportait néanmoins en 2010, une diminution de la proportion de *Firmicutes* et plus particulièrement de la classe *Clostridia*, avec un ratio *Bacteroidetes* sur *Firmicutes* corrélé positivement avec la glycémie mais pas avec l'index de masse corporelle, chez des patients atteints de diabète de type 2[446]. Le modèle animal d'induction du diabète qui est exploré dans le cadre de cette thèse est avant tout diabéto-gène, ainsi que déjà démontré pour ce type de régime très riche en graisses et ne contenant pas d'hydrates de carbone[520]. Il est donc approprié pour étudier la composition du microbiote en relation avec le développement de la résistance à l'insuline.

Characterization of tissue and gut microbiota in type 2 diabetes

Chantal Chabo^{1¶}, Jacques Amar^{2,3}, Rémy Burcelin¹

Running title: tissue and gut microbiota in type 2 diabetes

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institut de Recherche sur les Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Rangueil (I2MC), 31432 Toulouse, France.

² Rangueil Hospital, Department of Therapeutics, Toulouse, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U558, Toulouse, France.

[¶]Corresponding author: chantal.chabo@inserm.fr

Abstract

The discovery of the role of gut and more recently tissue microbiota on the control of metabolic diseases led us to more precisely describe the different bacterial components present in human blood from a general population and compare with prediabetic and diabetic high-fat diet-induced mouse models. In a cohort of 311 patients, we quantified bacterial DNA (*16S rRNA* gene) in total blood cells DNA, and found that the concentration of *16S rRNA* DNA was positively correlated with fasting glycemia, insulin, and triglycerides, as well as treated diabetes, and negatively correlated with HDL cholesterol. In a subset of diabetic patients and paired controls, we cloned and identified some bacterial groups and species and showed that blood from diabetic patients was enriched in Gram-negative bacteria, mainly from phylum *Proteobacteria*. Furthermore, blood concentration of genes involved in the biosynthesis of lipopolysaccharides (LPS) such as *lpxA* and *lpxB*, as well as genes involved in nitric oxide (NO) metabolism, such as *qnorB*, were increased in diabetics. We further validated these findings in a model of prediabetic and diabetic mice fed a high-fat diet, and extended these observations to mesenteric adipose tissue, suggesting that a change in tissue microbiota and its corresponding functional genes (microbiome), can constitute an early factor involved in the development of diabetes. So, we suggested a possible involvement of bacterial NO-reductases in vascular endothelial dysfunction before the onset of diabetes, leading to an increased recruitment of macrophages carrying Gram-negative bacteria inside adipose tissue, where an LPS-triggered low grade inflammation can then occur to subsequently impair insulin signaling. Furthermore, intestinal microbiota was quantitatively as well as qualitatively changed before the onset of diabetes in mice, with an important increase in Gram-negative to Gram-positive bacteria ratio, in favor of *Bacteroides-Prevotella* group, harboring non-inflammatory forms of LPS. But mechanisms linking gut microbiota dysbiosis to an increase bacterial translocation, before the onset of high-fat diet-induced diabetes, remain to be elucidated.

Introduction

All mammals house trillions of various bacteria into their gut that constitute the intestinal microbiota (1). It is inherited at birth, colonizes the intestine during the first 3-5 years of life and is specie-, age-, and sex-dependent (2). Then, throughout life the bacterial ecology tends to vary mostly according to the environment (3). The recent advent of high-throughput sequencing technologies allowed a major step towards the understanding of the molecular relationships between host and its microbiota. This second genome, the microbiome, has now been identified in a catalogue of more than 4, which is currently updated to 8 millions, non-redundant microbial putative genes and 1 to 2,000 prevalent bacterial species (4). The gut microbiome can classify humans through 3 enterotypes which are not nation- or continent- specific (5). It is more than 100-400 times larger than the human genome, can evolve dynamically according to the nutrition of individuals (4, 5). Each individual has at least 160 shared species and a number of well-balanced host-microbial molecular relationships that would define groups of individuals. An important matter is that individuals respond differently to diet (6, 7) and diseases such as obesity (8), independently from their genetic background or diabetes (9). Furthermore, we and others identified that obese and type 2 diabetic phenotypes in rodents fed a fat-enriched diet, are highly correlated with specific profiles of the intestinal microbiota (10, 11). One step further was made when the causal role of intestinal microbiota on the control of metabolic disease, was unequivocally determined through microbiota transfer in mouse (12) and evoked in humans (13). The first one was related to the bacterial genes involved in the fermentation of dietary fibers that produce short chain fatty acids which are then captured by the host as a supplementary source of energy (12, 14). A second molecular mechanism was related to the regulation by intestinal microbiota of the gut production of fast induced adipocyte factor (FIAF) that controls the circulating lipoprotein synthase and favors triglyceride storage in the liver (15). We also identified lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria as causal molecular links between intestinal microbiota and the well-defined metabolic inflammation (16). LPS from intestinal origin accumulates into the blood following a fat-enriched meal, leading to the establishment of a metabolic endotoxemia that triggers inflammation leading to diabetes and obesity (6, 17). Recently, in front of the highly intricate diversity of intestinal microbiota, we described the presence of a microbiota in tissues such as blood (18) and adipose tissue (19) but of much less diversity. *16S rRNA* DNA pyrosequencing revealed the presence of bacteria from the phylum *Proteobacteria* in large proportion in blood with predominance of the family *Burkholderiaceae*. In patients predisposed to become type 2 diabetic, the amount of bacterial DNA, mostly

represented by Gram-negative LPS-containing *Proteobacteria*, was increased, therefore defining *16Sr RNA* DNA as a predictive biomarker of the disease (18). To precise the molecular interactions between host and microbiota, we thought here to analyze the presence of master genes involved in LPS biosynthesis (20). We also thought to analyze whether bacterial genes could regulate known molecules, involved at the interface of metabolism, vascular function, and inflammation, such as nitric oxide (NO) (21-24).

In the present study, we quantified by qPCR bacterial DNA in the blood of 311 apparently healthy patients, and found a positive correlation between bacterial DNA concentration and several clinical parameters from features of the metabolic syndrome. Diversity of this blood microbiota was further analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), sequencing, and group-, specie- or gene-specific qPCR in a subset of diabetic and paired control patients. Animal preclinical studies were finally performed to validate findings observed in humans with an additional attention to the structure of intestinal microbiota.

Materials and Methods

1 - 311 cases from WHO-MONICA human cohort

Population

Among 1015 subjects, aged between 35 and 64 years, randomly selected from the polling lists by the Toulouse MONICA (Multinational MONItoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) centre between 1995 and 1997, 311 men with complete data for all the measurements, were analysed. Authorization from the appropriate Ethics Committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale, CHU Lille, France) was obtained and each subject signed an informed consent.

Questionnaire and anthropometrical measurements

The examination was performed in the morning and a blood sample was drawn after at least 10 hours fasting. Helped by the medical staff, each subject filled in a questionnaire on his medical history, drug intake, smoking habits, and alcohol consumption. Height, weight, waist and hip circumferences were measured. Tobacco consumption was defined according to current and past consumption.

Blood pressure (BP) measurements

BP measurements were performed with a standard sphygmomanometer (Mercurex III, Spengler, Paris) using cuff size adapted to the subject's arm circumference. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured twice on the right arm of subjects who had been resting for at least 5 min in a comfortable position (supine position). Two consecutive measurements of SBP and DBP were recorded to the nearest 2 mmHg, and the mean values of these were used for the statistical analysis.

Biological analyses

A 20-mL blood sample was drawn into a disodium EDTA tube (after the subjects had fasted for at least 10 hours), stored at room temperature and centrifuged within 4 hours. All measurements were performed in a central laboratory (Toulouse University Hospital in 1996-1997, France). Cholesterol and triglyceride concentrations were measured using enzyme assays (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). High-density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured after sodium phosphotungstate/magnesium chloride precipitation (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Glucose was measured using the standard glucose hexokinase method (DuPont Dimension, Brussels, Belgium). Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was determined by the Friedewald equation only if triglycerides levels were lower than 4.56 mM (4 g/L). C reactive protein was measured using an immunoenzymatic method (IBL, GmbH, Hamburg, Germany). Interleukin-6 (IL-6) concentration was determined with an immunoenzymatic method (Immunotech, Marseille, France). Total plasma insulin was measured by radioimmunoassay (BiInsuline, Eria Pasteur, France). Level of soluble CD14 (sCD14) was assessed by an immunoenzymatic method (IBL, Hamburg, Germany). Plasma LPS concentration was measured with an endotoxin assay, based on a *Limulus* amoebocyte extract with Kinetic-QCL test (Bio Whittaker, Cambrex BioScience, Walkersville, MD). Plasmas were diluted 1/2000 with 0.5% pyroserpse to minimize interferences in the reaction (inhibition or enhancement). In such conditions, the lower limit of detection of human plasma LPS concentration was 9 U/mL.

Bacterial DNA amplification

Genomic DNA was previously isolated from peripheral blood cells by phenol/chloroform extraction (CHU Lille, France). Total DNA concentration was then assessed using NanoDrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). For quantification of total bacterial DNA, conserved region of the gene coding for 16S rRNA surrounding the V3 variable region was amplified by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with primers HDA1 and HDA2 (table 1). The 16S rRNA region amplified with these primers in the different bacterial species was from nucleotide 341 to 534 in *Escherichia coli* (*E. coli*). qPCR was performed with StepOnePlus™ Real-Time PCR System on MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) as follows: 1 µL of blood DNA, 1 µL of standard DNA (*E. coli* DNA) or 1 µL of sterile TE (10 mM Tris-HCl

pH 8.0, 1 mM EDTA) as negative control, was added to PCR mix containing 300 nM of each primer, 10 µl of sterile DEPC-treated water and 12.5 µL of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) per well in 25 µL total volume. Thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 94°C followed by 40 cycles consisting of 15 sec at 94°C, 1 min at 55°C and 30 sec at 72°C. In order to generate comparable data for all subjects, quantification using *E. coli* DNA as standard was independently performed on each plate and blood *16S rRNA* DNA concentration was expressed as ng of *16S rRNA* DNA/µg of total DNA, representing the amount of bacterial DNA (from *16S rRNA* gene) normalized by the total DNA extracted from blood cells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SAS statistical software release 8.2 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA). *16S rRNA* DNA was undetectable for 40% of samples. So, bacterial DNA concentration was analyzed as a dichotomous outcome according to median. In addition, glucose metabolism abnormality was defined as fasting glycemia > 6.1 mM and/or treated diabetes. The relation between glucose metabolism abnormality and *16S rRNA* DNA concentration was assessed using multivariate logistic regression with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

2 - Human diabetes case-control and preclinical study

Human diabetes case-control

Among the 311 men with complete data for all the measurements, aged between 35 and 64 years, and randomly selected by the Toulouse MONICA centre between 1995 and 1997, a diabetes case-control was constituted with two groups differing only by their fasting glycemia. Control group included ten non-diabetic patients with $5.32 \text{ mM} \pm 0.10 \text{ (SD)}$ as fasting glycemia and diabetic group included twelve diabetic patients with $8.49 \text{ mM} \pm 0.31 \text{ (SD)}$ as fasting glycemia.

Animals and diets

Male eight weeks-old C57bL6/J mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed in a controlled environment (inverted 12 hours daylight cycle, lights off at 10h a.m.) and had free access to food and water. Mice were fed with either a normal chow diet (low-fat) [NC, 3% energy from fat, 21% energy from protein and 64% energy from carbohydrate (cereals)] (A04, Safe, Augy, France) or a very high-fat carbohydrate-free diet [HFD, 72% energy from fat (corn oil and lard), 28% energy from protein, and <1% energy from carbohydrate (cellulose)] (U8954 version 1, Safe, Augy, France). This very high-fat diet was previously demonstrated to generate fasting hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance following one month of feeding (Burcelin et al., 2002; Riant et al.; 2009). The diabetic phenotype was assessed by oral glucose tolerance test, and all the animal experimental procedures were validated by the local ethical committee of the Rangueil Hospital.

Nucleic acids extraction from mouse tissues

Genomic DNA and total mRNAs were isolated from caecal contents, blood, or mesenteric adipose tissue (MAT), using Tripure isolation reagent (Roche Applied Science, Germany). Briefly, tissues were homogenized in Tripure and then, cells were mechanically disrupted by mini-beads vibrating at 30 hertz for 2 x 3 min on a Retsch TissueLyser II (Qiagen GmbH, Germany) with 200 mg of acid-washed glass beads ($\varnothing < 106 \mu\text{m}$; Sigma-Aldrich, France), before RNA was precipitated and purified from the upper aqueous phase while DNA was precipitated and purified from lower and intermediate phases according to manufacturer's procedure (Roche Applied Science, Germany). Total DNA and RNA concentration was then assessed using NanoDrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Contaminating DNA was eliminated from RNA extracted from caecal content using DNase I (RNase-free, Ambion Ltd, UK) and DNase I was removed by a second phenol/chloroform extraction with Tripure, prior to reverse transcription using eAMV-RT (Sigma-Aldrich, France).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of bacteria in cæcum, blood and mesenteric adipose tissue (MAT)

The variable V3 region of the *16S rRNA* gene was amplified by final point PCR with primers HDA1-GC and HDA2 (**Table 1**). PCR amplification was done using the thermal cycler VWR Unocycler (VWR International, Belgium). The samples were first incubated for 5 min at 94°C to denature the DNA template and subsequently cooled down to 80°C, at which point 0.35 U of *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich, France) was added; this hot-start technique minimizing non-specific annealing of primers to non-target DNA. Twenty cycles were then carried out as follows: 94°C for 30 sec, annealing for 45 sec and 72°C for 1 min. The annealing temperature started 10°C above the expected annealing temperature and was decreased by 1°C every second cycle until a touchdown at 55°C. Ten more cycles were then carried out at 55°C as annealing temperature and the final primer extension was carried out at 72°C for 30 min. Amplification products were first analyzed by electrophoresis in 6% acrylamide gels to check for the presence of the ~233bp expected product. DGGE was performed with a DGGE-2401 system (CBS Scientific Company, California, USA). Electrophoresis was carried out with 0.75mm-thick 8% polyacrylamide gels (ratio of acrylamide to bisacrylamide, 37.5:1) submerged in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA; pH 7.4) at 60°C. The electrophoresis was run for 16 h at 60 V in a linear 35 to 55% denaturing gradient with 100% denaturant defined as 7 M urea and 40% deionized formamide. The gels were stained for 1 h in TAE buffer with Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen, Eugène, USA), visualized on the Typhoon 9400 variable mode imager fluorescent scanner and analyzed with ImageQuant TL software (v2003; Amersham Biosciences, Little Chalfont, England). Bands' relative intensities were finally used to perform hierarchical clustering of bacterial profiles with Permut Matrix software version 1.9.3 (<http://www.limm.fr/~caraux/>) (Montpellier, France).

DGGE bands identification

In order to identify bacteria, bands were excised from the human blood DGGE, placed in 0.5 mL TE pH8.0 at 4°C, overnight. Acrylamide was then crushed with a magnetic stirring bar and after centrifugation at 12,000g for 5 min, supernatant was used for subsequent purification. PCR products were concentrated and purified by isopropanol precipitation in 3 M sodium acetate, sedimented at 12,000g for 15 min, washed two times with 1 mL 80% ethanol, dried and

suspended in TLE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH8.0). 4 µL of each purified product was then amplified by PCR with HDA1 and HDA2 primers (targeting V3 region of *16S rRNA* gene) but without GC-clamp (**Table 1**), using the same cycling conditions as for DGGE PCR. PCR products were visualized by 6% acrylamide gel electrophoresis, purified using the EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (Bio Basic Inc., Canada) and sequenced by the Sanger technique using BigDye Terminator chemistry (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sequences were finally resolved on the Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sequences obtained were identified using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (NCBI, National Institute of Health, USA) and SeqMatch menu from Ribosomal Database Project Release 10 (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, USA).

Molecular cloning and sequencing of bacterial DNA in human blood

Region V1-V2-V3 of *16S rRNA* gene was amplified from human blood DNA in order to accurately identify bacteria. 5 µL of human blood cells DNA were involved in a 25 µL PCR mixture containing 0.1 µM of primers 10f and 534r (**Table 1**), 0.35 U of *Taq* polymerase (Sigma-Aldrich, France), 1 M betain, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and DEPC-water. Thermal cycling consisted of an initial denaturation of 5 min at 94°C, followed by three cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 50°C and 1 min at 72°C, followed by 35 cycles of 20 sec at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were visualized and gel-purified after electrophoresis on 6% acrylamide. Only bands with the good size (~520bp) were cut from gel and put in 10µL TE pH8.0 at 4°C, overnight. Acrylamide was then crushed with a magnetic stirring bar and after centrifugation during 5 min at 12,000g, supernatant was used for cloning. Purified PCR products (2 µL) (4 from non-diabetics and 4 from diabetics) were cloned into a TOPO TA pCR®2.1 vector, and transformed into *E. coli* TOP10 chemically competent cells, according to manufacturer instructions for the *Taq* polymerase-amplified PCR products cloning kit (TOPO TA cloning® kit, Invitrogen, California, USA). Transformants were screened by PCR colony with M13 primers (**Table 1**) and appropriate product sizes were determined by acrylamide gel electrophoresis. Thermal cycling consisted of an initial denaturation of 10 min at 95°C, followed by 28 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 49°C and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. The insertion of V1-V2-V3 region was checked by electrophoresis on 6% acrylamide gel. Plasmids from 65 positive clones (10 for non-diabetics , 55

for diabetics) were extracted using the PureYield™ Plasmid Miniprep System according to manufacturer instructions (Promega, USA). Inserts were then sequenced and identified with the same protocol described above for excised DGGE bands.

Quantification of bacterial DNA in cæcum content, blood and mesenteric adipose tissue (MAT) by qPCR

Universal primers used in this study are listed in **Table 1**. Total bacterial DNA was quantified using 16S rRNA universal primers (Eubac). To quantify all gram-negative bacteria, we targeted DNA encoding two different enzymes involved in the biosynthesis of lipid A, the pro-inflammatory moiety of LPS, LpxA and LpxB. LpxA (UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase) catalyzes the first reaction of lipid A biosynthesis while LpxB (lipid A disaccharide synthase) catalyses the condensation of 2,3-bis(3-hydroxymyristoyl)- β -D-glucosaminyl 1-phosphate and UDP-2,3-bis(3-hydroxymyristoyl)glucosamine (lipid X) to form lipid A. More specific primers were also used to quantify bacterial groups or species. Primers for Gram-positive bacteria are listed in **Table 2** and primers for Gram-negative bacteria are described in table 3. All the qPCR reactions were carried out with StepOnePlus™ Real-Time PCR System on MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) as follows: 2 μ L of DNA were added to PCR mix containing 300 nM of each primer, 9.5 μ L of sterile DEPC-treated water and 12.5 μ L of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) per well in 25 μ L total volume. Thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 94°C followed by 40 cycles consisting of 15 sec at 94°C, 1 min at appropriate annealing temperature (**Tables 1, 4 and 5**) and 30 sec at 72°C. Total bacterial DNA was absolutely quantified in total cæcum content using a standard curve of *E. coli* DNA. Relative abundance of main bacterial groups in cæcum content was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with universal 16S rRNA (Eubac) as reference gene and then normalized to total cæcum content in bacterial DNA, in order to give quantitative results. In blood and MAT, each primers' set was tested on serial dilutions of cæcum content DNA in order to verify and define the linear relation between C_t and DNA quantity. The number of target DNA copies was then calculated for each primers' set and normalized to total DNA.

Quantification of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) mRNA in mesenteric adipose tissue (MAT) by RT-qPCR

RT-qPCR was carried out with a Stepone Plus Real-Time PCR System and Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) as previously described (Amar et al., 2011). Sequences of primers for tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3' (forward) and 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' (reverse). Sequences of primers for ribosomal protein L19 (RPL19) were 5'-GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA-3' (forward) and 5'-CCCTGTCTGCCCTTCAGCTTGT-3' (reverse). The relative amount of TNF- α mRNA was normalized to RPL19 rRNA level as housekeeping gene, and data were analyzed according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Statistical analysis

Data were analyzed using Prism GraphPad version 5.01 (GraphPad Software Inc., California, USA). All data are expressed as mean $\pm$ standard error to mean (SEM). For comparison of 2 groups, Student's *t* test was used. For comparison of more than 2 groups, ANOVA was performed followed by Bonferroni's Multiple Comparison test to determine significance between groups. For linear regression analysis, significance of the correlation was determined by Pearson's test. Statistical difference was considered significant when $p < 0.05$.

References:

- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B (2002) Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E834-842
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150: 2109-2117
- Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán L G, Smirnova N, Bergé M, Sulpice T, Lahtinen S, Ouwehand A, Langella P, Rautonen N, Sansonetti P J, Burcelin R (2011) Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Molecular Medicine* Sep;3(9):559-72

Results

Bacterial *16S rRNA* DNA concentration in human blood cells

Blood concentration in bacterial DNA (*16S rRNA* DNA), was significantly correlated with features parameters of metabolic syndrome. Fasting glycemia, insulin and triglycerides, as well as percentage of treated diabetes were significantly higher in patients with blood bacterial DNA concentration above the median (0.065 ng 16S *rRNA* DNA/ μ g total DNA) (**Table 4B**). In addition, plasma HDL cholesterol was significantly lower in the same class of patients (**Table 4B**). Moreover, morphological characteristics (weight, waist circumference and body mass index), total cholesterol, treated dyslipidemia, blood pressure, hypertension and inflammatory markers (leukocytes count, CRP, sCD14, IL-6 and detectable endotoxemia) were not significantly different between the two classes of patients, either below or above the median for blood bacterial DNA concentration (**Tables 4A, 4B**). Furthermore, in multivariate logistic regression, blood bacterial DNA concentration, as well as waist circumference and systolic blood pressure, were independently associated with glucose metabolism abnormality (fasting glycemia > 6.1 mM and/or treated diabetes), after adjustment for traditional risk factors (**Table 5**).

Blood *16S rRNA* DNA diversity in diabetic cases and controls

We first analyzed blood bacterial diversity in four diabetics matched with four controls using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplicons of V3 region of the *16S rRNA* gene. After hierarchical clustering of the eight profiles according to band's relative intensities, both groups of patients could not be separated according to diabetes (**Figure 1**). In addition, sequencing of four bands excised from gel allowed to identify the highly abundant specie *Propionibacterium acnes* (darkest band at bottom of gel in **Figure 1**) as well as two other unclassified bacteria belonging to the same class of high-GC content Gram-positive bacteria, i.e. *Actinobacteria*, and one Gram-negative bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* (class *Gamma*proteobacteria) seen to be particularly abundant in blood of diabetic patient 318 (**Figure 1**). In order to more accurately identify bacteria, the V1-V2-V3 region of the *16S rRNA* gene was amplified by PCR from blood of both groups of patients, subsequently cloned and sequenced. Confirming what we found by identification of DGGE bands, the specie *Propionibacterium acnes* along with some species from the genus *Corynebacterium* (class *Actinobacteria*) were highly

represented in both groups. *Propionibacterium acnes* alone represented 67% of sequences identified in blood of non diabetics and 33% of sequences identified in blood of diabetics. But according to the number of clones analyzed, only 10 for non diabetics and 45 for diabetics, we couldn't conclude here on the apparently higher abundance of Gram-positive bacteria, such as *Propionibacterium acnes* in blood of non diabetics or on the higher bacterial diversity in blood of diabetics, that could result in fact from the higher number of sequences analyzed (**Figures 2A, 2B**). However, beyond the 55 total clones analyzed, 63% of sequences were identified as belonging to Gram-positive bacteria and 37% to Gram-negative bacteria. And moreover, all identified bacteria were oxygen-tolerant, with only one exception for a *Prevotella* specie representing only 1.7% of total sequences (**Table 6**). In order to quantify bacteria in blood of diabetics we then used specific quantitative PCR (qPCR). Beyond the panel of Gram-negative bacteria analyzed, the more abundant was *Parococcus denitrificans*, without difference between diabetics and non diabetics (**Figure 3A**). The only significant increase in blood of diabetics was observed for *Shewanella woodyi* and *sediminis* (primers' pair used amplifying the 2 species), as well for the sum of all Gram-negative bacteria (**Figures 3A, 3B**). However we didn't found any significant correlation between the sum of Gram-negative bacteria and fasting glycemia (**Figure 3C**). Conversely, for Gram-positive bacteria, the sum of groups and species analyzed was significantly lower in blood of diabetics, with the predominance of *Propionibacterium acnes*, thus confirming observations made from sequencing data (**Figures 4A, 4B**). However, Gram-negative to Gram-positive ratio wasn't significantly changed (**Figure 4C**). In addition, we found a negative correlation between all Gram-positive bacteria and fasting glycemia becoming significant when considering only diabetic patients (**Figures 4D, 4E**), with the main contribution of the largely dominant specie *Propionibacterium acnes*, that could thus be considered as a negative biomarker of diabetic state (**Figure 4F**).

Relevant bacterial genes in blood correlate with the diabetic phenotype

Since the concentration of universal *16S rRNA* DNA was higher in diabetic patients than in controls (**Figure 5A**), we thought to quantify master genes from the LPS biosynthesis pathway i.e. *lpxA* and *lpxB*. The copy number of each gene over the total blood DNA or *16S rRNA* DNA content were both increases in diabetics when compared to controls (**Figures 5A, 5B**). We then quantified important genes from the nitric oxide (NO) metabolism in bacteria such as nitric oxide reductase (Nor) and nitrite reductase (Nir), precisely *qnorB* gene coding for quinol-dependent

Nor, *cnorB* gene coding for cytochrome c/pseudoazurin-dependent Nor, *nirK* gene coding for Cu-containing Nir and *nirS* gene coding for *c* and *d1 hemes*-containing Nir. Only *qnorB* gene was increased in blood DNA from diabetic patients when compared with controls (**Figure 6**). Interestingly, although only a tendency was observed for some known Gram-negative qNorB-expressing bacteria (*Parococcus denitrificans*, *Synechocystis trididemni*, *Diaphorobacter nitroreducens* and *Ralstonia eutropha*), the Gram-negative specie *Shewanella woodyi* which is highly involved in NO metabolism (25) was significantly increased in diabetic patients (**Figure 3A**).

Blood bacterial markers of glycemia in non-diabetic patients.

Although we didn't find any correlation between fasting glycemia and concentration of total Gram-negative bacteria (**Figure 3C**), significant positive correlation between the concentration of some individual bacteria and fasting glycemia was interestingly found only when considering non-diabetics. Thus, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia mannitolylitica*, *Acinetobacter baumannii*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Xanthomonas axonopodis* could be considered as putative markers of fasting hyperglycemia in prediabetic state, and so, putative predictive markers of diabetes (**Figure 7**).

Blood bacterial DNA in preclinical animal models

To validate findings made in humans we set up an animal model of prediabetic state consisting in feeding mice a high-fat diet for only one week. This short-term nutritional treatment was not able to modify fasting glycemia but was engaging mice to become diabetic after four weeks of diet treatment. We first analyzed by DGGE the *16S rRNA* DNA (V3) diversity in blood from prediabetic mice, and hierarchical classification wasn't able to segregate the two groups of mice according to diet (**Figure 8A**). After 4 weeks of fat-enriched diet, the two groups of mice were no more segregated by hierarchical clustering but only one mouse from each group was randomly distributed (**Figure 8B**). Furthermore, the concentration of *16S rRNA*, *lpxB* and *qnorB* genes were increased in blood from prediabetic and diabetic mice (**Figures 9A, 9B**). In addition, we found a significant positive correlation between *cnorB* or *qnorB* gene concentration in blood and $\text{TNF-}\alpha$ mRNA relative expression in mesenteric adipose tissue (MAT) (**Figures 9C, 9D**).

Diversity of the bacterial population was also studied by qPCR in prediabetic and diabetic mice. In blood of prediabetic mice we found a significant increase in concentration of the qNorB-expressing bacteria *Ralstonia eutropha*, and a significant decrease in the concentration of the strictly anaerobic *Bacteroides-Prevotella* species (**Figure 10A**). In blood of diabetic mice, DNA concentration of the two qNorB-expressing bacteria, *Diaphorobacter nitroreducens* and *Parococcus denitrificans* as well as *Cardiobacterium hominis*, were significantly increased (**Figure 10A**). Consequently, sum of DNA concentration from all Gram-negative bacteria tested was significantly increased in blood of diabetic mice (**Figure 10B**). A significant positive correlation was also found between *Cardiobacterium hominis* DNA concentration in blood, and fasting glycemia as well as body weight of all mice (**Figures 10C, 10D**). When considering Gram-positive bacteria, blood DNA concentration from the *Clostridium leptum* subgroup, was significantly increased in prediabetic and diabetic mice whereas we found a decrease in DNA concentration from the *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group only in prediabetic mice (**Figure 11A**). Hence, sum of total Gram-positive bacteria DNA concentrations was unchanged whereas Gram negative to Gram positive bacteria ratio tended to continuously increase during diabetes development (**Figures 11B, 11C**).

Adipose tissue bacterial DNA in preclinical animal models

We previously reported that the presence of bacterial DNA in the adipose depot from diabetic mice was increased (19). We here further analyzed the diversity of these bacteria found in mesenteric adipose tissue (MAT) by DGGE profiling and showed that diabetic group of mice segregated from non-diabetic mice (**Figure 12A**) while prediabetic group wasn't separated from corresponding controls by hierarchical classification of their bacterial profiles (**Figure 12B**). Moreover, quantification of a survey of Gram-negative bacteria by qPCR showed an increase in DNA concentration of several bacterial species in MAT from prediabetic and diabetic mice when compared with controls (**Figure 12C**). Thus, three qNorB-expressing bacteria (*Parococcus denitrificans*, *Synechocystis trididemni*, *Ralstonia eutropha*) as well as *Ralstonia mannitolylitica* were significantly increased before the onset of diabetes, whereas *Ralstonia mannitolylitica*, *Parococcus denitrificans* as well as *Cardiobacterium hominis* were found significantly increased in diabetic mice, when compared to NC-fed controls. Therefore, the sum of DNA concentrations from all Gram-negative bacteria tended to increase in prediabetic and diabetic mice when compared to controls (**Figure 12D**). In parallel, the concentration in *16S rRNA* and *cnorB* genes was increased in

prediabetic mice adipose depot while the concentration in *16S rRNA*, *lpxB* and *qnorB* genes were increased in diabetic mice adipose depot when compared to controls (**Figures 13A, 13B**). Interestingly, concentration of DNA from some Gram-positive bacteria was also increased in MAT of prediabetic and diabetic mice (**Figure 14A**). Similarly to that was found in blood, concentration in DNA from *Clostridium leptum* subgroup was increased in MAT before the onset of diabetes. Whereas in diabetic state, MAT was significantly enriched in DNA from *Atopobium* cluster (mainly comprising *Faecalibacterium praunitzii*), *Lactobacillus* group and segmented filamentous bacteria (SFB). Consequently, the sum of DNA concentrations from all Gram-positive bacteria also tended to increase and the Gram-negative to Gram-positive ratio remained similar in the three groups of mice (**Figures 14B, 14C**).

Cæcum microbiota in preclinical animal models

We then analyzed the impact of high-fat feeding as well as fasting on cæcum microbiota. Conversely to that was found in blood and MAT, quantity of *16S rRNA* DNA was reduced in total cæcum content from prediabetic, starved or diabetic mice, when compared to control mice (**Figures 15A, 15D**). After DGGE analysis of viable and non-viable cæcum microbiota, despite a lot of common bands, hierarchical clustering was able to segregate prediabetic and control mice, while bacterial profiles from starved or prediabetic mice couldn't be differentiated (**Figures 15B, 15C**). But after four weeks of high-fat feeding, DGGE profiles of viable and non-viable microbiota were strongly different between diabetic and control mice (**Figures 15E, 15F**). We then analyzed cæcum microbiota diversity by qPCR in the same preclinical animal models. Even if DGGE analysis wasn't able to distinguish differences between the effect of starving or high-fat feeding during one week, specific qPCR could however reveal some differences. When considering Gram-positive bacteria, common trait between 1-week high-fat feeding and 48h-starving was a significant decrease in members of *Atopobium* cluster, *Lactobacillus* group, *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group, and SFB, while members of *Clostridium leptum* subgroup as well as *Bifidobacterium* spp. were decreased after 1-week of high-fat feeding only (**Figure 16A**). For Gram-negative bacteria, nitrite-oxidizing bacteria (*Nitrospira* spp.) and *Helicobacter-Flexispira-Wollinella* spp. were reduced in both prediabetic and starved mice, whereas *Enterobacteriaceae* spp. were increased specifically in starved mice and *Bacteroides-Prevotella* spp. only in prediabetic mice after 1-week high-fat diet, when compared to control NC-fed mice (**Figure 16A**). Thus, sum of all Gram-positive bacteria was significantly decreased in prediabetic and starved mice, whereas sum

of all Gram-negative bacteria was increased, compared to NC-fed controls (**Figure 16B**). Consequently, Gram-negative to Gram-positive ratio was increased after 48h-fasting as well as after 1-week high-fat feeding (**Figure 16C**). Despite a same global effect between fasting and high-fat feeding, impact of fat-enriched diet during one week was more pronounced because of a greater contribution of *Bacteroides-Prevotella* species on total Gram-negative bacteria (**Figure 16A**). In diabetic mice, after four weeks of high-fat feeding, we also observed a decrease in the sum of all Gram-positive bacteria, and an increase in the sum of total Gram-negative bacteria, leading to a significantly greater ratio between Gram-negative and Gram-positive bacteria, when compared to NC-fed control mice (**Figures 16E, 16F**). When analyzing bacterial groups contribution to this effect, we found that members from *Bifidobacterium* genus, *Lactobacillus* group, and *Atopobium* cluster were decreased, whereas those from *Clostridium leptum* subgroup were increased in cæcum microbiota of diabetic mice when compared to controls (**Figure 16D**). If considering Gram-negative bacteria, we observed an increase in *Bacteroides-Prevotella*, *Helicobacter-Flexispira-Wollinella*, and *Desulfovibrio* species (**Figure 16D**).

Discussion

We here found that total blood cells DNA fraction from type 2 diabetic patients was characterized by an increased proportion in genes from Gram-negative bacteria, and by a decreased proportion in genes from Gram-positive bacteria. We further established that concentration in *lpxB* and *qnorB* genes, involved in lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis and nitric oxide metabolism, respectively, were increased in blood from type 2 diabetic patients. Importantly, we validated these observations in blood and mesenteric adipose tissue (MAT) from prediabetic and diabetic mouse models. Altogether, present data further validate the recent concept of intestinal bacterial translocation that mediates metabolic infection during the development of type 2 diabetes.

In front of the growing body of evidence about the role of intestinal microbiota on the control of metabolic diseases (26) we recently reported the presence of a tissue microbiota that can originate from selective translocation of some gut microbes (18, 19). We showed that patients who intend to become type 2 diabetic within the following 6-9 years, were characterized by an increased bacterial DNA concentration in blood (18) which defined *16S rRNA* DNA as a biomarker of type 2 diabetes. However, the precise composition of this tissue microbiota and its corresponding genes (microbiome) was not known. We here further validated the concept of tissue microbiota in the human cohort MONICA, from general population, and also reported that concentration of *16S rRNA* DNA was increased in blood of patients with established diabetes. Furthermore, the amount of bacterial DNA was significantly correlated with several features characterizing metabolic syndrome, such as fasting hyperglycemia, hyperinsulinemia, low HDL cholesterol, and waist circumference. Altogether, these data could suggest that, in addition to the well-known low grade metabolic inflammation (27, 28), a low grade metabolic infection would characterize type 2 diabetic patients as well as these at risk for developing metabolic diseases. The concept of metabolic infection has been previously addressed through the use of antibiotic treatments. They have been successfully experienced to alleviate the impact of a fat-enriched diet, by reducing body weight gain, glucose intolerance, atherosclerosis, and inflammation in rodents with metabolic syndrome (29-31) and even in type 1 diabetes models (32), which has recently been shown to be, at least in part, causally linked to a change in gut microbiota (33, 34). Development of a low grade inflammation and infection during metabolic diseases is most likely associated with a role of innate immune system that infiltrates adipose depots (35, 36), secretes cytokines (27), and impairs insulin action (37, 38). Furthermore, recent evidences suggest that adaptive immune

system is also involved in the inflammatory process leading to diabetes in response to a fat-enriched diet, since transfer of IgG (39) or lymphocytes (40) from a diabetic mouse, induced glucose intolerance in recipient mouse. Therefore, our data here suggest that antigens responsible for activation of innate immune system within a targeted tissue, such as mesenteric adipose depot, could be related to a change in tissue microbiota. To identify some of the major differences in tissue microbiota related to diabetes, a diabetes control case, comprising 12 diabetics and 10 non-diabetics paired controls, was constituted within the 311 patients sampled from cohort MONICA. We first performed DGGE profiling followed by cloning and qPCR quantification of specific bacterial groups and species in blood DNA fraction. DGGE was performed in a small subset of patients (n=4), and hierarchical classification of whole DGGE bacterial profiles couldn't discriminate patients according to their fasting glycemia. Nevertheless, sequencing of some excised bands allowed the identification of high-GC-containing Gram-positive bacteria from class *Actinobacteria* as predominant members of this particular microbiota, mainly represented by the species *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Further sequencing of bacterial clones issued from blood DNA libraries, confirmed a high percentage of sequences from class *Actinobacteria* (*Propionibacterium* and *Corynebacterium* species), which were found decreased in blood of diabetics. Interestingly, qPCR results confirmed the importance of *P. acnes* DNA in human blood with, in addition, a negative correlation between its concentration in blood and fasting glycemia, suggesting a protective role for this bacterium against glycemic abnormalities. *P. acnes* (formerly *Corynebacterium parvum*) is part of the human flora and as such, is usually harmless, but also associated with several human pathologies, such as sarcoidosis (53). Furthermore, *P. acnes* possesses strong immunomodulatory activities, which make this bacterium interesting for prophylactic and therapeutic vaccination (51). *P. acnes*-based immunostimulant vaccines are thus used in the adult horse and have been shown to stimulate macrophage function, natural killer cell (NK) cytotoxicity, and production of cytokines IL-1 β and IFN- γ (52). In mice, intraperitoneal injection of killed *P. acnes* showed nonspecific resistance against subsequent lethal doses of an intraperitoneal challenge with *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes* (50). Treatment with *P. acnes* induces hypersensitivity to LPS, but also to bacterial lipopeptides and possibly other pathogen-associated molecular patterns, enhancing recognition of pathogens and elicitation of an accelerated and enhanced inflammatory reaction. This forms the basis for the enhanced resistance of *P. acnes*-primed animals to infection (51). We could thus speculate that the decrease in *P. acnes* DNA observed in blood of diabetics could have resulted in impaired immune vigilance, notably against Gram-negative bacteria. An enrichment in sequences from

Gram-negative bacteria, mainly belonging to *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* classes, was revealed in patients with established diabetes, when compared to their corresponding paired controls. And qPCR confirmed a significant increase in the sum of DNA from Gram-negative bacteria in blood of diabetics. This is in agreement with the fact that an increased LPS concentration was found in plasma of patients with type 2 diabetes (41), as well as in patients eating preferentially a fat-enriched diet (42). However, when considering fecal microbiota, bacterial diversity have been shown to be less diverse in type 2 diabetics (9) as well as in obese patients (8). Our data thus suggest that gut microbiota reaches blood through a process that selects the translocation of bacteria as proposed recently (18, 19). Paracellular mechanisms involving loosening of tight junctions between enterocytes (10, 30), or transcellular translocation through M cells in Peyer patches (43, 44), and as well as through goblet cells (45), have been proposed. Importantly, most of bacteria found in blood were aerobic and facultative anaerobic, or strictly aerobic, suggesting that lungs or skin could also be one site of entry for these bacteria. Changes in lung permeability has thus been previously reported in type 2 diabetic patients (46), and were linked to a modified thickness of capillary endothelial basement membrane. Moreover, and whatever the origin of bacterial translocation (airways, skin or intestine), blood microbiota structure, with mainly oxygen-tolerant species must more probably reflect the presence of oxygen in blood. In contrast, intestinal environment is highly anaerobic, and predominant Gram-negative bacteria found there, are strictly anaerobic, belonging to genera *Bacteroides* and *Prevotella*, as we further showed in cæcum of mice. However, we cannot rule out that contamination during sampling procedures could occurred, although this process should have similarly affected both controls and diabetic patients, which was not the case reported here. The increase in the proportion of Gram-negative bacteria within blood DNA fraction, prompted us to consider genes from the LPS pathway as putative biomarkers of type 2 diabetes. We quantified by qPCR *lpxA* and *lpxB* genes, coding for UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase and lipid A disaccharide synthase, respectively. Their concentration, although extremely low, was increased within blood DNA fraction of type 2 diabetic patients, validating a higher specific translocation of Gram-negative bacteria. However, we couldn't identify whether these genes were originating uniquely from intestine.

Through sequencing of the overall intestinal microbiome, the notion that microbiome, composed by all genes expressed by the microbiota, is a more relevant feature to identify molecular components leading to the development of metabolic diseases, has recently emerged (5, 8). Clusters of bacterial genes from intestinal microbiome, are currently correlated with

metabolic diseases (8), but their function on the development of diabetes remains to be understood and validated. However, we here considered a different strategy and suggested that the function of eukaryotic proteins encoded by their corresponding genes, involved in the regulation of diabetes, could be altered by prokaryotic genes. The synthesis of nitric oxide (NO) by nitric oxide synthases, is a putative example, since NO is a molecule of upmost importance for the control of vascular tone (47, 48), and insulin resistance (23, 24). Using universal primers able to recognize NO reductase (NOR)-coding gene from different bacterial species, we here showed by qPCR that concentration of *qnorB* was increased in blood DNA fraction from type 2 diabetic patients. This gene is expressed by various bacterial species such as *Ralstonia eutropha*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Parococcus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, *Diaphorobacter denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Synechocystis trididemni*, *Bacillus cereus*, *Bacillus azotoformans*, and 16S rRNA DNA from *Parococcus denitrificans* was found to be at least ten-fold more concentrated than others bacterial DNA quantified in human blood, and tended to be more present in blood of diabetics. Bacterial NOR are found as integral membrane protein complex responsible for the reduction of NO to nitrous oxide (N₂O), and their presence could lead to a reduction of NO concentration into blood of diabetics contributing, at least in part, to hypertension and insulin resistance commonly observed in type 2 diabetic patients (48). On another hand, enzymatic removal of NO can also be discussed as a potential defense strategy of invasive bacteria against phagocytic cells. Between the two types of bacterial NORs, cNOR and qNOR, the latter is present in several pathogens that are not denitrifiers, and when qNOR is expressed in a background that lacks the other functions of denitrification, its physiological activity may relate to the detoxification of NO not produced by the bacterium itself, but present in its environment, host's macrophages being a likely source for this NO (54). The presence of cNOR is thus characteristic of the denitrifying activity, and in many (pathogenic) organisms, qNOR may be considered as a virulence factor for invading bacteria. The fact that among the four genes involved in denitrifying activity (*nirS*, *nirK*, *cnorB*, *qnorB*), only *qnorB* concentration was modified in human blood consolidates this latter hypothesis, at least in established diabetic state.

To further validate our findings and follow what can happen before the onset of diabetes, we set up an animal model of type 2 diabetes and prediabetes by feeding mice a fat-enriched diet for different duration, as previously described (11). In prediabetic mice, analysis of blood bacterial DNA diversity by DGGE could not discriminate between cases and controls. In established diabetes, the same mice couldn't be no more segregated according to their bacterial DNA profiles, despite a great tendency. Although the causal role of change in blood microbiota on the

metabolic phenotype couldn't be revealed by DGGE in this study, we here showed that in prediabetic mice, blood concentration of *16S rRNA*, *lpxB* and *qnorB* gene were already increased and further enhanced in established diabetes. This set of data suggests that a progressive accumulation of bacterial DNA into blood could be a marker of the causal role of intestinal microbiota. Specific accumulation of *cnorB* and *qnorB* gene in blood was furthermore positively correlated with TNF- α expression in MAT, linking NO destruction in blood vasculature to adipose tissue inflammation, already shown to lead to insulin resistance (55). As already reported, a reduction of vascular NO content precedes the onset of vascular and then peripheral tissue (such as liver, muscle, and adipose) inflammation and insulin resistance during high-fat feeding (56). From our results, we can thus speculate that bacterial NOR activities could be responsible for the initial destruction of NO in blood vasculature, irrigating tissues as adipose tissue. Bacterial DNA from the qNORB-expressing species *Ralstonia eutropha* was increased in prediabetic state while DNA concentration of *Parococcus denitrificans* and *Diaphorobacter nitroreducens* were only increased during diabetes in mouse. But the presence of bacterial DNA into blood can be considered as a witness of bacterial functions affecting tissues involved in the development of metabolic disease. An important tissue is the adipose depot which is infiltrated by innate and adaptive immune cells, as described (49) and characterized by increased bacterial DNA content (19). This is the reason why we then focused on MAT. Similarly to what observed into blood, bacterial DNA DGGE profiles could not be segregated between mice in prediabetic state and controls, but dissimilarities were clearly identified when diabetes was installed. Moreover, three qNORB-expressing bacteria, *Ralstonia eutropha*, *Parococcus denitrificans*, and *Synechocystis trididemni*, showed a significant increase in their concentration before diabetes. Nevertheless, universal *qnorB* as well as *lpxB* DNA concentration were significantly increased only when diabetes was established. As qNOR is more likely devoted to detoxify NO produced by macrophages (54), this result is consistent with the fact that expression of TNF- α is significantly increased only after four weeks of high-fat feeding, and not in prediabetic state (19). On an another hand, and conversely to what observed in blood, *cnorB* gene concentration was specifically increased before diabetes in MAT, suggesting the increased presence of denitrifying bacteria in this tissue, as witnessed in particular by an increase in DNA from *Ralstonia eutropha* and *Parococcus denitrificans*, two well-known denitrifier (54), and by a concomitant tendency for an increase in *nirK* gene concentration. As translocated bacteria must likely reach body inside via lymphatics or blood vessels, we can thus hypothesize that the NOR activity of denitrifying bacteria in MAT, such as *Ralstonia eutropha* or *Parococcus denitrificans*, can first impact vasculature by decreasing endothelial

NO content, and hence increase tissue susceptibility to inflammation. Indeed, reduction in endothelial NO can lead to an increased infiltration of phagocytes, carrying for example viable Gram-negative bacteria, in particular *Proteobacteria*, able to detoxify NO produced inside such phagocytes, and thus reach tissue to trigger an LPS-induced low grade inflammation, leading finally to insulin resistance. Endothelial NO defect was indeed demonstrated to promote macrophages recruitment and proinflammatory cytokines expression in adipose tissue, by impacting the NO-cGMP-VASP (vasodilator-induced phosphoprotein) pathway (56). Interestingly, a reduced endothelial NO signaling has also been implicated in the activation of Kupffer cell during high-fat feeding, with reduced liver NO content preceding the onset of hepatic inflammation (at the level of NF- κ B) and impairment of insulin signaling at the level of IRS-1 and phospho-Akt (57). So, given the putative systemic impact of endothelial NO signaling defect on the development of insulin resistance, we can't no more consider what we found in blood as only an imprint of what could have happened in tissues. Consequently, bacterial NOR activity in blood, in particular that of the denitrifier *Ralstonia eutropha*, have to be considered as one of the putative early cause of the development of diabetes in mice fed a high-fat diet.

Nevertheless, mechanisms allowing these modifications in blood and MAT microbiota and microbiome during high-fat feeding are far to be elucidated. So, we sought to characterize intestinal microbiota in the same animal models of prediabetes and diabetes, as well as after long term fasting. If more bacterial DNA was detected in blood and MAT in prediabetic and diabetic state, conversely, total cæcum microbiota was reduced during high-fat feeding as well as after long term starving. As the high-fat diet used in this study is carbohydrate-free, this result is in agreement with the fact that the main sources of carbon and energy for intestinal bacteria are complex carbohydrates (starches, non-starch polysaccharides) (58). Nevertheless, we can't rule out a possible negative impact of fat on bacterial growth in high-fat-fed mice, as medium-chain monoglycerides and free fatty acids have demonstrated antibacterial effects (64). In addition, DGGE analysis revealed qualitative modifications of cæcum microbiota before diabetes, after only one week of high-fat feeding, further maintained in diabetic state. Interestingly, modifications induced by high-fat feeding during one week were undistinguishable from those induced by starving during 48 hours, when compared to NC-fed controls. This result suggested that, in addition to the negative impact of the absence of carbohydrates or the excess of fat on growth, so on total microbiota biomass, members of microbiota must have differentially adapted to carbohydrates limiting conditions, and these different adaptations beyond all the members of microbiota likely underlied the qualitative modifications observed by DGGE. We can thus

hypothesize that the ability for some bacteria to use alternative source of carbohydrates for their metabolism, represented a highly selective advantage. Using then qPCR primers specific for some bacterial groups usually found in mouse and human intestinal microbiota, we could more precisely characterize quantitative and qualitative modifications in cæcum content microbiota, induced by either high-fat feeding or starving. Human and mouse intestinal microbiota are very close at the phylum level (59), and as already reported in humans (60), quantification of main bacterial groups by qPCR revealed the importance of two phyla, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, associated with less important phyla, as *Proteobacteria* and *Actinobacteria* (*Bifidobacterium* spp.). Among Gram-positive bacteria, the phylum *Firmicutes* was diversely represented by *Eubacterium rectale* – *Clostridium coccoides* and *Clostridium leptum* groups, *Atopobium* cluster, *Lactobacillus* group, *Enterococcus* spp., and segmented filamentous bacteria (SFB). Among Gram-negative bacteria, the phylum *Bacteroidetes* was found largely represented by *Bacteroides* and *Prevotella* species, while the phylum *Proteobacteria* was less important and mainly represented by the family *Enterobacteriaceae* (class *Gammaproteobacteria*). Most of the published studies describe the differences between gut microbiota in obese compared to lean persons, and are controversial, while type 2 diabetes is generally considered as an attribute to obesity and thus far left behind as the focus of research (61). The high-fat diet we used is a very-high-fat and carbohydrate-free diet, and increasing the fat-to-carbohydrate ratio to the uppermost (*i.e.* carbohydrate-free) in a high-fat diet have been demonstrated to prevent the development of obesity, but not the prediabetic state (*i.e.* altered glucose tolerance and insulin sensitivity) (62). So, our model was well suited for the study of microbiota dynamics linked specifically to diabetes development. In type 2 diabetic humans, sequencing of the V4 region of the *16S rRNA* gene showed a significant reduction in the proportions of phylum *Firmicutes* and class *Clostridia*, and an increase in the proportion of phylum *Bacteroidetes* in the diabetic group compared to the control group, leading to increased ratios of *Bacteroidetes* to *Firmicutes* and of *Bacteroides-Prevotella* group to *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group (61). This is in agreement with our results showing an increase in *Bacteroides-Prevotella* group in diabetic as well as prediabetic mice, compared to NC-fed controls. We also observed a decrease in *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* and *Clostridium leptum* groups, but only in prediabetic state. In addition, modifications in cæcum microbiota were more pronounced in prediabetic state, with a decrease in all Gram-positive bacteria quantified, and an important increase in *Bacteroides-Prevotella* group, leading to a 73-fold increase in the ratio of Gram-negative to Gram-positive bacteria between prediabetic and normal state. The same ratio was increased by 10 between starved and normal mice, and by 2.8 between diabetic and normal mice. An increase

in the ratio of Gram-negative to Gram-positive bacteria was already reported in the same model of high-fat-induced diabetes in mice (30). Moreover, we couldn't establish a simplistic direct link between luminal gut microbiota dynamics in favor of Gram-negative bacteria (*Bacteroides-Prevotella* group), and the increase in the concentration of DNA from Gram-negative bacteria (mainly from *Proteobacteria*), shown here in blood and MAT before the onset of diabetes. Furthermore, the lipid A (*i.e.*, endotoxin) of *Bacteroidetes* LPS are essentially tetra- or pentacylated, a form that is not agonistic, and even antagonistic, to the TLR4/CD14/MD2 complex, conversely to the lipid A of commensal *Enterobacteriaceae*, largely hexacylated, thus agonistic to TLR4 (63). As the former group, dominates the latter by several logs in intestine (63) (**Figure 16A**), an increased overwhelming dominance of *Bacteroidetes* producing lipid A that is not sensed by the host and may even antagonize the sensing of the minority of *Enterobacteriaceae* (63), rather support a decreased pro-inflammatory potential for luminal microbiota before the onset of high-fat diet-induced diabetes. A great challenge remains to understand how this qualitative as well as quantitative dysbiosis in intestinal microbiota can lead to more bacterial adherence and translocation towards tissues, as we recently shown (19).

