

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2017

THESES 2017/ TOU3/ 2004

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Laure FRAYSSINHES

**IMPLICATION DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA SANTE ET ENJEUX
THERAPEUTIQUES**

Le 3 Février 2017

Directeur de thèse : Cendrine CABOU DI BARADAT

JURY

Président: Cécile ARELLANO
1er assesseur : Cendrine CABOU DI BARADAT
2ème assesseur : Nancy AFONSO

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2015

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maitres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERAÈVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. Olichon A.	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2015

Remerciements

A mon jury,

A ma directrice de thèse, **Madame CABOU**, pour l'honneur que vous me faites à diriger ce travail. Je vous remercie très sincèrement pour votre disponibilité, vos conseils toujours avisés, et la confiance que vous m'avez accordée.

A **Madame ARELLANO**, qui a été présente tout le long de mes études et qui me fait l'honneur de présider ce jury en ce jour important qui concrétise la fin de mes études.

A **Madame AFONSO**. Nancy, merci sincèrement d'avoir accepté de juger mon travail. Merci de ta disponibilité.

A ma famille,

Moumoune et Papounet, merci pour votre soutien sans faille ! Vous avez toujours cru en moi et je vous en suis éternellement reconnaissante. Finalement, 8 ans et une thèse, ce n'était pas la mer à boire, même si je pense que parfois vous avez été plus stressé que moi ! Merci d'être là ce jour, une page se tourne, et comme dirait papou, une chose de faite... !

A Bob, tu m'as toujours encouragée dans ce long parcours. Tous nos projets professionnels longuement discutés au téléphone vont pouvoir se concrétiser...appelle les cousins l'heure a sonnée !

A mon Amour, Bertrand. Merci d'être avec moi depuis le début, de m'avoir encouragée et supportée pendant les périodes de révisions, tu étais en première ligne et cela n'a pas été toujours facile ! On avance maintenant vers de nouvelles aventures, ensemble tout me paraît possible !

A mon amie, Laurie, avec qui tout a commencé et qui a fini par prendre de l'avance ! Merci pour tous tes conseils précieux et les grands moments passés ensemble... Je pense à la prépa, à la soirée post-concours, au wei...mais on ne dira pas tout !

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des tableaux.....	8
Tables des abréviations.....	9
Introduction.....	11
Chapitre 1 - Le microbiote intestinal	13
I. Quelques définitions	13
A. Notion de microbiote	13
B. Notion de microbiome	13
C. Notion de métagénome	13
D. Notion sur la taxonomie en bactériologie	14
II. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal	14
A. Les techniques de cultures.....	14
B. Séquençage de la sous-unité 16S ribosomique	15
C. La métagénomique.....	16
D. La métatranscriptomique.....	16
E. Autres méthodes	16
III. Composition du microbiote intestinal.....	18
A. Description générale	18
B. Description des principaux phylums.....	21
1. Phylum des Firmicutes.....	21
2. Phylum des Bacteroïdetes	23
3. Phylum des Actinobacteria.....	23
4. Phylum des Proteobacteria	24
IV. Origine et développement du microbiote intestinal.....	26
A. Origine du microbiote intestinal	26
B. Facteurs influençant la composition du microbiote.....	26
1. Facteurs propres à l'individu	26
2. Mode d'accouchement.....	27
3. L'alimentation.....	28
a) Lait maternel et lait infantile	28
b) Alimentation de l'adulte.....	30
4. L'environnement	31

5.	Exposition aux antibiotiques.....	31
Chapitre 2 -	Le microbiote intestinal impliqué dans la santé de l'hôte	33
I.	Les fonctions du microbiote intestinal	33
A.	Fonction protectrice.....	34
1.	Maintien de l'intégrité cellulaire	34
2.	Protection contre les bactéries pathogènes	34
B.	Fonctions métaboliques et nutritionnelles	35
1.	Métabolisme des glucides.....	35
2.	Métabolisme des lipides.....	38
3.	Métabolisme des protéines	39
4.	Mécanismes de régulation de la balance énergétique	39
5.	Synthèse de facteurs vitaminiques	42
C.	Fonction immunologique	43
1.	Le système immunitaire intestinal.....	43
a)	Immunité innée	44
b)	Immunité adaptative	45
2.	Immunité et microbiote intestinal.....	45
II.	Dysbioses et pathologies	47
A.	L'obésité.....	47
1.	Définition.....	47
2.	Epidémiologie	47
3.	Facteur causal et facteur de risque.....	48
4.	Le microbiote intestinal dans l'obésité	48
5.	Mécanismes.....	50
a)	Mécanismes métaboliques	50
b)	Inflammation de bas grade	50
B.	Les allergies alimentaires.....	53
1.	Définition.....	53
2.	Epidémiologie et prévalence	54
3.	Signes cliniques	55
4.	Implication du microbiote	56
a)	Profil du microbiote.....	56
b)	Mécanisme	57