Altogether, our present data suggests that the analysis of the tissue microbiome could provide important data to generate molecular hypotheses of the host to microbiota relationship for the understanding of the development of metabolic diseases. Such analysis could further provide original targets for the prevention and treatment of type 2 diabetes as well as the classification of the different metabolic phenotypes.

Acknowledgements

Rémy Burcelin was recipient from a grant from the 7th European framework program (Florinash), the Agence Nationale de la Recherche (ANR: Floradip, Transflora) and the Société Francophone de Diabétologie (SFD).

References

1. Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., and Relman, D. A. (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* **21**, 517-523
2. Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A., and Stobberingh, E. E. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**, 511-521
3. Maslowski, K. M., and Mackay, C. R. (2011) Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology* **12**, 5-9
4. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., and Ehrlich, S. D. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65
5. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Dore, J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., and Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180
6. Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C., and Burcelin, R. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761-1772
7. Turnbaugh, P., Ridaura, V., Faith, J., Rey, F., Knight, R., and Gordon, J. (2009) The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine* **1**, 6-14

8. Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., and Gordon, J. I. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480-484
9. Wu, X., Ma, C., Han, L., Nawaz, M., Gao, F., Zhang, X., Yu, P., Zhao, C., Li, L., Zhou, A., Wang, J., Moore, J. E., Millar, B. C., and Xu, J. (2010) Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Current microbiology* **61**, 69-78
10. Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Berge, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J., Klopp, C., Mariette, J., Bouchez, O., Lluch, J., Ouarne, F., Monsan, P., Valet, P., Roques, C., Amar, J., Bouloumie, A., Theodorou, V., and Burcelin, R. (2012) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* **61**, 543-553
11. Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A., and Thorens, B. (2002) Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E834-842
12. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027-1031
13. Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11070-11075
14. Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15718-15723
15. Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 979-984
16. Pickup, J. C., and Crook, M. A. (1998) Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* **41**, 1241-1248
17. Pendyala, S., Walker, J., and Holt, P. R. (2012) A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology*
18. Amar, J., Serino, M., Lange, C., Chabo, C., Iacovoni, J., Mondot, S., Lepage, P., Klopp, C., Mariette, J., Bouchez, O., Perez, L., Courtney, M., Marre, M., Klopp, P., Lantieri, O., Dore, J., Charles, M. A., Balkau, B., and Burcelin, R. (2011) Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia* **54**, 3055-3061

19. Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermudez-Humaran, L. G., Smirnova, N., Berge, M., Sulpice, T., Lahtinen, S., Ouwehand, A., Langella, P., Rautonen, N., Sansonetti, P. J., and Burcelin, R. (2011) Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med* **3**, 559-572
20. Schnaitman, C. A., and Klena, J. D. (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological reviews* **57**, 655-682
21. Allen, A. E., Booth, M. G., Frischer, M. E., Verity, P. G., Zehr, J. P., and Zani, S. (2001) Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria. *Applied and environmental microbiology* **67**, 5343-5348
22. Lin, J. T., and Stewart, V. (1998) Nitrate assimilation by bacteria. *Advances in microbial physiology* **39**, 1-30, 379
23. Duplain, H., Burcelin, R., Sartori, C., Cook, S., Egli, M., Lepori, M., Vollenweider, P., Pedrazzini, T., Nicod, P., Thorens, B., and Scherrer, U. (2001) Insulin resistance, hyperlipidemia and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **104**, 342-345
24. Cook, S., Hugli, O., Egli, M., Menard, B., Thalmann, S., Sartori, C., Perrin, C., Nicod, P., Thorens, B., Vollenweider, P., Scherrer, U., and Burcelin, R. (2004) Partial gene deletion of endothelial nitric oxide synthase predisposes to exaggerated high-fat diet-induced insulin resistance and arterial hypertension. *Diabetes* **53**, 2067-2072
25. Liu, N., Xu, Y., Hossain, S., Huang, N., Coursolle, D., Gralnick, J. A., and Boon, E. M. (2012) Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry* **51**, 2087-2099
26. Burcelin, R., Garidou, L., and Pomie, C. (2012) Immuno-microbiota cross and talk: The new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol*
27. Hotamisligil, G. S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867
28. Shoelson, S. E., Lee, J., and Goldfine, A. B. (2006) Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1793-1801
29. Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P. D., Burcelin, R. G., Cortes, I., Mace, K., and Chou, C. J. (2008) Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 2416-2426
30. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., and Burcelin, R. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470-1481

31. Rodriguez-Granillo, G. A., Rodriguez-Granillo, A., and Milei, J. (2011) Effect of doxycycline on atherosclerosis: from bench to bedside. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* **6**, 42-54
32. Brugman, S., Klatter, F. A., Visser, J. T., Wildeboer-Veloo, A. C., Harmsen, H. J., Rozing, J., and Bos, N. A. (2006) Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* **49**, 2105-2108
33. Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C., Hu, C., Wong, F. S., Szot, G. L., Bluestone, J. A., Gordon, J. I., and Chervonsky, A. V. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455**, 1109-1113
34. Vaarala, O., Atkinson, M. A., and Neu, J. (2008) The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* **57**, 2555-2562
35. Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of clinical investigation* **116**, 115-124
36. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1796-1808
37. Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., and Spiegelman, B. M. (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668
38. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91
39. Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M. G., Alonso, M. N., Leong, H. X., Glassford, A., Caimol, M., Kenkel, J. A., Tedder, T. F., McLaughlin, T., Miklos, D. B., Dosch, H. M., and Engleman, E. G. (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* **17**, 610-617
40. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2009) CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* **15**, 914-920
41. Lassenius, M. I., Pietilainen, K. H., Kaartinen, K., Pussinen, P. J., Syrjanen, J., Forsblom, C., Porsti, I., Rissanen, A., Kaprio, J., Mustonen, J., Groop, P. H., and Lehto, M. (2011)

- Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes care* **34**, 1809-1815
42. Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., Chamontin, B., and Ferrieres, J. (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* **87**, 1219-1223
 43. Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J. P., and Pringault, E. (1997) Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**, 949-952
 44. Suzuki, T., Itoh, K., Hagiwara, T., Nakayama, H., Honjyo, K., Hirota, Y., Kaneko, T., and Suzuki, H. (1996) Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice injected with cyclophosphamide. *Current microbiology* **33**, 78-83
 45. McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., Newberry, R. D., and Miller, M. J. (2012) Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**, 345-349
 46. Mousa, K., Onadeko, B. O., Mustafa, H. T., Mohamed, M., Nabilla, A., Omar, A., Al-Bunni, A., and Elgazzar, A. (2000) Technetium 99mTc-DTPA clearance in the evaluation of pulmonary involvement in patients with diabetes mellitus. *Respiratory medicine* **94**, 1053-1056
 47. Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Kregge, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., and Smithies, O. (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13176-13181
 48. Cook, S., Hugli, O., Egli, M., Vollenweider, P., Burcelin, R., Nicod, P., Thorens, B., and Scherrer, U. (2003) Clustering of cardiovascular risk factors mimicking the human metabolic syndrome X in eNOS null mice. *Swiss Med Wkly* **133**, 360-363
 49. Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumie, A. (2009) Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 482-485
 50. Kobayashi, F., Nagoya, T., Koshi, T., and Saino, Y. (1980) Biphasic protection against bacterial infection in mice induced by vaccination of *Propionibacterium acnes*. *Infect Immun* **27**, 391-396
 51. Kalis, C., Gumenscheimer, M., Freudenberg, N., Tchaptchet, S., Feier, G., Akira, S., Galanos, C., and Freudenberg, M. A. (2005) Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* **174**, 4295-4300
 52. Sturgill, T. L., Strong, D., Rachid, C., Betancourt, A., and Horohov, D. W. (2011) Effect of *Propionibacterium acnes*-containing immunostimulant on interferon-gamma (IFN- γ) production in the neonatal foal. *Vet Immunol Immunopathol* **141**, 124-127

53. Negi, M., Takemura, T., Guzman, J., Uchida, K., Furukawa, A., Suzuki, Y., Iida, T., Ishige, I., Minami, J., Yamada, T., Kawachi, H., Costabel, U., and Eishi, Y. (2012) Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. *Mod Pathol* **80**, 1-14
54. Hendricks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., and Saraste, M. (2000) Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 266-273
55. Tanti, J. F., Gual, P., Grémeaux, T., Gonzalez, T., Barrès, R., and Le Marchand-Brustel, Y. (2004) Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol* **65**, 43-48
56. Handa, P., Tateya, S., Rizzo, N. O., Cheng, A. M., Morgan-Stevenson, V., Han, C. Y., Clowes, A. W., Daum, G., O'Brien, K. D., Schwartz, M. W., Chait, A., and Kim, F. (2011) Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* **31**, 2827-2835
57. Tateya, S., Rizzo, N. O., Handa, P., Cheng, A. M., Morgan-Stevenson, V., Daum, G., Clowes, A. W., Morton, J. G., Schwartz, M. W., and Kim, F. (2011) Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. *Diabetes* **60**, 2792-2801
58. Macfarlane, G. T., and Macfarlane, S. (1997) Human colonic microbiota: ecology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl* **222**, 3-9
59. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., and Reman, D. A. (2007) An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* **449**, 811-818
60. Doré, J., and Corthier, G. (2010) The human intestinalmicrobiota. *Gastroenterol Clin biol* **34**, 7-15
61. Larsen, N., Vogensen, F. K., Van Den berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Al-Soud, W. A., Sorensen, S. J., Hansen, L. H., and Jacobsen, M. (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PlosOne* **5**, e9085, 1-10
62. Sinitskaya, N., Gourmelen, S., Schuster-Klein, C., Guardiola-Lemaitre, B., Pévet, P., and Challet, E. (2007) Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *Clin Sci (Lond)* **113**, 417-425
63. Sansonetti, P. J. (2011) To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol* **4**, 8-14
64. Desbois, A. P., and Smith, V. J. (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of cation and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1629-1642

FIGURES AND LEGENDS

Table 1. Universal PCR primers used in this study

Gene	Primers (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Reference
<i>16S rRNA</i> Eubac (qPCR)	<i>forward</i> : TCCTACGGGAGGCAGCAGT <i>reverse</i> : GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60	[487]
<i>16S rRNA</i> V1-V3 (cloning)	<i>forward</i> (10f): AGTTTGATCCTGGCTCAG <i>reverse</i> (534r): ATTACCGCGGCTGCTGG	50	[521]
<i>16S rRNA</i> HDA (DGGE)	<i>forward</i> (HDA1GC): CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGGCACG GGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG <i>reverse</i> (HDA2): ATTACCGCGGCTGCTGG	55	[522]
<i>16S rRNA</i> HDA (qPCR)	<i>forward</i> (HDA1): CCTACGGGAGGCAGCAG <i>reverse</i> (HDA2): ATTACCGCGGCTGCTGG	55	[522]
M13	<i>forward</i> : GTAAAACGACGGCCAG <i>reverse</i> : CAGGAAACAGCTATGAC	49	TOPO TA Cloning kit (Invitrogen)
<i>nirK</i>	<i>forward</i> : GGMATGGTKCCSTGGCA <i>reverse</i> : GAACITTGCCGGTVGYCCAGAC	43	[523]
<i>nirS</i>	<i>forward</i> : CCTAYTGGCCGCCRCART <i>reverse</i> : CGTTGAACTTRCCGGT	43	[523]
<i>cnorB</i>	<i>forward</i> : GACAAGNNNTACTGGTGGT <i>reverse</i> : GAANCCCCANACNCCNGC	55	[524]
<i>qnorB</i>	<i>forward</i> : GGNCAYCARGGNTAYGA <i>reverse</i> : ACCCANAGRTGNACNACCCACCA	55	[524]
<i>lpxA</i>	<i>forward</i> : GTGATTGANAAANCCGCCTTNTNCATCC ^(a) <i>reverse</i> : ANATCNTGNTTNNCTTCNCC ^(b)	60	[525]
<i>lpxB</i>	<i>forward</i> : GAAGCNTGGTANGANATGGAAG ^(c) <i>reverse</i> : GGNGCNTCNATNCCNACNAANACATCNGG ^(d)	60	[525]

(a) N9=30%C + 70%T, N13=40%A + 60%T, N22=60%A + 40%G, N24=30%C + 40%G + 30%T

(b) N2=10%C + 90%G, N6=80%C + 20%T, N9=10%A + 90%G, N12=45%A + 45%C + 10%T, N13=75%A + 25%G, N18=50%A + 50%G

(c) N6=90%C + 10%T, N12=60%C + 40%T, N15=60%A + 40%G

(d) N3=50%C + 50%G, N6=70%C + 30%T, N9=90%A + 10%G, N12=50%A + 15%C + 35%T, N15=60%A + 10%C + 30%G, N18=90%A + 10%G, N21=45%A + 10%C + 45%G, N27=10%A + 10%C + 40%G + 40%T

Table 2. 16S rRNA qPCR primers for Gram-positive bacteria

Bacterial group or species	Primers (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Reference or accession number
<i>Clostridium coccoides</i> <i>Eubacterium rectale</i> group (<i>Clostridium</i> cluster XIV a)	<i>forward:</i> AAATGACGGTACCTGACTAA <i>reverse:</i> CTTTGAGTTTTCATTCTTGCGAA	50	[526]
<i>Clostridium leptum</i> subgroup (<i>Clostridium</i> cluster IV)	<i>forward:</i> GCACAAGCAGTGGAGT <i>reverse:</i> CTTCTCCGTTTTGTCAA	50	[527]
<i>Lactobacillus</i> group	<i>forward:</i> AGCAGTAGGGAATCTTCCA <i>reverse:</i> CACCGCTACACATGGAG	60	[490]
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>forward:</i> CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT <i>reverse:</i> ACTCGTTGTACTTCCCAATTGT	60	[490]
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>forward:</i> GATTCTGGCTCAGGATGAACGC <i>reverse:</i> CTGATAGGACGCGACCCCAT	60	[528]
Segmented Filamentous Bacteria	<i>forward:</i> AGGAGGAGTCTGCGGCACATTAGC <i>reverse:</i> TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG	65	[529]
<i>Atopobium</i> cluster	<i>forward:</i> ACCGCTTTCAGCAGGGA <i>reverse:</i> ACGCCCAATGAATCCGGAT	60	[490]
<i>Bacillus azotoformans</i>	<i>forward:</i> GCGGCGGACGGGTGAGTAAC <i>reverse:</i> ACCATGAGGTTTCAAGAGTTATCCGGT	60	AB363732
<i>Gordonia bronchialis</i>	<i>forward:</i> GGTACTAGGTGTGGGGCTCA <i>reverse:</i> ATGCACCACCTGTACACCAA	60	X75903
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>forward:</i> TCTACGAAGATGAGGGATA <i>reverse:</i> TTTCCACCATATTTTGAATTGT	55	[530]
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>forward:</i> CCATAAAGTTGTTCTCAGTT <i>reverse:</i> CATGTCGATCTACGATTACT	50	[531]
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>forward:</i> GGCACACCCATCTCTGAGCAC <i>reverse:</i> GGGTTGTAAACCGCTTTCGCTG	54	[532]
<i>Bacillus cereus</i>	<i>forward:</i> GGAGTACGGCCGCAAGGCTG <i>reverse:</i> TCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCC	60	AY987936

Table 3. 16S/23S rRNA qPCR primers for Gram-negative bacteria

Bacterial group or species	Primers (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Reference or accession number
<i>Bacteroides Prevotella</i> spp.	<i>forward:</i> GAAGGTCCCCACATTG <i>reverse:</i> CAATCGGAGTTCTTCGTG	55	[533]
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>forward:</i> CATGACGTTACCCGCAGAAGAAGC <i>reverse:</i> CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	65	[533]
<i>Delta</i> proteobacteria (<i>Desulfovibrio</i> spp.)	<i>forward:</i> CCGTAGATATCTGGAGGAACATCAG <i>reverse:</i> ACATCTAGCATCCATCGTTTACAGC	65	[533]
<i>Helicobacter Flexispira Wollinella</i>	<i>forward:</i> TGGGAGAGGTAGGTGGAATTCT <i>reverse:</i> GTCGCCCTTCGCAATGAGTATTC	60	[490]

Nitrite-oxidizing bacteria (<i>Nitrospira</i> spp.)	forward: CGCAACCCCTGCTTTCAGT reverse: CGTTATCCTGGGCAGTCCTT	60	[534]
<i>Escherichia coli</i>	forward: CAATTTTCGTGTCCCCTTCG reverse: GTTAATGATAGTGTGTCGAAAC	60	[488] [535]
<i>Escherichia hermannii</i>	forward: TAATCGATCATCCACCCAT reverse: CAGACCTGGCACAGAGTCAA	55	EU240948
<i>Aquabacterium</i> spp.	forward: AGTCGAACGGTAACGCGGGG reverse: TTCGCCGGGCTATCCCCACT	60	NR_024875
<i>Shewanella oneidensis</i>	forward: TTCAGTAGGGAGGAAAGGGTATT reverse: AGCCCAGTGTTCAAGACACC	60	AB447987
<i>Shewanella woodyi</i>	forward: TAGTTACTGGGCTCCCAACG reverse: AACTCGCTGGCAAATAAGGA	60	AF003548
<i>Shewanella algae</i>	forward: CCATTTGTGGGGGATAACAG reverse: CCACCTGGGCTTATCCATC	60	DQ386137
<i>Shewanella benthica</i>	forward: ACGCGTTTTTCGAAGTGC reverse: TCTCAGTCCAGTGTGGCTG	60	AB008796
<i>Shewanella sediminis</i>	forward: TGCTTGCTTATCAAACGTGC reverse: CTCATCTAATCGCGAAAGGC	60	AY579750
<i>Shewanella woodyi, sediminis</i>	forward: TGCCGCGTGTGTGAAG reverse: GTTAGCCGGTGCCTTCTCTG	60	NC_010506
<i>Shewanella putrefaciens, oneidensis</i>	forward: GGTAATACGGAGGGTCCGAG reverse: TCGCCAGTTCGAAATGCTAT	60	NC_008322
<i>Shewanella halifaxensis, pealeana</i>	forward: GTCAAGTCATCATGGCCCTT reverse: TCCGTACATTCTGATCTCGATT	60	AY579751
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	forward: GTGACGTAGCGAGCGTTTGA reverse: CCAAGTTGCCTCAGGGTCATA	60	[536]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	forward: GTGGGGGACAACGTTTC reverse: CAATCAGTGTCAAGTATTAGC	57	[537]
<i>Pseudomonas putida</i>	forward: AAGCAACGCGAAGAACCCTTA reverse: CGGACTACGATCGGTTTTGT	54	[538]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	forward: GTCCAGGTGGTCGCCTTCGC reverse: GTCCAGGTGGTCGCCTTCGC	60	AY360347
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	forward: CAGCCTGCGAAAAGTA reverse: TTAAGCTTGCCACGAACAG	58	[539]
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	forward: GCAGGAAAGAAACGTGCGGGGT reverse: ATTTACATCTTTCTTTCCG	56	[540]
<i>Ralstonia insidiosa</i>	forward: ATGATCTAGCTTGCTAGATTGAT reverse: CACACCTAATATTAGTAAGTGCG	55	[541]
<i>Ralstonia eutropha</i>	forward: ACCCGGGTTCGATGACGGTA reverse: GCCTTGCACTCACAAGCGCC	60	EF599678
<i>Ralstonia pickettii</i>	forward: ATGATCTAGCTTGCTAGATTGAT reverse: ACTGATCGTCGCCTTGGTG	55	[542]
<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	forward: GGGAAAGCTTGCTTTCCCTGCC reverse: TCCGGGTATTAACCAGAGCCAT	57	[542]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	forward: TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC reverse: CTGTTTGCTCCCCATGCTTT	60	[192]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	forward: CGGACGGGTGAGTAATGTCT reverse: AGTGCCTTACAACCCGAAGG	60	FJ971886
<i>Vibrio campbelli, harveyi</i>	forward: TGTAGCGGTGAAATGCGTAG reverse: GGCCACAACCTCCAAGTAGA	60	AB497067
<i>Serratia proteamaculans</i>	forward: GCATTGACGTTACTCGCAGA reverse: ATGCAGTTCACACGTTAAGC	60	FJ811862
<i>Yersinia enterocolitica</i>	forward: CAGCCACACTGGAAGTGA reverse: CTTCTCTCTCGCTGAAAGTG	60	FM958228
<i>Parococcus denitrificans</i>	forward: CCCGGGCCTTGTTACACACCG reverse: GATCCAGCCGCAGGTTCCCC	60	X69159

<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	forward: GCCCGTCACACCATGGGAGC reverse: GGAGGTGATCCAGCCGCACC	60	NR_024782
<i>Alcaligenes faecalis</i>	forward: TGGTCGGGACAGAGGGTTCGC reverse: CCCCAGGTCATGAATCCCACCG	60	GQ495222
<i>Cardiobacterium hominis</i>	forward: ACACCGATGGCGAAGGCAGC reverse: CTCCACCGCTTGTGCGGGTC	60	AY360343
<i>Synechocystis trididemni</i>	forward: GGGTCCGCAGGTGGCCATTC reverse: GCTCCCTAAGGCACTCCCTGCT	60	AB011380
<i>Herminiimonas</i> spp.	forward: TGTCAGGGAAGAAACGGCCTGTTC reverse: GACCGTACTCCCCAGGCGGT	60	GU213388

Table 4A. Bacterial DNA and clinical characteristics of the study population (n=311)

	Blood bacterial DNA concentration (ng 16S rRNA DNA/μg total DNA)		<i>p</i>
	Below the median (n=154)	Above the median (n=157)	
Age (years)	53.25 ± 6.85	54.05 ± 7.68	0.35
Weight (kg)	77.34 ± 12.71	77.93 ± 11.70	0.66
Waist (cm)	92.96 ± 10.49	94.32 ± 10.28	0.24
Body mass index (kg/m ²)	25.92 ± 3.67	26.62 ± 3.77	0.10
Current smokers (%)	28 (18.18)	38 (24.20)	0.19
Systolic blood pressure (mmHG)	134.48 ± 14.90	136.84 ± 16.50	0.18
Diastolic blood pressure (mmHg)	82.93 ± 9.23	83.37 ± 8.97	0.66
Treated hypertension (%)	17 (11.04)	24 (15.29)	0.26

Table 4B. Bacterial DNA and biological characteristics of the study population (n=311)

	Blood bacterial DNA concentration (median value = 64.9 x10 ⁻³ ng 16S rRNA DNA/μg total DNA)		<i>p</i>
	Below the median (n = 154)	Above the median (n = 157)	
Lipid metabolism			
Total cholesterol (mM)	6.02 ± 1.00	5.98 ± 1.01	0.73
Triglycerides (mM)	1.28 ± 0.70	1.61 ± 1.25	0.004 †
HDL cholesterol (mM)	1.63 ± 0.45	1.44 ± 0.47	0.0005
Treated dyslipidemia (%)	17 (11.04)	14 (8.92)	0.53
Glucose metabolism			
Fasting glycemia (mM)	5.57 ± 0.54	6.28 ± 1.52	< 0.0001
Fasting insulin (μU/mL)	10.89 ± 5.58	13.92 ± 9.56	0.0008
Treated diabetes (%)	1 (0.65)	11 (7.01)	0.003
Fasting glycemia > 6.1mM or treated diabetes (%)	16 (10.39)	67 (42.68)	< 0.0001
Inflammatory markers			
Leukocytes count (10 ⁹ cells/L)	6.34 ± 1.71	6.53 ± 1.96	0.36
CRP (mg/L)	1.65 ± 2.43	2.00 ± 3.29	0.28
Soluble CD14 (mg/L)	3.53 ± 1.28	3.72 ± 1.01	0.15
Interleukin 6 (pg/mL)	4.10 ± 3.49	4.05 ± 3.52	0.90
Detectable endotoxemia (%) ‡	34 (30.63)	40 (32.79)	0.72

† log transformed triglycerides; ‡ analysis performed in 233 patients

Table 5. Multivariate logistic regression model with glucose metabolism abnormality (high fasting glycemia and/or treated diabetes) as independent outcome.

	Point estimate	95% confidence intervals		<i>p</i>
		Lower limit	Upper limit	
Age (per 1 year increase)	0.98	0.94	1.03	0.63
Bacterial DNA/ total DNA above the median (yes <i>vs</i> no)	8.02	3.89	16.11	< 0.0001
Systolic blood pressure (per 1 mm Hg increase)	1.02	1.00	1.05	0.006
Waist (per 1 cm increase)	1.09	1.05	1.13	< 0.0001
HDL (per 1 mM increase)	0.83	0.40	1.70	0.61
CRP (per 1 mg/L increase)	0.81	0.58	1.14	0.23
Leukocytes count (per 10 ⁹ cells/L increase)	0.94	0.78	1.12	0.51

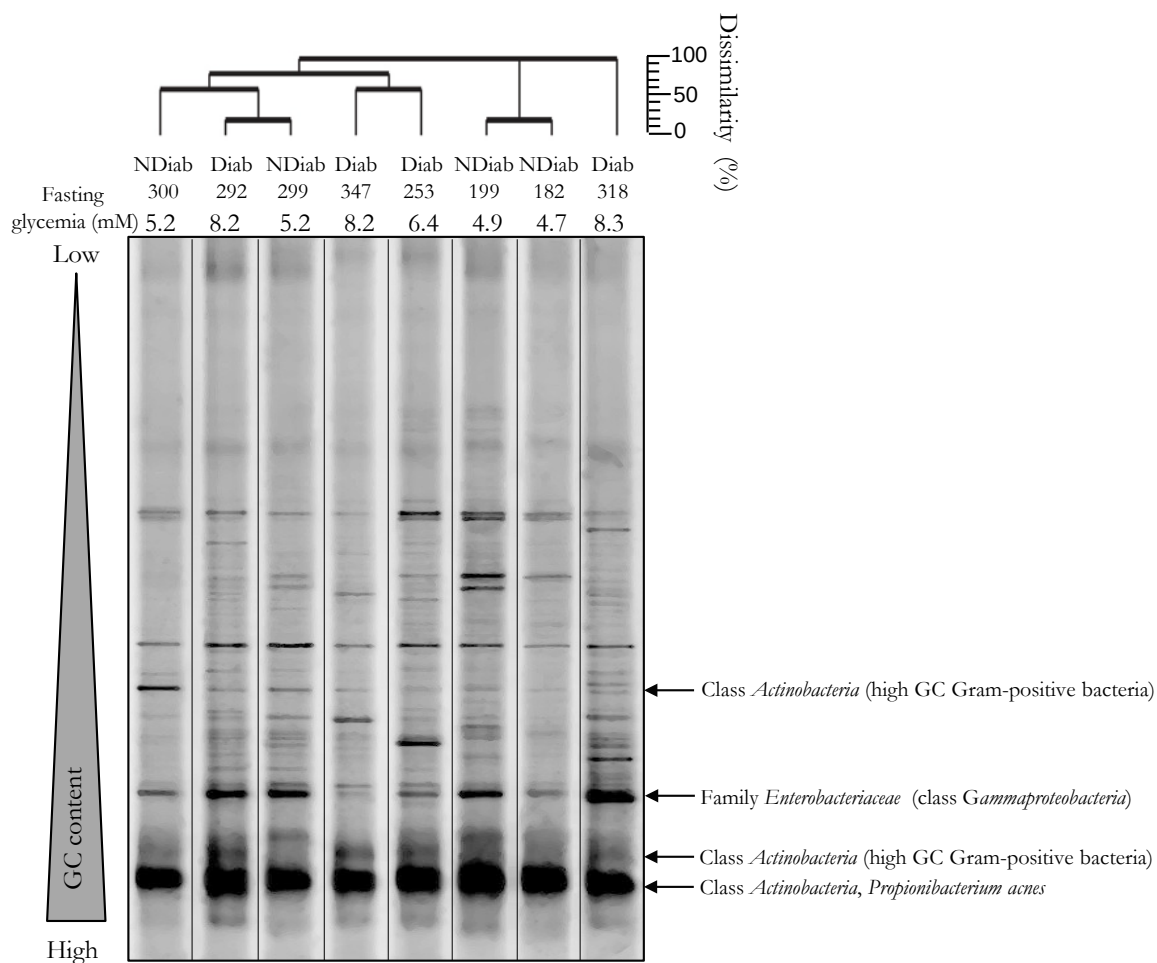
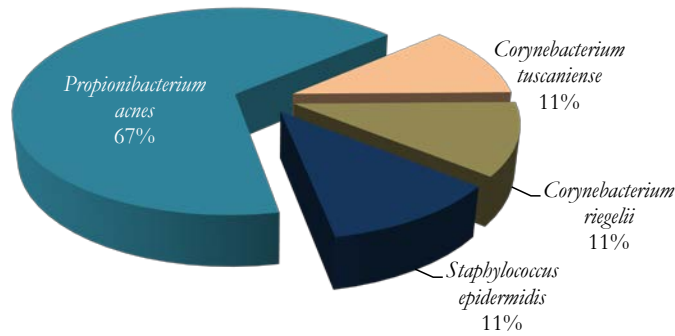


Figure 1. DGGE analysis is not able to segregate bacterial DNA profiles in human blood according to diabetes.

Bacterial DNA from blood cells was profiled by universal *16S rRNA* DNA (V3)-targeted denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) in diabetics (Diab) and non-diabetics (NDiab) (n=4). Bacterial profiles are reordered according to hierarchical clustering.

A *Non-diabetics*



B *Diabetics*

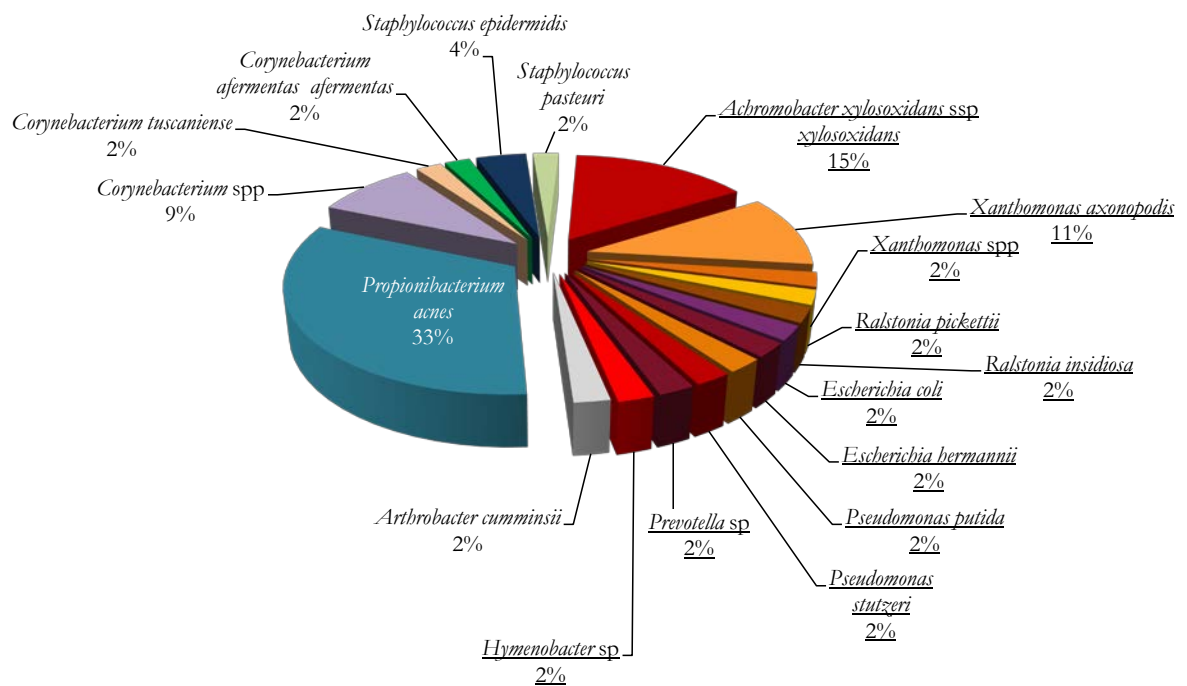


Figure 2. Molecular cloning and sequencing reveals apparently less Gram-positive bacteria and more Gram-negative bacteria in blood of diabetics.

Bacterial DNA from human blood was amplified by *16S rRNA* (V1-V2-V3)-targeted PCR and submitted to molecular cloning. *16S rRNA* insert from 55 different clones was subsequently sequenced for bacterial identification. **A**, Sequences identified in blood of non diabetics (n = 10 different clones). **B**, Sequences identified in blood of diabetics (n = 45 different clones). Gram-negative bacteria are underlined.

Table 6. Bacterial species or genus identified in human blood after 16S rRNA-targeted (V1-V2-V3) molecular cloning and sequencing.

Bacterial strains	Gram	Oxygen tolerance	Sequence abundance in 55 total sequences
<i>Propionibacterium acnes</i>	Positive	Aerobic facultative anaerobic	38.2%
<i>Corynebacterium</i> spp.	Positive	Aerobic facultative anaerobic	7.0%
<i>Corynebacterium tuscaniense</i>	Positive	Aerobic facultative anaerobic	5.5%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positive	Aerobic facultative anaerobic	5.5%
<i>Corynebacterium riegliei</i>	Positive	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Corynebacterium afermentas ssp afermentas</i>	Positive	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Positive	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	Positive	Strictly aerobic	1.7%
<i>Achromobacter xylosoxidans ssp xylosoxidans</i>	Negative	Aerobic facultative anaerobic	12.7%
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Negative	Aerobic facultative anaerobic	9.0%
<i>Xanthomonas</i> spp.	Negative	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Ralstonia pickettii</i>	Negative	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Ralstonia insidiosa</i>	Negative	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Escherichia coli</i>	Negative	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Escherichia hermannii</i>	Negative	Aerobic facultative anaerobic	1.7%
<i>Pseudomonas putida</i>	Negative	Strictly aerobic	1.7%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Negative	Strictly aerobic	1.7%
<i>Prevotella</i> spp.	Negative	Strictly anaerobic	1.7%
<i>Hymenobacter</i> spp.	Negative	Aerobic	1.7%

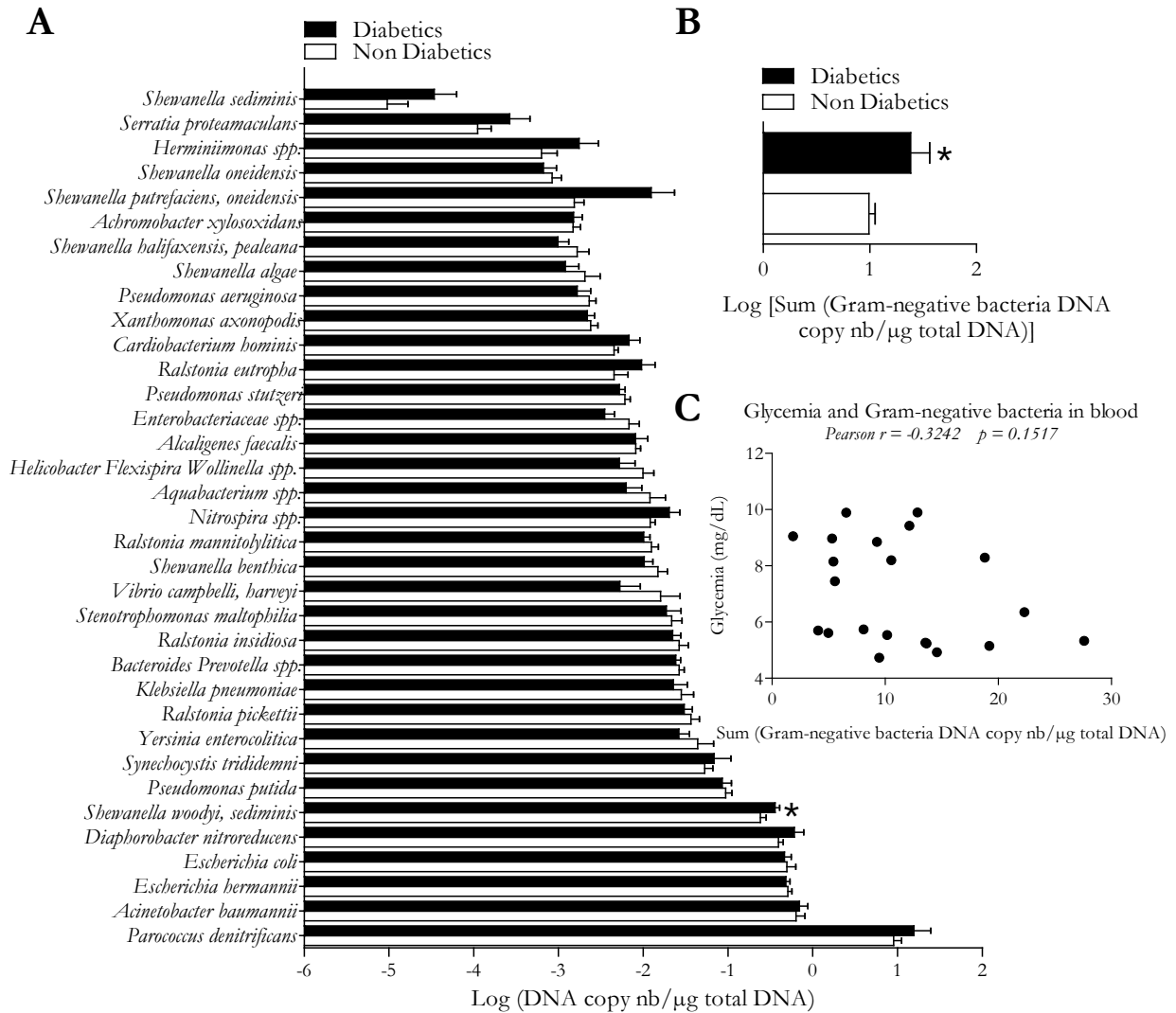


Figure 3. Genus or species-specific qPCR for Gram-negative bacteria and qNorB-expressing bacteria confirms enrichment of blood from diabetics in Gram-negative bacteria.

A, Genus or species-specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR in human blood; **B**, Sum of data presented in graph **A**; (n=9) (mean + sem; *: $p < 0.05$ versus non diabetics). qNorB-expressing bacteria: *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Synechocystis trididemni*, *Diaphorobacter nitroreducens*, *Parococcus denitrificans*. **C**, Correlation analysis between fasting glycemia and sum of Gram-negative bacteria in human blood.

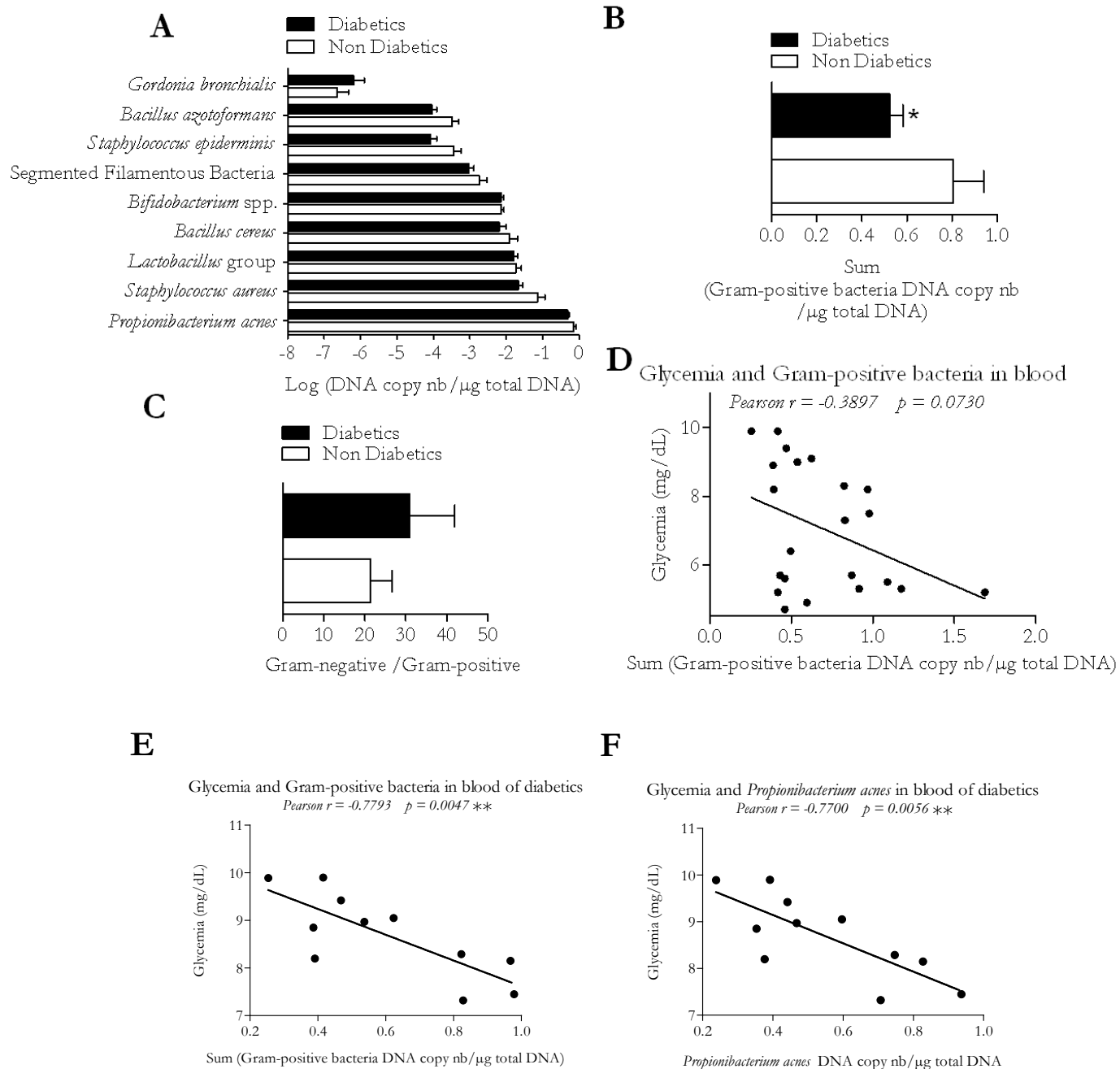


Figure 4. Specific qPCR confirms the presence of less Gram-positive bacteria DNA in blood of diabetics. Fasting glycemia is negatively correlated with Gram-positive bacteria DNA (*Propionibacterium acnes*) in blood of diabetics.

A, Genus or species-specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR in human blood; **B**, Sum of data presented in **A**; **C**, Gram-negative to Gram-positive ratio; ($n = 9$) (mean + sem; * : $p < 0.05$ versus non diabetics). **D**, Correlation analysis between fasting glycemia and sum of Gram-positive bacteria in human blood. **E**, **F**, Correlation analysis between diabetics fasting glycemia and sum of Gram-positive bacteria (**E**) or *Propionibacterium acnes* DNA (**F**). qNorB-expressing bacteria: *Bacillus azotoformans*, *Bacillus cereus*.

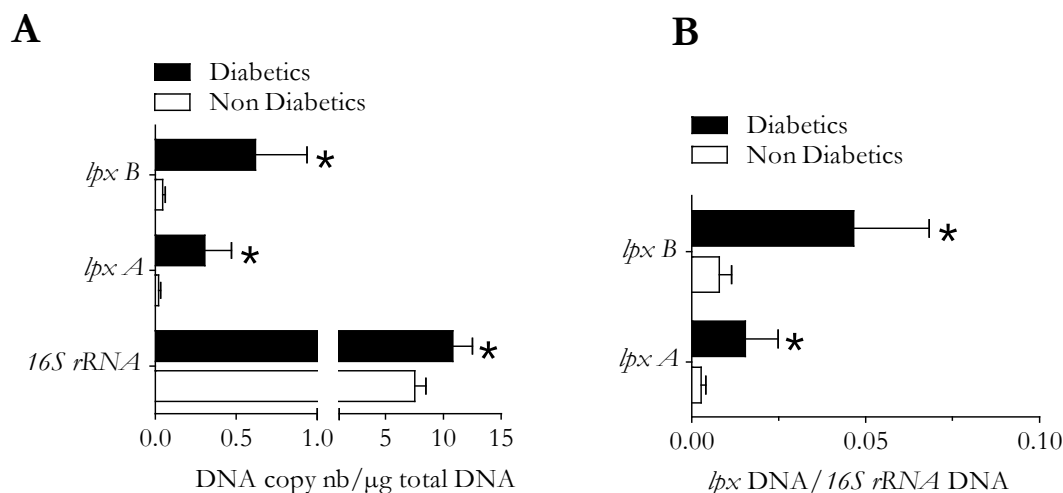


Figure 5. Blood of diabetics is enriched in DNA from Gram-negative bacteria.

Universal *16S rRNA* DNA (V3), *lpxA* (UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase-coding gene) and *lpxB* (lipid A disaccharide synthase-coding gene)-targetted qPCR in human blood; (n = 9) (mean + sem; * : p < 0.05 *versus* non diabetics). **A**, Gene copy number in total DNA. **B**, Gene copy number in total bacterial DNA.

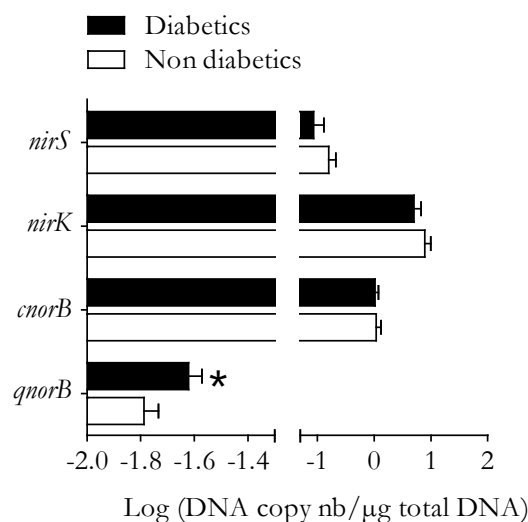


Figure 6. Resistance against nitric oxide as a virulence factor for bacteria found in blood of diabetics.

Nitric oxide reductase (Nor) and Nitrite reductase (Nir) coding DNA-targetted qPCR in human blood (n=10) (mean + sem; *: p < 0.05 *versus* non diabetics) (*qnorB* coding for quinol-dependent Nor, *cnorB* for cytochrome c/pseudoazurin-dependent Nor, *nirK* for Cu-containing Nir and *nirS* for *c* and *d1 hemes*-containing Nir)

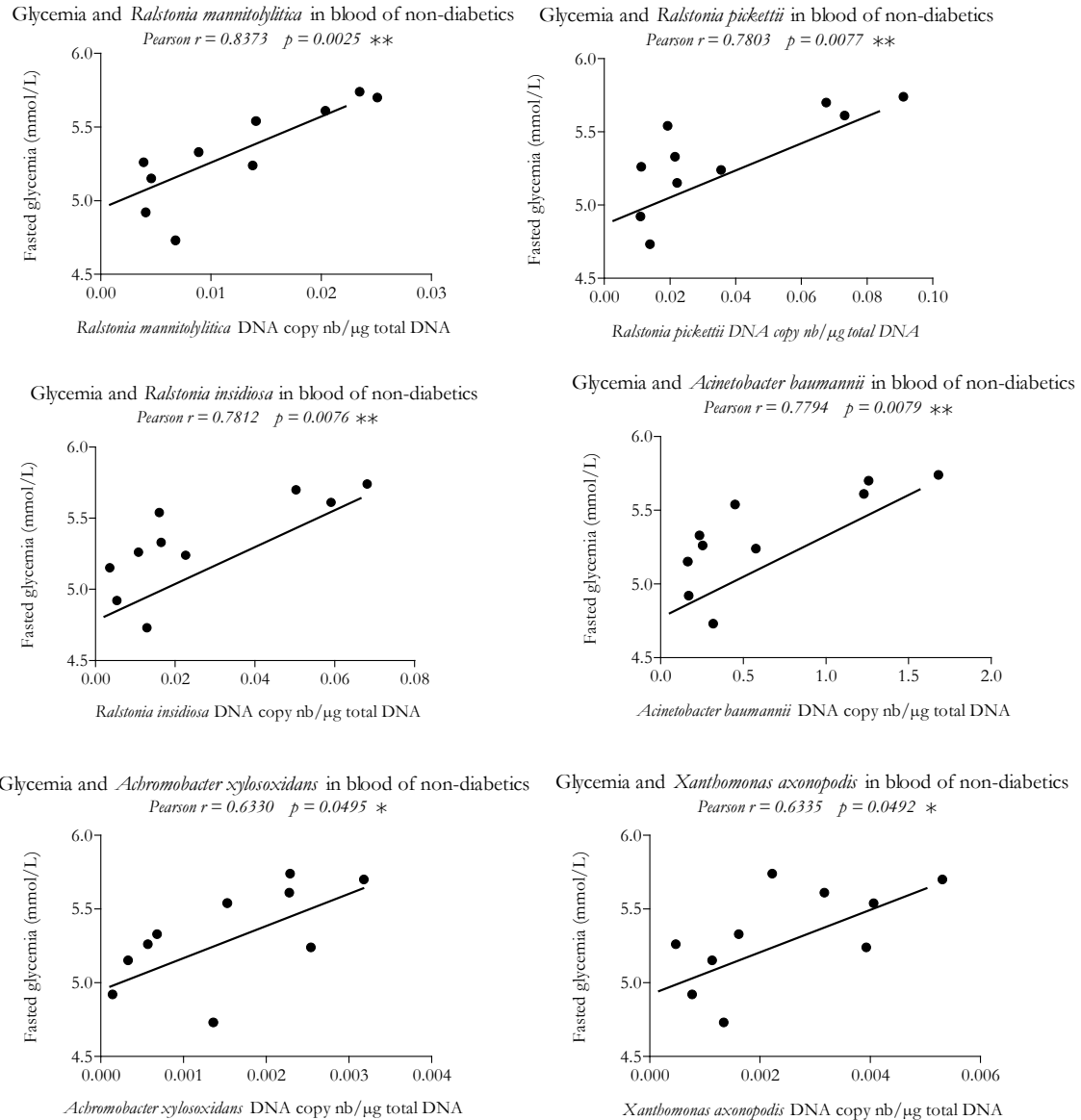


Figure 7. Fasted glycemia of non-diabetics correlates with the presence of some Gram-negative bacteria in blood.