Chapitre 3 - Approches thérapeutiques	60
A. Probiotiques, Prébiotiques et Symbiotiques	60
1. Définition	60
a) Les probiotiques	60
b) Les prébiotiques et symbiotiques	60
2. Réglementation	61
3. Classifications et propriétés	62
4. Utilisations actuelles des probiotiques	62
5. Mode d'action.....	63
6. Obésité et allergies	64
a) Probiotiques et obésité	64
b) Prébiotiques et obésité	66
c) Probiotiques et allergies	68
d) Prébiotiques et allergies	71
7. Conclusion sur l'utilisation des prébiotiques et probiotiques.	71
a) Conseil à l'officine et discussion	72
B. La transplantation de microbiote fécal.....	73
1. Définition et contexte	73
2. Réglementation	73
3. La transplantation	74
4. La transplantation fécale dans l'obésité.	78
5. La transplantation fécale dans les allergies	81
Conclusion.....	82
Bibliographie.....	84

Liste des figures

Figure 1 : Taxonomie.....	14
Figure 2 : Le microbiote du tractus digestif [7].....	18
Figure 3 : Phylums principaux	20
Figure 4 : Entérotypes	21
Figure 5 : <i>Lactobacillus casei</i>	22
Figure 6 : <i>Prevotella multisaccharivorax</i>	23
Figure 7 : <i>Bifidobacterium bifidum</i>	23
Figure 8 : <i>Escherichia coli</i>	24
Figure 9 : Influence de l'accouchement sur la composition du microbiote.....	27
Figure 10 : Le régime alimentaire modifie le microbiome du lait maternel.....	30
Figure 11 : Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal.....	31
Figure 12: Fonctions du microbiote intestinal [21]	33
Figure 13: Potentiel digestif du microbiote humain [29].....	36
Figure 14 : Schéma de la digestion des glucides	37
Figure 15: Produits issus de la fermentation [30].....	38
Figure 16: Mécanismes de régulation du métabolisme énergétique par le microbiote intestinal [30]	41
Figure 17: Système immunitaire intestinal (Magalhaes et al 2007)	44
Figure 18 : Fonctions du microbiote intestinal	46
Figure 19 : Echelle IMC	47
Figure 20 : Ratio firmicutes/bacteroïdetes	48
Figure 21 : Définition de l'allergie alimentaire (d'après l'OMS).....	54
Figure 22 : Enfant atteint de dermatite atopique.....	56
Figure 23 : Profil des réponses immunes	58
Figure 24 : Equilibre des réponses Th1/Th2.....	59
Figure 25 Exemples de compléments alimentaires probiotiques.....	61
Figure 26 Exemples de médicaments probiotiques.....	63
Figure 27 Structure chimique de l'acide linoléique et ALC.....	65
Figure 28 : Les prébiotiques diminuent l'inflammation [41].....	67
Figure 29 : Effet de <i>Lactobacillus GG</i> sur l'acquisition de la tolérance chez les enfants allergiques au lait de vache.	69
Figure 30 : Effet du transfert de flore fécale.....	80

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison des différentes techniques d'études	16
Tableau II : Classification des espèces du microbiote intestinal.....	25
Tableau III : Composition du microbiote selon l'alimentation du nouveau-né	29
Tableau IV : Synthèse vitaminique du microbiote.....	42
Tableau V : Manifestations cliniques de l'allergie alimentaire (Ancelin 2004).....	55
Tableau VI : Questionnaire de présélection (ANSM).....	75
Tableau VII : Liste des agents infectieux à dépister chez les donneurs (ANSM).....	76
Tableau VIII : Questionnaire de sélection (ANSM)	77