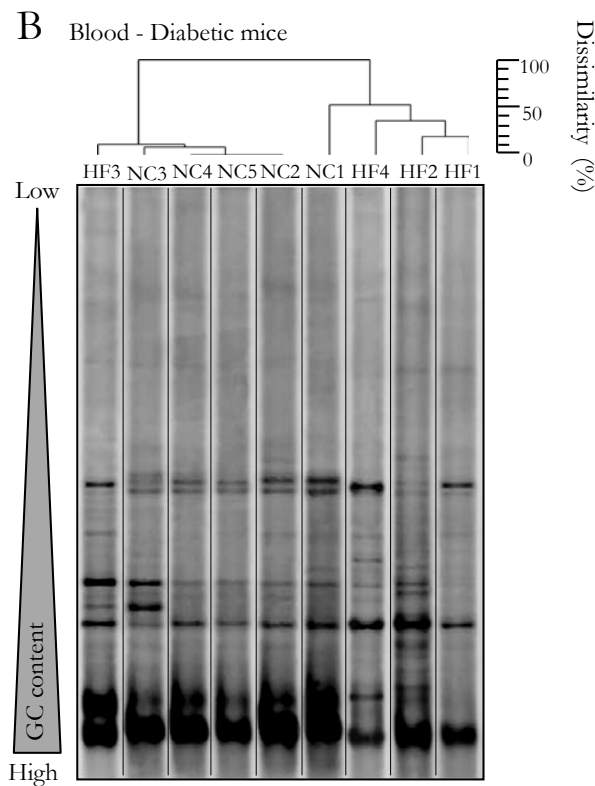
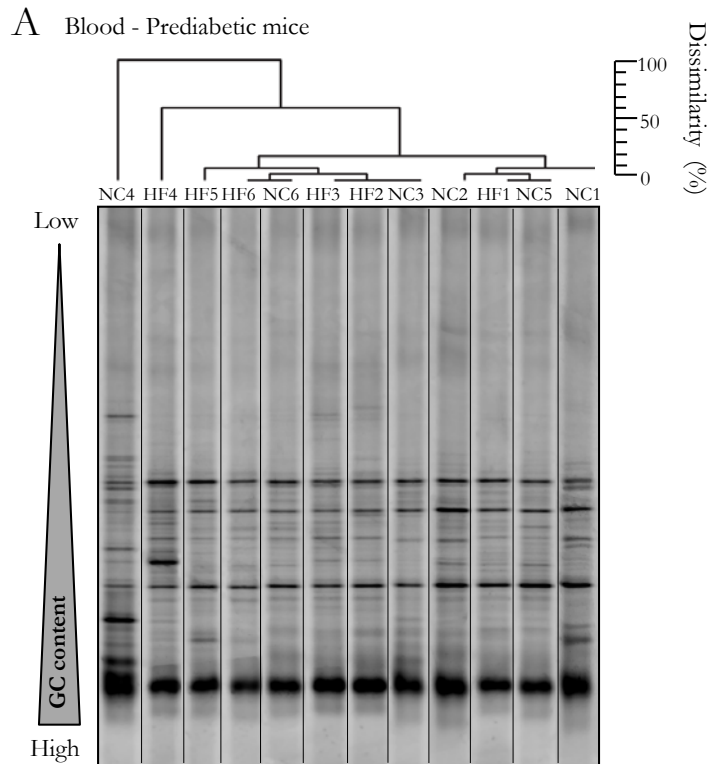


Figure 8. DGGE analysis is not able to segregate bacterial DNA profiles in mouse blood according to prediabetes or diabetes.

Bacterial community structure from mouse blood was profiled by universal *16S rRNA* DNA (V3)-targeted denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) in prediabetic mice (high-fat diet 1 week) (HF) and control mice (normal chow diet) (NC) ($n = 6$) (**A**); or in diabetic mice (high-fat diet 4 weeks) (HF) and control mice (normal chow diet) (NC) ($n = 4$ & 5) (**B**). Bacterial profiles were reordered according to dendrogram of hierarchical clustering.

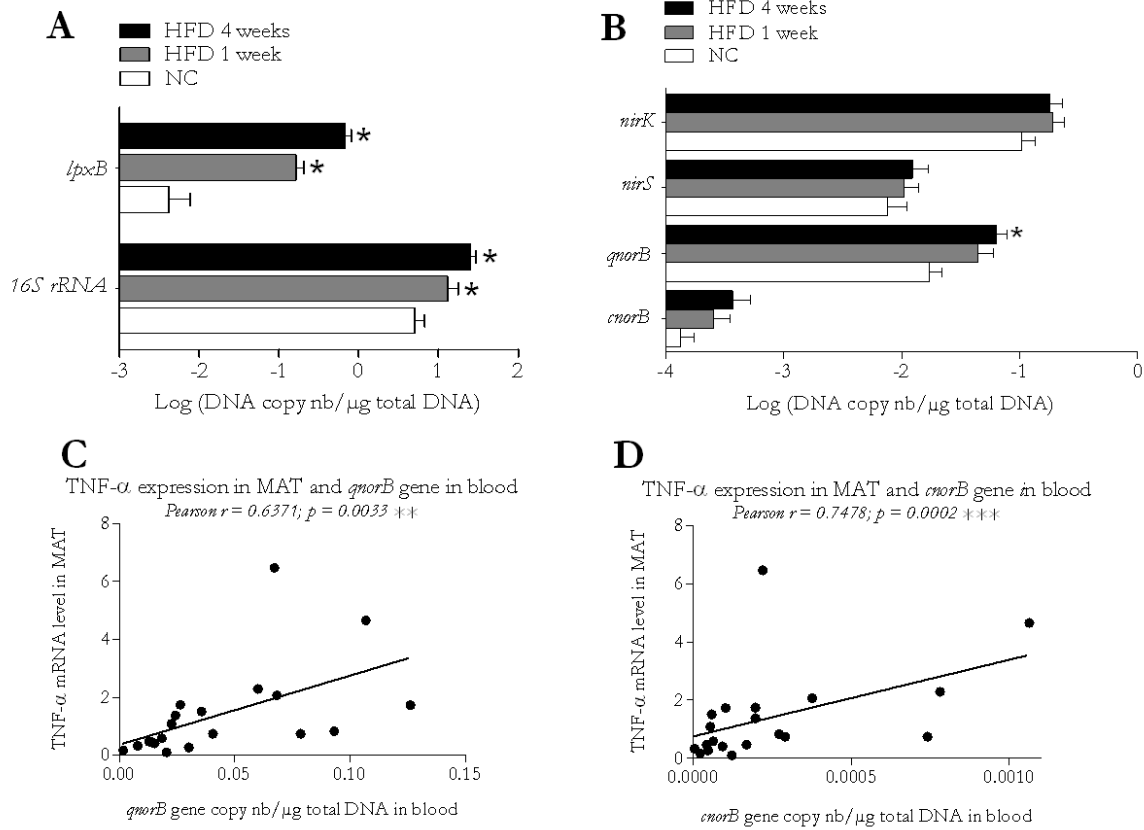


Figure 9. More Gram-negative bacteria are detected in mouse blood before the onset of diabetes. Resistance against nitric oxide as a virulence factor for bacteria found in blood of diabetic mice. Mesenteric adipose tissue inflammation correlates positively with the presence of bacterial NO reductase genes in blood.

Universal *16S rRNA* DNA (V3) and *lpxB* (lipid A disaccharide synthase-coding gene)-targetted qPCR in blood of prediabetic (HFD 1 week), diabetic (HFD 4 weeks), and control (NC) mice; (n=7) (mean + sem; * : $p < 0.05$ versus NC). **A**, DNA copy number in total DNA as viable and non viable bacteria. **B**, Nitric oxide reductase (Nor) and Nitrite reductase (Nir) coding DNA-targetted qPCR in blood of prediabetic (HFD 1 week), diabetic (HFD 4 weeks), and control (NC) mice; (n=7) (mean+sem; *: $p < 0.05$ versus NC) (*qnorB* coding for quinol-dependent Nor, *cnor* for cytochrome c/pseudoazurin-dependent Nor, *nirK* for Cu-containing Nir and *nirS* for *c* and *d1* hemes-containing Nir). **C**, **D**, Correlation analysis between TNF-α mRNA level in MAT and *qnorB* DNA (**C**) or *cnorB* DNA (**D**) concentration in blood.

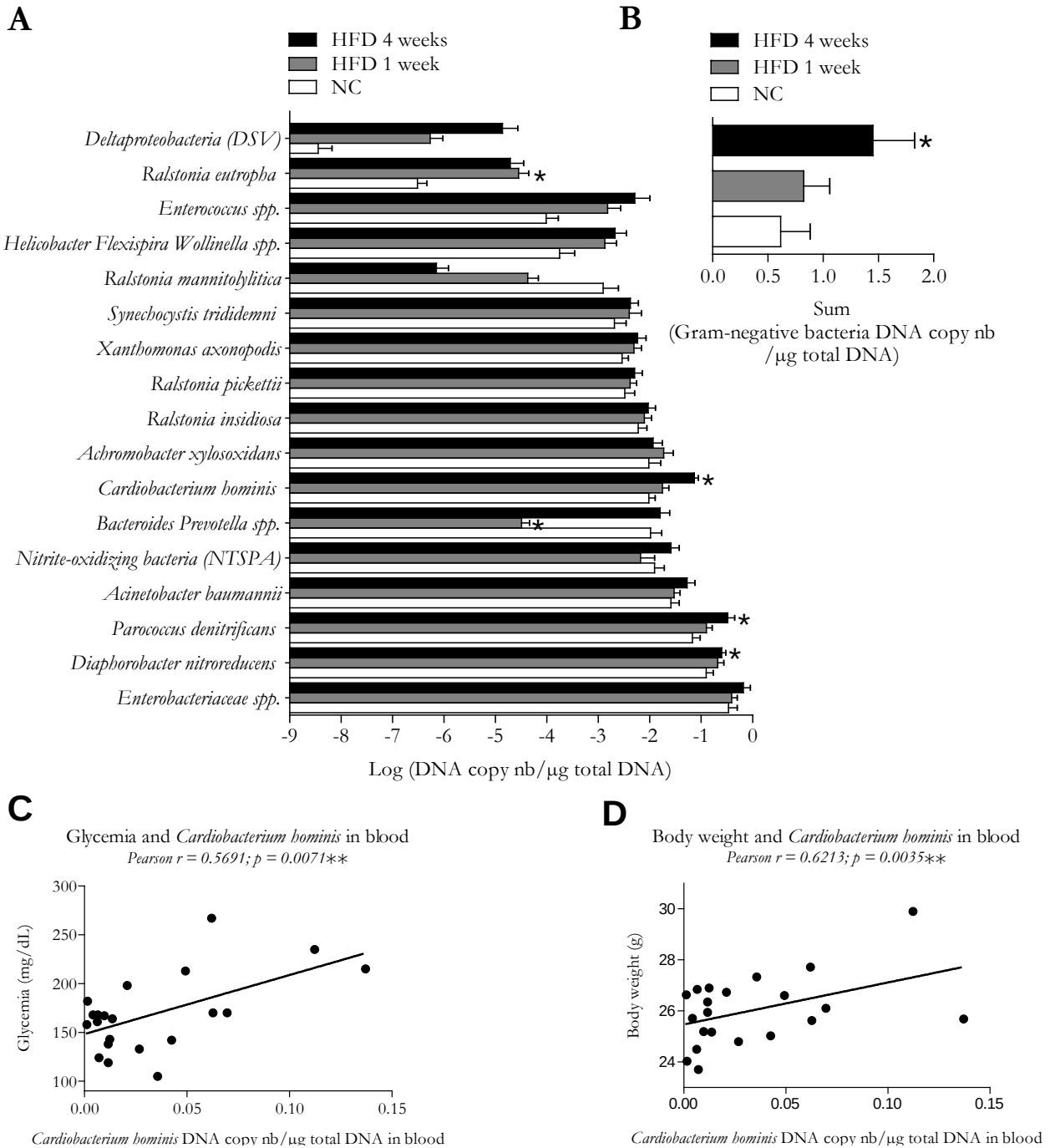


Figure 10. Genus or specie-specific qPCR for some Gram-negative bacteria and qNorB-expressing bacteria show enrichment of blood from diabetic mice in Gram-negative bacteria DNA.

A, Genus or specie-specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR in mouse blood; **B**, Sum of data presented in graph **A**; ($n=7$) (mean + sem; * : $p < 0.05$ versus NC). qNorB-expressing bacteria: *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Synechocystis trididemni*, *Diaphorobacter nitroreducens*, *Parococcus denitrificans*. **C**, **D**, Correlation analysis between *Cardiobacterium hominis* DNA in blood and fasting glycemia (**C**) or body weight (**D**).

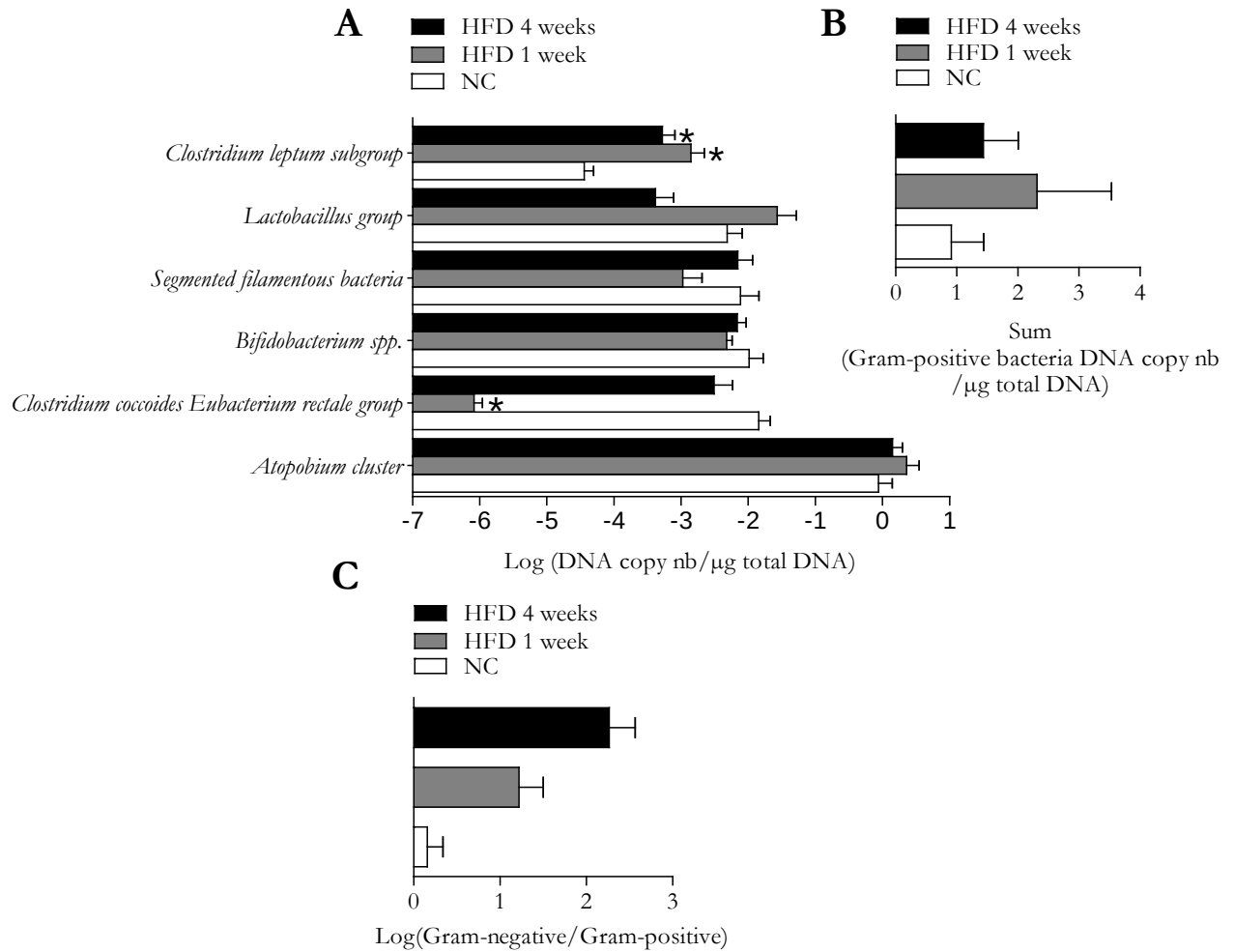
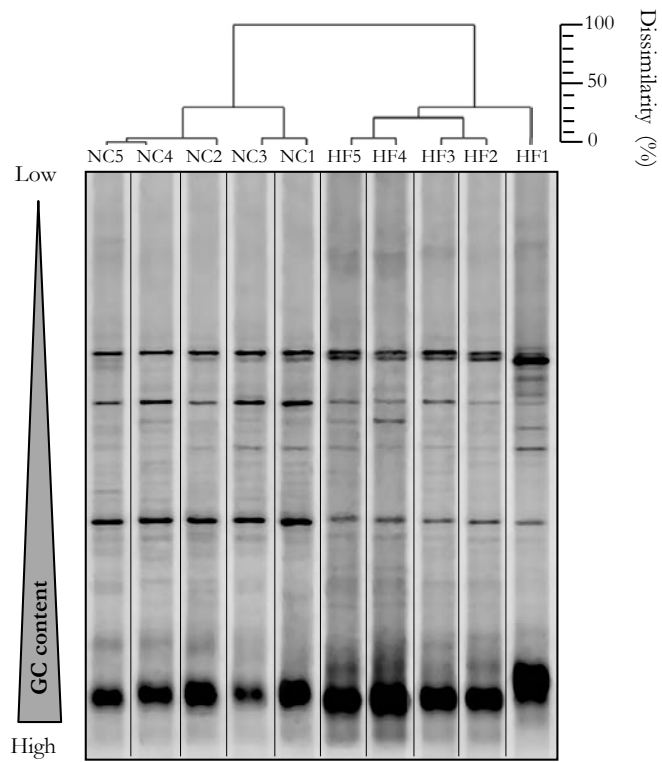


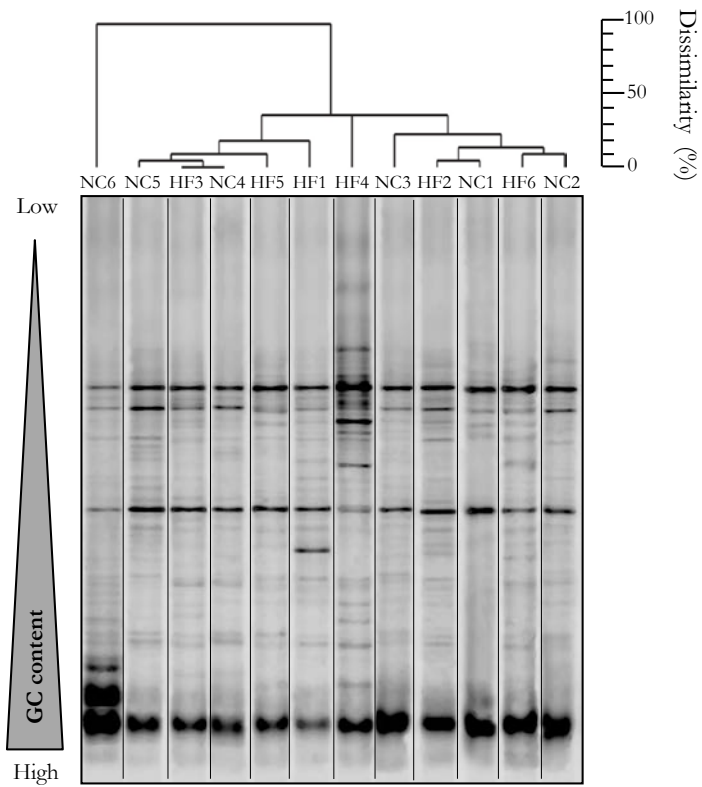
Figure 11. Specific qPCR of some Gram-positive bacteria DNA in blood of prediabetic and diabetic mice. Diabetes development in mouse is associated with a constant increase in Gram-negative to Gram-positive bacteria ratio.

A, Genus or specie-specific *16S rRNA* DNA-targetted qPCR in mouse blood; **B**, Sum of data presented in A; **C**, Gram-negative to Gram-positive ratio; (n=7) (mean + sem; * : $p < 0.05$ versus NC).

A MAT - Diabetic mice



B MAT - Prediabetic mice



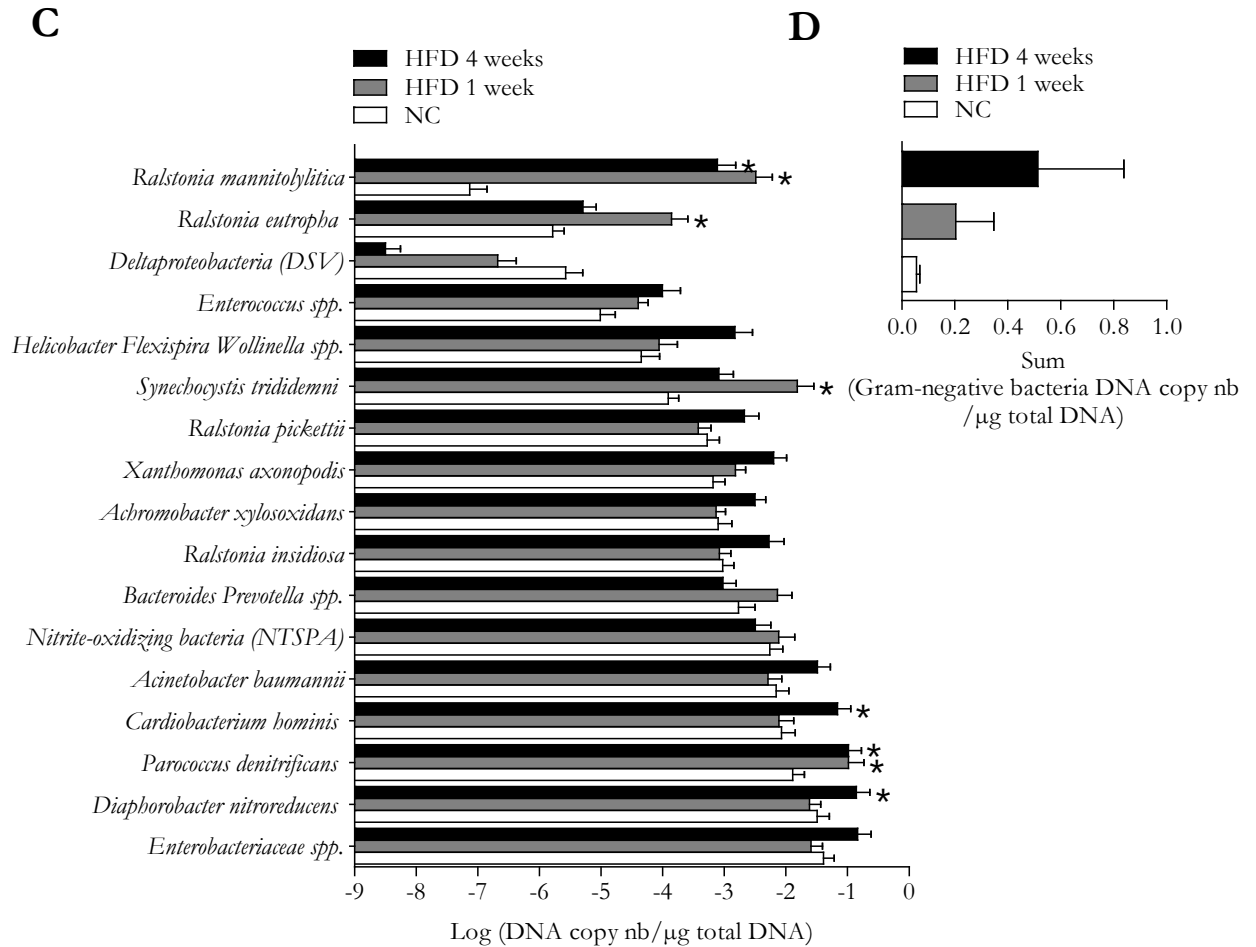


Figure 12. DGGE analysis of mesenteric adipose tissue bacterial DNA diversity reveals differences only after the onset of diabetes. Specific qPCR allows detection of more Gram-negative and qNorB-expressing bacteria in mesenteric adipose tissue of prediabetic and diabetic mice.

Structure of bacterial community from mesenteric adipose tissue (MAT) was profiled by universal *16S rRNA* DNA (V3)-targeted denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) in diabetic (high-fat diet 4 weeks) (HF) and control (normal chow diet) (NC) mice (**A**) ($n = 5$), or in prediabetic (high-fat diet 1 week) (HF) and control (normal chow diet) (NC) mice (**B**) ($n = 6$). All bacterial profiles are reordered according to hierarchical clustering. **C**, Genus or species-specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR in mesenteric adipose tissue of prediabetic (HFD 1 week), diabetic (HFD 4 weeks), and control (NC) mice; **D**, Sum of data presented in graph **C**; ($n=7$) (mean + sem; *: $p < 0.05$ versus NC). qNorB-expressing bacteria: *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia entrophpha*, *Synechocystis trididemni*, *Diaphorobacter nitroreducens*, *Parococcus denitrificans*.

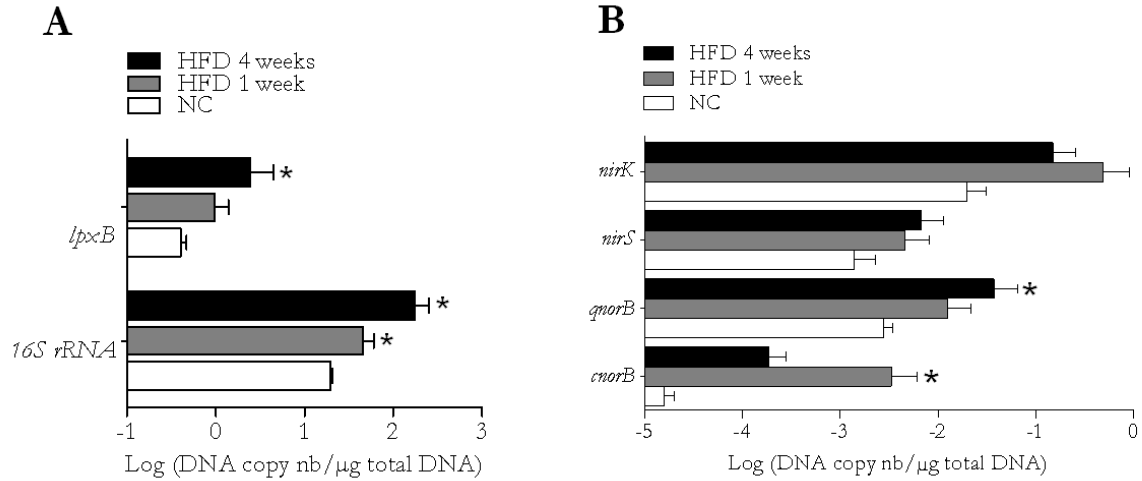


Figure 13. More bacteria are detected by qPCR in mouse mesenteric adipose tissue (MAT) before the onset of diabetes and diabetic state is associated with the presence of more Gram-negative bacteria. Resistance against nitric oxide as a virulence factor for bacteria found in MAT of prediabetic and diabetic mice.

Universal *16S rRNA* DNA (V3) and *lpxB* (lipid A disaccharide synthase-coding gene)-targetted qPCR in mesenteric adipose tissue of prediabetic (HFD 1 week), diabetic (HFD 4 weeks), and control (NC) mice; (n=7) (mean + sem; * : p < 0.05 *versus* NC). **A**, DNA copy number in total DNA as viable and non viable bacteria. **B**, Nitric oxide reductase (Nor) and Nitrite reductase (Nir) coding DNA-targetted qPCR in mesenteric adipose tissue of prediabetic (HFD 1 week), diabetic (HFD 4 weeks), and control (NC) mice; (n=7) (mean+sem; *: p< 0.05 *versus* NC) (*qnor* coding for quinol-dependent Nor, *cnor* for cytochrome c/pseudoazurin-dependent Nor, *nirK* for Cu-containing Nir and *nirS* for *c* and *d1 hemes*-containing Nir)

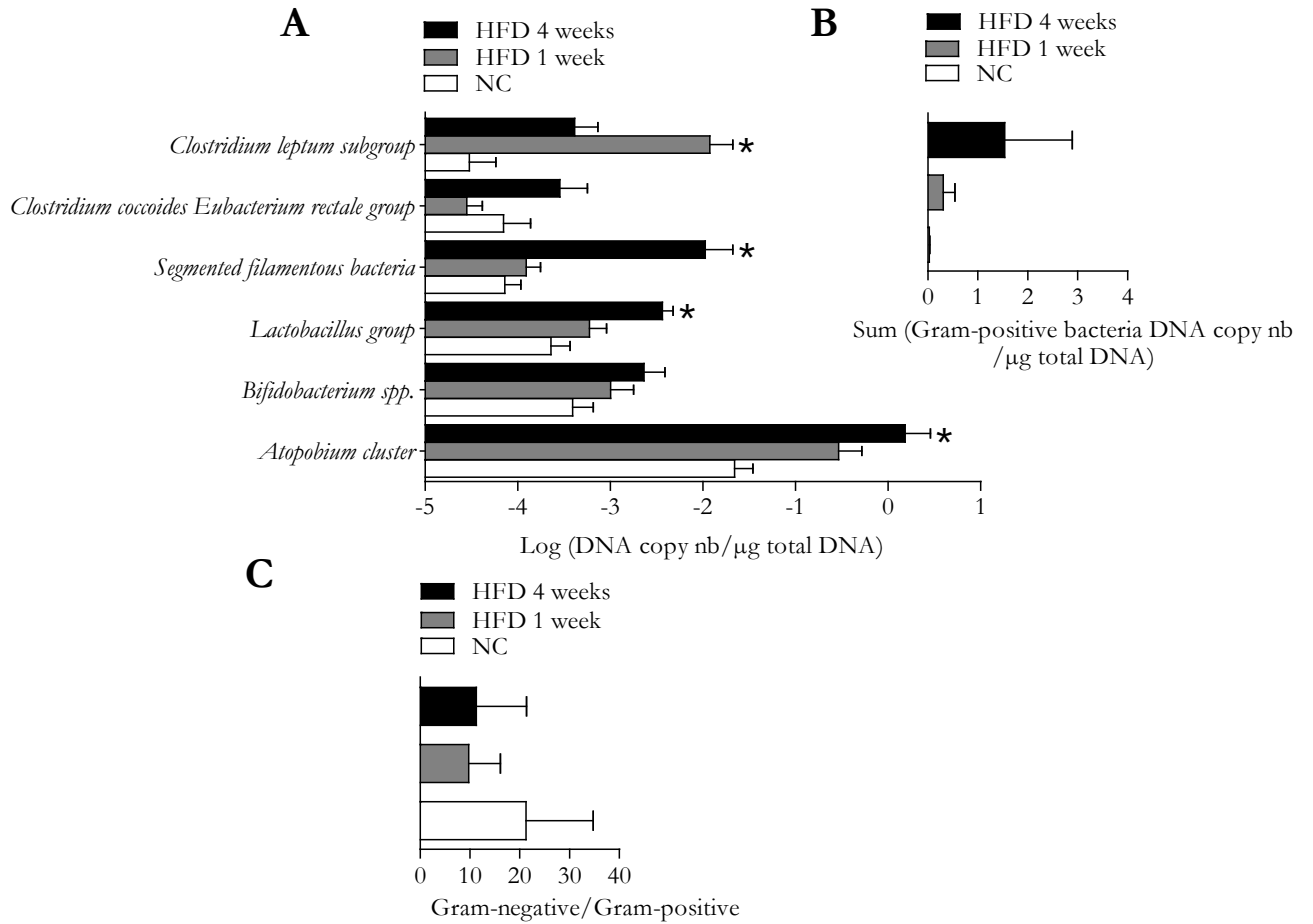
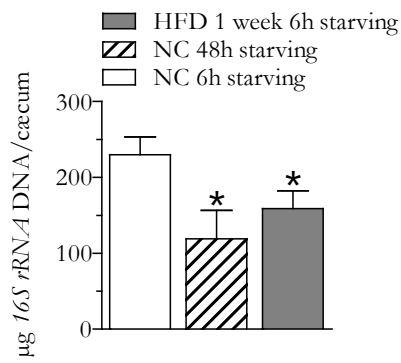


Figure 14. More Gram-positive bacteria are detected in mesenteric adipose tissue (MAT) of prediabetic and diabetic mice. Conversely to blood, Gram-negative to Gram-positive bacteria ratio is not modified in MAT of diabetic mice.

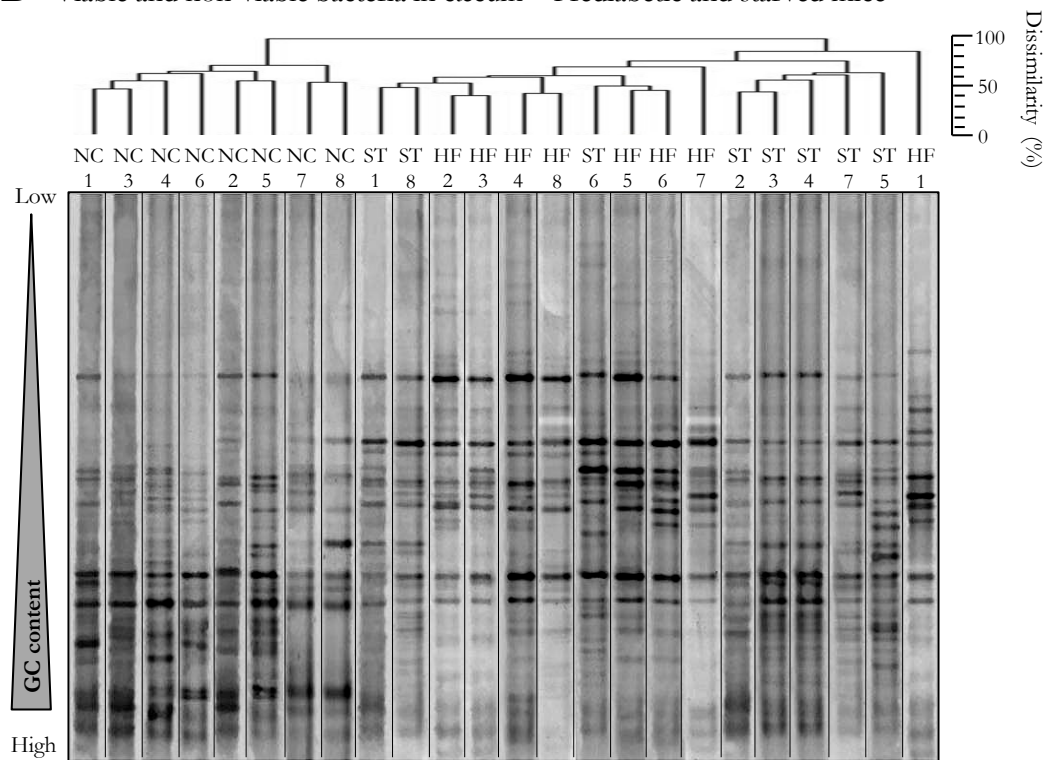
A, Genus or specie-specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR in mouse blood; **B**, Sum of data presented in A; **C**, Gram-negative to Gram-positive bacteria ratio; (n=7) (mean + sem; * : p < 0.05 versus NC).

A

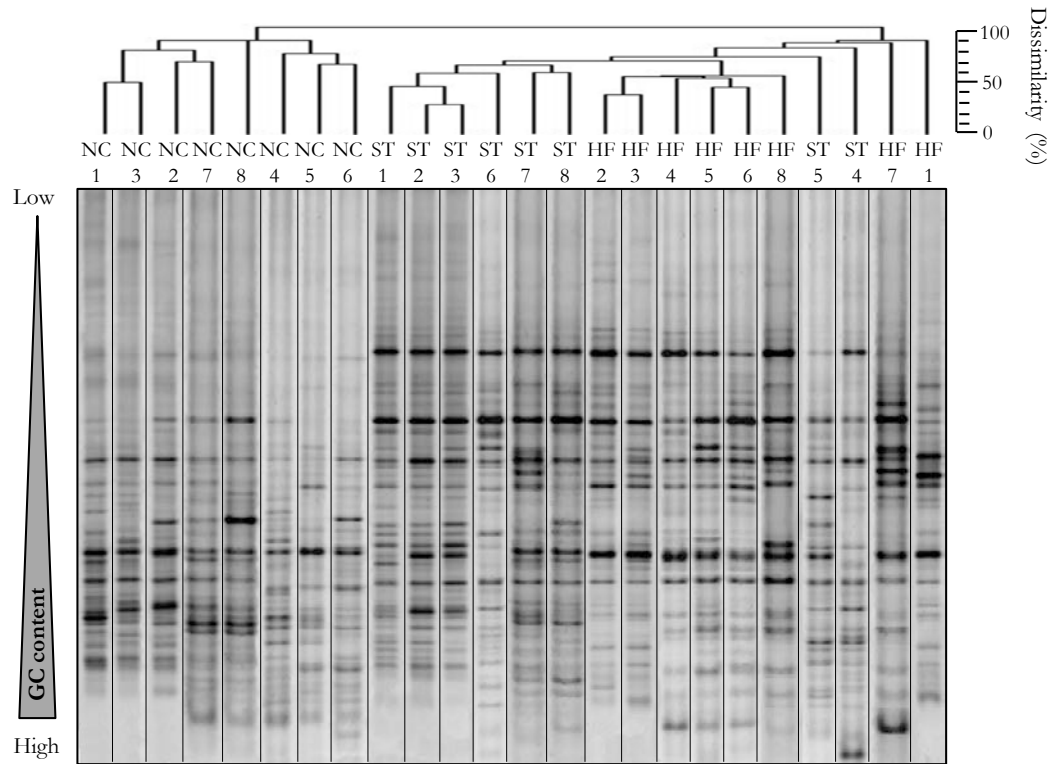


B

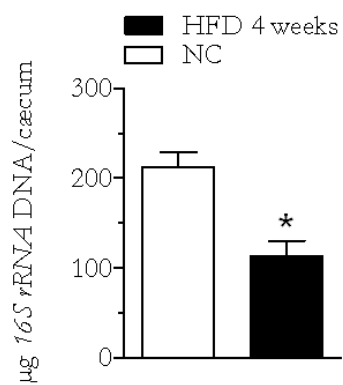
Viabile and non-viable bacteria in cæcum – Prediabetic and starved mice



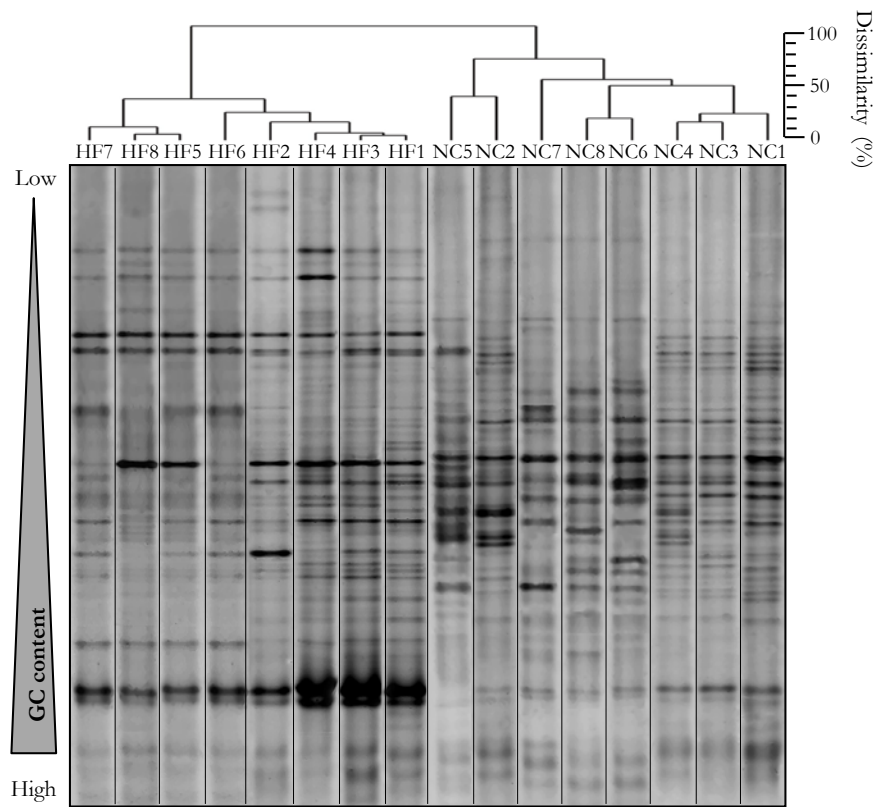
C Viable bacteria in cæcum – Prediabetic and starved mice



D



E Viable and non-viable bacteria in cæcum – Diabetic mice



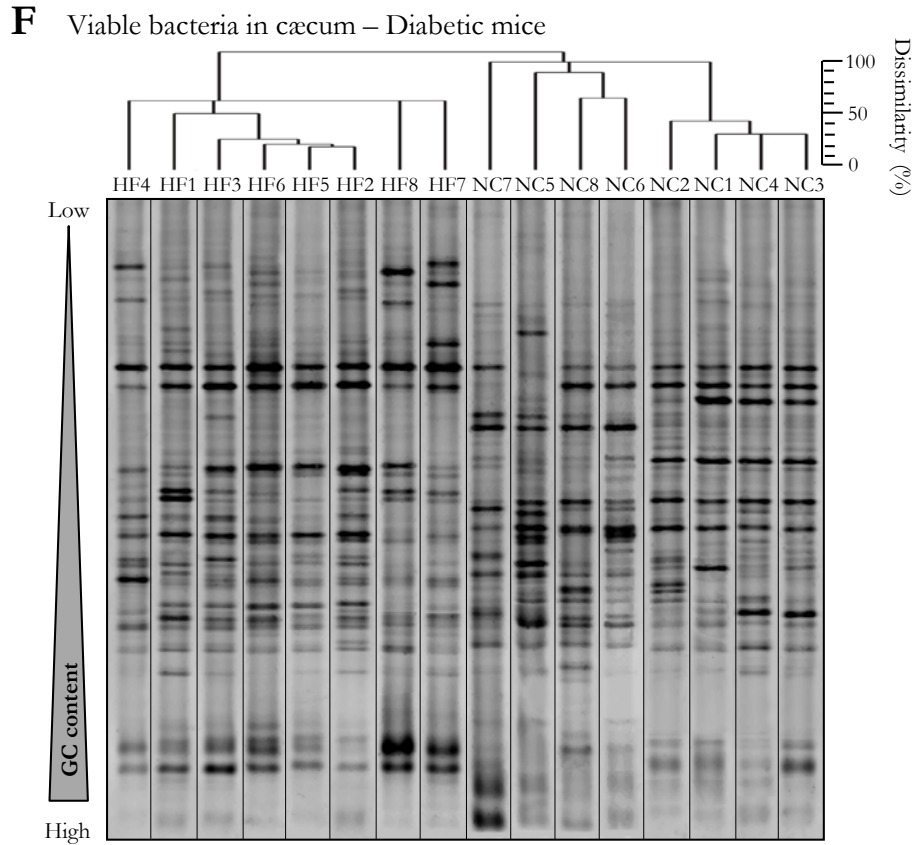
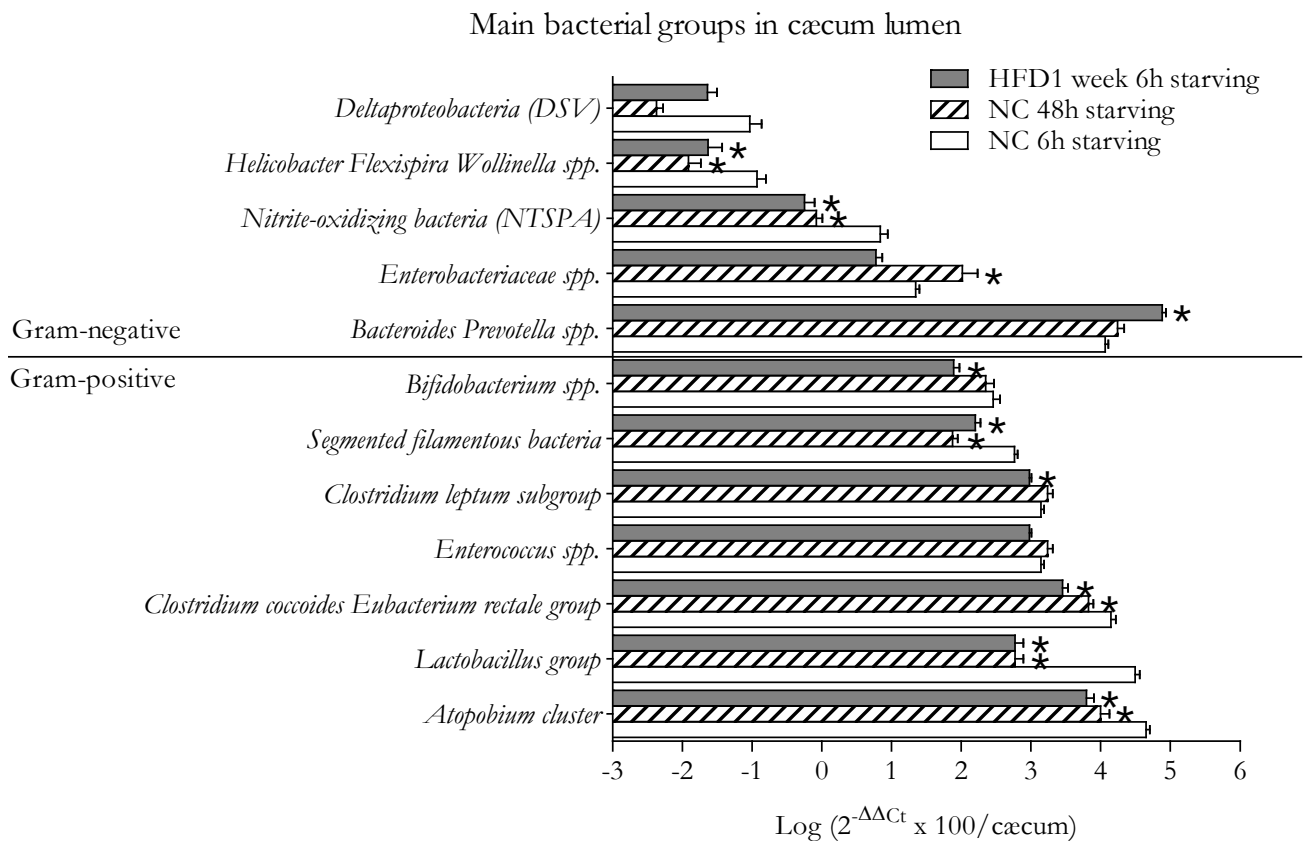


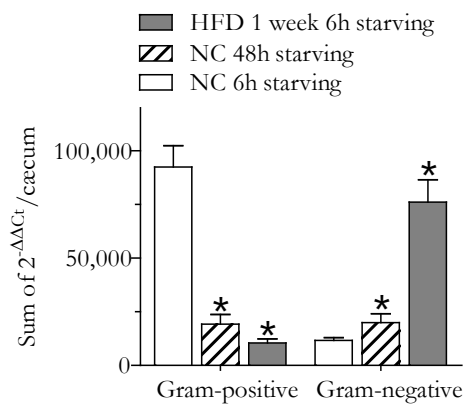
Figure 15. Universal qPCR and DGGE reveals the same quantitative and qualitative changes in intestinal microbiota of prediabetic or starved mice. Diabetic state is associated with a highly different intestinal microbiota.

A, All bacteria were quantified in cæcum of prediabetic (HFD 1 week 6h starving), and control mice after 6h starving (NC 6h starving) or after 48h starving (NC 48h starving), by universal *16S rRNA* DNA-targeted qPCR; mean $\pm$ sem; $n = 8$; * $p < 0.05$ versus NC 6h starving. **B**, **C**, Structure of viable and non viable (**B**) or viable (**C**) cæcal microbiota was profiled by universal *16S rRNA* DNA (V3)-targeted denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) (**B**) (RT PCR-DGGE) (**C**) in prediabetic (HF), and control mice after 6h starving (NC) or after 48h starving (ST); $n = 8$. **D**, All bacteria were quantified in cæcum of diabetic (HFD 4 weeks) and control (NC) mice by universal *16S rRNA* DNA-targeted qPCR; mean $\pm$ sem; $n = 8$; * $p < 0.05$ versus NC. **E**, **F**, Structure of viable and non viable (**E**) or viable (**F**) cæcal microbiota was profiled by universal *16S rRNA* DNA (V3)-targeted denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) (**E**) (RT PCR-DGGE) (**F**) in diabetic (HFD 4 weeks) (HF), and control mice (NC); $n = 8$. All bacterial profiles are reordered according to hierarchical clustering.

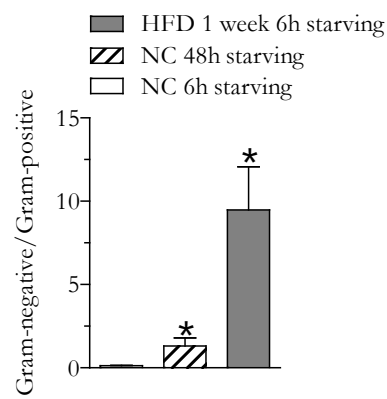
A



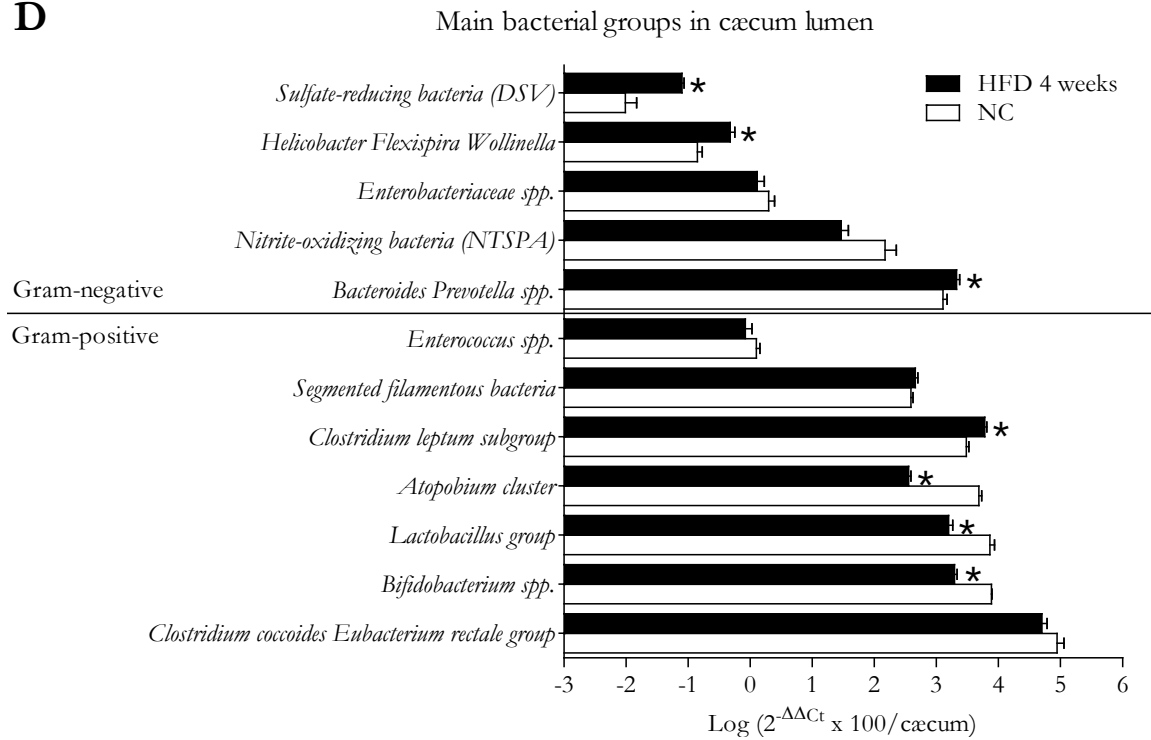
B



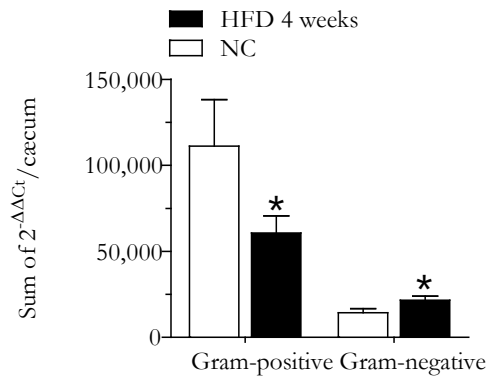
C



D



E



F

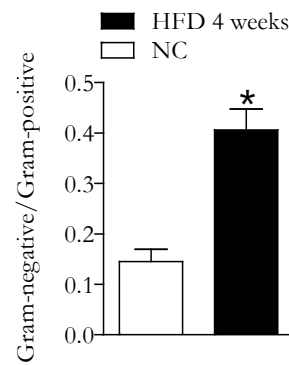


Figure 16. Genus or group-specific qPCR reveal quantitative and qualitative changes in intestinal microbiota of prediabetic, starved or diabetic mice.

A, Quantitative structure of cæcal microbiota determined in prediabetic (HFD 1 week 6h starving), and control mice after 6h starving (NC 6h starving) or after 48h starving (NC 48h starving) by specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR and normalized to total cæcum bacterial content. **B**, Sum of data presented in **A**. **C**, Gram-negative to Gram-positive bacteria ratio calculated from data presented in **B**; (mean $\pm$ sem); (n = 8); (* p < 0.05 *versus* NC 6h starving). **D**, Quantitative structure of cæcal microbiota determined in diabetic (HFD 4 weeks), and control mice (NC) by specific *16S rRNA* DNA-targeted qPCR and normalized to total cæcum bacterial content. **E**, Sum of data presented in **D**. **F**, Gram-negative to Gram-positive bacteria ratio calculated from data presented in **E**; (mean $\pm$ sem); (n = 8); (* p < 0.05 *versus* NC).

CONCLUSION

Ces travaux nous ont permis de confirmer chez l'homme l'existence d'une bactériémie non pathologique. L'étude d'un sous-groupe de 311 hommes issus de la population générale (cohorte MONICA pour Multinational MONItoring of Trends and Determinants in CARDiovascular Disease), nous a permis d'identifier l'ADN bactérien codant pour l'ARNr 16S, comme biomarqueur sanguin des maladies métaboliques, avec une corrélation positive entre la concentration en ADN bactérien de la fraction leucocytaire du sang et la glycémie à jeun, l'insulinémie, la triglycéridémie et le diabète traité, alors qu'une corrélation négative était constatée avec le taux de cholestérol HDL. Ces premiers résultats ont constitué les fondements d'un brevet d'invention accepté en 2011[525]. Nous avons ensuite caractérisé plus précisément la structure de ce microbiote sanguin dans le cadre d'un cas témoin diabète (12 patients et 10 contrôles appariés). Une première approche par profilage d'amplicons de la région V3 de l'ADN codant pour l'ARNr 16S sur gel d'électrophorèse en gradient dénaturant (DGGE), n'a pas permis de discriminer les patients diabétiques de leurs contrôles, mais le séquençage de certaines bandes excisées du gel DGGE a néanmoins permis de révéler la prédominance de la bactérie à Gram positif *Propionibacterium acnes*. Nous avons ensuite cloné et identifié les séquences couvrant les régions V1, V2 et V3 de l'ADN codant pour l'ARNr 16S et constaté que, comparé avec celui de leurs contrôles appariés, l'ADN de la fraction leucocytaire du sang des patients diabétiques était enrichi en séquences attribuables à des bactéries à Gram négatif, appartenant principalement au phylum *Proteobacteria*. La PCR quantitative a permis ensuite d'approcher plus précisément la structure quantitative de ce microbiote sanguin grâce à l'utilisation d'amorces ciblant spécifiquement l'ADN codant pour l'ARNr 16S de diverses espèces bactériennes, ou pour une enzyme clé de la voie de biosynthèse des LPS, LpxB (lipid A disaccharide synthase). Un enrichissement global en bactéries à Gram négatif a ainsi été confirmé, avec en parallèle une diminution globale des bactéries à Gram positif. Une corrélation négative entre la concentration en ADN de *Propionibacterium acnes* et la glycémie à jeun des patients diabétiques a d'ailleurs été révélée. Ces résultats ont ainsi confirmé chez l'homme une augmentation de la quantité de bactéries à Gram négatif dans le sang à l'état diabétique, que nous avons déjà démontrée chez la souris[476]. De plus, *Propionibacterium acnes* a été identifié en tant que marqueur négatif de l'état diabétique, conférant à cet organisme immunomodulateur[543-545] un potentiel rôle protecteur vis-à-vis d'une infection métabolique pro-inflammatoire causée principalement par des bactéries du phylum *Proteobacteria*. Une approche pharmacologique innovante dans le domaine des maladies métaboliques pourrait ainsi consister en une vaccination avec des fragments bactériens comme

ceux de la bactérie à Gram positif *Propionibacterium acnes*, afin de rétablir une immunovigilance suffisante pour contrer une infection métabolique par des bactéries à Gram négatif.

Nous avons ensuite montré une augmentation de la concentration en ADN codant pour la réductase du NO qNorB, dans le sang des patients diabétiques, identifiant ainsi un mécanisme pouvant expliquer la présence en plus grande quantité de bactéries dans le sang des diabétiques, grâce à la détoxification du NO produit par les macrophages[518]. Il est néanmoins important de souligner ici que les quantifications par qPCR ont été réalisées sur de l'ADN. Les résultats générés nous informent donc seulement sur la présence des gènes mais pas sur leur expression effective qu'il conviendrait d'évaluer par RT-qPCR. Mais de manière intéressante, ces données humaines ont été ensuite confirmées chez la souris, chez laquelle nous avons de plus étendu notre analyse à la diversité bactérienne du tissu adipeux mésentérique, démontré précédemment comme une cible de la translocation de bactéries commensales intestinales dès l'état pré-diabétique[476]. Nos résultats nous ont conduit principalement à suggérer dans le tissu adipeux, l'implication possible de réductases bactériennes du NO, détruisant le NO endothélial et conduisant ainsi à une augmentation du recrutement de macrophages au sein du tissu adipeux[546], macrophages pouvant de plus contenir plus de bactéries à Gram négatif en raison d'une potentielle détoxification du NO par qNorB[518], et donc pouvant alimenter au sein du tissu adipeux une inflammation métabolique à l'origine de la résistance à l'insuline[422].

Une dysbiose du microbiote intestinal a ensuite été identifiée chez la souris avant le développement du diabète sous régime gras. Elle est caractérisée par une perte importante de biomasse et une augmentation du ratio entre bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif, en faveur des genres *Bacteroides* et *Prevotella*, qui contiennent des LPS non-inflammatoires et même antagonistes du récepteur TLR4[172].

L'adhésion à la muqueuse intestinale étant un pré-requis à la translocation[547], il est plus approprié d'étudier le microbiote associé à la muqueuse, d'ailleurs différent du microbiote luminal[100] et considéré comme autochtone alors que la flore luminale n'est qu'en transit avec la masse fécale[2]. C'est ainsi que les derniers travaux présentés dans cette thèse s'attachent à décrire plus spécifiquement la relation entre la muqueuse intestinale et son microbiote associé, dans le cadre du développement d'un diabète de type 2 sous régime gras chez la souris.

ARTICLE 3

Relation hôte-microbiote intestinal au cours du diabète

(travaux non publiés)

INTRODUCTION

Les travaux présentés ci-dessus rapportent des quantités d'ADN bactérien augmentées dans le sang et le tissu adipeux de souris pré-diabétiques et diabétiques, alors que la masse totale du microbiote cæcal était réduite à l'état pré-diabétique après une semaine de régime gras, mais également après un jeûne prolongé de 48 heures. Par ailleurs, l'analyse des profils DGGE a montré également une convergence de la composition qualitative du microbiote entre l'état de pré-diabète après une semaine de régime gras et après un jeûne prolongé. La source principale de carbone et d'énergie des bactéries intestinales étant constituée par les hydrates de carbone complexes[548], nous avons alors émis l'hypothèse que les dynamiques quantitative et qualitative observées chez les souris nourries d'un régime gras pouvaient être dues à l'absence d'hydrates de carbone dans le régime gras utilisé et à une adaptation de certaines bactéries à l'utilisation de sources alternatives d'hydrates de carbone. Ces sources alternatives sont constituées par les glycosylations des mucines. En effet, la dégradation du mucus n'est pas limitée aux organismes pathogènes. Certaines bactéries commensales, comme les *Bacteroides* spp. et *Bifidobacterium* spp., sont mucolytiques et peuvent utiliser les glycoprotéines des mucines comme source d'énergie et fournir ainsi des substrats à d'autres consommateurs secondaires[549]. De plus, il a été déjà démontré qu'une situation de jeûne augmente la translocation de bactéries et de LPS[550, 551]. C'est ainsi que nous avons eu l'idée de nous intéresser plus particulièrement à la barrière de mucus dans notre modèle de développement du diabète de type 2. Si cette hypothèse était vérifiée, nous pouvions alors proposer la destruction du gel de mucus par les bactéries autochtones comme mécanisme expliquant en partie l'augmentation d'adhérence des bactéries à la muqueuse intestinale et ainsi aussi la translocation possible vers les tissus sous-jacents. La surcroissance bactérienne est en effet la cause principale de translocation bactérienne[312], particulièrement s'il s'agit de bactéries adhérentes[315].

Nous avons choisi d'étudier l'iléon pour plusieurs raisons. Premièrement, l'intestin grêle représente un site préférentiel de translocation bactérienne[5, 316] et de plus, bien que l'absorption des graisses concerne plutôt la partie proximale du jéjunum[552], l'iléon se situe juste en amont du cæcum et est ainsi potentiellement le premier à pouvoir être affecté par une surcroissance bactérienne.

Matériels et méthodes

Animaux et régimes

Les animaux, des souris C57bL6/J mâles de huit semaines (Laboratoires Charles River), sont hébergés dans un environnement contrôlé, en cycle jour/nuit normal, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Après une période d'acclimatation de deux semaines, les souris sont laissées sous régime normal pauvre en graisses [NC, 3% d'énergie sous forme de lipides, 21% sous forme de protéines et 64% sous forme d'hydrates de carbone (céréales)] (référence A04, Safe) ou soumises à un régime très riche en graisses et sans hydrates de carbone [HFD, 72% d'énergie sous forme de graisses (30% d'huile de maïs, 70% de lard), 28% sous forme de protéines et moins de 1% sous forme d'hydrates de carbone (cellulose)] (référence U8954 version 1, Safe). Le statut métabolique des souris est contrôlé par un suivi du poids et la réalisation de tests de tolérance au glucose. La masse grasse est déterminée par résonance magnétique quantitative à l'aide de l'EchoMRI 3-in-1 Composition Analyzer (Echo Medical Systems). A la fin des différents protocoles, les souris sont sacrifiées par élévation cervicale sans mise à jeun préalable. Tous les protocoles expérimentaux sont approuvés et validés par le comité éthique local de l'INSERM.

Analyse de la morphométrie de l'iléon

La portion distale de l'iléon (1 cm) est prélevée délicatement et placée dans 1 mL de fixateur de Carnoy (éthanol absolu/chloroforme/acide acétique glacial) (60/30/10) pendant 2 heures à 4°C, puis transférée dans l'éthanol à 70%. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine et des coupes de 6 µm d'épaisseur sont réalisées. Les mucines sont colorées selon un procédé histochimique par la technique au bleu Alcian/PAS (acide périodique de Schiff). Les mucines acides sont colorées en bleu par le bleu Alcian et la réaction à l'acide périodique de Schiff, correspondant à l'oxydation des polysaccharides neutres par l'acide périodique, donne une couleur rouge. Cette technique combinée permet ainsi de colorer toutes les mucines et si les deux types de mucines (neutres et acides) sont présentes, la coloration peut aller du bleu-violet au violet suivant les proportions de chaque type. Les lames sont déparaffinées par deux bains successifs de 30 minutes dans un substitut du xylène (Microclearing, D-limonène, DiaPath), puis réhydratées par des bains de 5 minutes chacun dans l'éthanol absolu, l'éthanol à 95%, l'éthanol à 70%, l'éthanol à 50% puis dans le TBS (50mM Tris, 66mM NaCl, pH 7.6). Les lames sont ensuite colorées pendant 30 minutes dans une solution de bleu Alcian 8GX (Sigma-Aldrich) (0,001%

dans l'acide acétique à 3%, pH 2.5), rincées dans l'eau distillée, placées pendant 5 minutes dans l'acide périodique à 0,5% (Sigma-Aldrich), rincées dans l'eau distillée, placées dans le réactif de Schiff (Sigma-Aldrich) (fuch sine basique : 0,001%, métabisulfite de sodium : 0,0018%, HCl concentré : 1%), rincées dans l'eau distillée, contre-colorées pendant 5 minutes dans l'hématoxyline, puis montées sous lamelle dans le milieu Aqueous Mount (SCYTEK référence AMT060) après un dernier rinçage. Après 24 heures de séchage, les coupes sont observées avec le microscope Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Les images sont acquises grâce à une caméra AxioCam ICc1 et au logiciel AxioVision 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Les différentes mesures morphométriques sont ensuite effectuées à l'aide du logiciel Axio Vision 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

Immunomarquage de Muc2, pNF- κ B et NF- κ B dans l'iléon

La portion distale de l'iléon (1 cm) est prélevée délicatement et placée dans 1 mL de fixateur de Carnoy (éthanol absolu/chloroforme/acide acétique glacial) (60/30/10) pendant 2 heures à 4°C, puis transférée dans l'éthanol 70%. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine et des coupes de 6 μ m d'épaisseur sont réalisées. Les lames sont déparaffinées par deux bains successifs de 30 minutes dans un substitut du xylène (Microclearing, D-limonène, DiaPath), puis réhydratées par des bains de 5 minutes chacun dans l'éthanol absolu, l'éthanol à 95%, l'éthanol à 70%, l'éthanol à 50% puis dans le TBS (50mM Tris, 66mM NaCl, pH 7.6). Les coupes sont ensuite incubées avec l'un des 3 anticorps primaires sur la nuit à température ambiante (pNF- κ B, Cell Signaling référence 3031, 1/1000 dans du sérum normal de chèvre à 10% dans le TBS) (NF- κ B Cell Signaling référence 3034, 1/1000 dans du sérum normal de chèvre à 10% dans le TBS) (Muc2 H-300, Santa Cruz sc-15334, 1/250 dans du sérum normal de chèvre à 10% dans le TBS). Après un rinçage dans le TBS, une incubation est réalisée avec l'anticorps secondaire pendant 2 heures à température ambiante (Goat Anti Rabbit IgG-Biotin, Jackson ImmunoResearch référence 111-065-003, 1/500 dans le TBS). Après rinçage dans le TBS, les coupes sont ensuite mise à incuber avec de l'avidine-FITC (Sigma-Aldrich, 1/500 dans le TBS) pendant 2 heures, rincées dans le TBS, puis contre-colorées avec du DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, 200 ng/mL, Sigma-Aldrich). Après un dernier rinçage dans le TBS, les coupes sont montées sous lamelle dans le milieu Aqueous Mount (SCYTEK référence AMT060) et laissées sécher pendant 24 heures. Les coupes sont observées à l'aide du microscope inversé à fluorescence Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Les images sont acquises avec la caméra Zeiss AxioCam

MRm et le logiciel AxioVision 4.7.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) et superposées avec Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc.).

Marquage des bactéries autochtones dans l'iléon par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La portion distale de l'iléon (1 cm) est prélevée délicatement et placée dans 1 mL de fixateur de Carnoy (éthanol absolu/chloroforme/acide acétique glacial) (60/30/10) pendant 2 heures à 4°C, puis transférée dans l'éthanol à 70%. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine et des coupes de 6 µm d'épaisseur sont réalisées. Les lames sont déparaffinées par deux bains successifs de 30 minutes dans un substitut du xylène (Microclearing, D-limonène, DiaPath), puis réhydratées par des bains de 5 minutes chacun dans l'éthanol absolu, l'éthanol à 95%, l'éthanol à 70%, l'éthanol à 50% puis dans le tampon d'hybridation (20mM Tris, 0,9M NaCl, SDS 0,1%, pH 7.6) à 50°C pendant 20 minutes. Les coupes sont ensuite incubées avec une sonde universelle ARNr 16S couplée au Texas-Red, pendant 20 heures à 50°C et à l'obscurité (EUB338 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Eurogentec) (100 µg/mL dans le tampon d'hybridation). Un rinçage dans le tampon d'hybridation sans SDS est ensuite effectué pendant 20 minutes à 50°C. Les coupes sont ensuite contre-colorées avec du DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, 200 ng/mL, Sigma-Aldrich). Après un rinçage dans le TBS (50mM Tris, 66mM NaCl, pH 7.6), les coupes sont montées sous lamelle dans le milieu Aqueous Mount (SCYTEK référence AMT060) et laissées sécher pendant 24 heures. Les coupes sont observées à l'aide du microscope inversé à fluorescence Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Les images sont acquises avec la caméra Zeiss AxioCam MRm et le logiciel AxioVision 4.7.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) et superposées avec Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc.).

Association de l'immunomarquage Muc2 avec le marquage des bactéries autochtones par FISH dans l'iléon

Quand le marquage des bactéries autochtones par FISH est associé avec l'immunomarquage de Muc2, l'immunomarquage est réalisé en premier selon la première partie du protocole décrit plus haut, jusqu'au rinçage après l'incubation avec l'anticorps secondaire puis le protocole FISH est suivi, à partir de la pré-incubation dans le tampon d'hybridation avec 0,1% de SDS à 50°C pendant 20 minutes.

Dosage des mucines par fluorimétrie directe

La réaction est basée sur la libération spécifique des O-glycosylations par beta-élimination en conditions alcalines modérées et la dérivatisation des extrémités réduites avec le 2-cyanoacétamide en présence de borate de sodium. La mesure de la fluorescence émise à 425 nm, contre une gamme étalon de N-acétylgalactosamine, permet finalement de calculer la quantité de O-glycosylations initiales et donc la quantité de mucines car les O-glycosylations sont spécifiques des mucines dans l'intestin. Mis à part les échantillons de muqueuse intestinale qui sont conservés à -20°C, tous les réactifs nécessaires sont préparés de manière extemporanée. Après décongélation sur glace, la muqueuse de l'iléon, prélevée par grattage de l'intérieur de l'iléon (8 cm distaux), est reprise dans du PBS pH 7.4 et chauffée pendant 10 minutes à 95°C pour inhiber les glycosidases. Les mucines sont ensuite solubilisées pendant 90 minutes à 37°C sous agitation. La beta-élimination et la dérivatisation sont ensuite réalisées de manière simultanée pendant 30 minutes à 100°C en présence d'une solution de 2-cyanoacétamide (Sigma-Aldrich) à la concentration de 0,1M dans l'hydroxyde de sodium 0,15M (Sigma-Aldrich). Un témoin négatif constitué de PBS seul ainsi qu'une gamme étalon de N-acétylgalactosamine (Sigma-Aldrich) subissent la réaction de beta-élimination et de dérivatisation dans les mêmes conditions que les échantillons. Du tampon borate pH 8.0, composé de borate de sodium 0,6M (Sigma-Aldrich) dans l'hydroxyde de sodium 0,15M (Sigma-Aldrich), est ensuite ajouté en excès à l'ensemble. Après homogénéisation, la lecture de la fluorescence se fait à 425 nm (excitation à 320 nm) sur 300 µL de la solution finale, à l'aide du fluorimètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific).

Mesure de la perméabilité intestinale au FITC-dextran 4kDa in vivo

Une quantité de 25 mg de FITC-Dextran 4 kDaltons (Sigma-Aldrich) est administrée par voie orale aux souris (200 µL d'une solution à 125 mg/mL dans du PBS pH 7.4), les souris n'étant pas à jeun. Après 1 heure, du sang est prélevé par voie rétro-orbitale à l'aide de capillaires pour micro-hématocrite. Le sang est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 5 minutes à 4°C, et 80 µL de plasma sont ensuite déposés dans une plaque 96 puits noire. Le plasma d'une souris gavée avec 200 µL de PBS, constitue le témoin négatif. Une gamme étalon est réalisée par dilution de la solution mère de FITC-Dextran qui a servi à gaver les souris. La lecture de la fluorescence se fait à 425 nm (excitation à 320 nm) à l'aide du fluorimètre Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific).

Biotinylation de la surface de la muqueuse de l'iléon

Après sacrifice, l'iléon est prélevé et déposé dans une boîte de Pétri. Une solution de NHS-Biotine (Biotin 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt, Sigma-Aldrich) (2 mg/mL dans du PBS pH 7.4 + 1mM de CaCl₂, Sigma-Aldrich) est injectée dans la lumière de l'iléon et laissée réagir pendant 10 minutes. L'iléon est ensuite rincé avec du PBS pendant 5 minutes puis une portion longue de 1 cm est placée dans le fixateur de Carnoy (éthanol absolu/chloroforme/acide acétique glacial) (60/30/10) pendant 2 heures à 4°C, puis congelé à la vapeur d'azote liquide dans une matrice appropriée (Tissue-Tek, Sakura). Des coupes de 8 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées au Cryostat et incubées avec de l'avidine-FITC (Sigma-Aldrich) à 1/500 dans du TBS (50mM Tris, 66mM NaCl, pH 7.6) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après rinçage dans le TBS, les coupes sont ensuite contre-colorées avec du 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (200 ng/mL, Sigma-Aldrich), puis rincées dans le TBS et montées sous lamelle dans le milieu Aqueous Mount (SCYTEK référence AMT060) et laissées sécher pendant 24 heures. Les coupes sont observées à l'aide du microscope inversé à fluorescence Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Les images sont acquises avec la caméra Zeiss AxioCam MRm et le logiciel AxioVision 4.7.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) et superposées avec Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems Inc.).

Extraction et quantification des protéines totales

La muqueuse est prélevée par grattage d'un morceau d'intestin de 1 cm de long et placée dans 500 µL de tampon d'extraction [50mM Tris-HCl, 0,5% déoxycholate de sodium, + cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)] sur glace. L'ensemble est homogénéisé à l'Ultra-Turrax® puis aux ultrasons pendant 5 secondes à la puissance maximum (Branson Sonifier 150). Après centrifugation à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré. Un dosage des protéines est ensuite réalisé à l'aide du DC Biorad Protein Assay (Biorad) sur 5 µL de la solution de protéines diluée 1/10, avec une gamme de sérum albumine bovine (Sigma-Aldrich), selon les recommandations du fournisseur.

Dosage du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 par ELISA

Les protéines TNF- α , IL-6 et IL-10 sont quantifiées dans la muqueuse intestinale par ELISA à l'aide de kits commerciaux [BD Biosciences, cat 555240 (IL-6), cat 555252 (IL-10), cat 555268 (TNF- α)] sur 100 µL de la solution de protéines extraites selon le protocole ci-dessus.

Dosage de Muc2 par ELISA

La protéine Muc2 est quantifiée dans la muqueuse intestinale par ELISA en phase solide selon le protocole ci-après. Les échantillons (100 µL de la solution de protéines) et la gamme de mucine [100 µL de mucine d'estomac de porc (Sigma-Aldrich M1778) de 0,5 à 1000 µg/mL dans le tampon de coating (0,1M carbonate de sodium, pH9.5)] sont déposés dans une plaque Nunc MaxiSorp®, et laissés incuber sur la nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite rincées 2 fois avec 200 µL de PBS puis bloquées avec 200 µL de gélatine de poisson d'eau froide (Sigma-Aldrich, G7765, 3% dans le PBS, 10% FBS) pendant 2 heures à température ambiante. Après 2 lavages avec 200 µL de PBS, 200 µL d'anticorps primaire anti-Muc2 (Santa Cruz sc-15334, 1/1000 dans le PBS) sont mis à incuber sur les échantillons pendant 1 heure à température ambiante. La suite du dosage est réalisée avec le kit BD Biosciences cat 555252, en utilisant l'anticorps secondaire Goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, cat 111-065-003, 1/1000) et en suivant le protocole du kit (BD Biosciences).

Extraction des acides nucléiques à partir des tissus de souris

L'ADN génomique et les ARN messagers totaux sont extraits à partir du contenu et de la muqueuse de l'iléon, du sang et du tissu adipeux mésentérique avec du TRIzol® (Invitrogen). En résumé, les tissus sont homogénéisés dans le TRIzol® à l'Ultra-Turrax®, et ensuite les cellules sont lysées mécaniquement avec un broyeur à billes (TissueLyser II, Qiagen) pendant 2 x 3 minutes à 30 hertz en présence de 200 mg de mini-billes ($\varnothing < 106 \mu\text{m}$, lavées à l'acide, Sigma-Aldrich). L'ARN est ensuite isolé après précipitation à l'isopropanol de la phase aqueuse supérieure alors que l'ADN est précipité et purifié à partir des phases intermédiaire et inférieure selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). La concentration des ARN et ADN est déterminée à l'aide du NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). L'intégrité des ARN est visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose. La rétrotranscription des ARN est ensuite réalisée avec le kit "high capacity cDNA Reverse Transcription Kit" selon le protocole du fournisseur (Applied Biosystems).

Quantification des groupes bactériens dans la muqueuse et le contenu de l'iléon par PCR quantitative

Les primers procaryotes utilisés dans cette étude sont listés dans le **tableau 1**. L'ADN codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) est quantifié avec les primers universels Eubac. Des primers plus spécifiques de groupes et genres bactériens sont utilisés pour quantifier les principaux groupes présents dans le contenu et la muqueuse de l'iléon. Toutes les réactions de PCR quantitative sont réalisées avec l'appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) dans les plaques MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) comme suit : 2 µL d'ADN sont ajoutés à un mix de PCR contenant 300 nM de chaque primer, 9,5 µL d'eau-DEPC et 12,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) par puit dans un volume final de 25 µL. Les conditions de thermocyclage sont : 10 minutes à 94°C puis 40 cycles consistant en 15 secondes à 94°C, 1 minute à la température d'hybridation (**tableau 1**) et 30 secondes à 72°C. L'ADN bactérien total (ARNr 16S universel) est quantifié de manière absolue à l'aide d'une gamme étalon d'ADN d'*Escherichia coli*. Un témoin négatif est systématiquement déposé sur chaque plaque afin de déterminer la valeur du bruit de fond qui est ensuite ôtée des résultats. Par contre, la proportion des différents groupes bactériens est calculée dans la lumière et la muqueuse de l'iléon relativement à la quantité totale d'ADN bactérien avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$, l'ARNr 16S total (Eubac) étant considéré alors comme gène de référence. Ce résultat qualitatif est ensuite normalisé par rapport à la quantité d'ADN bactérien total, précédemment déterminée par quantification absolue, afin d'avoir également des résultats quantitatifs.

Tableau 1 : Primers procaryotes

Gène	Primers (5'-3')	Temp. d'hybridation (°C)	Réf. ou n° accession NCBI
16S rRNA Eubac	<i>sens</i> : TCCTACGGGAGGCAGCAGT <i>anti-sens</i> : GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60	[487]
Groupe <i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> Eubacterium rectale (<i>Clostridium</i> cluster XIV a)	<i>sens</i> : AAATGACGGTACCTGACTAA <i>anti-sens</i> : CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	50	[526]
Sous-groupe <i>Clostridium</i> <i>leptum</i> (<i>Clostridium</i> cluster IV)	<i>sens</i> : GCACAAGCAGTGGAGT <i>anti-sens</i> : CTTCCTCCGTTTGTGCAA	50	[527]
Groupe <i>Lactobacillus</i>	<i>sens</i> : AGCAGTAGGGAATCTTCCA <i>anti-sens</i> : CACCGCTACACATGGAG	60	[490]

<i>Enterococcus</i> spp.	<i>sens</i> : CCCTTATTTGTTAGTTGCCATCATT <i>anti-sens</i> : ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	60	[490]
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>sens</i> : GATTCTGGCTCAGGATGAACGC <i>anti-sens</i> : CTGATAGGACGCGACCCCAT	60	[528]
<i>Segmented Filamentous Bacteria</i>	<i>sens</i> : AGGAGGAGTCTGCGGCACATTAGC <i>anti-sens</i> : TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG	65	[529]
Groupe <i>Bacteroides</i> <i>Prevotella Porphyromonas</i>	<i>forward</i> : GAAGGTCCCCCACAATTG <i>reverse</i> : CAATCGGAGTTCTTTCGTG	55	[533]
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>sens</i> : CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC <i>anti-sens</i> : CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	65	[533]
<i>Deltaproteobacteria</i> (<i>Desulfovibrio</i> spp.)	<i>sens</i> : CCGTAGATATCTGGAGGAACATCAG <i>anti-sens</i> : ACATCTAGCATCCATCGTTTACAGC	65	[533]
Groupe <i>Helicobacter</i> <i>Flexispira Wollinella</i>	<i>sens</i> : TGGGAGAGGTAGGTGGAATTCT <i>anti-sens</i> : GTCGCCTTCGCAATGAGTATTC	60	[490]
<i>Nitrite-oxidizing bacteria</i> (<i>Nitrospira</i> spp.)	<i>sens</i> : CGCAACCCCTGCTTTTCACT <i>anti-sens</i> : CGTTATCCTGGGCAGTCCTT	60	[534]

Analyse du transcriptome de la muqueuse de l'iléon par microarrays (plateformes Biopuces et Get-TRIX)

L'intégrité et la concentration des ARNs sont déterminées avec le Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) et le NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Les critères minimum retenus sont, pour le NanoDrop des ratios 260/230 et 260/280 supérieurs à 1,8 et une concentration supérieure à 60 ng/μL et pour le Bioanalyzer un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 8,5 et un ratio 28S/18S supérieur à 1,7. Les ARNs entrant dans ces critères sont amplifiés et 1 μg de chaque produit d'amplification est marqué avec la Cyanine-3 à l'aide du kit "Low Input Quick Amp Labeling kit one color" selon les recommandations du fournisseur (Agilent Technologies, référence G4140-90040). L'hybridation des puces à ADN (Agilent 4 x 44K whole mouse genome microarrays référence #G4122F) (Agilent Technologies) est faite suivant le protocole "One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis" selon les recommandations du fournisseur (Agilent Technologies, référence G4140-90040). La lame et le mix d'hybridation sont déposés dans une chambre d'assemblage qui est placée dans le four à hybrider (Agilent Technologies) durant 17 heures à 65°C et sous une agitation de 10 rpm. Après désassemblage, la lame est lavée suivant les recommandations du fournisseur puis scannée sur le scanner de haute résolution G2565CA (Agilent Technologies). L'analyse des images est ensuite réalisée à l'aide du logiciel Feature Extraction v 10.10. (Agilent Technologies). L'analyse des données est réalisée avec le

logiciel R (www.r-project.org) en utilisant différentes fonctions du paquet logiciel Bioconductor (www.bioconductor.org). Le filtrage et la normalisation des données ainsi que l'identification des gènes différentiellement exprimés sont réalisés avec le paquet limma (linear models for multiarray data) et le calcul de la probabilité de la présence de faux positifs (q-value). Trois comparaisons statistiques sont effectuées (HFD 1 semaine *versus* NC, HFD 4 semaines *versus* NC et HFD 4 semaines *versus* HFD 1 semaines) et les différences d'expression de chaque gène sont considérées comme significatives quand la q-value est inférieure à 5%.

Quantification de l'expression de gènes eucaryotes dans le sang, le tissu adipeux mésentérique et la muqueuse de l'iléon par RT PCR quantitative

Les primers utilisés sont listés dans le **tableau 2**. Les réactions de PCR quantitative sont réalisées avec l'appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) dans les plaques MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) comme suit : 2 µL d'ADN complémentaire sont ajoutés à un mix de PCR contenant 300 nM de chaque primer, 9,5 µL d'eau-DEPC et 12,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) par puit dans un volume final de 25 µL. Les conditions de thermocyclage sont : 10 minutes à 94°C puis 40 cycles consistant en 15 secondes à 94°C, 1 minute à 60°C. La quantité relative de chaque ARN messenger est calculée avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$, en prenant RPL19 comme gène de ménage.

Tableau 2 : Primers eucaryotes

Gène	Primers (5'-3')	Temp. d'hybridation (°C)	Réf. ou n° accession NCBI
<i>rpl19</i>	<i>sens</i> : GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTC <i>anti-sens</i> : CCTTGTCTGCCITCAGCTTGT	60	NM_009078.2
<i>galnt1</i>	<i>sens</i> : CGGGCTTGGCGGAACCACTC <i>anti-sens</i> : ACAAAGACGGCGGCAAGCGA	60	NM_013814
<i>galnt2</i>	<i>sens</i> : CGCTCTGGGCAGGACCCGTA <i>anti-sens</i> : TCCACTCGCCACTGCTTGCG	60	NM_139272
<i>galnt3</i>	<i>sens</i> : TGGTGCTTCTGGCAAGCCGT <i>anti-sens</i> : GTGGTCGGGTGTCAGGCCCA	60	NM_015736
<i>galnt4</i> 37	<i>sens</i> : AGCCGAGGGCCGACCTAGTG <i>anti-sens</i> : TGGGGCACGGTGACTTTCGG	60	NM_015737

<i>galnt4</i> 39	<i>sens</i> : GGTCCTGCCCTGCTCTCGGA <i>anti-sens</i> : CAGAGCCTTGCGTGCGGTGA	60	NM_173739
<i>galnt5</i>	<i>sens</i> : GCTCCGGGTCAGTTTGGGCG <i>anti-sens</i> : AGGTGTGAGGGGAGCGGTT	60	NM_172855
<i>galnt6</i> 51	<i>sens</i> : TTTGCCTCGGCGCGGATGTG <i>anti-sens</i> : TCCCGCGGAGAGACCTTGGG	60	NM_172451
<i>galnt6</i> 67	<i>sens</i> : TCGGCGCGGTAGGATGTGGT <i>anti-sens</i> : TCCCGCGGAGAGACCTTGGG	60	NM_001161767
<i>galnt7</i>	<i>sens</i> : CTCGGAGCATTGGCGCACAGA <i>anti-sens</i> : AGCATACTCCAGTCCCAGGCCC	60	NM_001167981
<i>galnt10</i>	<i>sens</i> : TCGGGCCCTCCCTGAGACAG <i>anti-sens</i> : GGCTAGGGATGGCTTGCGGC	60	NM_134189
<i>galnt11</i>	<i>sens</i> : GCGGGTGTCGCGGAACTGA <i>anti-sens</i> : GTGGGGCCCAGACCCCTTGA	60	NM_144908
<i>galnt12</i>	<i>sens</i> : GAAGCAGGTCGGGGACGGTG <i>anti-sens</i> : GTTCCAGCGCTCGGGCAGTC	60	NM_172693
<i>gcnt1</i>	<i>sens</i> : TGGCTCGGAGGTCTGGAGCG <i>anti-sens</i> : TGCAGGGCGCACGAAACAGT	60	NM_173442
<i>gcnt3</i>	<i>sens</i> : CAAGAGGAAGACGCCGCCACC <i>anti-sens</i> : AGGCATCCACGAGGCACGCT	60	NM_028087
<i>st3gal1</i>	<i>sens</i> : TGCCGACGCTGTGCAGTTGT <i>anti-sens</i> : TGGTCCGGCTCCCAACGTCT	60	NM_009177
<i>b3gnt6</i>	<i>sens</i> : CGTCTTCGTGCACACGGCCA <i>anti-sens</i> : CTGCGCAGGTTGCGGACTGT	60	NM_001081167
<i>st6galnac1</i>	<i>sens</i> : AGGGACCAGCCATCCACCATGAC <i>anti-sens</i> : GCGTCTTTGCAGCAGGCTCT	60	NM_011371
<i>st6galnac2</i>	<i>sens</i> : AGACCCAGGTTCGCCAGG <i>anti-sens</i> : GGGGGCACCAAACAGCTCCC	60	NM_009180
<i>relmβ</i>	<i>sens</i> : CAGGGAACGCGCAATGCTCC <i>anti-sens</i> : CCAGCAGGACAGGAGGCCAGT	60	NM_023881
<i>muc1</i>	<i>sens</i> : TGGATTGTTTCTGCAGATTTT <i>anti-sens</i> : CCTGACCTGAACTTGATGCT	60	[553]
<i>muc2</i>	<i>sens</i> : GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG <i>anti-sens</i> : GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	60	[554]
<i>muc3</i>	<i>sens</i> : CGTGGTCAACTGCGAGAATGG <i>anti-sens</i> : CGGCTCTATCTCTACGCTCTCC	60	[554]
<i>muc4</i>	<i>sens</i> : CAGCAGCCAGTGGGGACAG <i>anti-sens</i> : CTCAGACACAGCCAGGGAATC	60	[554]

<i>tff3</i>	<i>sens</i> : CCTGGT*TGCTGGGTCCTCTG <i>anti-sens</i> : GCCACGGTTGTTACACTGCTC	60	[554]
<i>kc</i>	<i>sens</i> : AATGAGCTGCGCTGTCAGTG <i>anti-sens</i> : CGCGACCATTCCTTGAGTGTG	60	[555]
<i>cryptdin-1</i>	<i>sens</i> : CTAGTCCTACTCTTTGCCCT <i>anti-sens</i> : TTGCAGCCTCTTGATCTACA	60	[556]
<i>cryptdin-4</i>	<i>sens</i> : GTCCAGGCTGATCCTATCCA <i>anti-sens</i> : GGGGCAGCAGTACAAAAATC	60	[556]
<i>cryptdin-5</i>	<i>sens</i> : GTCCAGGCTGATCCTATCCA <i>anti-sens</i> : GATT*CTGCAGGTCCCAAAA	60	[556]
<i>il1b</i>	<i>sens</i> : TCGCTCAGGGTCACAAGAAA <i>anti-sens</i> : CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC	60	[476]
<i>il10</i>	<i>sens</i> : CTGGACAACATACTGCTAACC <i>anti-sens</i> : GGGCATCACT*CTACCAGGTA	60	NM_010548.2
<i>tnfa</i>	<i>sens</i> : CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA <i>anti-sens</i> : TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	60	[476]
<i>pai1</i>	<i>sens</i> : ACAGCCT*TTGTTCATCTCAGCC <i>anti-sens</i> : CCGAACCACAAAGAGAAAGGA	60	[476]
<i>il6</i>	<i>sens</i> : ACAAGTCGGAGGCTTAAT*TACACAT <i>anti-sens</i> : TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC	60	[476]
<i>ifng</i>	<i>sens</i> : TTGGCT*TTGCAGCTCTTCCT <i>anti-sens</i> : ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	60	[476]

Analyse de la diversité bactérienne dans la muqueuse de l'iléon avec la technologie PhyloChip

Le microarray PhyloChip™ G3 (Second Genome Inc., USA) contient 1,1 million de sondes ADN, représentant environ 60 000 unités taxonomiques. L'ADN génomique est extrait de la muqueuse de l'iléon selon le protocole déjà décrit plus haut et envoyé à la société Second Genome. Le gène codant pour l'ARNr 16S est ensuite amplifié à l'aide du primer sens dégénéré 27F.1 5'-AGRGTTT*GATCMTGGCTCAG-3' et du primer anti-sens non dégénéré 1492R.jgi 5'-GGT*TAACCTTGTTACGACTT-3'. Pour chaque échantillon, les produits d'amplification sont concentrés par filtration/centrifugation et quantifiés par électrophorèse capillaire à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Le PhyloChip Control Mix™ est ajouté à chaque produit d'amplification. Les produits de PCR ainsi que les contrôles sont ensuite fragmentés avec la DNase1 (Invitrogen), marqués à la biotine et hybridés sur la puce PhyloChip™ version G3

pendant la nuit à 48°C et 60 rpm. Une quantité de 500 ng minimum est déposée sur chaque PhyloChip™ G3. Les puces sont ensuite rincées, colorées et scannées à l'aide du scanner GeneArray® (Affymetrix). Chaque image est acquise à l'aide d'un logiciel standard Affymetrix (GeneChip® Microarray Analysis Suite). Les différentes intensités sont ensuite corrigées par soustraction du bruit de fond et normalisées par rapport au mix contrôle (PhyloChip™ Control Mix). Pour chaque unité taxonomique opérationnelle (OTU), le score d'hybridation (HybScore) est calculé en moyennant toutes les intensités après exclusion des valeurs minimale et maximale. Après identification des OTU, les données sont traitées de deux manières différentes. Tous les profils sont comparés entre eux de manière appariée pour calculer un score de dissimilarité, qui est placé dans une matrice des distances. Les distances Unifrac ou WUnifrac (weighted Unifrac) sont calculées. La métrique Unifrac utilise la distance phylogénétique entre les OTU pour calculer la dissimilarité entre deux communautés bactériennes. La distance WUnifrac prend aussi en compte l'abondance des OTU. Une analyse en coordonnées principales (PCoA) est ensuite utilisée pour ordonner les échantillons dans un plan à deux dimensions. La PCoA positionne les échantillons les uns par rapport aux autres en fonction de leur score de dissimilarité (distance Unifrac ou WUnifrac). Le test Adonis est utilisé pour déterminer la significativité des différences entre les 3 groupes d'échantillons (NC, HFD 1 semaine et HFD 4 semaines).

Analyses statistiques

Les données sont analysées avec le logiciel Prism GraphPad version 5.01 (GraphPad Software Inc.). Elles sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (ESM). Pour la comparaison de deux groupes, le test *t* de Student est utilisé. Pour la comparaison de plus de deux groupes, une analyse de variance est réalisée suivie d'un test de comparaison multiple de Bonferroni. Les différences sont considérées significatives quand $p < 0,05$.

L'analyse des corrélations entre les données de RT-qPCR et les données métaboliques ou entre les données de RT-qPCR et les données de diversité bactérienne obtenues par l'analyse Phylochip est réalisée à l'aide du logiciel Prism GraphPad version 5,01 (GraphPad Software Inc.) avec la méthode de régression linéaire de Pearson. La corrélation est considérée comme significative quand $p < 0,05$. Afin de représenter graphiquement ces corrélations, la matrice des coefficients de corrélation de Pearson est ensuite soumise à une classification hiérarchique à l'aide du logiciel PermutMatrix version 1.9.3 (www.limm.fr/~caraux/PermutMatrix/) avec les paramètres

suivants, identiques pour le traitement des lignes et des colonnes : critère d'agrégation (Ward), dissimilarité (distance euclidienne), méthode de sériation arborée (multiple-fragment heuristic).

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre modèle d'étude du diabète

Le même régime très riche en graisses et sans hydrates de carbone a été utilisé pour l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse. Ce régime a permis le développement d'une intolérance au glucose après une semaine de traitement, avant toute prise de poids et de masse grasse, alors que l'état diabétique était établi après quatre semaines (**Figure 1**).

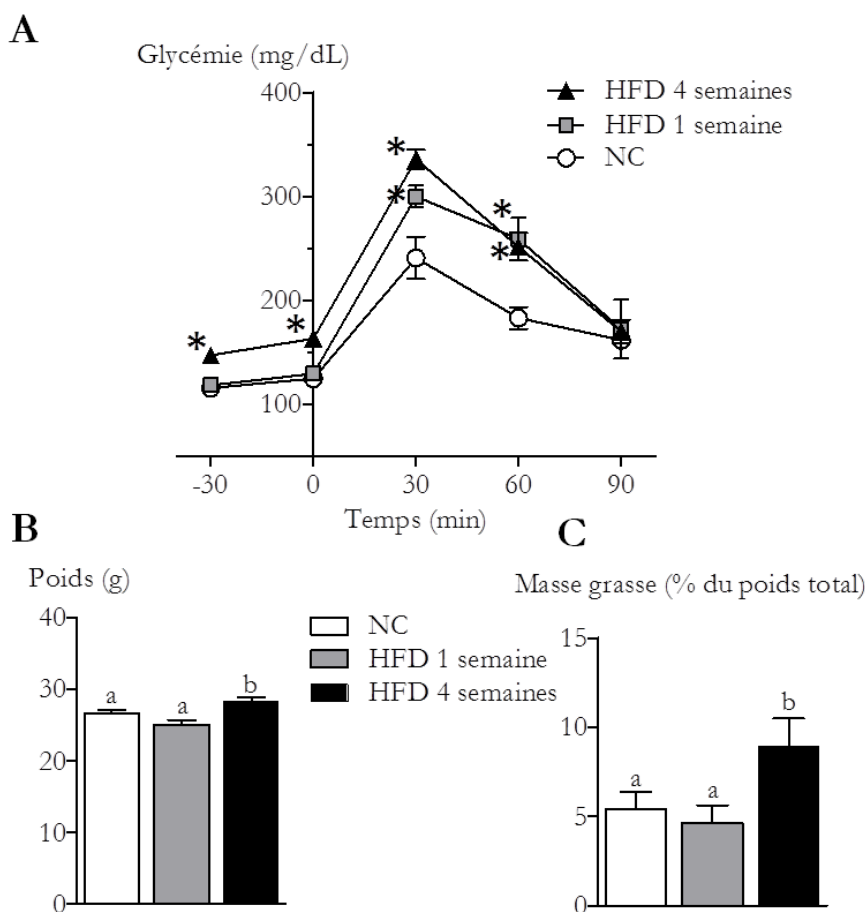


Figure 1 : L'intolérance au glucose précède l'augmentation de la masse grasse chez la souris C57Bl6J mâle nourrie d'un régime très riche en graisses et sans hydrates de carbone.

A, Test intrapéritonéal de tolérance au glucose (1 g/kg) (moyenne $\pm$ esm) (* : $p < 0,05$ *versus* NC).

B, Poids (g) (moyenne + esm). **C**, Masse grasse (% du poids total) (moyenne + esm) ($n = 7$).

Des lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$).

Souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines).

De plus, une inflammation métabolique du tissu adipeux était détectable pour $\text{TNF-}\alpha$ après quatre semaines (**Figure 2B**), alors qu'une expression augmentée d' $\text{IFN-}\gamma$ était détectable dès l'état pré-diabétique dans le sang, après seulement une semaine de régime gras (**Figure 2A**).

Expression génique d'agents pro-inflammatoires (unité relative *versus* RPL19)

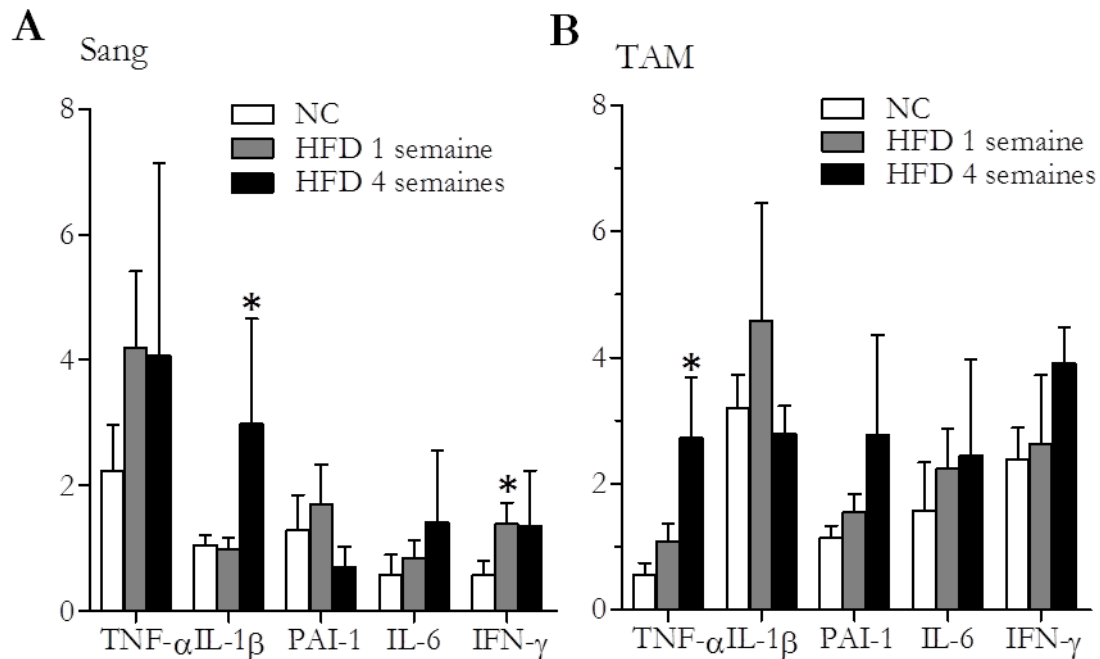


Figure 2 : L'inflammation métabolique concerne le sang avant le tissu adipeux mésentérique.

Quantification de l'expression génique du TNF- α , de l'IL-1 β , de PAI -1, de l'IL-6 et de l'IFN- γ dans le sang (**A**) et le tissu adipeux mésentérique (**B**) de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 *versus* NC)

La morphométrie de l'iléon est modifiée par un régime gras diabétogène

L'analyse de la morphométrie de l'iléon a été réalisée sur des coupes colorées au bleu Alcian/PAS et a premièrement révélé une diminution de diamètre sans modification du nombre de villosités (**Figure 3**).

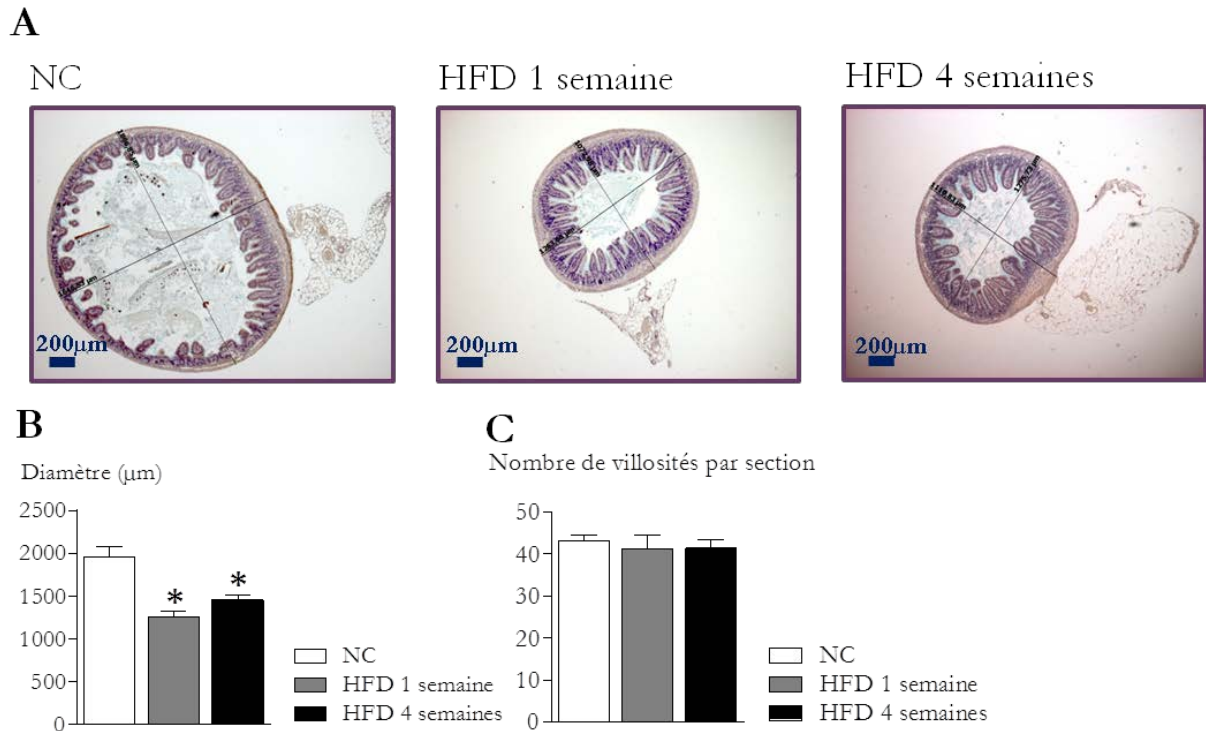


Figure 3 : Le diamètre de l'iléon est réduit sous régime gras diabétogène sans modification du nombre de villosités.

A, Coupes d'iléon colorées au bleu Alcian/PAS et contre-colorées à l'hématoxyline. **B**, Diamètre (μm) mesuré avec le logiciel AxioVision 4.8 (moyenne + esm). **C**, Nombre de villosités par section d'iléon (moyenne +/- esm) (* : $p < 0,05$ versus NC)

Souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines).