Tables des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

AMPK : Protéine kinase d'adénosine monophosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

CAZymes : Carbohydrate-active enzymes

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

EAACI : Académie Européenne d'Allergologie et d'Immunologie Clinique

EHCF : Extensively hydrolyzed casein formula

FIAF : Fast-Induced adipocyte Factor

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue

GH : Glycoside-hydrolases

GPR : Récepteurs couplés aux protéines G

HMP : Human Microbiome Project

IgA : Immunoglobulines A

IgG : Immunoglobulines G

IMC : index de masse corporelle (BMI= Body mass index)

LPL: Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharide

MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

MAMP : Microbe Associated Molecular Pattern

MetaHit : Metagenomics of the Human Intestinal Tract

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PL: polysaccharide-lyases

PRR : Pattern Recognition Receptor

Th1, Th2, Th17 : Lymphocytes T effecteurs de type 1, 2, 17

TLR : Toll-like receptors

Treg : Lymphocytes T régulateurs

Introduction

Historiquement, les microorganismes étaient vus comme des éléments étrangers déclenchant des maladies lorsqu'ils colonisaient le corps humain. Avec les progrès de la recherche, les scientifiques ont montré que non seulement tous les microorganismes ne sont pas des pathogènes mais qu'en plus notre propre corps coexiste en permanence avec bon nombre d'entre eux. Les chercheurs ont mis en évidence que notre organisme vit en symbiose avec plusieurs milliards de bactéries, bien implantées à différents endroits du corps comme la peau, la sphère ORL, le vagin et le tractus digestif en formant de véritables écosystèmes. La compréhension de cette relation étroite, dont les deux partis tirent profit, est devenue un véritable axe de recherche. Cet ensemble de microorganismes peuplant une partie du corps, anciennement appelé flore, est dorénavant appelé microbiote. Le microbiote intestinal est de loin le plus important du corps humain et est donc une piste de recherche particulièrement intéressante.

Récemment, les progrès de la biologie moléculaire ont permis de décrypter ce microbiote et d'avoir une idée de sa composition qualitative et quantitative. Des travaux de grande ampleur sur le sujet ont été menés de façon internationale et ont permis d'avancer l'existence de trois grands types de microbiote, appelés des entérotypes, caractérisés par leur composition spécifique en certains genres bactérien.

La première partie de cette thèse sera centrée sur la présentation du microbiote intestinal : Qu'est-ce que le microbiote intestinal ? De quoi est-il constitué ? Quel est son origine et quels sont les facteurs le déterminant ?

Les nombreuses données bibliographiques ont permis de résoudre, du moins en parti, ces interrogations. L'objectif principal de ces études sur le microbiote intestinal est de comprendre ses implications sur la santé de l'hôte. En effet, il a été montré que microbiote intestinal exerce des effets bénéfiques sur l'organisme, notamment par ses fonctions protectrice, métabolique et immunologique. Ces trois fonctions principales sont possibles lorsque le microbiote intestinal est équilibré, on parle

d'eubiose. Toutefois, un déséquilibre du microbiote tel qu'une altération de sa composition, on parle alors de dysbiose, a été montré dans différentes pathologies, qu'elles soient métaboliques, auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses.

La deuxième partie de cette thèse présentera les fonctions bénéfiques du microbiote intestinal sur l'hôte et nous étudierons comment une dysbiose peut être impliquée dans les cas de l'obésité et des allergies alimentaires.

Comprendre les rouages de l'interaction entre le microbiote et l'hôte nous emmène au troisième point capital : la modulation du microbiote intestinal peut-elle constituer une approche thérapeutique viable ? Deux grandes techniques de modulation font l'objet de recherches actuelles, l'utilisation des probiotiques d'une part, et d'autre part une technique encore méconnue mais pourtant prometteuse, le transfert de flore fécale. Ces différents moyens de modifier la composition du microbiote font l'objet de nombreuses recherches cliniques et constitueraient une révolution dans l'approche thérapeutique conventionnelle si leur efficacité était démontrée.