Une analyse plus précise nous a montré une augmentation de l'épaisseur de la muqueuse à l'état pré-diabétique, s'accroissant ensuite à l'état diabétique (**Figure 4B**). Cet épaissement était dû à une augmentation de la profondeur des cryptes de Lieberkühn (cryptes) et de la hauteur des villosités (**Figure 4C, 4D**). De plus, nous avons détecté une hyperplasie dans les cryptes à l'état pré-diabétique (**Figure 4F**), hyperplasie se propageant aux villosités à l'état diabétique (**Figure 4G**), ce qui s'est traduit par une augmentation du ratio profondeur de crypte/hauteur de villosité à l'état pré-diabétique (**Figure 4E**). L'hyperplasie des cryptes est considérée comme un processus de réparation et de régénération cellulaire, se traduisant par l'extension vers le haut du compartiment prolifératif situé à la base des cryptes[557]. Ce genre d'observation est typiquement rapporté dans des cas d'infection intestinale, comme avec *E. coli*[558]. Et de manière intéressante, des souris déplétées en MyD88 spécifiquement dans la muqueuse intestinale, montrent également une augmentation de la profondeur des cryptes, avec en parallèle une diminution de l'expression des défensines alpha et de RegIIIγ par les cellules de Paneth, ainsi qu'une augmentation de la

translocation de bactéries commensales[497]. Le déficit en défenses antibactériennes particulièrement dans les cryptes chez la souris déficiente en MyD88, pourrait permettre l'entrée de bactéries dans ce compartiment normalement stérile et conduire à une translocation bactérienne. L'hyperplasie des cryptes traduirait ainsi la réponse des cellules des cryptes vis-à-vis d'une agression bactérienne. Par ailleurs, la carence en fibres dans le régime alimentaire de nos souris, doit conduire à un déficit en SCFA, dont le butyrate. Celui-ci a en effet des effets protecteurs vis-à-vis de la cancérogenèse[139] et stimule la migration des cellules épithéliales[147].

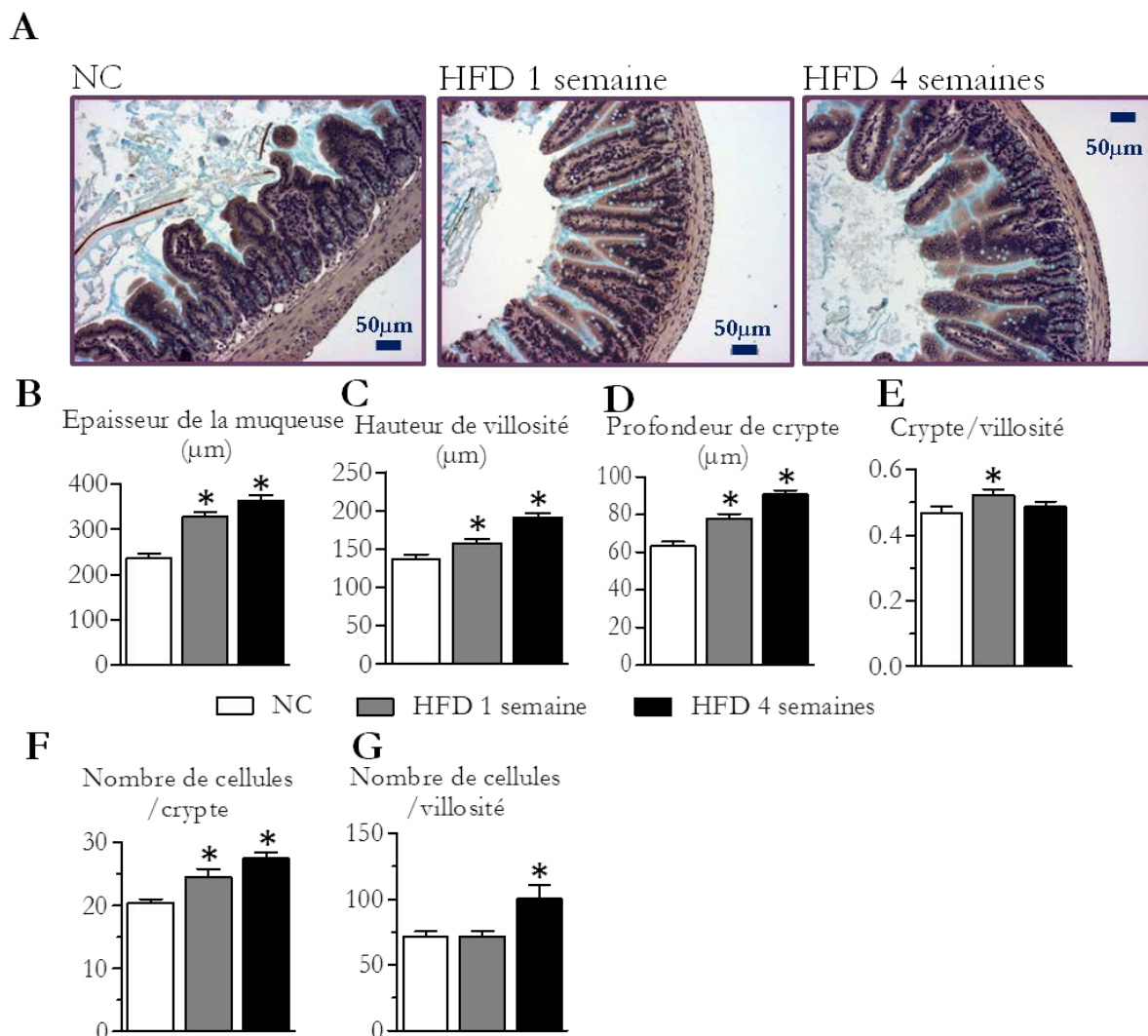


Figure 4 : L'épithélium de l'iléon montre une hyperplasie qui prend son origine dans les cryptes avant le diabète.

A, Coupes d'iléon colorées au bleu Alcian/PAS et contre-colorées à l'hématoxyline.

Mesures effectuées avec le logiciel AxioVision 4.8 : épaisseur de muqueuse (**B**), hauteur de villosité (**C**), profondeur de crypte (**D**), profondeur crypte/hauteur villosité (**E**), nombre de cellules par crypte (**F**) et nombre de cellules par villosité. (moyenne + esm) (* : $p < 0,05$ *versus* NC). Souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines).

La quantité de mucus est diminuée et ses glycosylations sont modifiées à l'état pré-diabétique dans l'iléon

Le mucus est produit par les cellules caliciformes et nous en avons dénombré moins à l'état diabétique (**Figure 5B**). De plus, la coloration des mucines au bleu Alcian/PAS a révélé que les villosités ne sont pas totalement recouvertes de mucus dans l'iléon (**Figure 4A, 5A**). Néanmoins, du fait que le diamètre de l'iléon soit significativement diminué sous régime gras (**Figure 3B**), une couverture similaire des villosités entre l'état normal et l'état pré-diabétique peut laisser présager d'une diminution globale de la quantité de mucus. Il est à noter de plus, que les cellules contenant des mucines colorées en bleu par le bleu Alcian (cellules caliciformes et cellules de Paneth), sont apparues vidées de leur contenu à l'état pré-diabétique (**Figure 5A**).

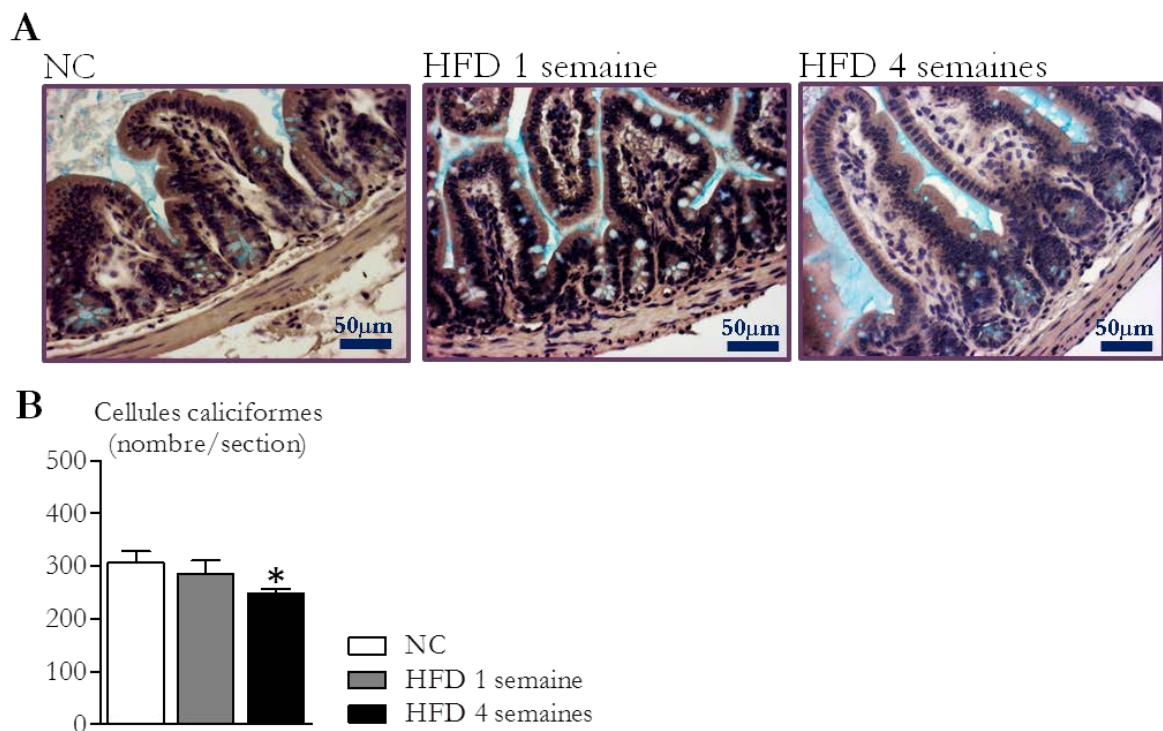


Figure 5 : Les cellules à mucus se vident avant le diabète et leur nombre diminue significativement au cours du diabète installé.

A, Coupes d'iléon colorées au bleu Alcian/PAS et contre-colorées à l'hématoxyline.

B, Nombre de cellules caliciformes par section complète d'iléon (moyenne + esm) (* : $p < 0,05$ versus NC). Souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines).

Le gel de mucus est composé principalement de Muc2 et nous avons trouvé que la muqueuse de l'iléon en contient moins à l'état diabétique, alors qu'à l'état pré-diabétique le marquage de Muc2 est au moins aussi intense et aussi couvrant qu'à l'état normal (**Figure 6**).

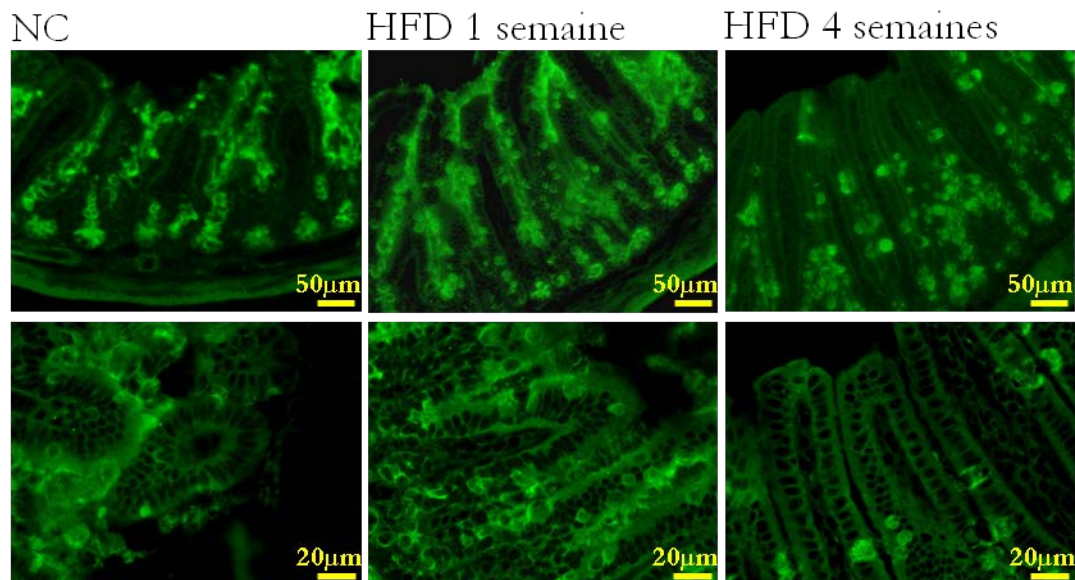


Figure 6 : Le nombre de cellules à mucus ainsi que la couverture par Muc2 sont diminués à l'état diabétique.

Immunomarquage de Muc2 dans l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines).

Nous avons ensuite quantifié Muc2 par ELISA et constaté premièrement un gradient croissant du jéjunum au côlon (**Figure 7A**) et deuxièmement une diminution à l'état pré-diabétique, renforcée à l'état diabétique (**Figure 7B**).

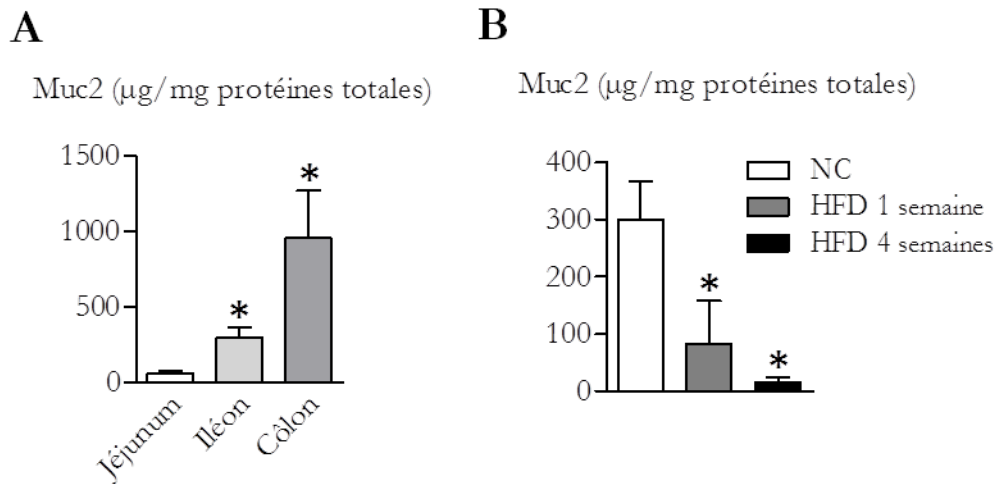


Figure 7 : La quantité de Muc2 augmente du jéjunum au côlon. La quantité de Muc2 est diminuée dans l'iléon à l'état prédiabétique.

Dosage de Muc2 par ELISA dans la muqueuse du jéjunum, de l'iléon et du côlon de souris sous régime normal (A), et dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (B). (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 versus NC)

Pourtant, l'expression génique de la mucine Muc2 n'était pas diminuée et même augmentée à l'état pré-diabétique, en même temps que celle des mucines Muc3, Muc4 et du peptide trifolié TFF3. Seule l'expression de la mucine membranaire Muc1 était diminuée (**Figure 8**). Cette contradiction pourrait s'expliquer soit par une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de Muc2, soit par sa dégradation. En fait, l'expression des mucines est contrôlée par régulation transcriptionnelle ou épigénétique. La régulation transcriptionnelle de Muc2 est médiée par des facteurs de transcription qui se fixent spécifiquement sur le promoteur du gène codant pour Muc2. Des facteurs biologiques, incluant des bactéries, des produits bactériens, des toxines, des cytokines, des hormones, des neuropeptides et des facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation positive ou négative de la transcription de Muc2[559]. De plus, une régulation épigénétique de Muc5AC et Muc2 est rapportée dans la carcinogenèse colorectale, par déméthylation du promoteur[560]. Une stimulation de l'expression de Muc2 est rapportée dans des cellules coliques en réponse à l'adhérence de bactéries pathogènes du genre *Shigella*[561] ou de probiotiques comme *Lactobacillus plantarum*[562]. Ainsi, la surcroissance bactérienne que nous avons identifiée précédemment dans l'iléon[476] pourrait conduire à l'augmentation de l'expression des mucines que nous avons quantifiée à l'état pré-diabétique. La déplétion de Muc2 au niveau protéique pourrait alors être due à une activité mucolytique exacerbée sous régime gras. Une augmentation de l'expression de mucines au niveau de l'ARN messager associée à une

quantité moindre de mucus a d'ailleurs été déjà rapportée dans l'intestin grêle sous l'effet du jeûne[563].

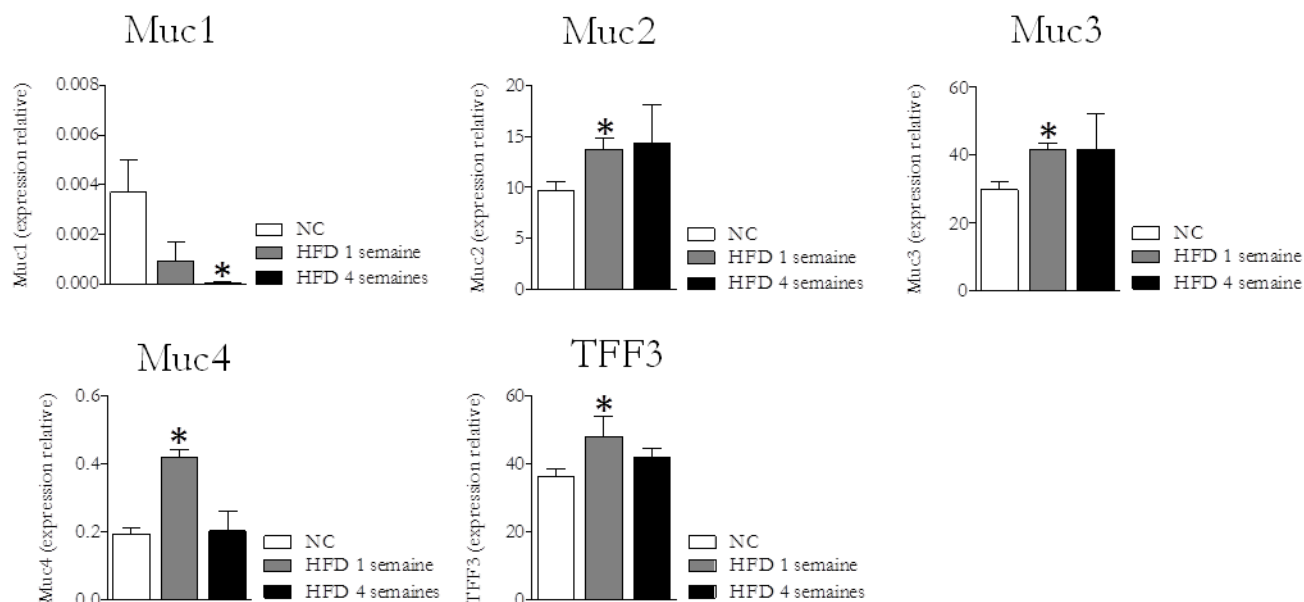


Figure 8 : L'expression des mucines (Muc2, Muc3, Muc4) et de TFF3 est augmentée avant le diabète.

Quantification de l'expression génique de Muc1, Muc2, Muc3, Muc4 et TFF3 par RT-qPCR dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 *versus* NC)

Après l'analyse de la fraction protéique des mucines, nous avons ensuite étudié la fraction glucidique. Quantifiées par fluorimétrie directe, les O-glycosylations totales étaient diminuées significativement à l'état pré-diabétique (**Figure 9**), alors que l'analyse de l'expression génique des différents variants de l'enzyme responsable de l'initiation des O-glycosylations (Galnt) a montré pour certaines une augmentation significative (**Figure 10**). La diminution simultanée de la fraction protéique et de ses glycosylations nous suggère que l'ensemble de la mucine était dégradé dès l'état pré-diabétique.

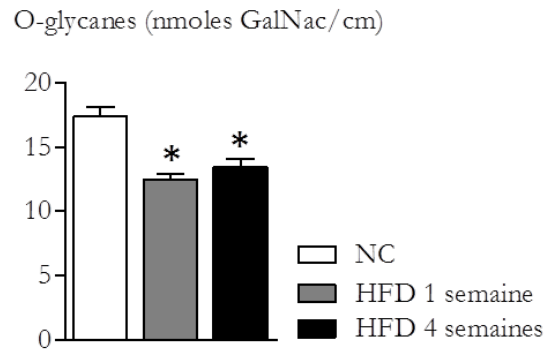


Figure 9 : La quantité de O-glycosylations diminue à l'état pré-diabétique.

Quantification des O-glycosylations par fluorimétrie directe dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 6) (* : p<0,05 *versus* NC)

Expression génique comparative des Galnt (UDP-N-acétyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase) (unité relative *versus* RPL19)

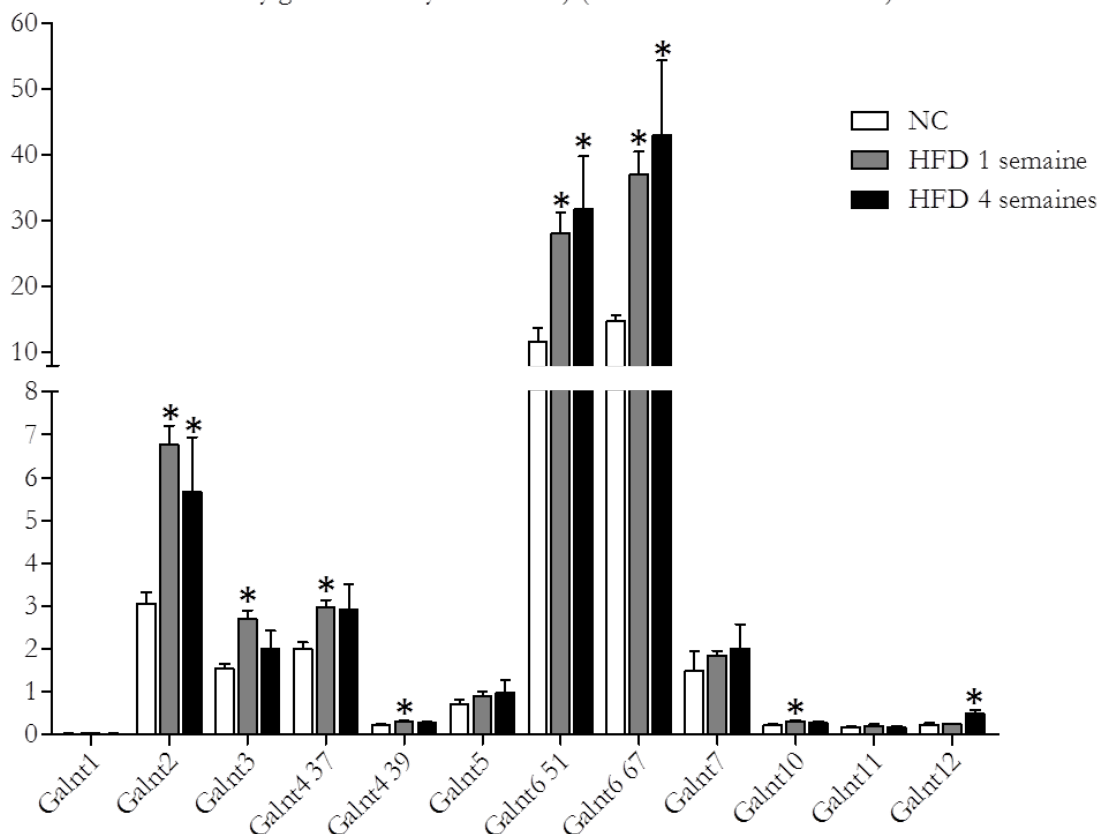


Figure 10 : L'expression de certaines UDP-N-acétyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases est augmentée avant le diabète.

Quantification de l'expression génique des différentes Galnt exprimées d'après les microarrays Agilent dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 *versus* NC)

Suite à la mise en évidence d'une diminution de la quantité de Muc2 et des O-glycosylations totales, le profil des glycosylations des mucines a été analysé par spectrométrie de masse (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle à Lille) (cf **Annexe**) et nous avons quantifié l'expression de certaines des glycosyltransférases impliquées dans la formation de ces glycosylations. L'expression de St3Gal1 et St6GalNac2 était augmentée avant le diabète, alors que celle de Gcnt1 était diminuée (**Figure 11**). Les profils de glycosylation ont confirmé par ailleurs ce que pouvait prédire l'expression génique, avec une diminution de certaines structures glycaniques neutres (branchées par Gcnt1), une augmentation de structures glycaniques sialylées (branchées par St3Gal1 et St6GalNac2) et une augmentation de structures glycaniques sulfatées, avant le diabète (cf **Tableaux 3, 4 et 5 de l'Annexe**). Une augmentation des structures sialylées est d'ailleurs rapportée dans les maladies inflammatoires intestinales[564].

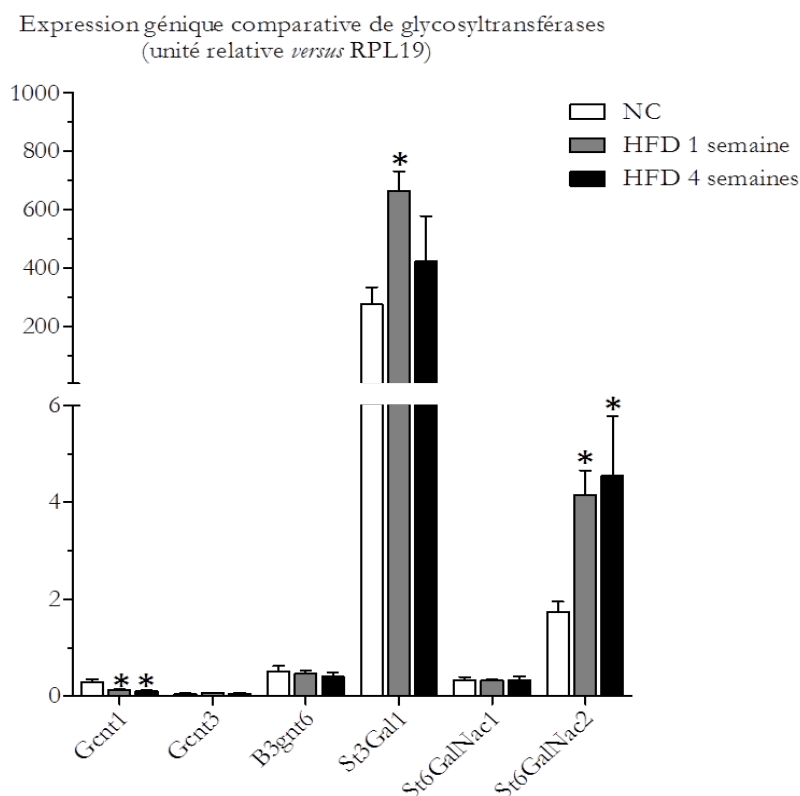


Figure 11 : L'expression de certaines glycosyltransférases est augmentée avant le diabète.

Quantification de l'expression génique de Gcnt1 (beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotéine beta-1,6-N-acétylglucosaminyltransférase 1, Gcnt3 (beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotéine beta-1,6-N-acétylglucosaminyltransférase 3), B3gnt6 (acétylgalactosaminyl-O-glycosyl-glycoprotéine beta-1,3-N-acétylglucosaminyltransférase), St3Gal1 (beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransférase 1), St6GalNac1 [(alpha-N-acétyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acétylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransférase 1] et St6GalNac2 [(alpha-N-acétyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acétylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransférase 2] exprimées d'après les microarrays Agilent, dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 *versus* NC)

Une interaction étroite se met en place à l'état pré-diabétique entre les bactéries autochtones et la muqueuse iléale

Nous avons ensuite cherché à visualiser, grâce à des techniques de microscopie principalement, la présence des bactéries au niveau de la muqueuse de l'iléon.

Une surcroissance bactérienne a tout d'abord été confirmée par qPCR dans la lumière et dans la muqueuse de l'iléon à l'état de pré-diabète (**Figure 12**).

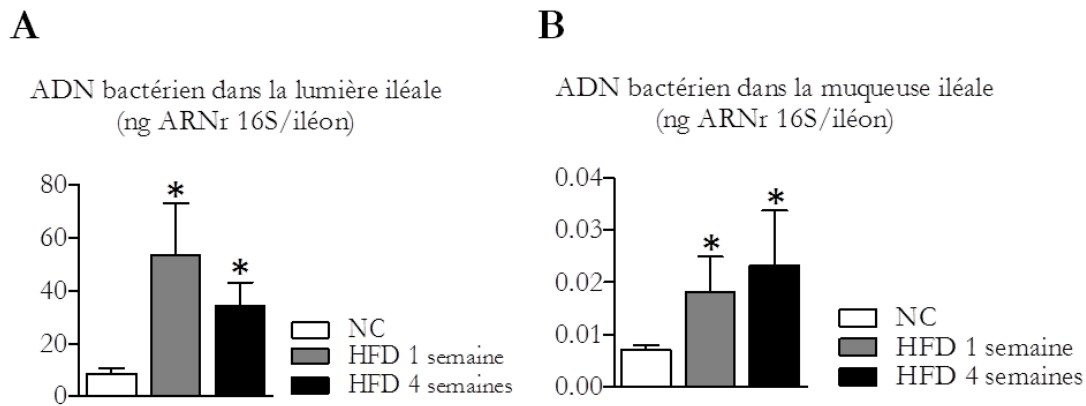


Figure 12 : Une surcroissance bactérienne affecte l'iléon dès l'état pré-diabétique.

Quantification de l'ADN bactérien (ARNr 16S universel) par qPCR dans la lumière (A) et la muqueuse (B) d'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p < 0,05 *versus* NC)

Un marquage des bactéries autochtones a ensuite été réalisé par FISH avec une sonde fluorescente (Texas Red) ciblant l'ARNr 16S universel (EUB338) sur des coupes d'iléon distal. Les résultats montrent que des bactéries étaient associées aux cellules épithéliales intestinales à l'état pré-diabétique, majoritairement au fond des cryptes, et à l'état diabétique les bactéries étaient visibles dans l'ensemble de la *lamina propria*, à l'intérieur de phagocytes (**Figure 13**). La présence de bactéries au fond des cryptes pourrait expliquer alors l'hyperplasie spécifique de ce compartiment à l'état pré-diabétique, révélée plus haut (**Figure 4**).

Afin d'explorer l'hypothèse selon laquelle les bactéries pourraient dégrader le mucus chez les souris nourries de régime gras, nous avons ensuite couplé la technique FISH avec un immunomarquage de Muc2. Une association spécifique des bactéries avec les cellules productrices de Muc2 (cellules caliciformes et cellules de Paneth) constituerait en effet un nouvel indice en faveur de notre hypothèse. Chez la souris normale, les bactéries luminales étaient séparées de l'apex des villosités par une couche contenant Muc2 (**Figure 14A**), alors qu'à l'état pré-diabétique des bactéries étaient associées à des cellules caliciformes et visibles dans la lumière des cryptes en étroite relation avec les cellules du fond des cryptes (**Figure 14B**). A l'état diabétique, des bactéries étaient visibles dans la *lamina propria* et entre les entérocytes (**Figure**

14C). L'association spécifique des bactéries avec les cellules sécrétant Muc2 renforce ainsi la possibilité d'un parasitisme métabolique.

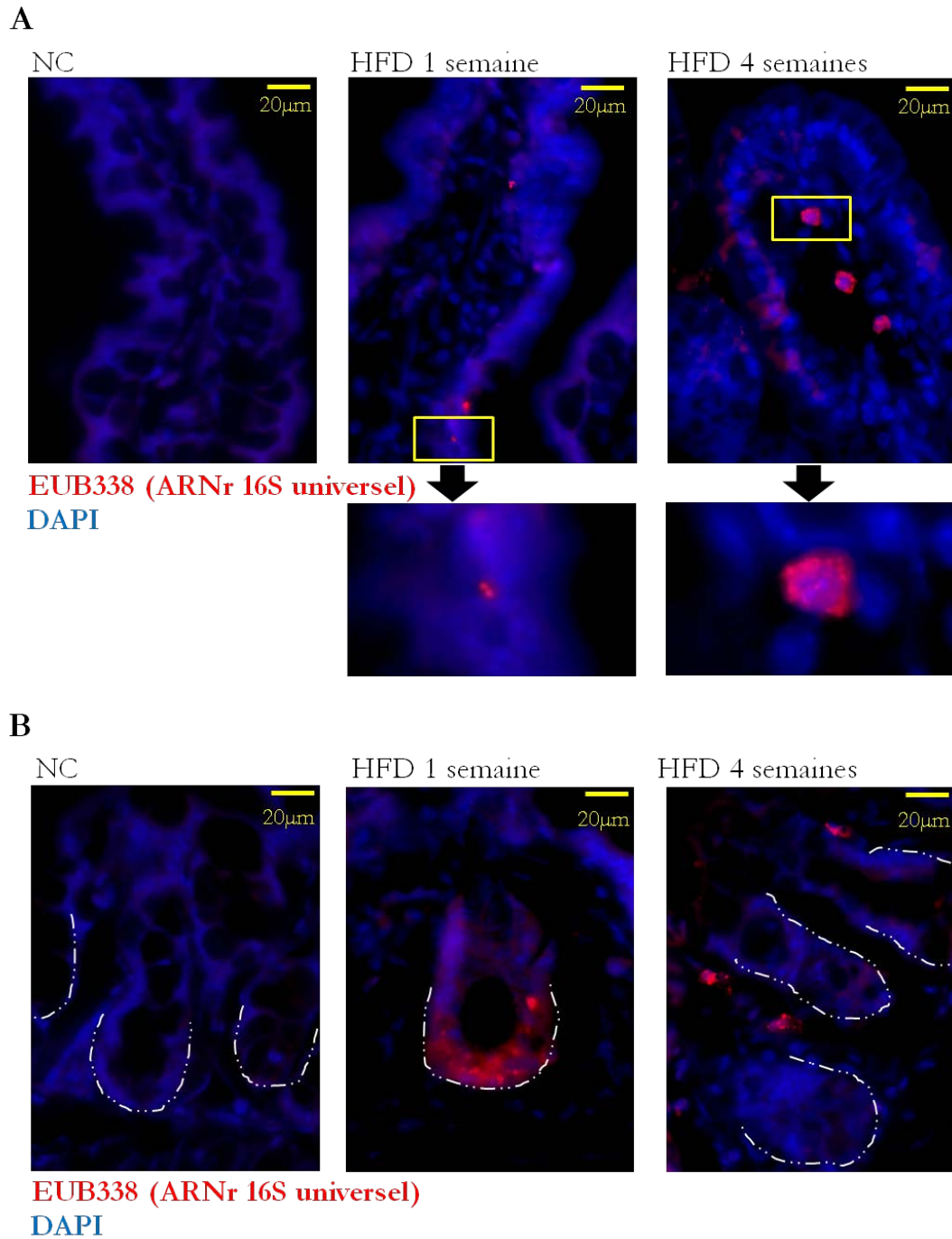


Figure 13 : Des bactéries sont étroitement associées à l'épithélium de l'iléon à l'état pré-diabétique et sont dans la *lamina propria* à l'état diabétique.

Hybridation in situ en fluorescence (FISH) des bactéries autochtones dans l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines). **A**, Villosités. **B**, Cryptes dont la base est soulignée par une ligne pointillée.

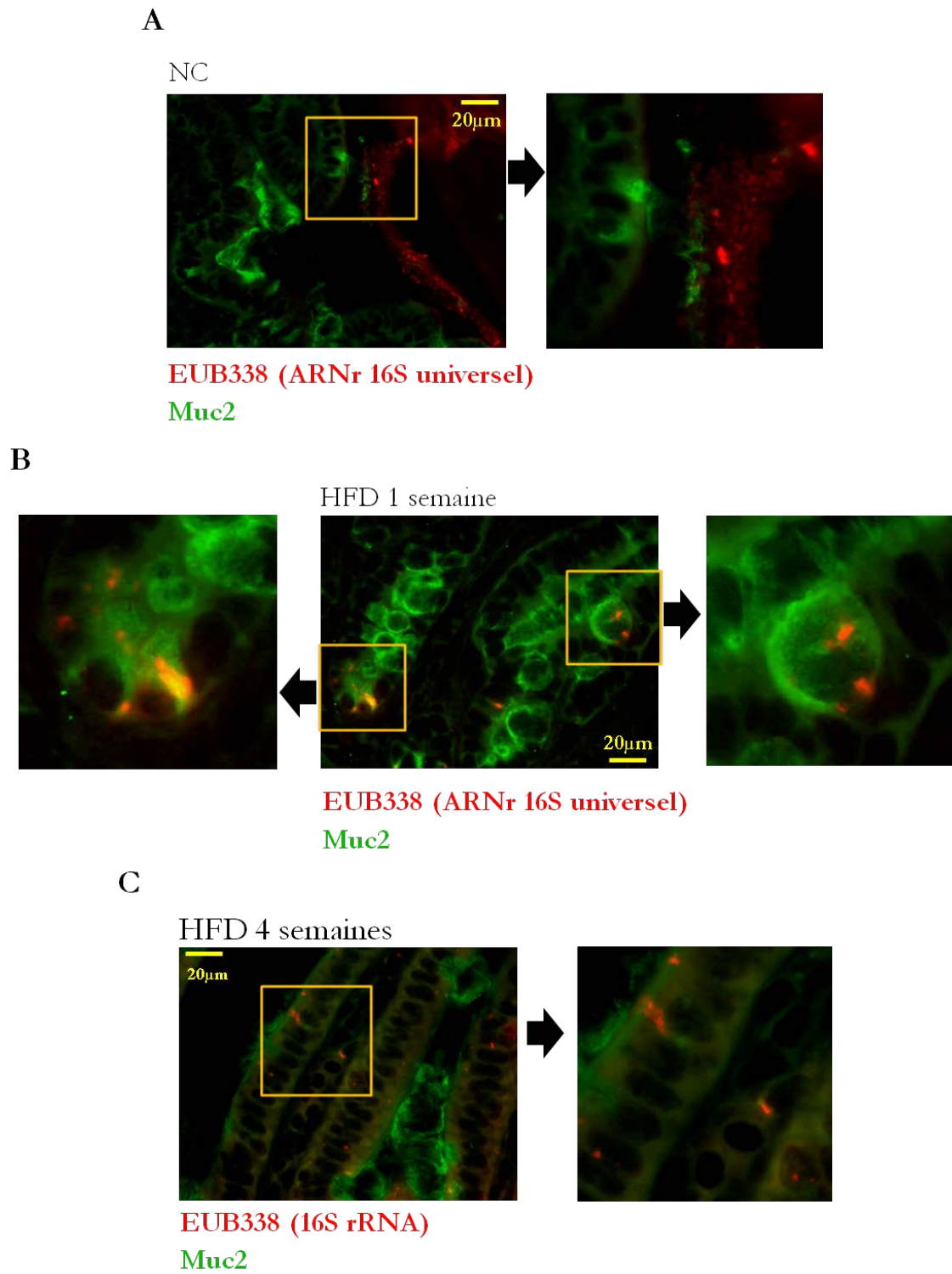


Figure 14 : Des bactéries adhèrent spécifiquement aux cellules productrices de Muc2 dans l'iléon à l'état pré-diabétique et franchissent l'épithélium à l'état diabétique.

Hybridation in situ en fluorescence (FISH) des bactéries autochtones dans l'iléon de souris saines (NC) (A), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) (B) et diabétiques (HFD 4 semaines) (C).

Plusieurs fonctions de la barrière intestinale sont altérées à l'état pré-diabétique dans l'iléon

Nous avons ensuite étudié la perméabilité ainsi que le statut inflammatoire et les défenses antibactériennes de la muqueuse de l'iléon.

La perméabilité de la muqueuse intestinale a été tout d'abord quantifiée à l'aide d'un traceur fluorescent, le FITC-Dextran 4 kDa. Les résultats ont montré que l'intestin était significativement plus perméable à ce traceur à l'état pré-diabétique spécifiquement (**Figure 15**).

Perméabilité intestinale au FITC-Dextran 4 kDa
($\mu\text{g/mL}$ plasma)

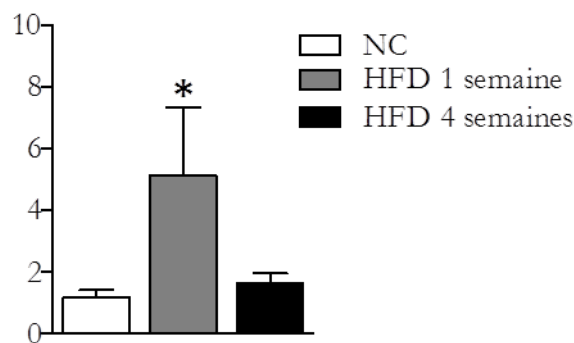


Figure 15 : A l'état pré-diabétique, l'iléon est plus perméable au FITC-Dextran 4 kDa.

Quantité de FITC-Dextran 4 kDa retrouvé dans le plasma 1 heure après administration orale chez des souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) ($n = 6$) (moyenne + esm) (* : $p < 0,05$ versus NC).

Un autre traceur, la NHS-Biotine, a ensuite été utilisé afin de visualiser sur des coupes d'iléon quelle voie de passage pouvait être affectée : paracellulaire ou transcellulaire. La révélation de la biotine à l'aide d'avidine-FITC a permis de mettre en lumière des voies différentes de passage de la biotine entre l'état pré-diabétique et l'état diabétique (**Figure 16**). Chez les souris saines la biotinylation n'atteignait que le haut des villosités ou alors n'atteignait pas l'épithélium. Chez la souris pré-diabétique par contre, la biotine avait pénétré dans l'ensemble des cellules épithéliales selon une voie transcellulaire, la fluorescence cernant les noyaux colorés au DAPI (**Figure 16B**). Et à l'état diabétique, une voie paracellulaire semblait être privilégiée, avec une fluorescence observée en dessous de l'épithélium de surface (**Figure 16B**). Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans la figure 14, où la localisation des bactéries est limitée à l'épithélium de surface à l'état pré-diabétique et étendue à la *lamina propria* à l'état diabétique. Néanmoins, le FITC-Dextran 4 kDa est habituellement rapporté comme traceur paracellulaire. Il est alors

envisageable que celui-ci puisse diffuser selon une voie transcellulaire si les jonctions serrées ne sont pas perméables.

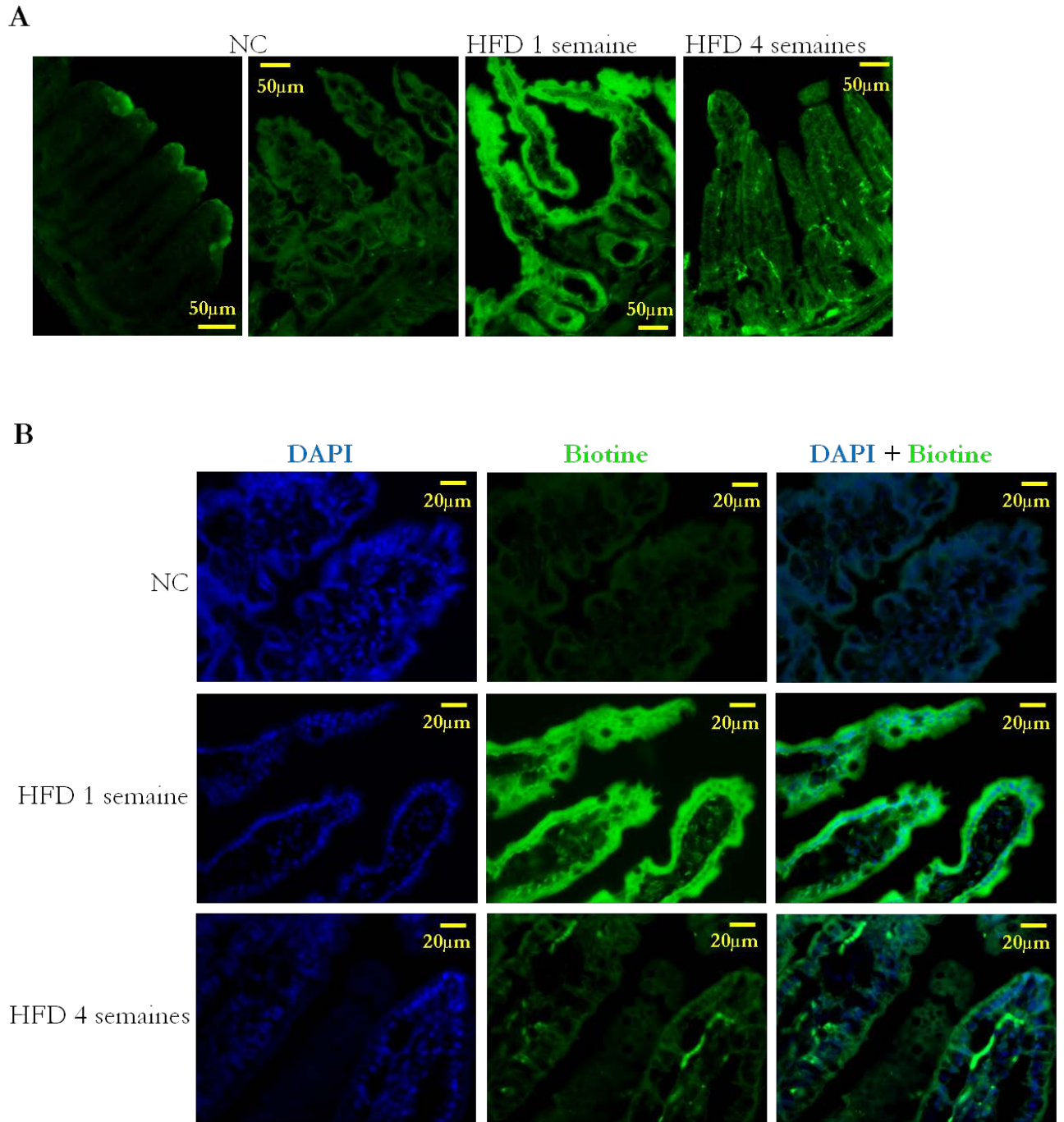


Figure 16 : La perméabilité de l'iléon est augmentée au niveau transcellulaire à l'état pré-diabétique, et au niveau paracellulaire à l'état diabétique.

Biotinylation révélée en fluorescence avec de l'avidine-FITC dans l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines). **A**, FITC seul. **B**, FITC + DAPI.

Nous avons ensuite examiné le statut inflammatoire de la muqueuse de l'iléon dans notre modèle. Au niveau de l'expression génique, nous avons constaté principalement une augmentation de l'expression de TNF- α et de KC à l'état pré-diabétique (**Figure 17**). Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par Shengli Ding, qui rapporte une augmentation de l'expression de TNF- α dans l'iléon de souris sous régime gras, avant l'apparition du diabète et de l'obésité[565].

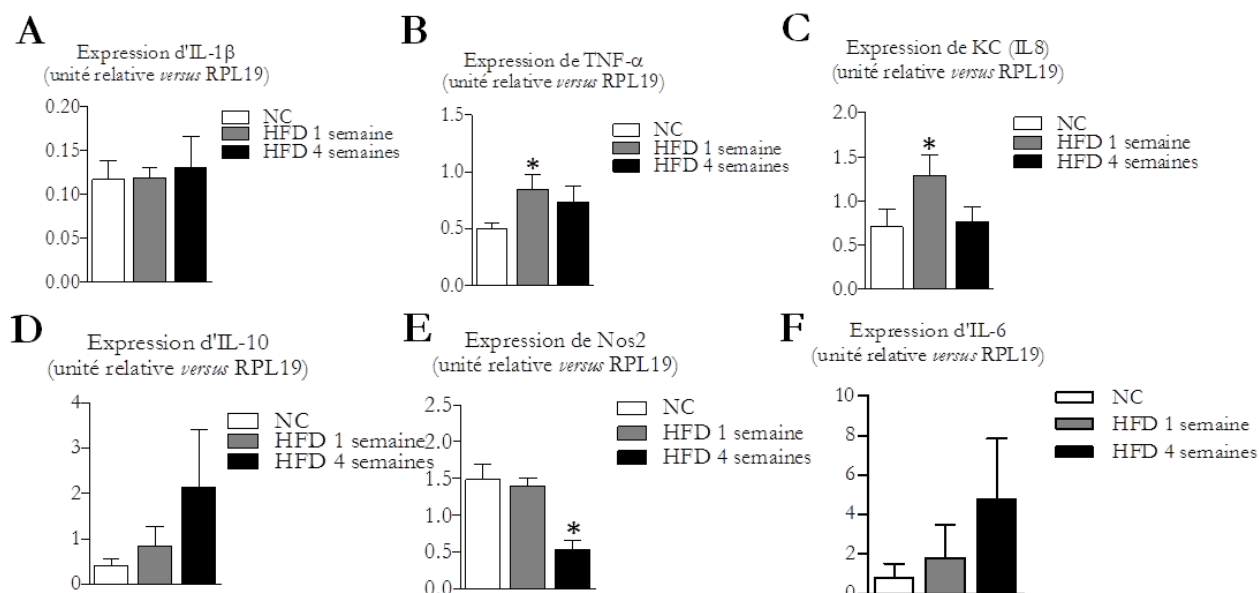


Figure 17 : L'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires est augmentée avant le diabète.

Quantification de l'expression génique de l'IL-1 β (**A**), du TNF- α (**B**), de KC (**C**), de l'IL-10 (**D**), de Nos2 (**E**) et de l'IL-6 (**F**) dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p < 0,05 versus NC)

Néanmoins, une quantification au niveau protéique par ELISA, nous a en fait révélé significativement moins de TNF- α et d'IL-6 dans la muqueuse de l'iléon (**Figure 18**). La quantité d'IL-10 étant en même temps diminuée, nous ne pouvons pas, de plus, attribuer cet effet anti-inflammatoire à une surexpression d'IL-10, suggérant une régulation autre que celle du système immunitaire. La prédominance et la présence accrue de bactéries des genres *Bacteroides* et *Prevotella* dans le microbiote intestinal à l'état pré-diabétique, nous a précédemment suggéré un potentiel plutôt anti-inflammatoire de la flore intestinale dans notre modèle, en raison du caractère anti-inflammatoire du lipide A des LPS des *Bacteroides* et *Prevotella* spp. Une régulation post-transcriptionnelle négative de TNF- α , a d'ailleurs été déjà décrite chez des phagocytes en présence de *Pseudomonas aeruginosa*, dont le LPS contient un lipide A pentacyclé[566]. Par ailleurs,

une voie de régulation négative de la traduction des ARN messagers de TNF- α et IL-6 en réponse aux LPS, a été identifiée. Elle implique la PKC et la fascine, protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette durant les processus de mouvement cellulaire mais aussi d'adhésion et d'invasion virale et bactérienne[567]. De manière intéressante, l'expression de la fascine Fscn3 (fascin homolog 3, actin-bundling protein, testicular) était significativement augmentée sous régime gras dans notre modèle (résultats microarrays).

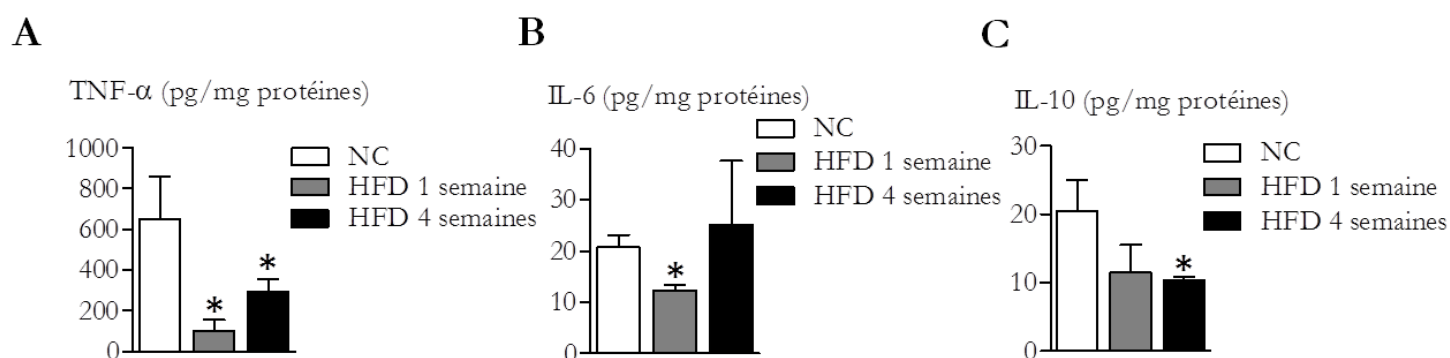


Figure 18 : La muqueuse de l'iléon est moins enflammée avant le diabète et ce n'est pas du à une surexpression d'IL-10.

Quantification de TNF- α (A), IL-6 (B) et IL-10 (C) par ELISA dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 6) (* : p < 0,05 versus NC)

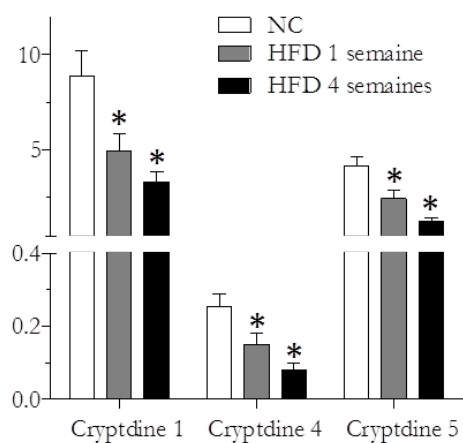
Un contexte moins inflammatoire alors qu'une interaction étroite s'établissait à l'état pré-diabétique entre les bactéries et la muqueuse intestinale dans l'iléon, semblait d'abord contradictoire. Mais l'accroissement de la translocation de bactéries viables à Gram négatif dans le sang et le tissu adipeux que nous avons constaté dans nos premiers travaux[476], suggérait un processus permissif de translocation bactérienne sous l'effet du régime gras, sans réponse défensive de la part de l'hôte. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, le système immunitaire mucosal est tolérant vis-à-vis du microbiote commensal, mais néanmoins, les bactéries ne doivent pas normalement pouvoir atteindre la circulation systémique en raison d'un état de vigilance (inflammation physiologique), qui doit permettre une réponse inflammatoire appropriée pour détruire les bactéries invasives. Tout semble se passer comme si

cette inflammation physiologique n'était plus opérationnelle sous l'effet du régime gras dans notre modèle. Cette hypothèse a par ailleurs été déjà publiée dans un autre contexte. John C. Alverdy a ainsi démontré qu'en conditions de stress et de déficit en nutriments, les bactéries adhèrent à la muqueuse intestinale sans provoquer d'inflammation, afin de pouvoir se nourrir aux dépens de l'hôte[568], la flore commensale adoptant alors un comportement parasite. Un effet anti-inflammatoire médié par la fascine pourrait être l'un des mécanismes par lesquels les bactéries commensales pourraient envahir les cellules épithéliales sans éveiller le système immunitaire de l'hôte.

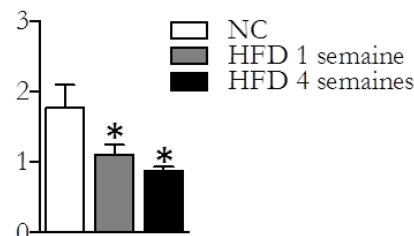
Nous avons ensuite abordé l'un des éléments essentiels du système de défense mucosal vis-à-vis des bactéries : les défensines. En raison du ciblage préférentiel des cellules produisant Muc2 par les bactéries (**Figure 14**), nous avons quantifié par RT-qPCR l'expression génique de défensines alpha (cryptdines) et de Relm β , qui sont produites respectivement par les cellules de Paneth et les cellules caliciformes. Toutes ces molécules étaient légèrement mais significativement sous-exprimées à l'état pré-diabétique (**Figure 19 A et B**). De plus, l'expression de la phospholipase A2 (Pla2g4c) (enzyme antibactérienne produite par les cellules de Paneth) et des défensines beta 37, 39 et 40 (défensines produites par les entérocytes), était largement diminuée à l'état pré-diabétique selon les microarrays (**Figure 19C**). La présence de bactéries en étroite association avec les cellules épithéliales intestinales et même dans la lumière des cryptes à l'état pré-diabétique, pourrait alors s'expliquer par la diminution de toutes les défenses antibactériennes locales. L'augmentation de la perméabilité pourrait ensuite faciliter un passage des bactéries vers les tissus.

A

Expression génique comparative des défensines alpha (cryptdines)
(unité relative *versus* RPL19)

**B**

Expression génique de Relm β
(unité relative *versus* RPL19)

**C**

Nom du gène	HFD1vsNC		HFD4vsNC		HFD4vsHFD1	
	logFC	q.value	logFC	q.value	logFC	q.value
Pla2g4c	-2,90	5,18E-03	-2,75	4,04E-03	0,15	6,06E-01
Defb37	-2,30	6,14E-05	-1,94	1,52E-04	0,37	3,41E-01
Defb40	-2,18	7,31E-06	-1,73	3,52E-05	0,45	1,87E-01
Defb39	-2,11	1,91E-06	-2,01	1,67E-06	0,10	5,24E-01
Retnlb	-1,58	5,45E-03	-1,90	9,11E-04	-0,32	4,44E-01

Figure 19 : L'expression d'agents antibactériens par les entérocytes, les cellules de Paneth et les cellules caliciformes est diminuée avant le diabète.

Quantification de l'expression génique des cryptdines 1, 4 et 5 (A) et de Relm β (resistin-like molecule beta) (B) dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 *versus* NC)

C, Expression différentielle de défensines beta, de la phospholipase A2 (Pla2g4c) et de Retnlb (= Relm β) d'après les résultats des microarrays Agilent.

Afin de visualiser l'inflammation physiologique dans l'iléon, nous avons ensuite effectué un immunomarquage de l'un des principaux facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux agents bactériens : NF- κ B. Nous avons évalué l'activation de la voie pro-inflammatoire médiée par ce facteur de transcription de deux manières différentes. Premièrement, nous avons marqué la forme active de NF- κ B, sous-unité p65 phosphorylée en sérine536 (pNF- κ B), avec un anticorps spécifique. Deuxièmement, nous avons marqué la protéine NF- κ B (sous-unité p65 totale) et évalué son activation en fonction de sa position dans le noyau, par superposition avec la contre-coloration au DAPI. Chez les souris saines, pNF- κ B était visible seulement à l'apex des villosités intestinales dans l'iléon, au niveau des entérocytes majoritairement, alors que les cellules des cryptes ne montraient pas d'immunoréactivité (Figure 20).

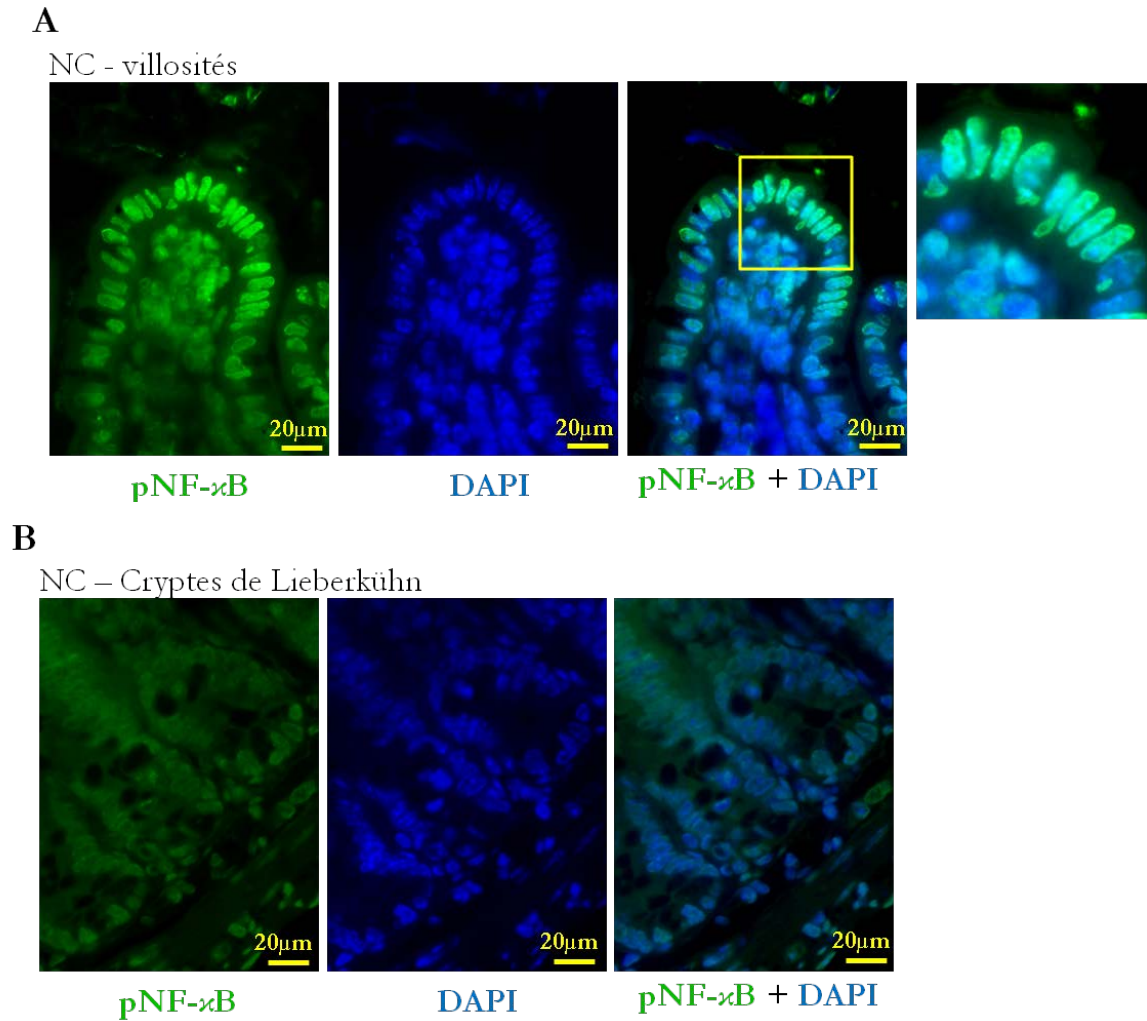


Figure 20 : Chez la souris saine, l'inflammation physiologique concerne les entérocytes et les lymphocytes intra-épithéliaux de l'apex des villosités, et pas les cryptes.

Immunomarquage de pNF- κ B dans l'iléon de souris saines (NC). **A**, Villosités. **B**, Cryptes de Lieberkühn

A l'état pré-diabétique, en opposition avec l'état sain, ce sont les cellules des cryptes principalement qui montraient un marquage positif de pNF- κ B, en position périnucléaire (**Figure 21**). Des cellules de la *lamina propria* environnante et de la sous-muqueuse étaient aussi concernées.

HFD 1 semaine – Cryptes de Lieberkühn

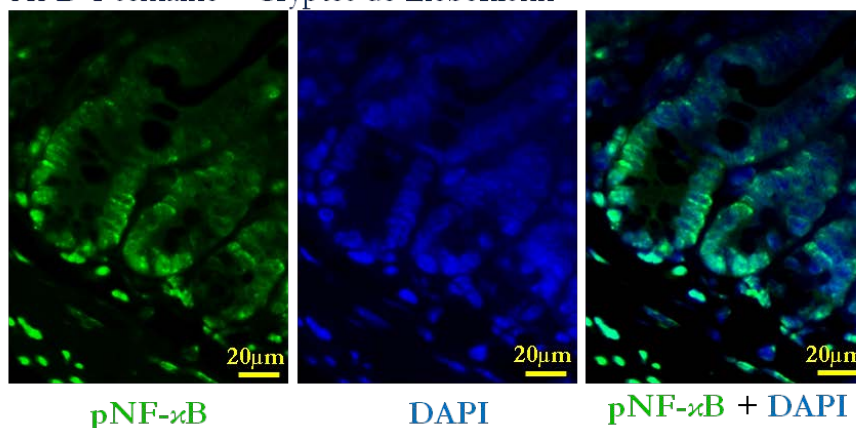


Figure 21 : Chez la souris pré-diabétique, la voie pro-inflammatoire NF- κ B est activée dans les cellules des cryptes.

Immunomarquage de pNF- κ B dans l'iléon de souris pré-diabétiques (HFD 1 semaine)

A l'état diabétique, le marquage de pNF- κ B était peu visible et concernait plutôt des cellules dans la *lamina propria*. Un léger marquage sur le versant basolatéral du noyau des entérocytes était également visible (**Figure 22**).

HFD 4 semaines – Villosités

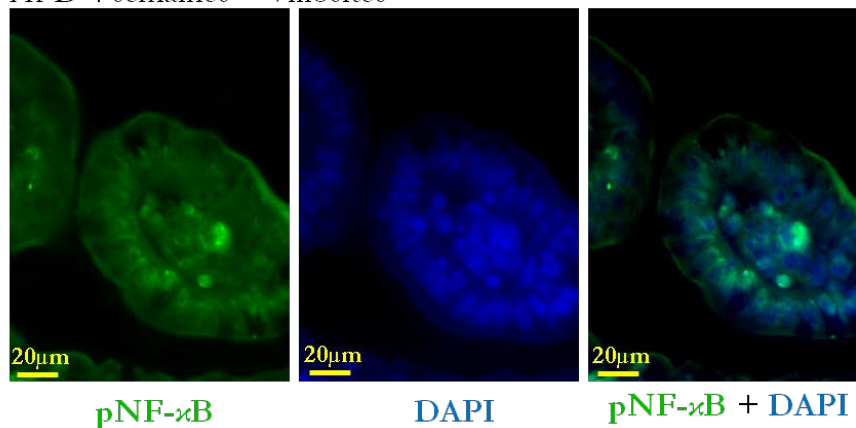


Figure 22 : Chez la souris diabétique, la voie pro-inflammatoire NF- κ B est activée dans des cellules de la *lamina propria* et sur le versant basolatéral des entérocytes.

Immunomarquage de pNF- κ B dans l'iléon de souris diabétiques (HFD 4 semaines)

Le marquage de NF- κ B (p65) a confirmé une activation préférentielle de cette voie dans les cellules de l'apex des villosités, dans l'iléon des souris saines, le marquage de la sous-unité p65 étant colocalisé avec le marquage au DAPI (**Figure 23**). Néanmoins, seule une observation en microscopie confocale pourrait formellement situer le marquage à l'intérieur du noyau.

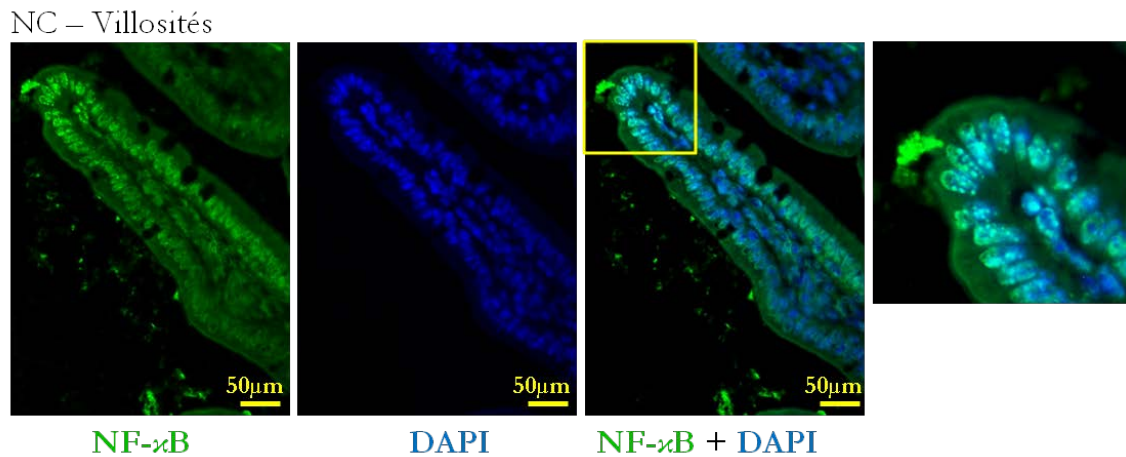


Figure 23 : Chez la souris saine, la localisation nucléaire de NF- κ B confirme une inflammation physiologique concernant les cellules de l'apex des villosités.

Immunomarquage de NF- κ B dans l'iléon de souris saines (NC).

A l'état pré-diabétique, les entérocytes ne présentaient plus d'immunopositivité pour NF- κ B. Celle-ci concernait le noyau de certaines cellules caliciformes ainsi que celui de la cellule sous-jacente dans la *lamina propria*, dans certains cas. Quelques cellules isolées localisées dans la lumière intestinale étaient aussi positives pour le marquage de NF- κ B, sur le même plan que celui de leur noyau (**Figure 24**).

HFD 1 semaine – Villosités

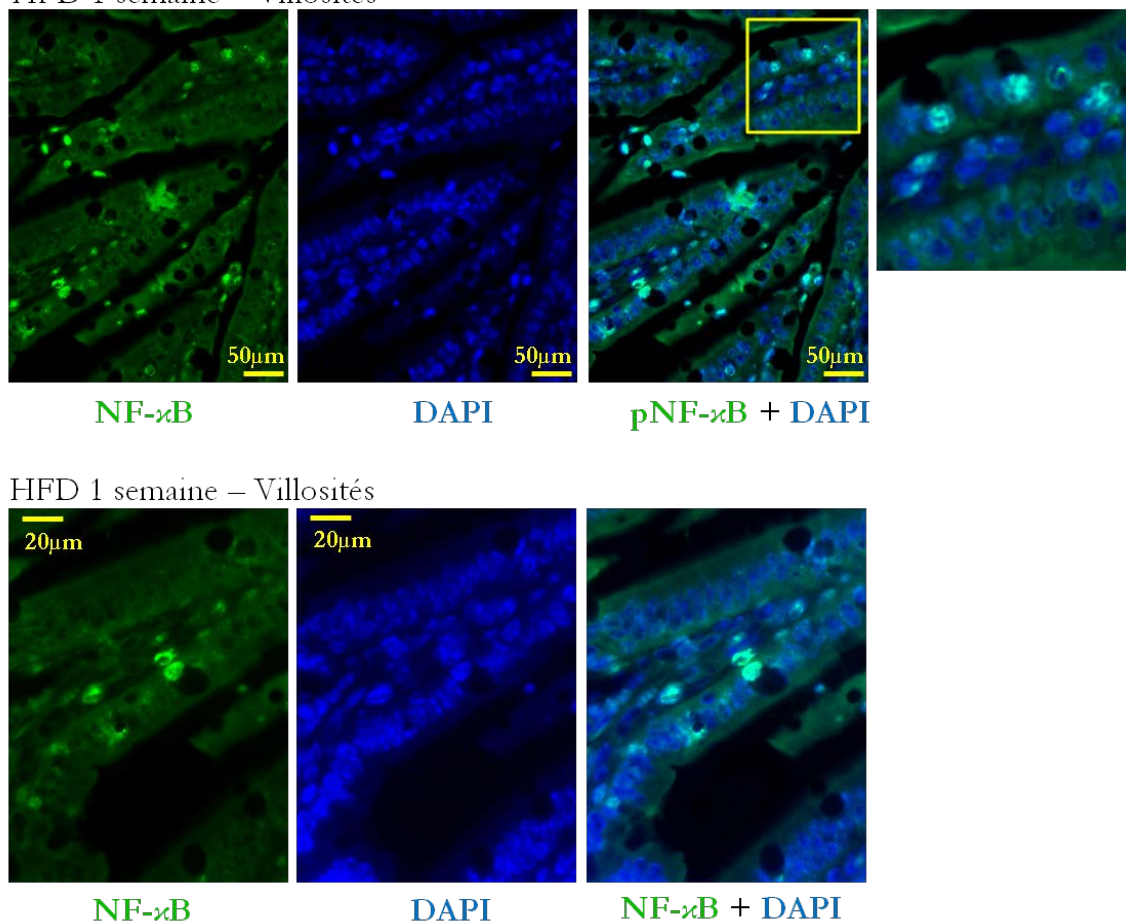


Figure 24 : Chez la souris pré-diabétique, ce ne sont plus les entérocytes qui montrent une activation de NF-κB, mais certaines cellules caliciformes.

Immunomarquage de NF-κB dans l'iléon de souris prédiabétiques (HFD 1 semaine).

Ainsi que nous le suggérons plus haut en discutant la diminution de la quantité de TNF-α et d'IL-6 et de l'expression de diverses défensines dans la muqueuse de l'iléon, la diminution de l'état inflammatoire général semble se confirmer et concerner majoritairement les entérocytes chez les souris nourries de régime gras. De plus, l'histologie nous a permis de visualiser un déplacement de l'activation pro-inflammatoire vers les cellules des cryptes et les cellules caliciformes à l'état pré-diabétique, puis vers la *lamina propria* à l'état diabétique. Ce qui correspond à ce que nous a révélé le marquage des bactéries par FISH, à savoir une association étroite des bactéries avec les cellules caliciformes et les cellules des cryptes à l'état pré-diabétique. Néanmoins, un marquage de NF-κB associé avec la technique FISH n'a pas été réalisé, nous ne pouvons donc pas formellement attribuer l'activation de NF-κB à la présence de bactéries. Nous avons ensuite étudié la composition du microbiote de l'iléon.

La muqueuse de l'iléon est enrichie en bactéries mucolytiques à l'état pré-diabétique

Alors que le microbiote luminal du cæcum était dominé par les phyla *Firmicutes* (groupe *Clostridium coccoides*-*Eubacterium rectale* principalement) et *Bacteroidetes* (*Bacteroides*-*Prevotella* spp. majoritairement), nous avons déterminé dans l'iléon une composition différente, avec la domination des phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria* dans la lumière (Figure 25) et dans la muqueuse (Figure 26).

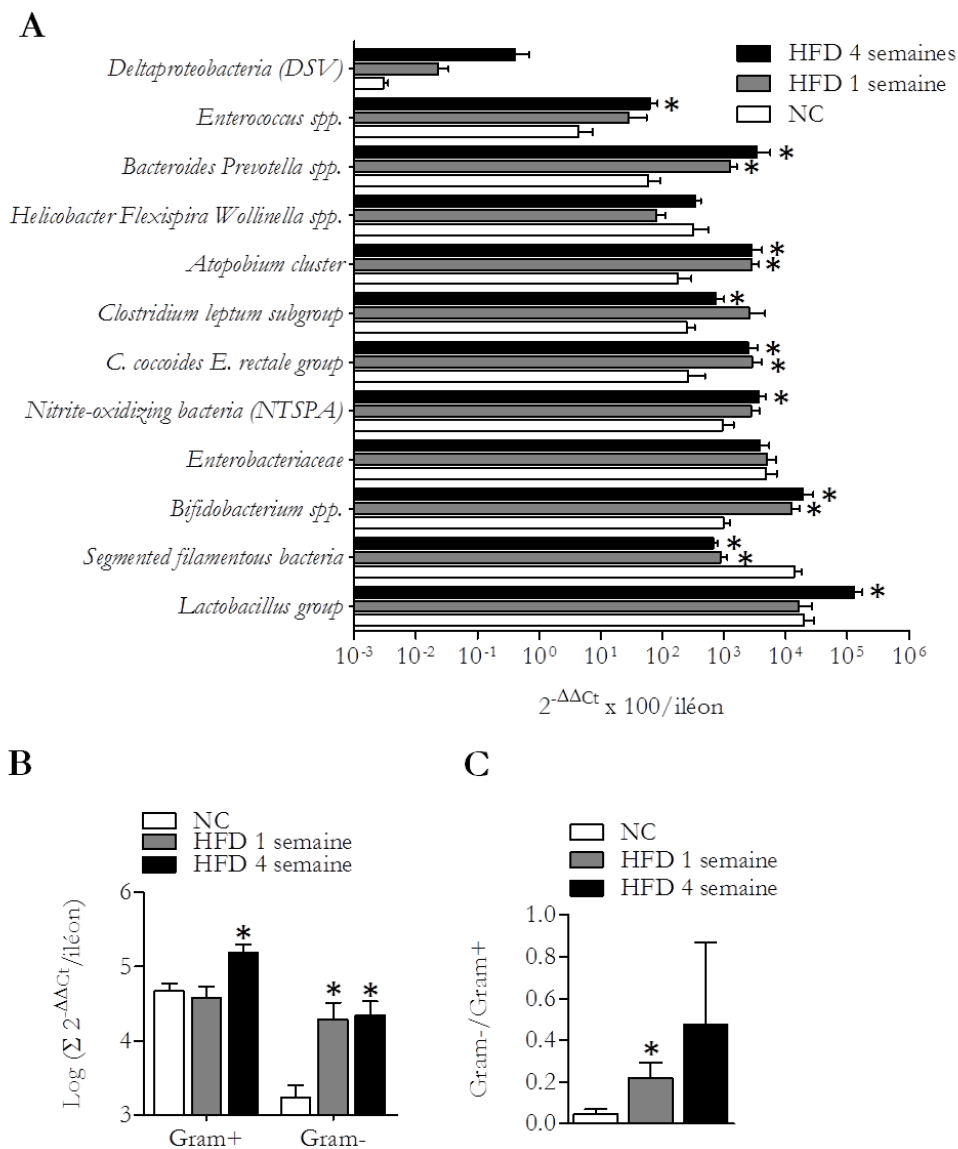


Figure 25 : La structure quantitative du microbiote luminal de l'iléon est modifiée avant le diabète.

A, Quantification des principaux groupes bactériens dans la lumière de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) **B**, Somme des données de la figure **A**. **C**, Ratio bactéries à Gram négatif sur bactéries à Gram positif calculé d'après les données de la figure **B**. (moyenne + esm) (n = 7) (* : p<0,05 versus NC)

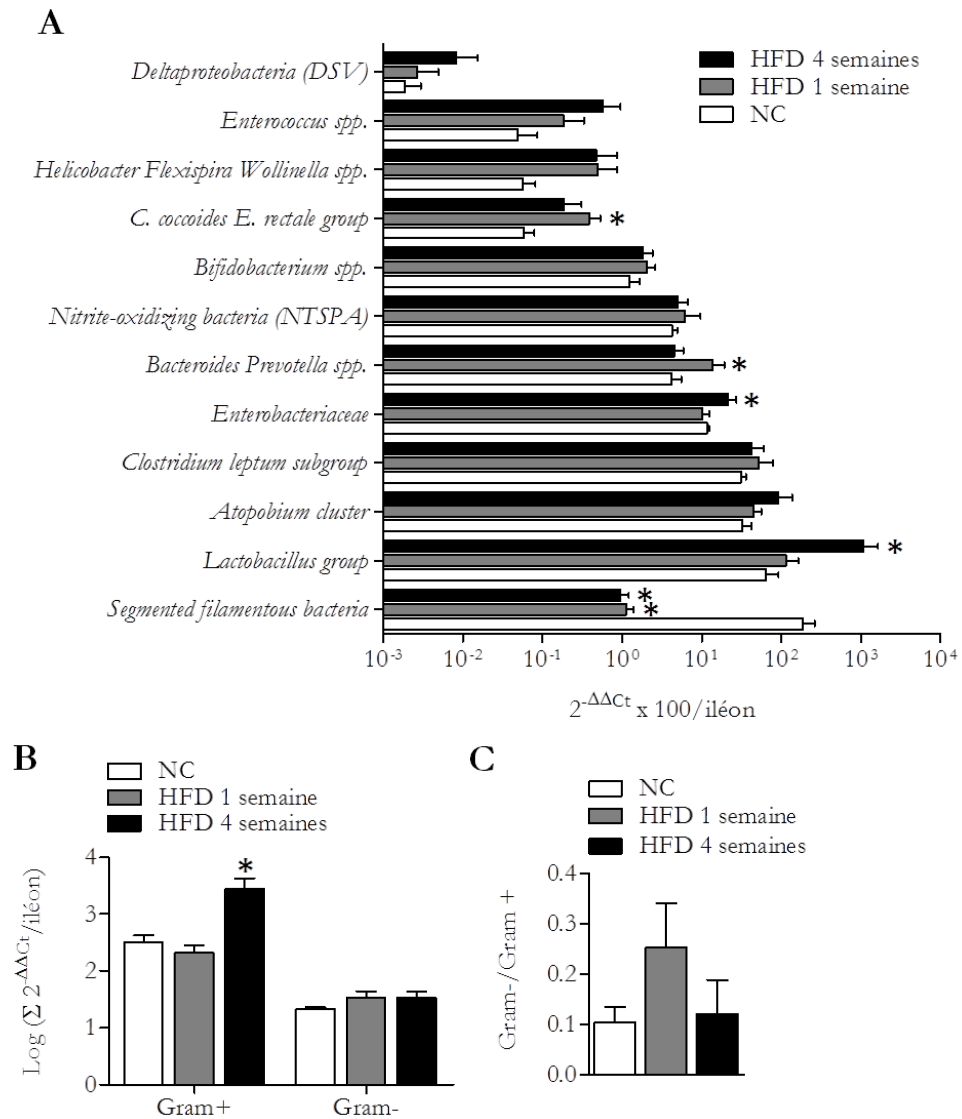


Figure 26 : La structure quantitative du microbiote mucosal de l'iléon est modifiée avant le diabète.

A, Quantification des principaux groupes bactériens dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines) **B**, Somme des données de la figure **A**. **C**, Ratio bactéries à Gram négatif sur bactéries à Gram positif calculé d'après les données de la figure **B**. (moyenne + esm) ($n = 7$) (* : $p < 0,05$ versus NC)

A l'état pré-diabétique, nous avons quantifié dans le microbiote luminal de l'iléon, une diminution des SFB, une augmentation des *Bifidobacterium spp.*, ainsi que du groupe *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* (représenté par les familles *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae*) et du cluster *Atopobium* (représenté par *Atopobium parvulum*, *Colinsella aerofaciens*, *Colinsella intestinalis*, *Colinsella stercoris* et *Eggerthella lenta*). Parmi les groupes à Gram négatif, le

groupe *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* était par contre augmenté à l'état pré-diabétique. Ainsi, la quantité de bactéries à Gram négatif était augmentée à l'état pré-diabétique sans modification globale de la quantité de bactéries à Gram positif, ce qui s'est traduit par un ratio Gram négatif/Gram positif augmenté significativement à l'état pré-diabétique (**Figure 25 B et C**). A l'état diabétique, le microbiote luminal de l'iléon était par contre toujours déplété en SFB, plus riche en bactéries du groupe *Lactobacillus* (représenté par les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* principalement), du genre *Bifidobacterium*, du groupe *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*, du groupe *Clostridium leptum* (représenté par *Faecalibacterium praunitzii*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii* et *Ruminococcus callidus*), du cluster *Atopobium* et du genre *Enterococcus*. Parmi les groupes bactériens à Gram négatif, le groupe *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* était toujours augmenté ainsi que les « nitrite-oxidizing bacteria » (genre *Nitrospira*). Ainsi, en raison de la prédominance du groupe *Lactobacillus*, le ratio Gram négatif/Gram positif n'était pas modifié à l'état diabétique dans la lumière de l'iléon (**Figure 25 B et C**).

Au niveau du microbiote associé à la muqueuse de l'iléon, nous avons quantifié 100 fois moins de SFB à l'état pré-diabétique et diabétique alors que le groupe *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* (représenté par les familles *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae*) était augmenté seulement à l'état pré-diabétique. De plus, le groupe *Lactobacillus* était très augmenté à l'état diabétique, pour devenir largement prédominant. Pour ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, le groupe *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* était spécifiquement augmenté à l'état pré-diabétique, son importance rejoignant ensuite celle constatée sous régime normal, à l'état diabétique. La famille des *Enterobacteriaceae* était quant à elle augmentée seulement à l'état diabétique. Le ratio Gram négatif/Gram positif n'était pas modifié significativement bien qu'une tendance à l'augmentation était constatée à l'état pré-diabétique (**Figure 26 B et C**).

Nous avons tout d'abord été étonnés de l'importance du groupe *Lactobacillus* dans l'iléon et de son augmentation à l'état diabétique. Un enrichissement en *Lactobacillus* spp. a déjà été rapporté dans le microbiote associé à la muqueuse intestinale[559]. Par ailleurs, les *Lactobacillus* spp. atténuent l'inflammation induite par les LPS en inhibant la dégradation d'I κ B α (protéine inhibitrice de NF- κ B) et empêchant ainsi la translocation de NF- κ B dans le noyau[569]. Il n'est donc pas impossible que l'effet anti-inflammatoire de ces bactéries, qui leur vaut d'être utilisées par ailleurs comme probiotiques, puissent en fait contribuer à la diminution de l'inflammation physiologique dans notre modèle. Néanmoins, l'augmentation du groupe *Lactobacillus* n'a été constatée qu'à l'état diabétique et ne peut donc pas contribuer à l'initiation de la pathologie. On ne peut néanmoins pas exclure la possibilité que les *Lactobacillus* spp. puissent ensuite contribuer à

l'entretien d'un déficit de vigilance immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction bibliographique, les *Lactobacillus* spp. sont utilisées dans l'industrie de l'élevage pour leur efficacité énergétique élevée[460, 461] et sont associées à une prise de poids chez l'homme[462-464].

Pour ce qui concerne l'état pré-diabétique, nous avons observé une augmentation spécifique des groupes *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* et *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*. Ces groupes bactériens comprennent des organismes capables de dégrader les mucines, comme le genre *Bacteroides* et les familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococceae*[570, 571]. Néanmoins une implication formelle de ces bactéries dans la diminution de la quantité de mucus ne peut pas être prouvée ici. Il serait nécessaire de mesurer spécifiquement l'expression et l'activité des différentes enzymes bactériennes responsables (protéases, sialidases, exoglycosydases...).

Néanmoins, nous avons confirmé ces résultats avec de nouveaux groupes de souris et avec une technique d'analyse différente de la diversité bactérienne (puces PhyloChip). Une modification qualitative significative, plus importante à l'état pré-diabétique, a ainsi été démontrée avec la technique PhyloChip (**Figure 27**). Cette technique a permis de confirmer également l'importance des phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria*, représentant respectivement 37,4% et 35,4% des séquences. Une augmentation des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* à l'état pré-diabétique a été confirmée, avec de plus une augmentation des phyla *Verrucomicrobia* et *Cyanobacteria* (**Figure 28**). Ces augmentations étaient attribuables aux familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* (*Firmicutes*), à la classe *Bacteroidia* (*Bacteroidetes*), alors que le phylum *Verrucomicrobia* comprend par ailleurs la bactérie mucolytique *Akkermansia muciniphila*.

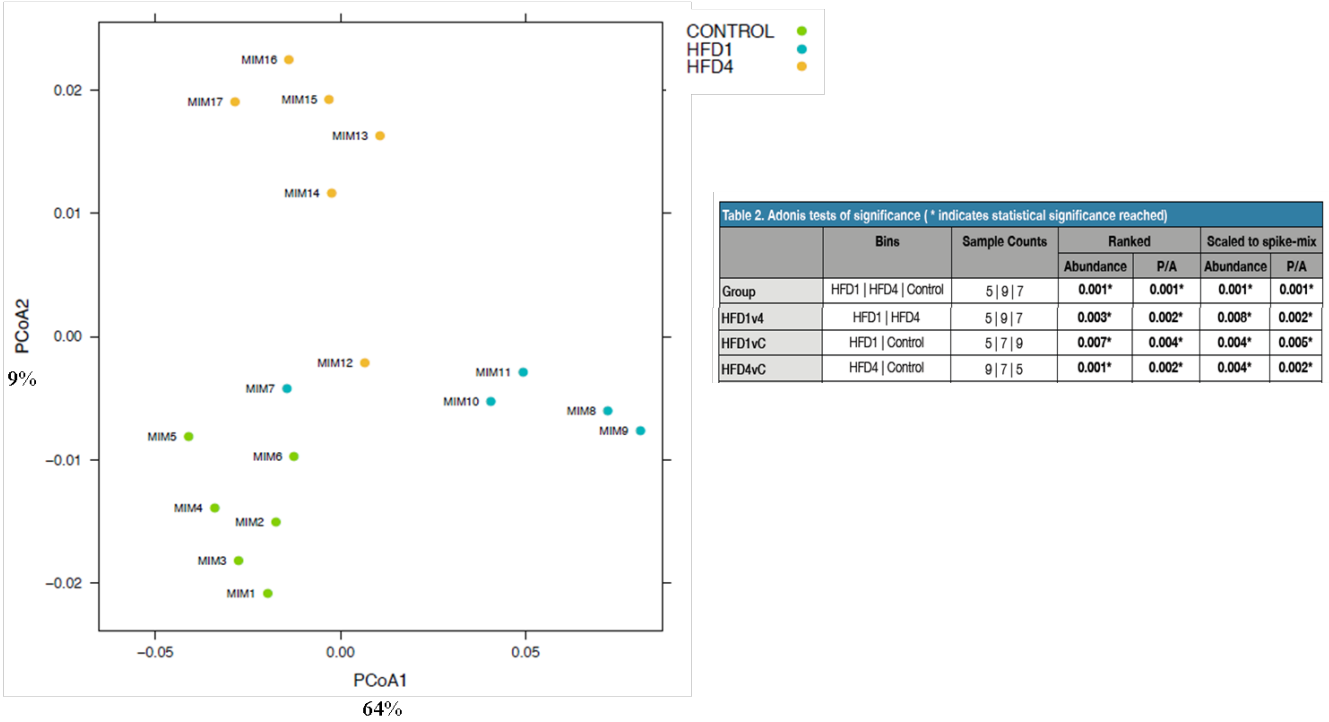


Figure 27 : La technique PhyloChip révèle également une modification de la structure qualitative du microbiote mucosal de l'iléon, plus importante avant le diabète.

Analyse en coordonnées principales des distances Unifrac pondérées entre les différentes communautés bactériennes identifiées par PhyloChip dans la muqueuse d'iléon de souris saines (control, points verts), pré-diabétiques (HFD1, points bleus) et diabétiques (HFD4, points oranges).

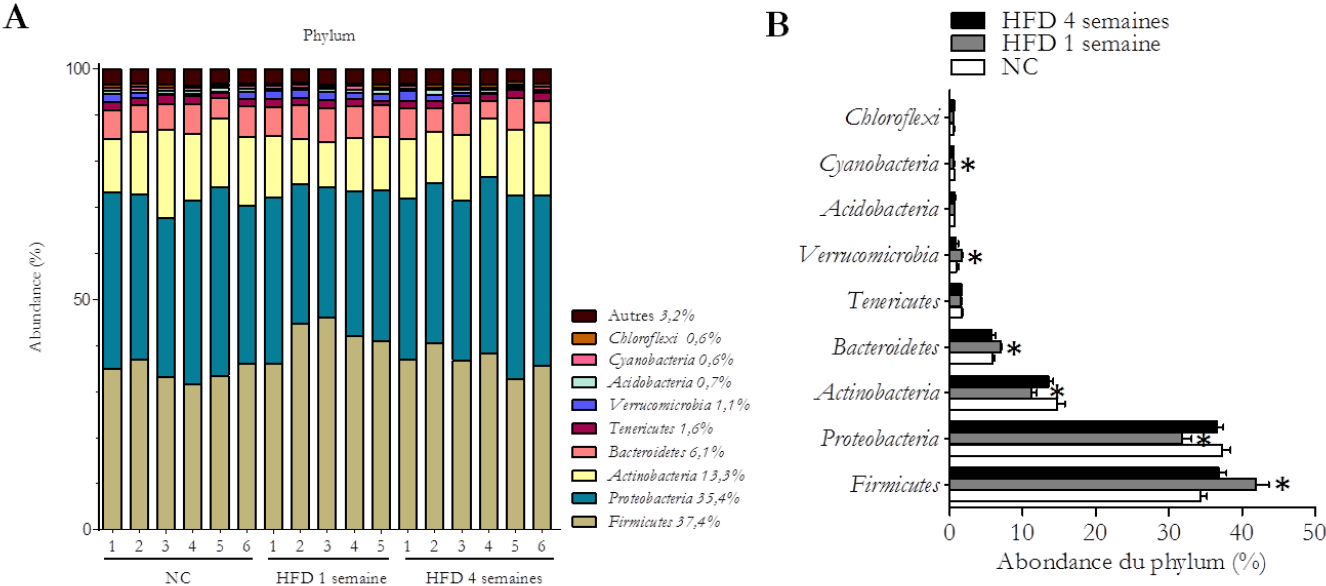


Figure 28 : Le microbiote mucosal est dominé par les phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria*.

Répartition qualitative des phyla identifiés par la technique PhyloChip dans la muqueuse de l'iléon de souris saines (NC), pré-diabétiques (HFD 1 semaine) et diabétiques (HFD 4 semaines). **A**, Valeurs individuelles. **B**, Valeurs moyennes (+esm) (* : p < 0,05 versus NC)

Interaction entre le microbiote et l'expression génique de l'hôte

Nous avons ensuite tenté de corrélérer la composition du microbiote mucosal de l'iléon avec l'expression des gènes de l'hôte. Dans un premier temps une analyse de corrélation a été réalisée avec limma (linear models for multiarray data) sur les données microarrays et les données qualitatives PhyloChip. Sur 31815 taxa identifiés par la technique PhyloChip, 828 corrélaient avec les 76 gènes sélectionnés. L'ensemble des variables sont représentées dans la **figure 29**. Parmi ces 828 taxa corrélés, 85% appartenaient au phylum *Firmicutes* (famille *Lachnospiraceae* principalement), 7,85% appartenaient au phylum *Bacteroidetes* et 3,1% appartenaient au phylum *Proteobacteria*. Ainsi, bien que les phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria* composaient en majorité ce microbiote, c'est le phylum *Firmicutes* qui était le plus corrélé au transcriptome de l'hôte. Néanmoins, le critère de sélection des 76 gènes était relativement restrictif puisque seuls ceux ayant un LogFC compris entre -0,8 et 0,8 pour toutes les comparaisons (HFD1 vs NC, HFD4 vs NC et HFD4 vs HFD1) avaient été retenus.

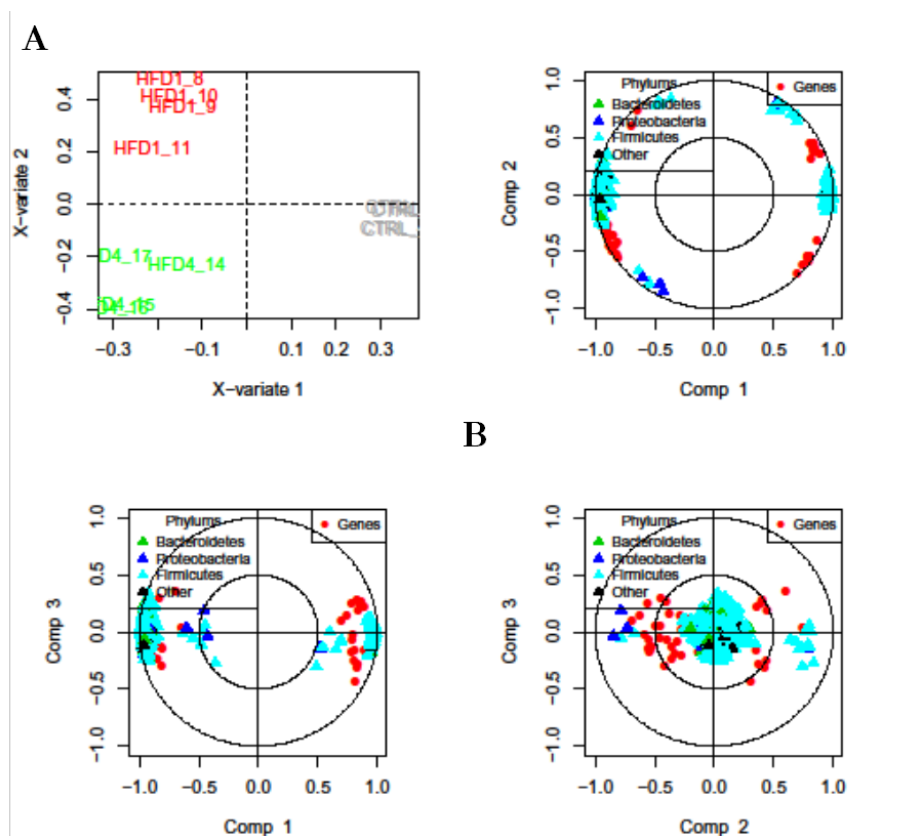


Figure 29 : Corrélation des gènes (microarrays) avec la diversité bactérienne (PhyloChip).

Analyse limma (linear models for multiarray data) sur 76 gènes et 828 OTU. La sélection des 76 gènes repose sur $[\text{LogFC}] > 0,8$ pour les 3 comparaisons (HFD 1 semaine versus NC, HFD 4 semaines versus NC, HFD 4 semaines versus HFD 1 semaine) et $p < 0,05$. **A**, Discrimination des individus suivant les composantes. **B**, Discrimination des variables suivant les composantes.

Une seconde analyse a ensuite retenu un plus grand nombre de gènes, en appliquant comme critère de sélection un LogFC compris entre -1 et 1 pour au moins une des 3 comparaisons. Les variables ainsi que la répartition des individus en fonction des variables sont représentées dans la **figure 30**.

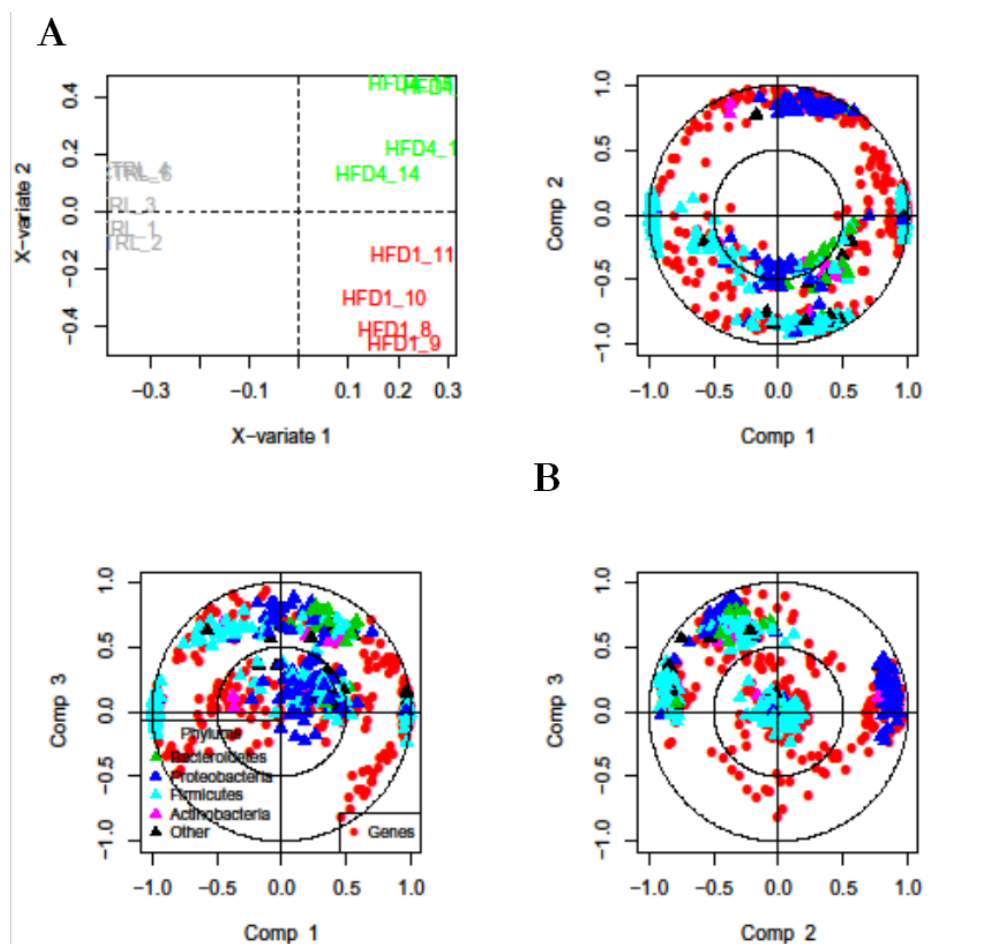


Figure 30 : Corrélation des gènes (microarrays) avec la diversité bactérienne (PhyloChip).

Analyse limma (linear models for multiarray data) en composantes principales des différentes variables (100 gènes et 100 OTU par composante) présélectionnées par spls (sparse partial least square regression). La sélection des 100 gènes repose sur $|\text{LogFC}| > 1$ pour au moins une des 3 comparaisons (HFD 1 semaine versus NC, HFD 4 semaines versus NC, HFD 4 semaines versus HFD 1 semaine) et $p < 0,05$. **A**, Discrimination des individus suivant les composantes. **B**, Discrimination des variables suivant les composantes.

L'effet du régime gras, porté sur la composante 1, était corrélé majoritairement avec le phylum *Firmicutes*, alors que la composante 2 permettait de discriminer les souris entre l'état pré-diabétique et diabétique, avec le phylum *Proteobacteria* corrélé positivement avec l'état diabétique et le phylum *Firmicutes* corrélé négativement (**Figure 30**). Bien que les données PhyloChip soient

qualitatives, nous avons également constaté par qPCR une augmentation de la quantité d'*Enterobacteriaceae* (phylum *Proteobacteria*) spécifiquement à l'état diabétique (**Figure 26**).

Afin de pouvoir mieux comprendre les fonctions de l'hôte qui sont altérées à l'état pré-diabétique, nous avons soumis l'ensemble des gènes corrélés avec l'effet du régime gras à une analyse avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis, en entrant les LogFC constatés entre l'état pré-diabétique et l'état sain. Quelques résultats de cette analyse sont présentés dans la **figure 31**. Le résultat le plus marquant de cette analyse est la prédiction de l'activation du facteur de transcription PPAR α . La diminution de l'état de vigilance (inflammation physiologique) spécifiquement dans les entérocytes pourrait en fait être due à l'activation de PPAR α par divers ligands issus du régime gras, qui conduit à l'inactivation de NF- κ B[572]. Les cellules caliciformes et les cellules au fond des cryptes garderaient leur potentiel d'activation de NF- κ B, car elles ont plutôt des fonctions sécrétrices et ne seraient pas concernées par une activation de PPAR α . Les ligands endogènes de PPAR α sont des acides gras poly-insaturés comme l'acide linoléique, l'acide dodécahexanoïque (DHA) et l'acide éicosapentanoïque (EPA)[573] et sont présents dans le régime gras utilisé, notamment l'acide linoléique dans l'huile de maïs.

Facteur de transcription PPAR α			
A			
Genes in dataset	Prediction (based on expression direction)	Log Ratio	Findings
PEX11A	Activated	1,962	Upregulates
PDK4	Activated	7,671	Upregulates
HMGCS2	Activated	5,730	Upregulates
FDFT1	Activated	-1,208	Downregulates
FABP1	Activated	4,219	Upregulates
CPT2	Activated	1,001	Upregulates
Acot1	Activated	6,331	Upregulates
ACADVL	Activated	1,184	Upregulates
ACADL	Activated	1,560	Upregulates

B			
Name	p-value	Ratio	
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	5,99E-04	6/230 (0,026)	
Fatty Acid Metabolism	1,73E-03	4/113 (0,035)	
Cholesterol Biosynthesis	2,63E-03	2/16 (0,125)	
Reversible Glomerulonephritis Biomarker Panel (Rat)	5,65E-03	2/25 (0,08)	
Mechanism of Gene Regulation by Peroxisome Proliferators via PPAR α	1,08E-02	3/94 (0,032)	

Figure 31 : Analyse des 100 gènes corrélés avec l'effet du régime gras (composante 1) avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis.

A, Gènes prédisant l'activation de PPAR α (HFD 1 semaine versus NC). **B**, Voies significativement modifiées (HFD 1 semaine versus NC).

Les microarrays étant semi-quantitatifs, nous avons ensuite effectué des analyses de corrélation sur un nombre plus restreint de données acquises par RT-qPCR. Dans un premier temps, nous avons croisé ces données d'expression dans la muqueuse de l'iléon avec le poids, la glycémie à jeun et l'intolérance au glucose des souris. De manière intéressante, la glycémie à jeun était corrélée positivement avec l'expression d'IL-10 et négativement avec l'expression de Nos2 (**Figure 32**). Ce résultat confirme l'importance du maintien d'une inflammation physiologique au niveau de l'intestin dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Pour ce qui concerne l'intolérance au glucose, caractéristique de l'état pré-diabétique, elle était corrélée négativement avec l'expression des cryptdines 1 et 4. Par ailleurs, plusieurs glycosyltransférases impliquées dans l'initiation des O-glycosylations ainsi que la sialyltransférase St6GalNac2, étaient corrélées positivement en expression avec l'intolérance au glucose, alors que l'expression de l'enzyme Gcnt1, responsable du branchement de glycanes neutres, était corrélée négativement avec l'intolérance au glucose. Les modifications qualitatives des glycosylations des mucines semblent ainsi avoir un rôle dans l'initiation des désordres métaboliques. Il est par ailleurs notable que l'expression des cryptdines 1 et 4 était corrélée négativement avec la glycémie à jeun mais également avec l'intolérance au glucose, ce qui positionne la perte des défenses antimicrobiennes dans les cryptes comme un élément clé du processus d'initiation et de maintien des désordres métaboliques induits par un régime gras.