Chapitre 1 - Le microbiote intestinal

I. Quelques définitions

A. Notion de microbiote

Le corps humain enferme en son sein et cohabite avec des milliards de bactéries. On parle de relation symbiotique, car plus que de la cohabitation, cette flore et son hôte ont besoin l'un de l'autre pour survivre. Ces microorganismes résident à différents endroits de l'organisme ; anciennement appelée « flore » on appelle maintenant microbiote l'ensemble des microorganismes constitutifs d'un milieu donné. On retrouve quatre microbiotes principaux : cutané, respiratoire, génital et digestif.

Le microbiote intestinal est le plus dense et le plus complexe d'entre eux. Il désigne l'ensemble des microorganismes tapissant les 400m² de surface intestinale. Ces bactéries entretiennent une relation privilégiée avec les cellules intestinales de l'hôte et avec les nutriments transitant par le tractus gastro-intestinal.

Tout au long de cette thèse, je parlerai de « microbiote » comme référence au microbiote intestinal.

B. Notion de microbiome

Les microorganismes, par l'intermédiaire des produits d'expression de leur génome interagissent avec l'hôte et l'environnement. Le terme de microbiome correspond à l'ensemble du génome exprimé par le microbiote.

C. Notion de métagénome

Le métagénome est l'ensemble du matériel génétique, c'est-à-dire le génome de l'Homme associé au microbiome. La métagénomique utilise des méthodes de séquençage ADN afin d'identifier des gènes et leur expression.

D. Notion sur la taxonomie en bactériologie

Nous allons prochainement entrer dans la description du microbiote intestinal, il est important de bien distinguer la classification scientifique des bactéries.

La taxonomie est la science qui en biologie étudie la classification des êtres vivants. La classification actuelle comprend le règne, l'embranchement (ou phylum), la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. L'espèce constitue l'unité de base dans la classification du vivant.

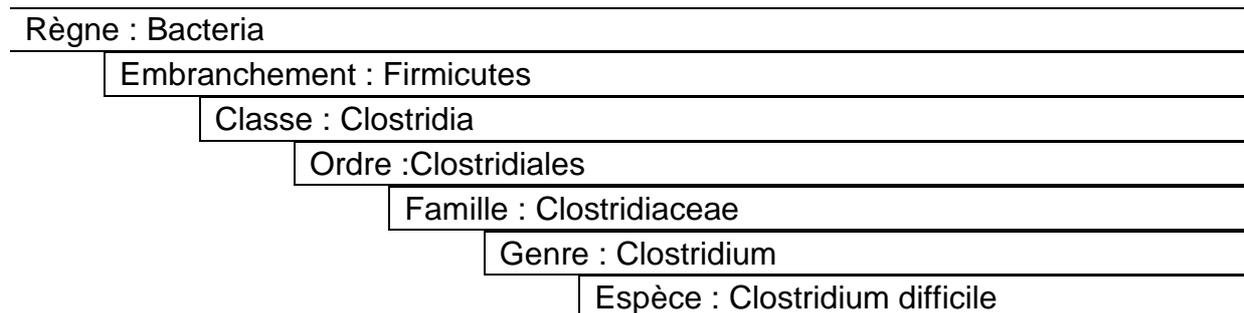


Figure 1 : Taxonomie

Cette figure permet d'illustrer un exemple de taxonomie, on peut voir que l'espèce Clostridium difficile, appartient au genre des Clostridium et au phylum des Firmicutes.

II. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal

Pour pouvoir définir la composition du microbiote intestinal il est nécessaire de disposer de techniques permettant de rechercher et d'analyser les différents microorganismes. Ces techniques ont beaucoup évoluées ces dernières années, cela a permis d'affiner notre connaissance du microbiote intestinal et cela explique également les divergences que l'on peut retrouver dans les publications scientifiques, en effet selon la technique employée on peut mettre en évidence de nouvelles bactéries ou quantifier plus ou moins précisément les gènes exprimés.

A. Les techniques de cultures.

Les premières études s'intéressant au microbiote intestinal ont utilisé des méthodes basées sur la culture in vitro pour identifier les espèces dominantes. Le microbiote

était alors étudié par l'intermédiaire du microbiote fécal, les techniques de culture permettaient ensuite d'isoler une souche bactérienne puis de la cultiver. Le développement de la culture en milieu anaérobie a notamment permis d'identifier certaines espèces bactériennes.