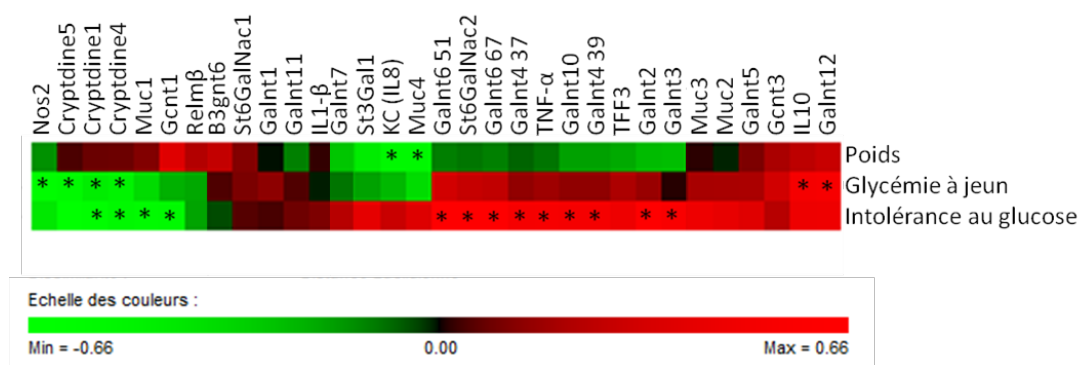


Figure 32 : Corrélations entre le métabolisme (poids, glycémie à jeun, intolérance au glucose) et l'expression de gènes dans la muqueuse de l'iléon (RT-qPCR).

Matrice des coefficients de corrélation de Pearson sériée avec le logiciel PermutMatrix (n = 17)

(* : corrélation significative avec $p < 0,05$)

Nous avons ensuite corrélié ces mêmes données de RT-qPCR avec la composition du microbiote déterminée par la technique PhyloChip. De manière intéressante, l'intolérance au glucose était corrélée positivement avec le phylum *Firmicutes* et plus particulièrement avec les familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* (**Figures 33 et 34**). Ces résultats confirment ainsi l'importance du phylum *Firmicutes* et des bactéries mucolytiques appartenant aux familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* dans l'interaction hôte-microbiote au cours du développement de la résistance à l'insuline. L'expression de la glycosyltransférase Galnt3, qui était corrélée positivement avec l'intolérance au glucose (**Figure 32**), était aussi corrélée positivement avec les familles mucolytiques *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*.

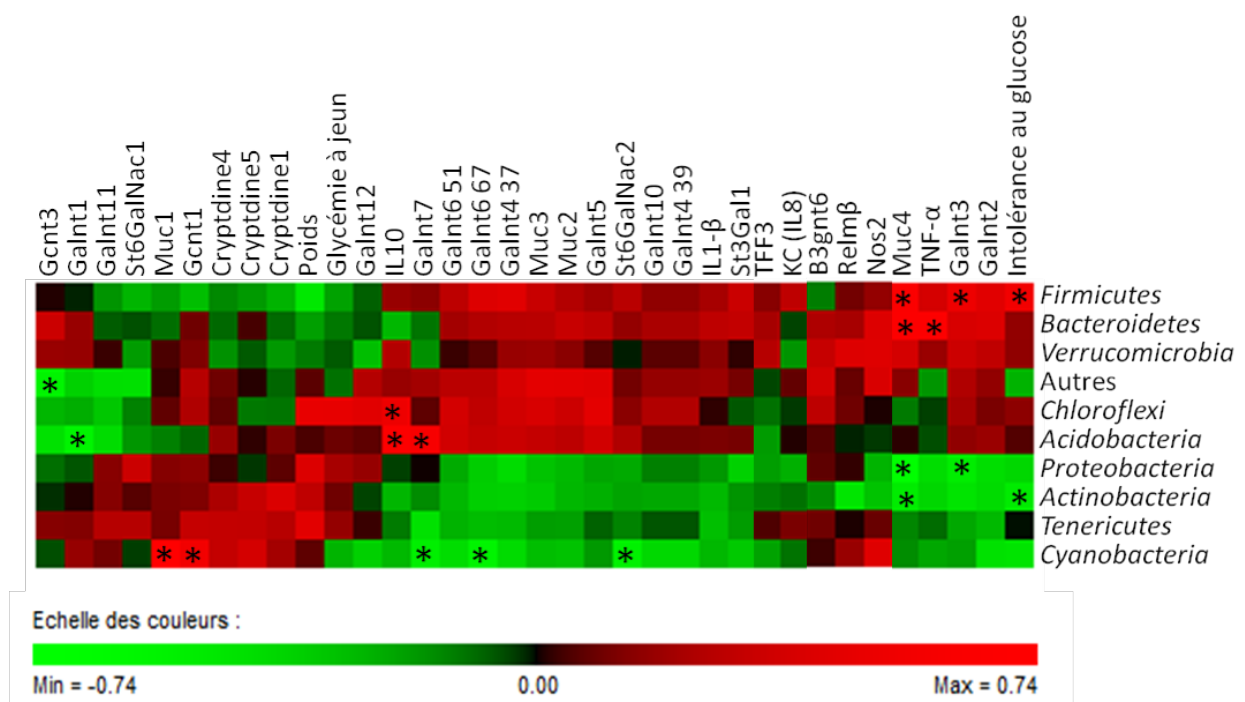


Figure 33 : Corrélations entre les phyla bactériens (PhyloChip), le métabolisme (poids, glycémie à jeun, intolérance au glucose) et l'expression de gènes dans la muqueuse de l'iléon (RT-qPCR).

Matrice des coefficients de corrélation de Pearson sériée avec le logiciel PermutMatrix (n = 17)

(* : corrélation significative avec $p < 0,05$)

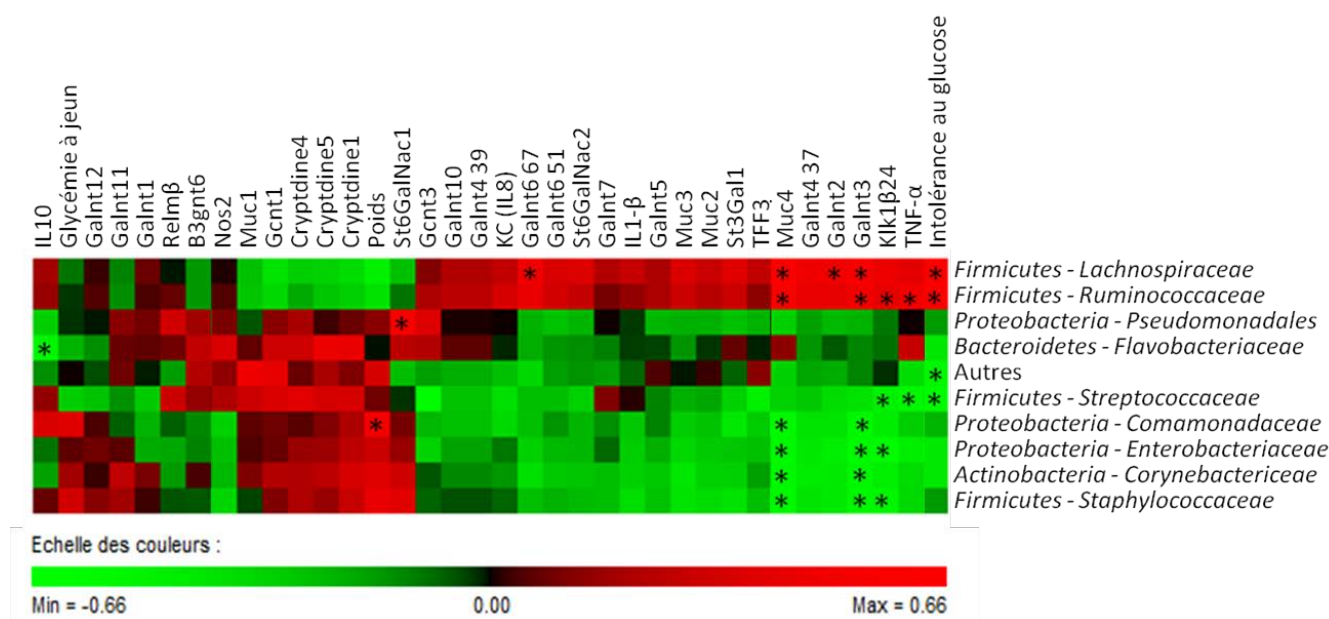


Figure 34 : Corrélations entre les familles bactériennes (PhyloChip), le métabolisme (poids, glycémie à jeun, intolérance au glucose) et l'expression de gènes dans la muqueuse de l'iléon (RT-qPCR).

Matrice des coefficients de corrélation de Pearson sériée avec le logiciel PermutMatrix (n = 17) (* : corrélation significative avec p < 0,05)

Néanmoins, ces corrélations ont été réalisées avec les données de composition bactérienne acquises par la technique PhyloChip, qui sont des données qualitatives. C'est pourquoi nous avons ensuite corréler des données d'expression de gènes obtenues par RT-qPCR sur un autre groupe de souris avec des données de composition du microbiote acquises par qPCR. L'expression de la glycosyltransférase Galnt4 39, qui était corrélée positivement avec l'intolérance au glucose (**Figure 32**), était également corrélée positivement avec le groupe *Lactobacillus* (**Figure 35**). La glycémie à jeun était également corrélée positivement avec le groupe *Lactobacillus*. Mais par ailleurs, le groupe *Lactobacillus* était aussi corrélé positivement avec l'expression de la cryptdine 1. Des analyses complémentaires s'avèrent nécessaires pour clarifier le rôle ambigu de ce groupe. Par contre, l'expression des cryptdines 1, 4 et 5 était corrélée positivement avec la quantité de SFB. La déplétion importante en SFB dans la muqueuse de l'iléon à l'état pré-diabétique, pourrait ainsi être responsable de la diminution d'expression des défensines alpha. Néanmoins, les SFB sont très dépendants de l'hôte pour la fourniture de nutriments essentiels[574]. La carence en hydrates de carbone du régime gras que nous avons utilisé, a pu avoir un impact négatif sur les entérocytes qui dépendent beaucoup de la présence de butyrate pour leur métabolisme, et par

voie de conséquence la population de SFB a pu aussi être affectée, sans que la disparition de celle-ci soit forcément la cause de la diminution de l'expression des cryptdines.

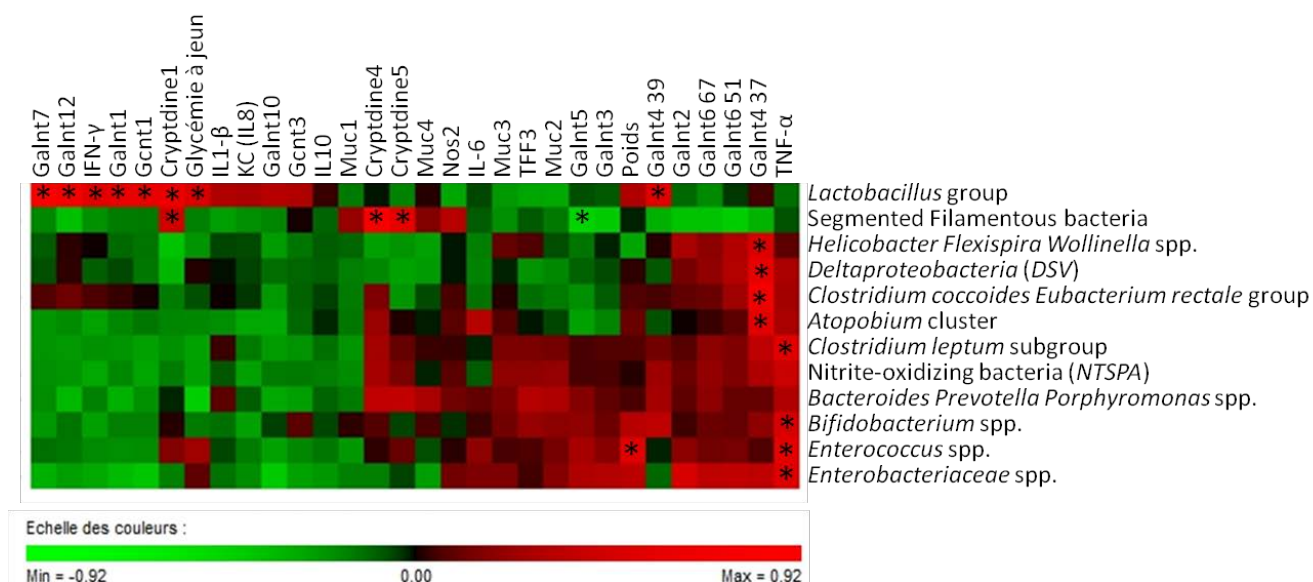


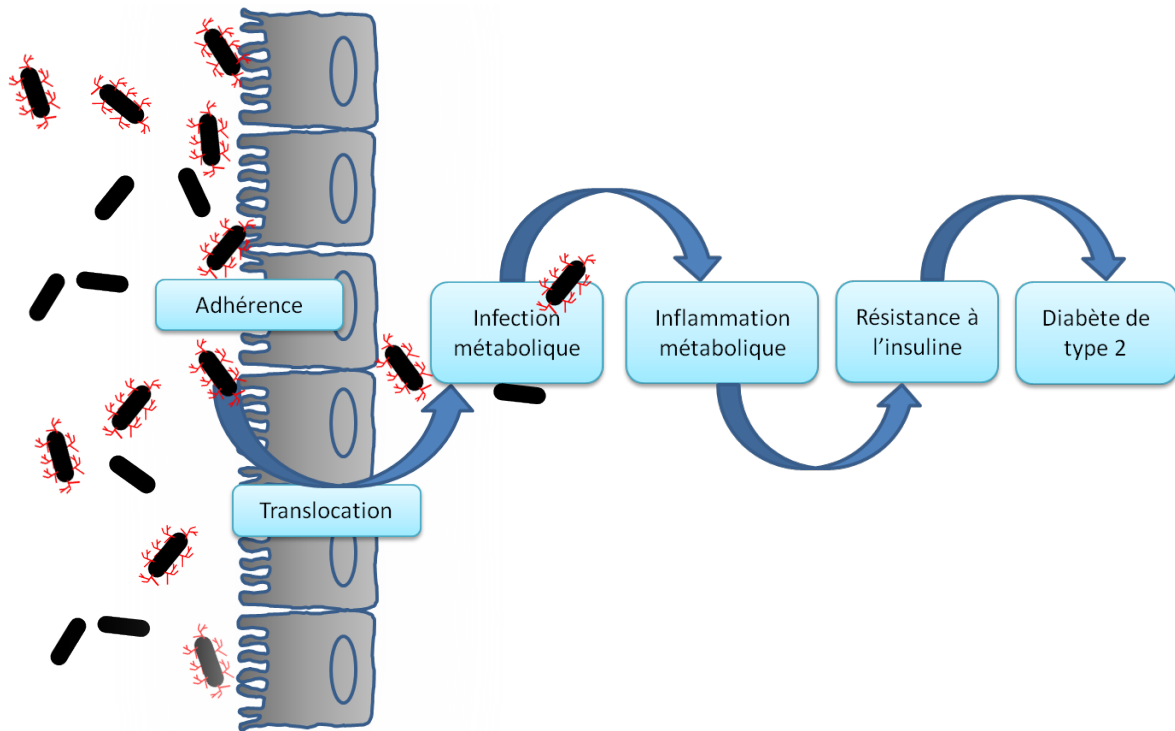
Figure 35 : Corrélations entre les groupes bactériens (qPCR), le métabolisme (poids, glycémie à jeun, intolérance au glucose) et l'expression de gènes déterminée par RT-qPCR.

Matrice des coefficients de corrélation de Pearson sériée avec le logiciel PermutMatrix (n = 21) (* : corrélation significative avec p < 0,05)

La diminution de l'inflammation physiologique spécifiquement dans les entérocytes nous laisse suggérer que l'activation de PPAR α pourrait contribuer majoritairement à la baisse des défenses antibactériennes dans la muqueuse de l'iléon. Les bactéries mucolytiques peuvent alors utiliser les glycosylations des mucines sans provoquer de réponse qui viserait à les détruire. Ce comportement de parasitisme métabolique peut conduire ainsi à l'augmentation de la présence de bactéries dans les tissus, où une inflammation métabolique chronique peut alors engendrer une résistance à l'insuline et un diabète de type 2.

Conclusion générale

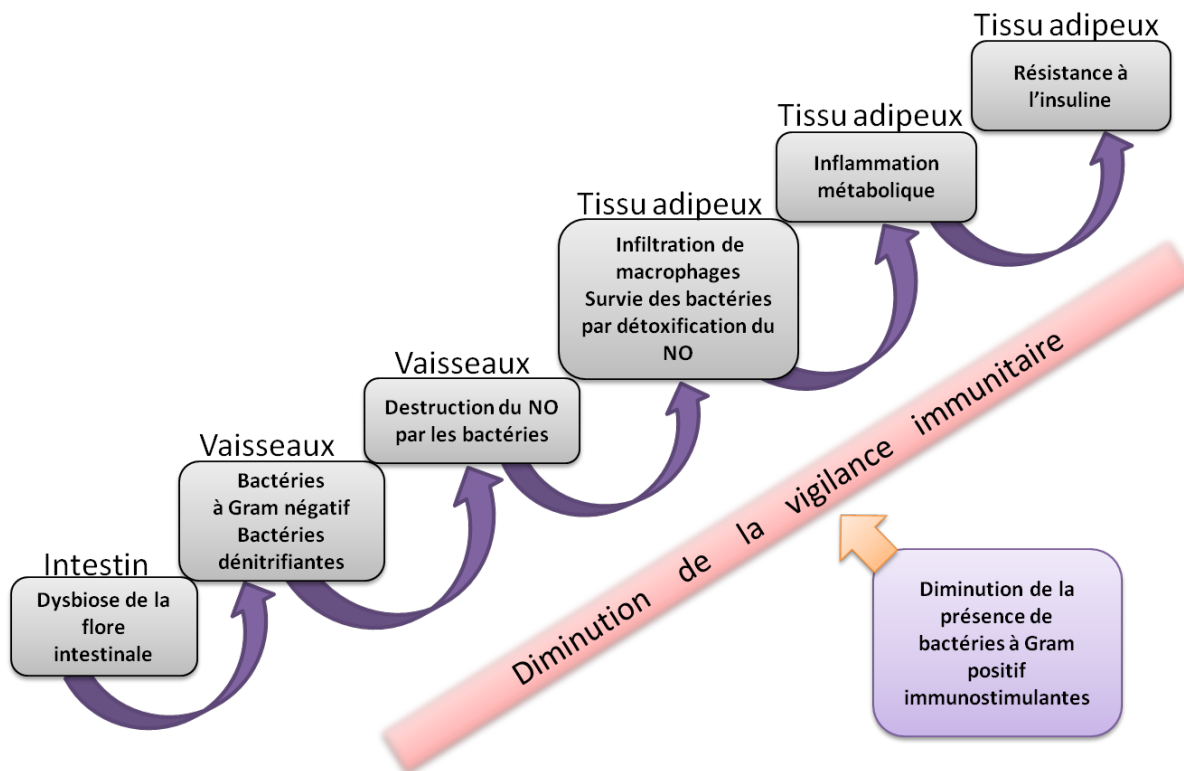
Les résultats présentés dans le premier article sont synthétisés dans le schéma ci-dessous. Nous avons mis en évidence sous régime gras chez la souris, une augmentation de l'adhérence des bactéries à la muqueuse intestinale, ainsi qu'une augmentation de la translocation de bactéries vers le sang et le tissu adipeux, où une inflammation métabolique peut conduire ensuite à une résistance à l'insuline locale puis systémique, prédisposant au développement du diabète de type 2.



Article 1 : Adhérence et translocation bactériennes au cours du diabète.

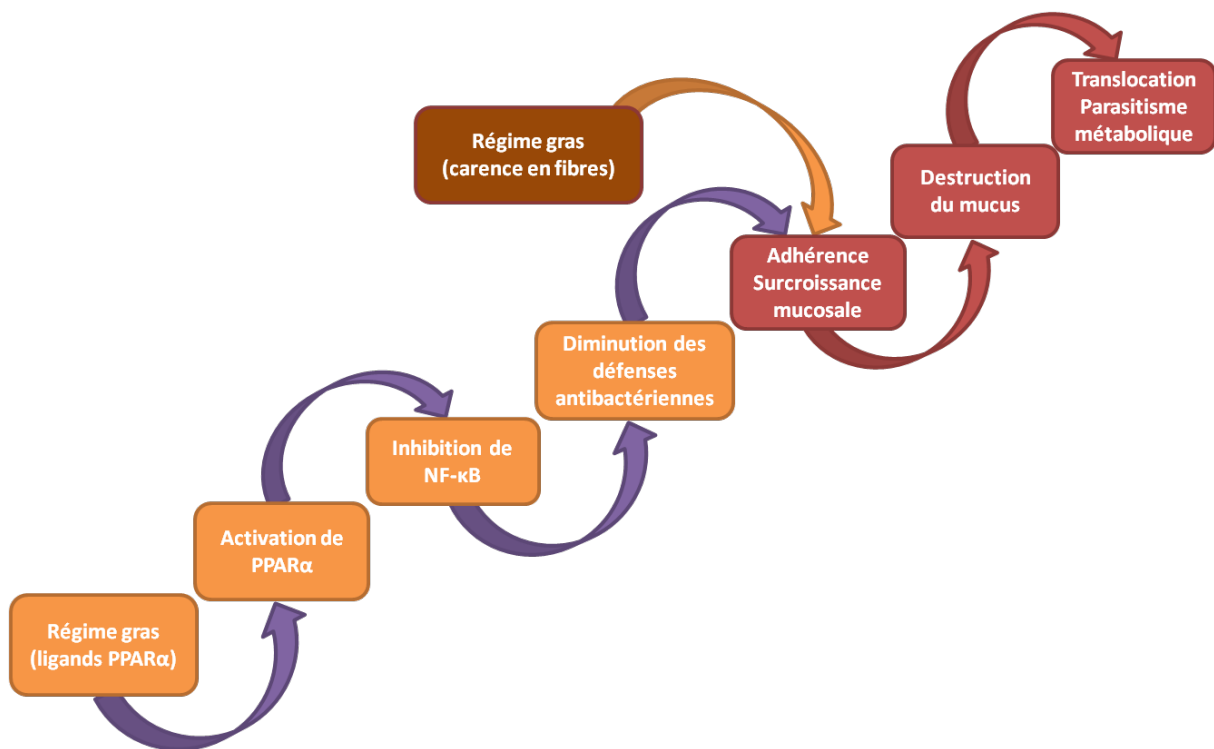
Dans le second article nous avons plus particulièrement décrit la composition du microbiote sanguin et tissulaire découverts précédemment. Les principales conclusions et hypothèses émanant de ce travail sont proposées dans le schéma ci-après. Dans la mesure où nous avons détecté en premier une inflammation métabolique dans le sang à l'état pré-diabétique, nous proposons l'hypothèse selon laquelle des bactéries dénitrifiantes pourraient altérer l'homéostasie de l'endothélium vasculaire très précocement. Nous avons en effet constaté sous régime gras chez la souris, une augmentation de la présence de bactéries dénitrifiantes dans les tissus. Les bactéries étant disséminées par les vaisseaux, nous proposons que l'activité de réductases du NO

de ces bactéries pourrait contribuer à la destruction du NO endothélial, ce qui aurait pour conséquence une susceptibilité accrue des tissus irrigués, dont le tissu adipeux, vis-à-vis d'une infiltration de cellules immunitaires. De plus, une activité de détoxification du NO par les bactéries constituerait pour celles-ci un avantage sélectif pour leur survie dans le tissu. L'infection augmentée à bactéries à Gram négatif arborant des LPS inflammatoires (*Proteobacteria*), pourrait alors alimenter l'inflammation métabolique. Par ailleurs, la corrélation entre la diminution de la quantité de bactéries à Gram positif (*Propionibacterium acnes*) et la glycémie à jeun des patients nous a suggéré qu'une baisse de vigilance immunitaire pouvait intervenir à la fois au niveau de l'intestin et au niveau systémique.



Article 2 : Microbiote tissulaire et intestinal au cours du diabète.

Nous avons ensuite tenté d'approcher les mécanismes pouvant conduire à l'adhérence et à la translocation accrues de bactéries, en nous focalisant sur la relation hôte-microbiote dans l'intestin (iléon). Les hypothèses majeures inspirées par ces derniers travaux sont représentées dans le schéma ci-dessous. La carence en hydrates de carbone dans le régime gras que nous avons utilisé, pourrait constituer un stress nutritionnel pour le microbiote intestinal, dont certains de ses membres mucolytiques adhèreraient à la muqueuse intestinale afin d'exploiter les sources glucidiques produites par l'hôte. L'installation concomittante d'une permissivité inhabituelle du système immunitaire mucosal sous régime gras, pourrait être en partie liée à l'activation de PPAR α par des ligands lipidiques présents dans le régime des souris. Une translocation alors incontrôlée de bactéries pourrait alimenter l'inflammation métabolique des tissus.



Article 3 : Relation hôte-microbiote intestinal avant le diabète.

L'innovation pharmacologique dans le domaine des maladies métaboliques pourrait alors consister premièrement à rétablir un statut d'immunovigilance capable de combattre une translocation bactérienne d'origine métabolique. Des stratégies de vaccination avec des composés immunostimulants pourraient être envisagées soit au niveau systémique, soit au niveau de la muqueuse intestinale en utilisant des bactéries probiotiques comme vecteurs.

Par ailleurs, nous avons démontré le potentiel thérapeutique de souches probiotiques dans la prévention de l'adhérence mucosale et de la translocation, avec un impact bénéfique sur le statut inflammatoire et métabolique des souris. Cette stratégie peut être améliorée en fonction des connaissances croissantes dans le domaine des interactions entre l'hôte et son microbiote. Les thérapies futures devraient ainsi être individualisées pour restaurer des interactions entre un hôte particulier et son microbiote qui soient optimales pour sa santé[14]. Contrairement aux stratégies actuelles, la sélection de souches probiotiques ainsi que des cibles de prébiotiques devrait concerner des symbiotes qui ont co-évolué historiquement avec l'homme, car ils sont les mieux adaptés à procurer des bénéfices[15].

Nous avons également démontré le potentiel thérapeutique de la vectorisation de molécules bioactives, comme la leptine. D'autres molécules impliquées dans l'adhérence et la translocation des bactéries, une fois identifiées, pourront constituer des cibles potentielles.

Néanmoins, en préalable à toute approche pharmacologique, il est évident que les stratégies nutritionnelles doivent être privilégiées, avec une attention toute particulière à la présence de fibres non digestibles et à la quantité et la qualité des apports lipidiques, afin que notre microbiote, du moins celui qu'il nous reste, ne soit pas poussé à se nourrir à nos dépends. Le comportement parasite des bactéries ne constitue en fait qu'une stratégie de survie, qui implique une aptitude inhérente à rompre les barrières de l'hôte. Le besoin de se reproduire et d'acquérir des nutriments constituent la force motrice de cette évolution, rendant les microbes capables d'exploiter une niche précédemment inoccupée, en conditions de stress nutritionnel notamment. Cette intrusion, ainsi que l'acquisition des gènes qui la rendent possible, deviennent une nécessité pour les microbes car ils ont par ailleurs perdu les gènes qui étaient importants dans leur précédente vie planctonique en dehors d'un hôte. Ainsi l'évolution de l'adaptation hôte-bactéries est toujours en nous et y persistera tant que les micro-organismes nous dépasseront en nombre et en pouvoir de réplication[51].

Selon Albert Einstein, la vraie valeur d'un être humain se trouve dans sa capacité à se libérer de lui-même. Notre vision de nous-mêmes, longtemps restreinte à notre corps d'eucaryote, est maintenant étendue à nos communautés microbiennes, grâce aux avancées récentes de la biologie. Cette nouvelle vision de l'homme en tant que super-organisme, communauté de cellules humaines et microbiennes, devrait contribuer ainsi à nous libérer de nous-même[45], ou tout au moins à nous éclairer sur notre dimension métagénomique, qui doit constituer la base d'approches thérapeutiques préventives ou curatives efficaces, qui font cruellement défaut aujourd'hui dans le domaine des maladies métaboliques.

ANNEXE

METHODES ET FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Extraction des mucines totales et analyse des oligosaccharides (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576, Lille)

La muqueuse de l'iléon (8 cm distaux) et de la totalité du colon est prélevée par grattage et placée dans un tampon d'extraction des mucines, qui consiste en une solution de chlorure de guanidine 4M, contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (EDTA 5mM, benzamidine 10mM, N-ethylmaleimide 5mM, inhibiteur de trypsine 0,1 mg/mL, DTT 10mM, azide de sodium 0,02% et PMSF 1mM dissous dans 500 µL d'isopropanol). Les muqueuses de 10 souris de chaque groupe (NC, HFD 1 semaine, HFD 4 semaines) sont rassemblées dans 1 mL de tampon. Ces échantillons sont ensuite envoyés à Catherine Robbe-Masselot (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576, Université des Sciences et Technologies de Lille). La densité des échantillons est ajustée à 1,4 g/mL à l'aide de chlorure de césium solide puis les échantillons sont soumis à une ultracentrifugation. Cette dernière est réalisée à 308500 g, pendant 48 heures à 20°C en utilisant un rotor Beckman 70.1 Ti. Des fractions de 1 mL sont ensuite récupérées à l'aide d'un collecteur de fraction et d'une pompe péristaltique.

Les mucines sont repérées par le biais de deux tests : la mesure de la densité de chaque fraction (comprise entre 1,35 g/mL et 1,45 g/mL pour les mucines) et de l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-mucines à l'aide d'un appareil à slot blot. Pour cela, 20 µL de chacune des fractions sont déposées sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil à slot blot. La membrane est saturée par une solution à 5% de lait écrémé dans du TBS-T (50mM tris, 150mM NaCl, pH 7,6) 1 heure à température ambiante. L'immunodétection est réalisée en utilisant un anticorps anti-mucine au 1:1000^{ème} dans du TBS-T avec 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante. La membrane de nitrocellulose est saturée par une solution à 5% de lait écrémé dans du TBS-T pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée 5 fois 10 minutes dans le TBS-T. Elle est ensuite incubée avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin le cas échéant marqué à la peroxydase (Amersham Biosciences) utilisé à une dilution au 1:10000^{ème} dans 5% de lait dans le TBS-T, 45 minutes sous agitation lente. Après 5 fois 10 minutes de lavage, la révélation se fait par chimiluminescence (ECL-Advance, Amersham Biosciences) pour être visualisée à l'aide d'un film photographique.

Les fractions contenant les mucines sont rassemblées et dialysées contre de l'eau. Les boudins de dialyses utilisés possèdent une valeur seuil de 14000 Daltons (MWCO : 14000). Le bain de dialyse est changé 2 fois par jour pendant 3 jours. Une fois l'échange osmotique effectué le contenu des boudins de dialyse est récupéré et lyophilisé.

Les extraits lyophilisés sont dissous dans une solution de NaOH 0,1M contenant du BH_4Na 1M. La solution est incubée au bain marie à 45°C pendant 20 heures. La réaction est arrêtée par addition d'une résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 20-50 mesh, forme H^+) à 4°C et la solution est ensuite filtrée puis évaporée à sec. L'excédent de sels de borate est éliminé par codistillation avec du méthanol. Les glycanes libérés sont alors sous forme d'oligosaccharide-alditols.

Les peptides sont éliminés du mélange par passage de la solution sur une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50x2, 200-400 mesh, forme H^+). Les oligosaccharides sont élués par de l'eau désionisée tandis que les peptides restent fixés sur la résine. La solution obtenue est ensuite concentrée sous évaporateur rotatif à 40°C.

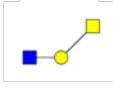
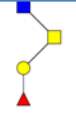
En conditions anhydres, les échantillons sont dissous dans une solution de perméthylation (200 μL de diméthylsulfoxyde, 300 μL de iodométhane, 1g de NaOH) puis placés en agitation pendant 2 heures. La réaction de perméthylation est arrêtée avec 1 mL d'acide acétique 5%.

Les échantillons dissous dans l'acide acétique sont filtrés sur colonne de silice HLB Oasis®. Les colonnes sont activées avec 3 mL de méthanol 100% puis équilibrées avec 3 mL d'une solution d'eau/méthanol (95:5). L'échantillon est placé dans la colonne et rincé avec 3 mL d'eau/méthanol (95:5). L'élution est effectuée avec 2 mL de méthanol 100%. L'éluat est mis à évaporer sous azote.

Les analyses de spectrométrie de masse sont réalisées sur un spectromètre de masse de géométrie MALDI-TOF-TOF de type Analyzer 4800 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) équipé d'une source laser. Les échantillons sont dissous dans un solvant méthanol/eau (50:50) et déposés sur une cible MALDI en addition avec une matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) à une dilution volume/volume. La puissance du laser appliqué sur la cible est de 2500 V. Pour chaque structure d'intérêt, l'intensité de 10 pics d'expériences indépendantes est mesurée. La moyenne de ces intensités est calculée et l'écart-type calculé sur cette moyenne.

Tableau 3 : Composition des principales structures glycaniques neutres identifiées dans les mucines iléales de souris.

Le pourcentage relatif de chaque glycanes a été calculé en intégrant la surface des pics des ions correspondants sur les spectres MS.

Composition des oligosaccharides		[M+Na] ⁺	NC	HFD1	HFD4
		534	3.2%	2.7%	1.4%
		575	1.7	2.4	0.5
		708	4.8	3	1.3
  		779	3.7	3.9	2.5
		953	1.6	1.9	0.8
2 Hex, 1 HexNAc, GalNAcol		983	2.3	3.1	3.3
1 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol		1024	0	1.1	0.8
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol		1157	0.7	0.9	0.5
1Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol		1198	0.3	0.7	0.4
2 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol		1228	0.8	3.3	1.3
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol		1402	0.6	2	0.9
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol		1576	4.1	4.4	5.8
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol		1606	0.6	2.4	1.5
2 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol		1821	0.7	0.3	0

 Galactose (Gal)	 Xylose (Xyl)
 N-Acetylgalactosamine (GalNAc)	 N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
 Galactosamine (GalN)	 N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)
 Glucose (Glc)	 2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)
 N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	 Fucose (Fuc)
 Glucosamine (GlcN)	 Glucuronic acid (GlcA)
 Mannose (Man)	 Iduronic acid (IdoA)
 N-Acetylmannosamine (ManNAc)	 Galacturonic acid (GalA)
 Mannosamine (ManN)	 Mannuronic acid (ManA)

Tableau 4 : Composition des principales structures glycaniques sialylées identifiées dans les mucines iléales de souris.

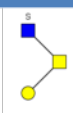
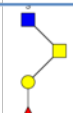
Le pourcentage relatif de chaque glycane a été calculé en intégrant la surface des pics des ions correspondants sur les spectres MS.

Composition des oligosaccharides	[M+Na] ⁺	[M+2Na-H] ⁺	NC	HFD1	HFD4
	691	713	0.7	1.6	0.4
	721	743	0.7	1	0
	895	917	2.9	2.4	3.5
	925	947	0.8	1.1	0.8
	1140	1162	1.4	1	1.9
	1170	1192	0.2	0.5	0.4
1 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1314	1326	3	1.9	0
2 Hex, 1 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1344	1366	3.9	5.3	5.4
2 Hex, 1 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	1374	1396	0	1.2	1.5
	1385	1407	0.6	0.7	0.7
2 Hex, 1 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuGc, GalNAcol	1548	1570	0	1.3	1.3
2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1589	1611	13.4	14.9	12.2
2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuGc, GalNAcol	1619	1641	1.2	3.5	5.2
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1763	1785	1.7	0.7	0
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuGc, GalNAcol	1793	1815	0	0.4	0.7
2 Hex, 3 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1834	1856	0.9	0.3	0.9
2 Hex, 2 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	1950	1972	1	0.5	1
2 Hex, 3 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	2195	2217	1	0.9	1.1
3 Hex, 3 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	2399	2421	2.2	2.3	1.5
3 Hex, 4 HexNAc, 2 NeuAc, GalNAcol	2644	2666	2.8	3	2.4
3 Hex, 3 HexNAc, 1 NeuAc, 1 NeuGc, GalNAcol	2674	2696	0	0.6	0.6

Galactose (Gal)	Xylose (Xyl)
N-Acetylgalactosamine (GalNAc)	N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
Galactosamine (GalN)	N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)
Glucose (Glc)	2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)
N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	Fucose (Fuc)
Glucosamine (GlcN)	Glucuronic acid (GlcA)
Mannose (Man)	Iduronic acid (IdoA)
N-Acetylmannosamine (ManNAc)	Galacturonic acid (GalA)
Mannosamine (ManN)	Mannuronic acid (ManA)

Tableau 5 : Composition des principales structures glycaniques sulfatées identifiées dans les mucines iléales de souris.

*En mode positif, les structures possédant un sulfate peuvent subir une désulfatation sur la cible MALDI, qui se traduit par l'obtention d'un ion monohydroxylé (le CH₃ est remplacé par un OH) pour lequel il faut soustraire 102 à la valeur de sa masse [M+Na].

Composition des oligosaccharides	[M+2Na -H] ⁺	[M+Na] ⁺ - 102	NC	HFD1	HFD4
	867	765	2.3	2.2	1.6
	1041	939	0.9	1.2	0.5
1 Hex, 2 HexNAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1112	1010	0.7	0.5	0.6
2 Hex, 2 HexNAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1316	1214	1.1	2.2	1.4
1 Hex, 3 HexNAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1357	1255	0	0.5	0.6
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1664	1562	0	0	1
2 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1677	1575	2.1	3.9	3.9
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1694	1592	0	0.9	1.2
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1851	1749	0.5	0.4	0
2 Hex, 3 HexNAc, 1 NeuAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	1922	1820	0	0.5	0
3 Hex, 3 HexNAc, 1 NeuAc, 1 SO ₃ , GalNAcol	2126	2024	0.3	0.3	0.5

 Galactose (Gal)	 Xylose (Xyl)
 N-Acetylgalactosamine (GalNAc)	 N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
 Galactosamine (GalN)	 N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)
 Glucose (Glc)	 2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)
 N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	 Fucose (Fuc)
 Glucosamine (GlcN)	 Glucuronic acid (GlcA)
 Mannose (Man)	 Iduronic acid (IdoA)
 N-Acetylmannosamine (ManNAc)	 Galacturonic acid (GalA)
 Mannosamine (ManN)	 Mannuronic acid (ManA)

BIBLIOGRAPHIE

1. Pace, N.R., *Mapping the tree of life: progress and prospects*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(4): p. 565-76.
2. Nava, G.M. and T.S. Stappenbeck, *Diversity of the autochthonous colonic microbiota*. Gut Microbes, 2011. **2**(2): p. 99-104.
3. Vaarala, O. and H. Yki-Jarvinen, *Diabetes: Should we treat infection or inflammation to prevent T2DM?* Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(6): p. 323-5.
4. Margulis, L., *Serial endosymbiotic theory (SET) and composite individuality, Transition from bacterial to eukaryotic genomes*. Microbiology Today, 2004. **31**.
5. Sansonetti, P.J., *Homéostasie de l'interface hôte-commensaux : furtivité ou tolérogénèse active?*, in *Chaire de Microbiologie et Maladies Infectieuses* 2010: Collège de France.
6. Kalupahana, N.S., N. Moustaid-Moussa, and K.J. Claycombe, *Immunity as a link between obesity and insulin resistance*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(1): p. 26-34.
7. Coudeyras, S. and C. Forestier, *[Microbiota and probiotics: effects on human health]*. Can J Microbiol, 2010. **56**(8): p. 611-50.
8. Davidov, Y. and E. Jurkevitch, *Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes*. Bioessays, 2009. **31**(7): p. 748-57.
9. Manco, M., L. Putignani, and G.F. Bottazzo, *Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk*. Endocr Rev, 2010. **31**(6): p. 817-44.
10. Blander, J.M. and L.E. Sander, *Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 215-25.
11. Schloss, P.D. and J. Handelsman, *Status of the microbial census*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(4): p. 686-91.
12. Woese, C.R. and G.E. Fox, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(11): p. 5088-90.
13. Cho, I. and M.J. Blaser, *The human microbiome: at the interface of health and disease*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 260-70.
14. Blaser, M.J., *Disappearing microbiota: Helicobacter pylori protection against esophageal adenocarcinoma*. Cancer Prev Res (Phila), 2008. **1**(5): p. 308-11.
15. Walter, J., R.A. Britton, and S. Roos, *Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the Lactobacillus reuteri paradigm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108** Suppl 1: p. 4645-52.
16. Willey, J.M., L.M. Sherwood, and C.J. Woolverton, *Microbiologie*, ed. D.B. University. Vol. 3ième édition. 2010.

17. Knoll, A.H. and E.S. Barghoorn, *Archean microfossils showing cell division from the swaziland system of South Africa*. Science, 1977. **198**(4315): p. 396-8.
18. Donoghue, P.C. and J.B. Antcliffe, *Early life: Origins of multicellularity*. Nature, 2010. **466**(7302): p. 41-2.
19. Dahl, T.W., et al., *Devonian rise in atmospheric oxygen correlated to the radiations of terrestrial plants and large predatory fish*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 17911-5.
20. Falkowski, P.G. and Y. Isozaki, *Geology. The story of O₂*. Science, 2008. **322**(5901): p. 540-2.
21. Payne, J.L., et al., *Two-phase increase in the maximum size of life over 3.5 billion years reflects biological innovation and environmental opportunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(1): p. 24-7.
22. Wallace, R., *Metabolic constraints on the eukaryotic transition*. Orig Life Evol Biosph, 2009. **39**(2): p. 165-76.
23. Vellai, T., K. Takacs, and G. Vida, *A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes*. J Mol Evol, 1998. **46**(5): p. 499-507.
24. Andersson, S.G., et al., *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 133-40.
25. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *The origin and early evolution of mitochondria*. Genome Biol, 2001. **2**(6): p. REVIEWS1018.
26. Sagan, L., *On the origin of mitosing cells*. J Theor Biol, 1967. **14**(3): p. 255-74.
27. Wickstead, B. and K. Gull, *The evolution of the cytoskeleton*. J Cell Biol, 2011. **194**(4): p. 513-25.
28. Yutin, N., et al., *The origins of phagocytosis and eukaryogenesis*. Biol Direct, 2009. **4**: p. 9.
29. von Dohlen, C.D., et al., *Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts*. Nature, 2001. **412**(6845): p. 433-6.
30. Baluska, F., *Cell-cell channels, viruses, and evolution: via infection, parasitism, and symbiosis toward higher levels of biological complexity*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1178**: p. 106-19.
31. Nowak, M.A., *Five rules for the evolution of cooperation*. Science, 2006. **314**(5805): p. 1560-3.
32. Baltrus, D.A., M.J. Blaser, and K. Guillemin, *Helicobacter pylori Genome Plasticity*. Genome Dyn, 2009. **6**: p. 75-90.
33. Merhej, V., et al., *Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria*. Biol Direct, 2009. **4**: p. 13.
34. Toft, C. and S.G. Andersson, *Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(7): p. 465-75.
35. Medina, M. and J.L. Sachs, *Symbiont genomics, our new tangled bank*. Genomics, 2010. **95**(3): p. 129-37.

36. Sachs, J.L., C.J. Essenberg, and M.M. Turcotte, *New paradigms for the evolution of beneficial infections*. Trends Ecol Evol, 2011. **26**(4): p. 202-9.
37. Sachs, J.L., R.G. Skophammer, and J.U. Regus, *Evolutionary transitions in bacterial symbiosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 2**: p. 10800-7.
38. Snel, B., P. Bork, and M.A. Huynen, *Genomes in flux: the evolution of archaeal and proteobacterial gene content*. Genome Res, 2002. **12**(1): p. 17-25.
39. Ley, R.E., et al., *Evolution of mammals and their gut microbes*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1647-51.
40. Stevens, C.E. and I.D. Hume, *Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients*. Physiol Rev, 1998. **78**(2): p. 393-427.
41. Ley, R.E., et al., *Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(10): p. 776-88.
42. Bergman, E.N., *Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species*. Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 567-90.
43. Zaneveld, J., et al., *Host-bacterial coevolution and the search for new drug targets*. Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(1): p. 109-14.
44. Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D.A. Relman, *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 811-8.
45. Sleator, R.D., *The human superorganism - of microbes and men*. Med Hypotheses, 2010. **74**(2): p. 214-5.
46. Turnbaugh, P.J., et al., *The human microbiome project*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-10.
47. Rosenberg, E., G. Sharon, and I. Zilber-Rosenberg, *The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework*. Environ Microbiol, 2009. **11**(12): p. 2959-62.
48. Neish, A.S., *Microbes in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 65-80.
49. Yu, L.C., et al., *Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012. **3**(1): p. 27-43.
50. Tilman, D., *Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 10854-61.
51. Merrell, D.S. and S. Falkow, *Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 250-6.
52. Hooper, L.V., *Do symbiotic bacteria subvert host immunity?* Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(5): p. 367-74.

53. Blaser, M.J. and S. Falkow, *What are the consequences of the disappearing human microbiota?* Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(12): p. 887-94.
54. Staley, J.T., *Biodiversity: are microbial species threatened?* Curr Opin Biotechnol, 1997. **8**(3): p. 340-5.
55. Blaser, M.J., *Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases.* EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 956-60.
56. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size.* BMJ, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
57. Linz, B., et al., *An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori.* Nature, 2007. **445**(7130): p. 915-8.
58. Chen, Y. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori colonization is inversely associated with childhood asthma.* J Infect Dis, 2008. **198**(4): p. 553-60.
59. Chen, Y. and M.J. Blaser, *Inverse associations of Helicobacter pylori with asthma and allergy.* Arch Intern Med, 2007. **167**(8): p. 821-7.
60. Reibman, J., et al., *Asthma is inversely associated with Helicobacter pylori status in an urban population.* PLoS One, 2008. **3**(12): p. e4060.
61. Blaser, M.J., *Equilibria of humans and our indigenous microbiota affecting asthma.* Proc Am Thorac Soc, 2012. **9**(2): p. 69-71.
62. Codolo, G., et al., *The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori down-modulates Th2 inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma.* Cell Microbiol, 2008. **10**(11): p. 2355-63.
63. Looft, T., et al., *In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1691-6.
64. Danzeisen, J.L., et al., *Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27949.
65. Martinez, J.J., et al., *Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells.* EMBO J, 2000. **19**(12): p. 2803-12.
66. Connell, I., et al., *Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9827-32.
67. Plos, K., et al., *Escherichia coli in patients with renal scarring: genotype and phenotype of Gal alpha 1-4Gal beta-, Forssman- and mannose-specific adhesins.* Pediatr Infect Dis J, 1991. **10**(1): p. 15-9.
68. Fronzes, R., et al., *Structure of a type IV secretion system core complex.* Science, 2009. **323**(5911): p. 266-8.
69. Koch, M., et al., *Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012.
70. Sjolund, M., et al., *Persistence of resistant Staphylococcus epidermidis after single course of clarithromycin.* Emerg Infect Dis, 2005. **11**(9): p. 1389-93.

71. Sjolund, M., et al., *Long-term persistence of resistant Enterococcus species after antibiotics to eradicate Helicobacter pylori*. Ann Intern Med, 2003. **139**(6): p. 483-7.
72. Sachs, J.L. and E.L. Simms, *Pathways to mutualism breakdown*. Trends Ecol Evol, 2006. **21**(10): p. 585-92.
73. Sachs, J.L., et al., *The evolution of cooperation*. Quarterly Review of Biology, 2004. **79**(2): p. 135-60.
74. Axelrod, R. and W.D. Hamilton, *The evolution of cooperation*. Science, 1981. **211**(4489): p. 1390-6.
75. Bull, J.J. and W.R. Rice, *Distinguishing mechanisms for the evolution of co-operation*. J Theor Biol, 1991. **149**(1): p. 63-74.
76. Foster, K.R. and T. Wenseleers, *A general model for the evolution of mutualisms*. J Evol Biol, 2006. **19**(4): p. 1283-93.
77. Yatsunenko, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-7.
78. Lepp, P.W., et al., *Methanogenic Archaea and human periodontal disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6176-81.
79. Costello, E.K., et al., *Bacterial community variation in human body habitats across space and time*. Science, 2009. **326**(5960): p. 1694-7.
80. Moore, W.E. and L.V. Holdeman, *Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians*. Appl Microbiol, 1974. **27**(5): p. 961-79.
81. Lee, A., J. Gordon, and R. Dubos, *Enumeration of the oxygen sensitive bacteria usually present in the intestine of healthy mice*. Nature, 1968. **220**(5172): p. 1137-9.
82. Finegold, S.M., et al., *Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(Suppl 1): p. S6-S16.
83. Berg, R.D., *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract*. Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: p. 11-30.
84. Schaedler, R.W., R. Dubos, and R. Costello, *The Development of the Bacterial Flora in the Gastrointestinal Tract of Mice*. J Exp Med, 1965. **122**: p. 59-66.
85. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1115-8.
86. Turnbaugh, P.J., et al., *Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(16): p. 7503-8.
87. Franks, A.H., et al., *Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(9): p. 3336-45.

88. Jansen, G.J., et al., *Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria*. J Microbiol Methods, 1999. **37**(3): p. 215-21.
89. Sghir, A., et al., *Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(5): p. 2263-6.
90. Lay, C., et al., *Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the Clostridium leptum subgroup in human faecal microbiota*. Environ Microbiol, 2005. **7**(7): p. 933-46.
91. Doré, J. and G. Corthier, *The human intestinal microbiota*. Gastroentérologie Clinique et Biologique, 2010. **34**(Suppl. 1): p. S7-S15.
92. Huse, S.M., et al., *Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing*. PLoS Genet, 2008. **4**(11): p. e1000255.
93. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
94. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
95. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
96. Hakansson, A. and G. Molin, *Gut microbiota and inflammation*. Nutrients, 2011. **3**(6): p. 637-82.
97. Frank, D.N. and N.R. Pace, *Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(1): p. 4-10.
98. Marteau, P., et al., *Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4939-42.
99. Takahashi, T. and E. Sakaguchi, *Transport of bacteria across and along the large intestinal lumen of guinea pigs*. J Comp Physiol B, 2006. **176**(2): p. 173-8.
100. Swidsinski, A., et al., *Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(8): p. 963-70.
101. Davis, C.P., J.S. McAllister, and D.C. Savage, *Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice*. Infect Immun, 1973. **7**(4): p. 666-72.
102. Dubos, R., et al., *Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract*. J Exp Med, 1965. **122**: p. 67-76.
103. Lepage, P., et al., *Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 473-80.
104. Wang, M., et al., *Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes*. FEMS Microbiol Ecol, 2005. **54**(2): p. 219-31.

105. Zoetendal, E.G., et al., *Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(7): p. 3401-7.
106. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing*. Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1713-9.
107. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11971-5.
108. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1035S-1045S.
109. Koenig, J.E., et al., *Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4578-85.
110. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.
111. Clemente, J.C., et al., *The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1258-70.
112. McNulty, N.P., et al., *The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins*. Sci Transl Med, 2011. **3**(106): p. 106ra106.
113. Zhang, C., et al., *Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations*. ISME J, 2012.
114. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 3854-9.
115. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-9.
116. Caporaso, J.G., et al., *Moving pictures of the human microbiome*. Genome Biol, 2011. **12**(5): p. R50.
117. Kau, A.L., et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 327-36.
118. Maslowski, K.M. and C.R. Mackay, *Diet, gut microbiota and immune responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 5-9.
119. Candela, M., et al., *Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes*. Trends Microbiol, 2012.
120. Muegge, B.D., et al., *Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans*. Science, 2011. **332**(6032): p. 970-4.
121. Walker, A.W., et al., *Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota*. ISME J, 2011. **5**(2): p. 220-30.

122. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science, 2011. **334**(6052): p. 105-8.
123. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
124. Nam, Y.D., et al., *Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22109.
125. Thomas, F., et al., *Environmental and gut bacteroidetes: the food connection*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 93.
126. Hehemann, J.H., et al., *Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 908-12.
127. Stewart, J.A., V.S. Chadwick, and A. Murray, *Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 12): p. 1239-42.
128. Benson, A.K., et al., *Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(44): p. 18933-8.
129. Nakayama, K., et al., *Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6629-34.
130. Markart, P., et al., *Comparison of the microbicidal and muramidase activities of mouse lysozyme M and P*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 385-92.
131. De Kimpe, S.J., et al., *The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10359-63.
132. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
133. Claesson, M.J., et al., *Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108** Suppl 1: p. 4586-91.
134. Biagi, E., et al., *Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10667.
135. Biagi, E., et al., *Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart*. Age (Dordr), 2012. **34**(1): p. 247-67.
136. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 283-307.
137. Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane, *Colonic microflora: nutrition and health*. Nutrition, 1997. **13**(5): p. 476-8.
138. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 361-80.

139. Roediger, W.E., *Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man*. Gut, 1980. **21**(9): p. 793-8.
140. Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B.L. Pool-Zobel, *Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 451S-455S.
141. Hague, A., et al., *Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer*. Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 498-505.
142. Roediger, W.E., *The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease?* Lancet, 1980. **2**(8197): p. 712-5.
143. Den Hond, E., et al., *In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1998. **115**(3): p. 584-90.
144. Segain, J.P., et al., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NF-kappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
145. Luhrs, H., et al., *Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(4): p. 458-66.
146. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(2): p. 104-19.
147. Wilson, A.J. and P.R. Gibson, *Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro*. Gastroenterology, 1997. **113**(2): p. 487-96.
148. Gaudier, E., et al., *Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(6): p. G1168-74.
149. Barcelo, A., et al., *Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon*. Gut, 2000. **46**(2): p. 218-24.
150. Barrett, K.E., *A new twist on trefoils. Focus on "TFF3 modulates NF- κ B and a novel regulatory molecule of NF- κ B in intestinal epithelial cells via a mechanism distinct from TNF- α "*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(5): p. C1069-71.
151. Schaubert, J., et al., *Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways*. Gut, 2003. **52**(5): p. 735-41.
152. Ren, H., et al., *Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 631-9.
153. D'Argenio, G., et al., *Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity*. Gastroenterology, 1994. **106**(2): p. 399-404.
154. Blaut, M. and T. Clavel, *Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease*. J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 751S-5S.
155. Clinton, S.K., et al., *Effects of ammonium acetate and sodium cholate on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced colon carcinogenesis of rats*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3035-9.

156. Hecht, S.S., *Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **216**(2): p. 181-91.
157. Bone, E., A. Tamm, and M. Hill, *The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer*. Am J Clin Nutr, 1976. **29**(12): p. 1448-54.
158. Kikugawa, K. and T. Kato, *Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite*. Food Chem Toxicol, 1988. **26**(3): p. 209-14.
159. Roediger, W.E., et al., *Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1993. **104**(3): p. 802-9.
160. Gibson, G.R., G.T. Macfarlane, and J.H. Cummings, *Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut*. J Appl Bacteriol, 1988. **65**(2): p. 103-11.
161. Summerton, J., et al., *Effect of deoxycholic acid on the tumour incidence, distribution, and receptor status of colorectal cancer in the rat model*. Digestion, 1985. **31**(2-3): p. 77-81.
162. McBain, A.J. and G.T. Macfarlane, *Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites*. J Med Microbiol, 1998. **47**(5): p. 407-16.
163. Chang, Y.C. and M.G. Nair, *Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria*. J Nat Prod, 1995. **58**(12): p. 1892-6.
164. Heinonen, S., K. Wahala, and H. Adlercreutz, *Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds*. Anal Biochem, 1999. **274**(2): p. 211-9.
165. Mousavi, Y. and H. Adlercreutz, *Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **41**(3-8): p. 615-9.
166. Kitts, D.D., et al., *Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone*. Mol Cell Biochem, 1999. **202**(1-2): p. 91-100.
167. Lee, Y.K. and S.K. Mazmanian, *Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?* Science, 2010. **330**(6012): p. 1768-73.
168. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
169. Ehlers, S. and S.H. Kaufmann, *Infection, inflammation, and chronic diseases: consequences of a modern lifestyle*. Trends Immunol, 2010. **31**(5): p. 184-90.
170. Rook, G.A. and L.R. Brunet, *Microbes, immunoregulation, and the gut*. Gut, 2005. **54**(3): p. 317-20.
171. Ohnmacht, C., et al., *Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity*. Cell Microbiol, 2011. **13**(5): p. 653-9.

172. Sansonetti, P.J., *To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 8-14.
173. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. Science, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
174. Hooper, L.V., *Bacterial contributions to mammalian gut development*. Trends Microbiol, 2004. **12**(3): p. 129-34.
175. Strydom, D.J., *The angiogenins*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(8): p. 811-24.
176. Hooper, L.V., et al., *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 269-73.
177. Biol, M.C., *Nutritional and developmental variations of intestinal glycosylation*. Nutrition, 1992. **8**(5): p. 368-9.
178. Bry, L., et al., *A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1380-3.
179. Umesaki, Y., et al., *Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse*. Microbiol Immunol, 1995. **39**(8): p. 555-62.
180. Stecher, B. and W.D. Hardt, *The role of microbiota in infectious disease*. Trends Microbiol, 2008. **16**(3): p. 107-14.
181. Corr, S.C., et al., *Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7617-21.
182. Kim, Y., et al., *Inhibition of Escherichia coli O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells*. J Microbiol Biotechnol, 2008. **18**(7): p. 1278-85.
183. Raqib, R., et al., *Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9178-83.
184. Wells, J.M., et al., *Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4607-14.
185. Pinto, D., et al., *Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium*. Genes Dev, 2003. **17**(14): p. 1709-13.
186. Salzman, N.H., M.A. Underwood, and C.L. Bevins, *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa*. Semin Immunol, 2007. **19**(2): p. 70-83.
187. Madara, J.L., *Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions*. J Membr Biol, 1990. **116**(2): p. 177-84.
188. Watson, A.J., et al., *Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers*. Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 902-12.

189. Flynn, A.N. and A.G. Buret, *Tight junctional disruption and apoptosis in an in vitro model of Citrobacter rodentium infection*. Microb Pathog, 2008. **45**(2): p. 98-104.
190. Yu, L.C., et al., *SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism?* FASEB J, 2005. **19**(13): p. 1822-35.
191. Hsiao, J.K., et al., *Magnetic resonance imaging detects intestinal barrier dysfunction in a rat model of acute mesenteric ischemia/reperfusion injury*. Invest Radiol, 2009. **44**(6): p. 329-35.
192. Huang, L., et al., *Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of Acinetobacter baumannii in a Chinese hospital*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **62**(3): p. 326-32.
193. Omatsu, T., et al., *Involvement of reactive oxygen species in indomethacin-induced apoptosis of small intestinal epithelial cells*. J Gastroenterol, 2009. **44 Suppl 19**: p. 30-4.
194. Redlak, M.J., J.J. Power, and T.A. Miller, *Prevention of deoxycholate-induced gastric apoptosis by aspirin: roles of NF- κ B and PKC signaling*. J Surg Res, 2008. **145**(1): p. 66-73.
195. Renchan, A.G., et al., *Early cellular events in colorectal carcinogenesis*. Colorectal Dis, 2002. **4**(2): p. 76-89.
196. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
197. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G922-9.
198. Aranow, J.S. and M.P. Fink, *Determinants of intestinal barrier failure in critical illness*. Br J Anaesth, 1996. **77**(1): p. 71-81.
199. Corazzari, E.S., *Intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **48 Suppl 2**: p. S54-5.
200. Sajjan, S.U. and J.F. Forstner, *Role of the putative "link" glycopeptide of intestinal mucin in binding of pilated Escherichia coli serotype O157:H7 strain CL-49*. Infect Immun, 1990. **58**(4): p. 868-73.
201. Smith, C.J., J.B. Kaper, and D.R. Mack, *Intestinal mucin inhibits adhesion of human enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995. **21**(3): p. 269-76.
202. Taupin, D. and D.K. Podolsky, *Trefoil factors: initiators of mucosal healing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 721-32.
203. Santaolalla, R., M. Fukata, and M.T. Abreu, *Innate immunity in the small intestine*. Curr Opin Gastroenterol, 2011. **27**(2): p. 125-31.
204. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.

205. Wells, J.M., L.M. Loonen, and J.M. Karczewski, *The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(1): p. 41-8.
206. Furrie, E., et al., *Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria*. Immunology, 2005. **115**(4): p. 565-74.
207. Cario, E., et al., *Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 966-72.
208. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
209. Otte, J.M. and D.K. Podolsky, *Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(4): p. G613-26.
210. Ortega-Cava, C.F., et al., *Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 3977-85.
211. Chabot, S., et al., *TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4275-83.
212. Hornef, M.W., et al., *Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 559-70.
213. Hornef, M.W., et al., *Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1225-35.
214. Rehwinkel, J. and C. Reis e Sousa, *RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing*. Science, 2010. **327**(5963): p. 284-6.
215. Williams, A., R.A. Flavell, and S.C. Eisenbarth, *The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(1): p. 34-40.
216. Humann, J. and L.L. Lenz, *Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection*. J Innate Immun, 2009. **1**(2): p. 88-97.
217. Rehman, A., et al., *Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities*. Gut, 2011. **60**(10): p. 1354-62.
218. Petnicki-Ocwieja, T., et al., *Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15813-8.
219. Hisamatsu, T., et al., *CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 993-1000.
220. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
221. Lipinski, S., et al., *DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3522-30.

222. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
223. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, *Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1487-95.
224. Bouskra, D., et al., *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 507-10.
225. Hasegawa, M., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of Clostridium difficile and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4872-80.
226. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
227. Shibolet, O. and D.K. Podolsky, *TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1469-73.
228. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
229. Schilling, J.D., et al., *Toll-like receptor 4 on stromal and hematopoietic cells mediates innate resistance to uropathogenic Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4203-8.
230. Lebeis, S.L., et al., *TLR signaling mediated by MyD88 is required for a protective innate immune response by neutrophils to Citrobacter rodentium*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 566-77.
231. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
232. Maeda, S., et al., *Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing*. Science, 2005. **307**(5710): p. 734-8.
233. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
234. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
235. Johansen, F.E., et al., *Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 915-22.
236. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 331-41.
237. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.

238. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 361-7.
239. Chieppa, M., et al., *Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement*. J Exp Med, 2006. **203**(13): p. 2841-52.
240. Sansonetti, P.J. and J.P. Di Santo, *Debugging how bacteria manipulate the immune response*. Immunity, 2007. **26**(2): p. 149-61.
241. McDole, J.R., et al., *Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 345-9.
242. Murdoch, J.R. and T. Junt, *Editorial: Peer across the barrier--new live transmissions from the intestinal mucosa*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(3): p. 407-9.
243. Hanson, L.A., *Comparative analysis of human milk and human blood plasma by means of diffusion-in-gel methods*. Experientia, 1959. **15**: p. 473-4.
244. He, B., et al., *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 812-26.
245. Lotz, M., et al., *Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 973-84.
246. Bates, J.M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 371-82.
247. Rimoldi, M., et al., *Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2818-26.
248. Dewhirst, F.E., et al., *Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(8): p. 3287-92.
249. Geuking, M.B., et al., *Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 794-806.
250. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
251. Gaboriau-Routhiau, V., et al., *The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses*. Immunity, 2009. **31**(4): p. 677-89.
252. Ivanov, II, et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell, 2009. **139**(3): p. 485-98.
253. Chow, J. and S.K. Mazmanian, *A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(4): p. 265-76.
254. Sansonetti, P.J., *War and peace at mucosal surfaces*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 953-64.
255. Vance, R.E., R.R. Isberg, and D.A. Portnoy, *Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(1): p. 10-21.

256. Tlaskalova-Hogenova, H., et al., *The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases*. Cell Mol Immunol, 2011. **8**(2): p. 110-20.
257. Bach, J.F., *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 911-20.
258. Backhed, F., *99th Dablem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: the normal gut microbiota in health and disease*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(1): p. 80-4.
259. Ehlers, S. and S.H. Kaufmann, *99th Dablem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: lifestyle changes affecting the host-environment interface*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(1): p. 10-4.
260. Israeli, E., et al., *Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease*. Gut, 2005. **54**(9): p. 1232-6.
261. Shoenfeld, Y., et al., *The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases--2008*. Isr Med Assoc J, 2008. **10**(1): p. 13-9.
262. Westall, F.C., *Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(6): p. 2099-104.
263. Blank, M., O. Barzilai, and Y. Shoenfeld, *Molecular mimicry and auto-immunity*. Clin Rev Allergy Immunol, 2007. **32**(1): p. 111-8.
264. Barnes, M.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 401-11.
265. Tlaskalova-Hogenova, H., et al., *Autoimmunity, immunodeficiency and mucosal infections: chronic intestinal inflammation as a sensitive indicator of immunoregulatory defects in response to normal luminal microflora*. Folia Microbiol (Praha), 1998. **43**(5): p. 545-50.
266. Singh, B., et al., *Control of intestinal inflammation by regulatory T cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 190-200.
267. Clavel, T. and D. Haller, *Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation*. Curr Issues Intest Microbiol, 2007. **8**(2): p. 25-43.
268. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
269. Blumberg, R.S., *Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 455-64.
270. Mathew, C.G., *New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(1): p. 9-14.
271. Parkes, G.C., et al., *Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of subgroups of irritable bowel syndrome*. Neurogastroenterol Motil, 2012. **24**(1): p. 31-9.

272. Fasano, A. and T. Shea-Donohue, *Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(9): p. 416-22.
273. Wapenaar, M.C., et al., *Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis*. Gut, 2008. **57**(4): p. 463-7.
274. Stepankova, R., et al., *Changes in jejunal mucosa after long-term feeding of germfree rats with gluten*. Scand J Gastroenterol, 1996. **31**(6): p. 551-7.
275. Vaarala, O., *Leaking gut in type 1 diabetes*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(6): p. 701-6.
276. Pozzilli, P., et al., *NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures*. Immunol Today, 1993. **14**(5): p. 193-6.
277. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
278. Watts, T., et al., *Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2916-21.
279. Schrijver, I.A., et al., *Bacterial peptidoglycan and immune reactivity in the central nervous system in multiple sclerosis*. Brain, 2001. **124**(Pt 8): p. 1544-54.
280. de Magistris, L., et al., *Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010. **51**(4): p. 418-24.
281. Weber, P., et al., *Gastrointestinal symptoms and permeability in patients with juvenile idiopathic arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(5): p. 657-62.
282. Toivanen, P., *Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 807-11.
283. Vahtovuo, J., et al., *Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2008. **35**(8): p. 1500-5.
284. Ayada, K., et al., *Chronic infections and atherosclerosis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2009. **37**(1): p. 44-8.
285. Sandek, A., S.D. Anker, and S. von Haehling, *The gut and intestinal bacteria in chronic heart failure*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(1): p. 22-8.
286. Koren, O., et al., *Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4592-8.
287. Guarner, F., et al., *Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(5): p. 275-84.
288. von Mutius, E., *Gene-environment interactions in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 3-11; quiz 12-3.

289. de Martel, C. and S. Franceschi, *Infections and cancer: established associations and new hypotheses*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **70**(3): p. 183-94.
290. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
291. Babu, S.D., et al., *Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 10.
292. Fukata, M. and M.T. Abreu, *Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies*. Oncogene, 2008. **27**(2): p. 234-43.
293. Vannucci, L., et al., *Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: different intestinal environments affect the systemic immunity*. Int J Oncol, 2008. **32**(3): p. 609-17.
294. Garrett, W.S., J.I. Gordon, and L.H. Glimcher, *Homeostasis and inflammation in the intestine*. Cell, 2010. **140**(6): p. 859-70.
295. Sansonetti, P.J. and R. Medzhitov, *Learning tolerance while fighting ignorance*. Cell, 2009. **138**(3): p. 416-20.
296. Duncan, S.H., et al., *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(11): p. 1720-4.
297. Schwartz, A., et al., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(1): p. 190-5.
298. Greenblum, S., P.J. Turnbaugh, and E. Borenstein, *Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 594-9.
299. Turnbaugh, P.J. and J.I. Gordon, *The core gut microbiome, energy balance and obesity*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 17): p. 4153-8.
300. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
301. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
302. Fleissner, C.K., et al., *Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity*. Br J Nutr, 2010. **104**(6): p. 919-29.
303. Murphy, E.F., et al., *Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models*. Gut, 2010. **59**(12): p. 1635-42.
304. Hildebrandt, M.A., et al., *High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1716-24 e1-2.
305. Caballero, B., *The global epidemic of obesity: an overview*. Epidemiol Rev, 2007. **29**: p. 1-5.
306. Bleich, S., et al., *Why is the developed world obese?* Annu Rev Public Health, 2008. **29**: p. 273-95.

307. Flegal, K.M., et al., *Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008*. JAMA, 2010. **303**(3): p. 235-41.
308. Swinburn, B.A., et al., *The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 804-14.
309. Diamant, M., E.E. Blaak, and W.M. de Vos, *Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?* Obes Rev, 2011. **12**(4): p. 272-81.
310. Greiner, T. and F. Backhed, *Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(4): p. 117-23.
311. Berg, R.D. and A.W. Garlington, *Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model*. Infect Immun, 1979. **23**(2): p. 403-11.
312. Steffen, E.K., R.D. Berg, and E.A. Deitch, *Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node*. J Infect Dis, 1988. **157**(5): p. 1032-8.
313. Lee, P.I., et al., *Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia*. J Infect Dis, 2009. **199**(11): p. 1664-70.
314. Wells, C.L., et al., *Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria*. Infect Immun, 1987. **55**(11): p. 2689-94.
315. Boedeker, E.C., *Adherent bacteria: breaching the mucosal barrier?* Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 255-7.
316. Koh, I.H., et al., *Can bacterial translocation to the mesenteric lymph node be correlated with systemic infection?* Transplant Proc, 1996. **28**(5): p. 2673.
317. MacFie, J., et al., *Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity*. Gut, 1999. **45**(2): p. 223-8.
318. Wu, C.C., et al., *Role of myosin light chain kinase in intestinal epithelial barrier defects in a rat model of bowel obstruction*. BMC Gastroenterol, 2010. **10**: p. 39.
319. Wu, L.L., et al., *Epithelial inducible nitric oxide synthase causes bacterial translocation by impairment of enterocytic tight junctions via intracellular signals of Rho-associated kinase and protein kinase C zeta*. Crit Care Med, 2011. **39**(9): p. 2087-98.
320. Ferrier, L., et al., *Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 795-804.
321. Clark, E., et al., *Interferon gamma induces translocation of commensal Escherichia coli across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process*. Gastroenterology, 2005. **128**(5): p. 1258-67.
322. Nazli, A., et al., *Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 947-57.
323. Lewis, K., et al., *Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(7): p. 1138-48.

324. Inaba, T., et al., *Nitric oxide promotes the internalization and passage of viable bacteria through cultured Caco-2 intestinal epithelial cells*. Shock, 1999. **11**(4): p. 276-82.
325. Wang, G., et al., *Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1295-300.
326. Wells, C.L., et al., *Effect of hypoxia on enterocyte endocytosis of enteric bacteria*. Crit Care Med, 1996. **24**(6): p. 985-91.
327. Kalischuk, L.D., G.D. Inglis, and A.G. Buret, *Campylobacter jejuni induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts*. Gut Pathog, 2009. **1**(1): p. 2.
328. Moore, F.A., et al., *Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma*. J Trauma, 1991. **31**(5): p. 629-36; discussion 636-8.
329. O'Boyle, C.J., et al., *Microbiology of bacterial translocation in humans*. Gut, 1998. **42**(1): p. 29-35.
330. Deitch, E.A., *Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings?* Surgery, 2002. **131**(3): p. 241-4.
331. Sedman, P.C., et al., *The prevalence of gut translocation in humans*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 643-9.
332. Oozeer, R., et al., *Gut health: predictive biomarkers for preventive medicine and development of functional foods*. Br J Nutr, 2010. **103**(10): p. 1539-44.
333. Isolauri, E. and S. Salminen, *Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report*. J Clin Gastroenterol, 2008. **42 Suppl 2**: p. S91-6.
334. Cukrowska, B., et al., *Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917*. Scand J Immunol, 2002. **55**(2): p. 204-9.
335. Bleich, A., et al., *Sensitivity to Escherichia coli Nissle 1917 in mice is dependent on environment and genetic background*. Int J Exp Pathol, 2008. **89**(1): p. 45-54.
336. Preidis, G.A. and J. Versalovic, *Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era*. Gastroenterology, 2009. **136**(6): p. 2015-31.
337. Trebichavsky, I., et al., *Cross-talk of human gut with bifidobacteria*. Nutr Rev, 2009. **67**(2): p. 77-82.
338. Hormannspurger, G. and D. Haller, *Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(1): p. 63-73.
339. Karczewski, J., et al., *Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(6): p. G851-9.

340. Kajander, K., et al., *A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(5): p. 387-94.
341. O'Mahony, L., et al., *Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 541-51.
342. Whorwell, P.J., et al., *Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in women with irritable bowel syndrome*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(7): p. 1581-90.
343. Rijkers, G.T., et al., *Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research*. J Nutr, 2010. **140**(3): p. 671S-6S.
344. Lodinova-Zadnikova, R., B. Cukrowska, and H. Tlaskalova-Hogenova, *Oral administration of probiotic Escherichia coli after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years)*. Int Arch Allergy Immunol, 2003. **131**(3): p. 209-11.
345. Matsuzaki, T., et al., *Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity*. J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 798S-802S.
346. Maassen, C.B. and E. Claassen, *Strain-dependent effects of probiotic lactobacilli on EAE autoimmunity*. Vaccine, 2008. **26**(17): p. 2056-7.
347. Furet, J.P., et al., *Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers*. Diabetes, 2010. **59**(12): p. 3049-57.
348. Zhang, H., et al., *Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2365-70.
349. Samuel, B.S. and J.I. Gordon, *A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 10011-6.
350. Kootte, R.S., et al., *The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(2): p. 112-20.
351. Luoto, R., et al., *The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(10): p. 1531-7.
352. Kadooka, Y., et al., *Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial*. Eur J Clin Nutr, 2010. **64**(6): p. 636-43.
353. Cani, P.D., et al., *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia*. Diabetologia, 2007. **50**(11): p. 2374-83.
354. Cani, P.D., C. Dewever, and N.M. Delzenne, *Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats*. Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 521-6.
355. Cani, P.D., et al., *Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor*. Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1484-90.

356. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut, 2009. **58**(8): p. 1091-103.
357. Cani, P.D., et al., *Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(5): p. 1236-43.
358. Parnell, J.A. and R.A. Reimer, *Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(6): p. 1751-9.
359. van Baarlen, P., et al., *Differential NF-kappaB pathways induction by Lactobacillus plantarum in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2371-6.
360. Wells, J., *Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria*. Annu Rev Food Sci Technol, 2011. **2**: p. 423-45.
361. Bermudez-Humaran, L.G., et al., *Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines*. Microb Cell Fact, 2011. **10 Suppl 1**: p. S4.
362. Rottiers, P., T. De Smedt, and L. Steidler, *Modulation of gut-associated lymphoid tissue functions with genetically modified Lactococcus lactis*. Int Rev Immunol, 2009. **28**(6): p. 465-86.
363. Vandenbroucke, K., et al., *Active delivery of trefoil factors by genetically modified Lactococcus lactis prevents and heals acute colitis in mice*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 502-13.
364. Hanniffy, S., et al., *Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health*. Adv Appl Microbiol, 2004. **56**: p. 1-64.
365. Schwarzer, M., et al., *Neonatal colonization of mice with Lactobacillus plantarum producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization*. Allergy, 2011. **66**(3): p. 368-75.
366. Kolida, S. and G.R. Gibson, *Synbiotics in health and disease*. Annu Rev Food Sci Technol, 2011. **2**: p. 373-93.
367. Wallace, D.C., *Colloquium paper: bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107 Suppl 2**: p. 8947-53.
368. Wallace, D.C., *Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 781-821.
369. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **94**(3): p. 311-21.
370. International Diabetes Federation, *International Diabetes Federation - Diabetes Atlas*, 2011.
371. Waugh, N., et al., *Screening for type 2 diabetes: literature review and economic modelling*. Health Technol Assess, 2007. **11**(17): p. iii-iv, ix-xi, 1-125.
372. Kanavos, P., S. van den Aardweg, and W. Schurer, *Diabetes expenditure, burden of disease and management in 5 EU countries*, L.S.o.E. LSE Health, Editor 2012.

373. Bringer, J., et al., *Prevalence of diagnosed type 2 diabetes mellitus in the French general population: the INSTANT study*. Diabetes Metab, 2009. **35**(1): p. 25-31.
374. Lecomte, P., et al., *Self-monitoring of blood glucose in people with type 1 and type 2 diabetes living in France: the Entred study 2001*. Diabetes Metab, 2008. **34**(3): p. 219-26.
375. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
376. Baker, R.G., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *NF- κ B, inflammation, and metabolic disease*. Cell Metab, 2011. **13**(1): p. 11-22.
377. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
378. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
379. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
380. Emanuelli, B., et al., *SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47944-9.
381. Zick, Y., *Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance*. Sci STKE, 2005. **2005**(268): p. pe4.
382. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 183-90.
383. Rui, L., et al., *SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42394-8.
384. Ueki, K., et al., *Positive and negative roles of p85 α and p85 β regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48453-66.
385. Burcelin, R., et al., *Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective*. Acta Diabetol, 2011. **48**(4): p. 257-73.
386. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 98-107.
387. Robertson, R.P., et al., *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S119-24.
388. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, *Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S16-21.
389. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
390. Hull, R.L., et al., *Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 3629-43.

391. Harding, H.P. and D. Ron, *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S455-61.
392. Donath, M.Y., et al., *Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(8): p. 455-70.
393. Ehres, J.A., et al., *Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction*. Arch Physiol Biochem, 2009. **115**(4): p. 240-7.
394. Donath, M.Y., et al., *Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy*. Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S161-4.
395. Masters, S.L., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 897-904.
396. Williamson, R.T., *On the Treatment of Glycosuria and Diabetes Mellitus with Sodium Salicylate*. Br Med J, 1901. **1**(2100): p. 760-2.
397. Hotamisligil, G.S., et al., *Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4854-8.
398. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
399. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
400. Pickup, J.C., et al., *NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X*. Diabetologia, 1997. **40**(11): p. 1286-92.
401. Spranger, J., et al., *Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 812-7.
402. Herder, C., et al., *Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg*. Gesundheitswesen, 2005. **67 Suppl 1**: p. S115-21.
403. Herder, C., et al., *Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study*. Diabetes Care, 2009. **32**(3): p. 421-3.
404. Pradhan, A.D., et al., *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*. JAMA, 2001. **286**(3): p. 327-34.
405. Shoelson, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine, *Inflammation and insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1793-801.
406. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 191-8.
407. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.

408. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
409. Eldor, R., et al., *Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5072-7.
410. Westwell-Roper, C., et al., *IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2755-65.
411. Maedler, K., et al., *Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8138-43.
412. Ehses, J.A., et al., *Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2356-70.
413. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
414. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
415. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 16-23.
416. Bhargava, P. and C.H. Lee, *Role and function of macrophages in the metabolic syndrome*. Biochem J, 2012. **442**(2): p. 253-62.
417. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
418. Elinav, E., et al., *Adoptive transfer of regulatory NKT lymphocytes ameliorates non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice and is associated with intrahepatic CD8 trapping*. J Pathol, 2006. **209**(1): p. 121-8.
419. Pickup, J.C., *Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 813-23.
420. Duncan, B.B., et al., *Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1799-805.
421. Moreira, A.P., et al., *Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia*. Br J Nutr, 2012. **108**(5): p. 801-9.
422. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
423. Elson, G., et al., *Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1574-83.
424. Wiedermann, C.J., et al., *Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(7): p. 1975-81.

425. Ghoshal, S., et al., *Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 90-7.
426. Laugerette, F., et al., *Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(1): p. 53-9.
427. Ghanim, H., et al., *Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(4): p. 940-9.
428. Erridge, C., et al., *A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1286-92.
429. Pussinen, P.J., et al., *Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes*. Diabetes Care, 2011. **34**(2): p. 392-7.
430. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.
431. Laugerette, F., et al., *Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation*. Biochimie, 2011. **93**(1): p. 39-45.
432. Amar, J., et al., *Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1219-23.
433. Harris, H.W., et al., *Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 1028-34.
434. Boroni Moreira, A.P. and R. de Cassia Goncalves Alfenas, *The influence of endotoxemia on the molecular mechanisms of insulin resistance*. Nutr Hosp, 2012. **27**(2): p. 382-90.
435. Dandona, P., et al., *Insulin suppresses endotoxin-induced oxidative, nitrosative, and inflammatory stress in humans*. Diabetes Care, 2010. **33**(11): p. 2416-23.
436. Mehta, N.N., et al., *Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 172-81.
437. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
438. de La Serre, C.B., et al., *Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(2): p. G440-8.
439. Suzuki, T. and H. Hara, *Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats*. Nutr Metab (Lond), 2010. **7**: p. 19.
440. Moser, S.A. and D.C. Savage, *Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(8): p. 3476-80.
441. Wexler, H.M., *Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 593-621.

442. Prouty, A.M., et al., *Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in Salmonella typhimurium*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 4): p. 775-83.
443. Begley, M., C.G. Gahan, and C. Hill, *The interaction between bacteria and bile*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(4): p. 625-51.
444. Lorenzo-Zuniga, V., et al., *Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats*. Hepatology, 2003. **37**(3): p. 551-7.
445. Raimondi, F., et al., *Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(4): p. G906-13.
446. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
447. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
448. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded?* Diabetes Care, 2010. **33**(10): p. 2277-84.
449. Cordain, L., et al., *Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(2): p. 341-54.
450. Meyer, D. and M. Stasse-Wolthuis, *The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health*. Eur J Clin Nutr, 2009. **63**(11): p. 1277-89.
451. Roberfroid, M., *Prebiotics: the concept revisited*. J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 830S-7S.
452. Verhoef, S.P., D. Meyer, and K.R. Westerterp, *Effects of oligofructose on appetite profile, glucagon-like peptide 1 and peptide YY3-36 concentrations and energy intake*. Br J Nutr, 2011. **106**(11): p. 1757-62.
453. Cani, P.D., et al., *Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study*. Eur J Clin Nutr, 2006. **60**(5): p. 567-72.
454. Fuentes, S., et al., *Administration of Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure*. Res Microbiol, 2008. **159**(4): p. 237-43.
455. Goossens, D.A., et al., *The effect of a probiotic drink with Lactobacillus plantarum 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(2): p. 255-63.
456. Matsuzaki, T., et al., *Antidiabetic effects of an oral administration of Lactobacillus casei in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice*. Endocr J, 1997. **44**(3): p. 357-65.
457. Tabuchi, M., et al., *Antidiabetic effect of Lactobacillus GG in streptozotocin-induced diabetic rats*. Biosci Biotechnol Biochem, 2003. **67**(6): p. 1421-4.

458. Yadav, H., S. Jain, and P.R. Sinha, *Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose fed rats*. Nutrition, 2007. **23**(1): p. 62-8.
459. Naito, E., et al., *Beneficial effect of oral administration of Lactobacillus casei strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice*. J Appl Microbiol, 2011. **110**(3): p. 650-7.
460. Angelakis, E. and D. Raoult, *The increase of Lactobacillus species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10463.
461. Khan, M., et al., *Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens*. Br Poult Sci, 2007. **48**(6): p. 732-5.
462. Armougom, F., et al., *Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7125.
463. Chouraqui, J.P., et al., *Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1365-73.
464. Guandalini, S., et al., *Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **30**(1): p. 54-60.
465. Moroti, C., et al., *Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 29.
466. Roselino, M.N., et al., *A potential synbiotic product improves the lipid profile of diabetic rats*. Lipids Health Dis, 2012. **11**(1): p. 114.
467. Begin-Heck, N., M. Bourassa, and H.M. Heick, *The effect of oxytetracycline on insulin resistance in obese mice*. Biochem J, 1974. **142**(3): p. 465-75.
468. Dalpe-Scott, M., H.M. Heick, and N. Begin-Heick, *Oxytetracycline treatment improves the response to insulin in the spontaneously diabetic (BB) rat*. Diabetes, 1982. **31**(1): p. 53-9.
469. Dubuc, P.U. and P.L. Willis, *Age dependent effects of oxytetracycline in ob/ob mice*. Diabetologia, 1978. **14**(2): p. 129-33.
470. Membrez, M., et al., *Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice*. FASEB J, 2008. **22**(7): p. 2416-26.
471. Ferrier, L., et al., *Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1148-54.
472. Bech-Nielsen, G.V., et al., *Manipulation of the gut microbiota in C57BL/6 mice changes glucose tolerance without affecting weight development and gut mucosal immunity*. Res Vet Sci, 2012. **92**(3): p. 501-8.
473. Ajslev, T.A., et al., *Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics*. Int J Obes (Lond), 2011. **35**(4): p. 522-9.

474. Thuny, F., et al., *Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9074.
475. Bartlett, J.G., *Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease*. Ann Intern Med, 2006. **145**(10): p. 758-64.
476. Amar, J., et al., *Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(9): p. 559-72.
477. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
478. Tanti, J.F., et al., *Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling*. Ann Endocrinol (Paris), 2004. **65**(1): p. 43-8.
479. Backhed, F., et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1915-20.
480. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
481. Keita, A.V., et al., *Increased uptake of non-pathogenic E. coli via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease*. J Pathol, 2008. **215**(2): p. 135-44.
482. Neal, M.D., et al., *Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3070-9.
483. Kufer, T.A., et al., *The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction*. Cell Microbiol, 2008. **10**(2): p. 477-86.
484. Weisberg, S.P., et al., *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 115-24.
485. Burcelin, R., et al., *Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(4): p. E834-42.
486. Riant, E., et al., *Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice*. Endocrinology, 2009. **150**(5): p. 2109-17.
487. Nadkarni, M.A., et al., *Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 1): p. 257-66.
488. Khan, I.U., et al., *Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable Escherichia coli from agriculture watersheds*. J Microbiol Methods, 2007. **69**(3): p. 480-8.
489. Crowell, D.N., W.S. Reznikoff, and C.R. Raetz, *Nucleotide sequence of the Escherichia coli gene for lipid A disaccharide synthase*. J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5727-34.
490. Rinttila, T., et al., *Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR*. J Appl Microbiol, 2004. **97**(6): p. 1166-77.

491. Matsuda, K., et al., *Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(1): p. 32-9.
492. Makivuokko, H., et al., *In vitro effects on polydextrose by colonic bacteria and caco-2 cell cyclooxygenase gene expression*. Nutr Cancer, 2005. **52**(1): p. 94-104.
493. Plaisancie, P., et al., *Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(4): p. G805-12.
494. El Homsí, M., et al., *Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(1): p. G365-73.
495. Mackey-Lawrence, N.M. and W.A. Petri, Jr., *Leptin and mucosal immunity*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(5): p. 472-9.
496. Hosoi, T., et al., *Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice*. PLoS One, 2010. **5**(9).
497. Gong, J., et al., *Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation*. Clin Immunol, 2010. **136**(2): p. 245-56.
498. Takeda, K. and S. Akira, *Toll receptors and pathogen resistance*. Cell Microbiol, 2003. **5**(3): p. 143-53.
499. Brandl, K., et al., *MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1891-900.
500. Vaishnava, S., et al., *The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine*. Science, 2011. **334**(6053): p. 255-8.
501. Preidis, G.A., et al., *Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 8-14.
502. Medellin-Pena, M.J., et al., *Probiotics affect virulence-related gene expression in Escherichia coli O157:H7*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(13): p. 4259-67.
503. Medellin-Pena, M.J. and M.W. Griffiths, *Effect of molecules secreted by Lactobacillus acidophilus strain La-5 on Escherichia coli O157:H7 colonization*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(4): p. 1165-72.
504. Pothoulakis, C., et al., *Saccharomyces boulardii inhibits Clostridium difficile toxin A binding and enterotoxigenicity in rat ileum*. Gastroenterology, 1993. **104**(4): p. 1108-15.
505. Castagliuolo, I., et al., *Saccharomyces boulardii protease inhibits Clostridium difficile toxin A effects in the rat ileum*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5225-32.
506. Miettinen, M., et al., *Lactobacilli and Streptococci activate NF-kappa B and STAT signaling pathways in human macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3733-40.
507. Grangette, C., et al., *Enhanced antiinflammatory capacity of a Lactobacillus plantarum mutant synthesizing modified teichoic acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10321-6.

508. Iyer, C., et al., *Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling*. Cell Microbiol, 2008. **10**(7): p. 1442-52.
509. Mazmanian, S.K., et al., *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system*. Cell, 2005. **122**(1): p. 107-18.
510. Lin, Y.P., et al., *Probiotic Lactobacillus reuteri suppress proinflammatory cytokines via c-Jun*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(8): p. 1068-83.
511. Petrof, E.O., et al., *Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. 1474-87.
512. Fukuda, S., et al., *Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters*. Gut Microbes, 2012. **3**(5).
513. Schnaitman, C.A. and J.D. Klena, *Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria*. Microbiol Rev, 1993. **57**(3): p. 655-82.
514. Allen, A.E., et al., *Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(11): p. 5343-8.
515. Lin, J.T. and V. Stewart, *Nitrate assimilation by bacteria*. Adv Microb Physiol, 1998. **39**: p. 1-30, 379.
516. Duplain, H., et al., *Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 342-5.
517. Cook, S., et al., *Partial gene deletion of endothelial nitric oxide synthase predisposes to exaggerated high-fat diet-induced insulin resistance and arterial hypertension*. Diabetes, 2004. **53**(8): p. 2067-72.
518. Hendriks, J., et al., *Nitric oxide reductases in bacteria*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 266-73.
519. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
520. Sinitskaya, N., et al., *Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(10): p. 417-25.
521. Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden, *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(3): p. 695-700.
522. Lopez, I., et al., *Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6801-7.
523. Braker, G., A. Fesefeldt, and K.P. Witzel, *Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 3769-75.
524. Braker, G. and J.M. Tiedje, *Nitric oxide reductase (norB) genes from pure cultures and environmental samples*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(6): p. 3476-83.

525. Amar, J., R. Burcelin, and C. Chabo, *Bacterial DNA as Markers of Cardiovascular and/or Metabolic Disease*, 2011, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) CHU de Toulouse.
526. Matsuki, T., et al., *Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(11): p. 5445-51.
527. Matsuki, T., et al., *Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(12): p. 7220-8.
528. Gueimonde, M., et al., *New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(7): p. 4165-9.
529. Suzuki, K., et al., *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1981-6.
530. Iacumin, L., et al., *Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages*. Syst Appl Microbiol, 2006. **29**(6): p. 480-6.
531. Saberssheikh, S. and N.A. Saunders, *Quantification of virulence-associated gene transcripts in epidemic methicillin resistant Staphylococcus aureus by real-time PCR*. Mol Cell Probes, 2004. **18**(1): p. 23-31.
532. Ishige, I., et al., *Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis*. Lancet, 1999. **354**(9173): p. 120-3.
533. Bartosch, S., et al., *Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(6): p. 3575-81.
534. Kindaichi, T., et al., *Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR*. Biotechnol Bioeng, 2006. **94**(6): p. 1111-21.
535. Maheux, A.F., et al., *Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of Escherichia coli/Shigella in water samples*. Water Res, 2009. **43**(12): p. 3019-28.
536. Cubero, J. and J.H. Graham, *Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate xanthomonas strains on citrus*. Phytopathology, 2005. **95**(11): p. 1333-40.
537. Diep, C.N., et al., *Isolation of Pseudomonas stutzeri in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment*. Bioresour Technol, 2009. **100**(16): p. 3787-91.
538. Kumita, W., et al., *Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of Pseudomonas putida*. J Infect Chemother, 2009. **15**(1): p. 6-12.
539. Whitby, P.W., et al., *Identification and detection of Stenotrophomonas maltophilia by rRNA-directed PCR*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(12): p. 4305-9.
540. Liu, L., et al., *Ribosomal DNA-directed PCR for identification of Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1210-3.

541. Coenye, T., et al., *Classification of Ralstonia pickettii-like isolates from the environment and clinical samples as Ralstonia insidiosa sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 4): p. 1075-80.
542. Coenye, T., P. Vandamme, and J.J. LiPuma, *Infection by Ralstonia species in cystic fibrosis patients: identification of R. pickettii and R. mannitolilytica by polymerase chain reaction.* Emerg Infect Dis, 2002. **8**(7): p. 692-6.
543. Sturgill, T.L., et al., *Effect of Propionibacterium acnes-containing immunostimulant on interferon-gamma (IFN γ) production in the neonatal foal.* Vet Immunol Immunopathol, 2011. **141**(1-2): p. 124-7.
544. Kalis, C., et al., *Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of Propionibacterium acnes.* J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4295-300.
545. Kobayashi, F., et al., *Biphasic protection against bacterial infection in mice induced by vaccination of Propionibacterium acnes.* Infect Immun, 1980. **27**(2): p. 391-6.
546. Handa, P., et al., *Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(12): p. 2827-35.
547. Katouli, M., et al., *Selective translocation of coliform bacteria adhering to caecal epithelium of rats during catabolic stress.* J Med Microbiol, 1997. **46**(7): p. 571-8.
548. Macfarlane, G.T. and S. Macfarlane, *Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria.* Scand J Gastroenterol Suppl, 1997. **222**: p. 3-9.
549. McGuckin, M.A., et al., *Mucin dynamics and enteric pathogens.* Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 265-78.
550. Zhou, Q.Q., et al., *Over-starvation aggravates intestinal injury and promotes bacterial and endotoxin translocation under high-altitude hypoxic environment.* World J Gastroenterol, 2011. **17**(12): p. 1584-93.
551. Deitch, E.A., J. Winterton, and R. Berg, *Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation.* Arch Surg, 1987. **122**(9): p. 1019-24.
552. Borgstrom, B., A. Dahlqvist, and G. Lundh, *On the site of absorption of fat from the human small intestine.* Gut, 1962. **3**: p. 315-7.
553. Tai, E.K., et al., *A new role for cathelicidin in ulcerative colitis in mice.* Exp Biol Med (Maywood), 2007. **232**(6): p. 799-808.
554. Hoebler, C., et al., *MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice.* Dig Dis Sci, 2006. **51**(2): p. 381-9.
555. Guang, W., et al., *Muc1 cell surface mucin attenuates epithelial inflammation in response to a common mucosal pathogen.* J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20547-57.
556. Inaba, Y., et al., *Expression of the antimicrobial peptide alpha-defensin/cryptidins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10-deficient mice.* Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(9): p. 1488-95.

557. Serra, S. and P.A. Jani, *An approach to duodenal biopsies*. J Clin Pathol, 2006. **59**(11): p. 1133-50.
558. Hornich, M., et al., *Enteric Escherichia coli infections. Morphological findings in the intestinal mucosa of healthy and diseased piglets*. Vet Pathol, 1973. **10**(6): p. 484-500.
559. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
560. Yamada, N., et al., *Epigenetic regulation of mucin genes in human cancers*. Clin Epigenetics, 2011. **2**(2): p. 85-96.
561. Prakash, R., et al., *Up-regulation of MUC2 and IL-1beta expression in human colonic epithelial cells by Shigella and its interaction with mucins*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27046.
562. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G941-50.
563. Smirnov, A., D. Sklan, and Z. Uni, *Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation*. J Nutr, 2004. **134**(4): p. 736-42.
564. Shirazi, T., et al., *Mucins and inflammatory bowel disease*. Postgrad Med J, 2000. **76**(898): p. 473-8.
565. Ding, S., et al., *High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12191.
566. Pollard, A.J., et al., *Differential post-transcriptional activation of human phagocytes by different Pseudomonas aeruginosa isolates*. Cell Microbiol, 2004. **6**(7): p. 639-50.
567. Kim, J.K., et al., *A novel pathway responsible for lipopolysaccharide-induced translational regulation of TNF-alpha and IL-6 expression involves protein kinase C and fascin*. J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6327-34.
568. Alverdy, J., O. Zaborina, and L. Wu, *The impact of stress and nutrition on bacterial-host interactions at the intestinal epithelial surface*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(2): p. 205-9.
569. Lee, S.K., et al., *[Anti-inflammatory Mechanism of Lactobacillus rhamnosus GG in Lipopolysaccharide- stimulated HT-29 Cell]*. Korean J Gastroenterol, 2012. **60**(2): p. 86-93.
570. Sonnenburg, J.L., et al., *Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1955-9.
571. Png, C.W., et al., *Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(11): p. 2420-8.
572. Moraes, L.A., L. Piqueras, and D. Bishop-Bailey, *Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation*. Pharmacol Ther, 2006. **110**(3): p. 371-85.
573. Castrillo, A. and P. Tontonoz, *Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 455-80.

574. Pamp, S.J., et al., *Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB)*. Genome Res, 2012. **22**(6): p. 1107-19.

REMERCIEMENTS

Je remercie profondément l'ensemble des membres de mon jury de thèse :

Monsieur **Rémy Burcelin**, qui m'a accueillie dans son laboratoire,

Mesdames **Muriel Thomas** et **Catherine Postic**, qui ont accepté d'être mes rapporteurs,

Madame **Vassilia Théodorou**, à qui je dois beaucoup et sans qui je ne serais surement pas là aujourd'hui,

Monsieur **Philippe Langella**, pour sa gentillesse,

et Monsieur le **Professeur Gérard Campistron**, qui m'a fait l'honneur d'être présent en ce jour si important pour moi.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'UMR1048 pour leur soutien, ainsi que les différents collaborateurs qui ont contribué à la génération des résultats présentés : Christelle Vachoux et Aurélie Waget de l'équipe 2, Jason Iacovoni et Marion Aguirrebengoa du plateau Bioinformatique, Lidwine Trouilh du plateau Biopuces, Pascal Martin du plateau Get-TRIX, Marie-Pierre Duviau et Muriel Mercier-Bonin de l'INSA de Toulouse, Catherine Robbe-Masselot du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille.

Je remercie la société Vaiomer d'avoir financé ma dernière année de thèse.

Enfin, je ne pourrais jamais assez remercier ma famille, mon mari et mes enfants pour m'avoir supportée et soutenue jusqu'à la fin de ce projet.

PUBLICATIONS

-Serino M, **Chabo C**, Burcelin R. **Intestinal MicrobiOMICS to define Health and Disease in Human and Mice**. Curr Pharm Biotechnol. 2012 Apr 1;13(5):746-58.

-Amar J, Serino M, Lange C, **Chabo C**, Iacovoni J, Mondot S, Lepage P, Klopp C, Mariette J, Bouchez O, Perez L, Courtney M, Marre M, Klopp P, Lantieri O, Doré J, Charles MA, Balkau B, Burcelin R; D.E.S.I.R. Study Group. **Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept**. Diabetologia. 2011 Dec;54(12):3055-61.

-Amar J, Burcelin R, **Chabo C** (INSERM, CHU de Toulouse) 2011 **BACTERIAL DNA AS MARKERS OF CARDIOVASCULAR AND/OR METABOLIC DISEASE**. EP2396425 <http://www.freepatentsonline.com/EP2396425A2.html>

-Burcelin R, Serino M, **Chabo C**, Blasco-Baque V, Amar J. **Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective**. Acta Diabetol. 2011 Dec;48(4):257-73.

-**Chabo C**, Amar J, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán L G, Smirnova N, Bergé M, Sulpice T, Lahtinen S, Ouwehand A, Langella P, Rautonen N, Sansonetti P J, Burcelin R. **Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment**. EMBO Molecular Medicine. 2011 Sep;3(9):559-72

-Burcelin R, Luche E, Serino M, **Chabo C**. **The intestinal flora: new concepts for the regulation of energetic metabolism**. Sang Thrombose Vaisseaux. 2009; 21, n°7 : 322-33.

-Serino M, Luche E, **Chabo C**, Amar J, Burcelin R. **Intestinal microflora and metabolic diseases**. Diabetes Metab. 2009 May 4.

-Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, **Chabo C**, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, Burcelin R. **Role of the central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing**. Diabetes. 2008 Oct; 57(10):2603-12.

-Eutamène H, Lamine F, **Chabo C**, Theodorou V, Rochat F, Bergonzelli GE, Corthésy-Theulaz I, Fioramonti J, Bueno L. **Synergy between Lactobacillus paracasei and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats**. Journal of nutrition. 2007 Aug;137(8):1901-7.

-Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, **Chabo C**, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. **Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance**. Diabetes. 2007 Jul; 56(7):1761-72.

-Ferrier L, Bérard F, Debrauwer L, **Chabo C**, Langella P, Bueno L, Fioramonti J. **Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents**. American Journal of Pathology. 2006 Apr;168(4):1148-54.

ABSTRACT

Metabolic diseases such as type 2 diabetes are a major public health issue. A low grade chronic inflammatory reaction is one of the mechanisms appearing early during the development of these diseases. We hypothesized that bacteria could be a direct triggering factor of metabolic inflammation. First, we discovered the existence of a physiological infection. Moreover we found in mice an increased translocation of commensal bacteria towards blood and adipose tissue, before the onset of high-fat diet-induced diabetes, providing a putative direct cellular link between intestinal microbiota and metabolic inflammation. This bacterial translocation was prevented in mice lacking receptors for bacterial patterns NOD1 or CD14, but conversely increased in ob/ob or MyD88-deficient mice. Moreover, a probiotic treatment with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, or with *Lactococcus lactis* delivering active leptine, was able to prevent metabolic infection and inflammation as well as diabetes. We then confirmed in man the existence of a physiological bacteremia. Bacterial DNA was moreover identified as a positive marker of metabolic diseases. Analysis of this microbiota shown a decrease in Gram positive bacteria and an increase in Gram negative ones, as well as an increase in NO reductase-expressing bacteria, in diabetics. These results were confirmed in mice. Moreover, mucus quantity and quality of its glycosylations were modified before diabetes, along with a decrease in defensins' expression, a loss of physiological inflammation and increased transcellular permeability.

Auteur : Chantal VERGELY CHABO

Titre : La relation hôte-microbiote dans le développement du diabète de type 2 : du mutualisme au parasitisme métabolique

Directeur de thèse : Pr Rémy BURCELIN

Date et lieu de soutenance : 23 novembre 2012 – Université Toulouse III – Paul SABATIER

Résumé : Le diabète de type 2 est associé à une inflammation chronique de bas niveau et nous avons pensé que la présence de bactéries pouvait alimenter cette inflammation. Après la découverte d'une infection physiologique, nous avons révélé une augmentation de la translocation de bactéries commensales dans le tissu adipeux et le sang, avant l'apparition d'un diabète induit par un régime gras chez la souris. Cette translocation bactérienne était prévenue chez des souris déficientes pour NOD1 ou CD14, mais au contraire augmentée chez les souris ob/ob ou déficientes pour MyD88. De plus, un traitement probiotique avec *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, ou *Lactococcus lactis* délivrant de la leptine active ont prévenu l'infection métabolique, l'inflammation et le diabète. Nous avons ensuite confirmé chez l'homme l'existence d'une bactériémie physiologique. L'ADN bactérien sanguin a été de plus identifié comme marqueur positif du diabète. L'étude du microbiote sanguin humain a montré une diminution des bactéries à Gram positif et une augmentation de celles à Gram négatif, ainsi qu'une présence accrue d'ADN codant pour des réductases du NO, chez les patients diabétiques. Ces résultats ont été confirmés chez la souris. De plus, le mucus était modifié dans l'iléon avant l'apparition du diabète, avec une baisse de l'expression des défensines, une perte de l'inflammation physiologique des entérocytes et une augmentation de la perméabilité transcellulaire. Un comportement parasite de la part de bactéries normalement commensales a été ainsi mis en lumière avant le développement du diabète chez la souris.

Mots-clés : Diabète de type 2 ; Microbiote intestinal ; Translocation bactérienne ; Mucus ; Probiotiques ; Mutualisme ; Parasitisme

Discipline administrative : Biotechnologies, Pharmacologie

Ecole doctorale : Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Intitulé et adresse du laboratoire : INSERM U1048 Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, CHU Rangueil, Toulouse, France