Moore et Holdeman [1] ont ainsi identifié en 1974 cinq genres bactériens dominants : Bacteroides (Phylum des Bacteroidetes), Eubacterium (Phylum des Actinobacteria), Fusobacterium (Phylum des Firmicutes), Peptostreptococcus (Phylum des Firmicutes) et Bifidobacterium (Phylum des Actinobacteria).

Ces techniques de culture présentent certaines limites. En effet, une espèce sous représentée était très difficilement identifiable et les milieux de culture disponibles n'étaient pas adaptés au développement de toutes les bactéries de part l'anaérobiose ou encore le manque de certains nutriments. Entre le prélèvement de l'échantillon et les manipulations pour la culture et ensuite l'identification, la composition pouvait être modifiée entraînant de faux résultats. Il a été estimé qu'environ 60% du microbiote n'est pas cultivable [2].

B. Séquençage de la sous-unité 16S ribosomique

Les progrès des techniques de biologie moléculaires ont permis une nouvelle approche pour l'étude du microbiote intestinal. La majorité des techniques moléculaires sont basées sur l'utilisation de l'acide ribonucléique ribosomique 16S (ARNr 16S). Cette structure est présente chez toutes les bactéries, elle présente des régions très conservées et d'autres hypervariables, leur comparaison va donc permettre de différencier les espèces.

Le séquençage consiste à extraire l'ADN des bactéries puis à amplifier l'ADNr 16S codant pour l'ARNr 16S et à le séquencer. Deux grands projets, MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) en Europe [3] et the Human Microbiome Project (HMP) [4] ont utilisés des nouvelles techniques de séquençage afin de constituer une base de données référençant les gènes du métagénome intestinal humain. En comparant les séquences obtenues à cette base il est possible d'identifier les bactéries en présence.

C. La métagénomique

La métagénomique permet de caractériser un ensemble de gènes d'une communauté. La métagénomique permet un séquençage direct de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) microbien extrait d'un milieu donné. Contrairement à l'étude de l'ARN 16S, la métagénomique ne nécessite pas d'amplification de gène.

Cette méthode présente également des limites puisque bien que l'on puisse déterminer quels gènes sont présents, on ne peut savoir si ceux-ci sont exprimés ou non et quelle est leur fonction [5]

D. La métatranscriptomique

Cette technique permet l'analyse directe des ARN de l'ensemble des microorganismes contenus dans un échantillon. Cela permet de contourner l'obstacle de la métagénomique, c'est-à-dire que cette technique permet d'analyser l'expression des gènes pour déterminer l'activité des bactéries. Toutefois, l'instabilité de l'ARNm rend cette technique difficile. [5]

E. Autres méthodes

Des techniques comme la métaprotéomique (étude des protéines) et métabolomique (étude des métabolites) peuvent également être employées

Le tableau ci-dessous résume les avantages et limites des techniques citées :

Tableau I : Comparaison des différentes techniques d'études

Technique	Avantages	Limites
Culture	Ne prend en compte que les bactéries vivantes	-Peu de bactéries cultivables -Méthode de comptage -Conditions de conservation des échantillons
Séquençage ARNr 16S	Permet d'identifier des espèces bactériennes	Technique faiblement quantitative

Technique	Avantages	Limites
Métagénomique	<ul style="list-style-type: none"> -Permet d'observer la composition microbienne sans amplification -Détece les gènes présents dans un échantillon -Permet de comparer des profils génomiques entres échantillons 	Ne donne pas d'information sur l'expression des gènes
Métatranscriptomique	<ul style="list-style-type: none"> -Détece l'expression des gènes -Compare l'expression des gènes entre deux échantillons 	Difficulté de mise en oeuvre, stabilité de l'ARNm
Métaprotéomique	<ul style="list-style-type: none"> -Détece des profils protéiques -Permet de comparer la production de protéines entre deux échantillons 	Difficulté de mise en oeuvre
Métabolomique	<ul style="list-style-type: none"> - Détece des profils métaboliques - Permet de comparer les métabolites entre deux échantillons 	Métabolites de l'hôte et du microbiote mélangés

III. Composition du microbiote intestinal

A. Description générale

Le nombre de microorganismes constituant le microbiote intestinal est de l'ordre de 10^{12} à 10^{14} soit 2 à 10 fois plus que le nombre de cellules qui constituent notre corps, pour un poids de 2 kilos. [6]

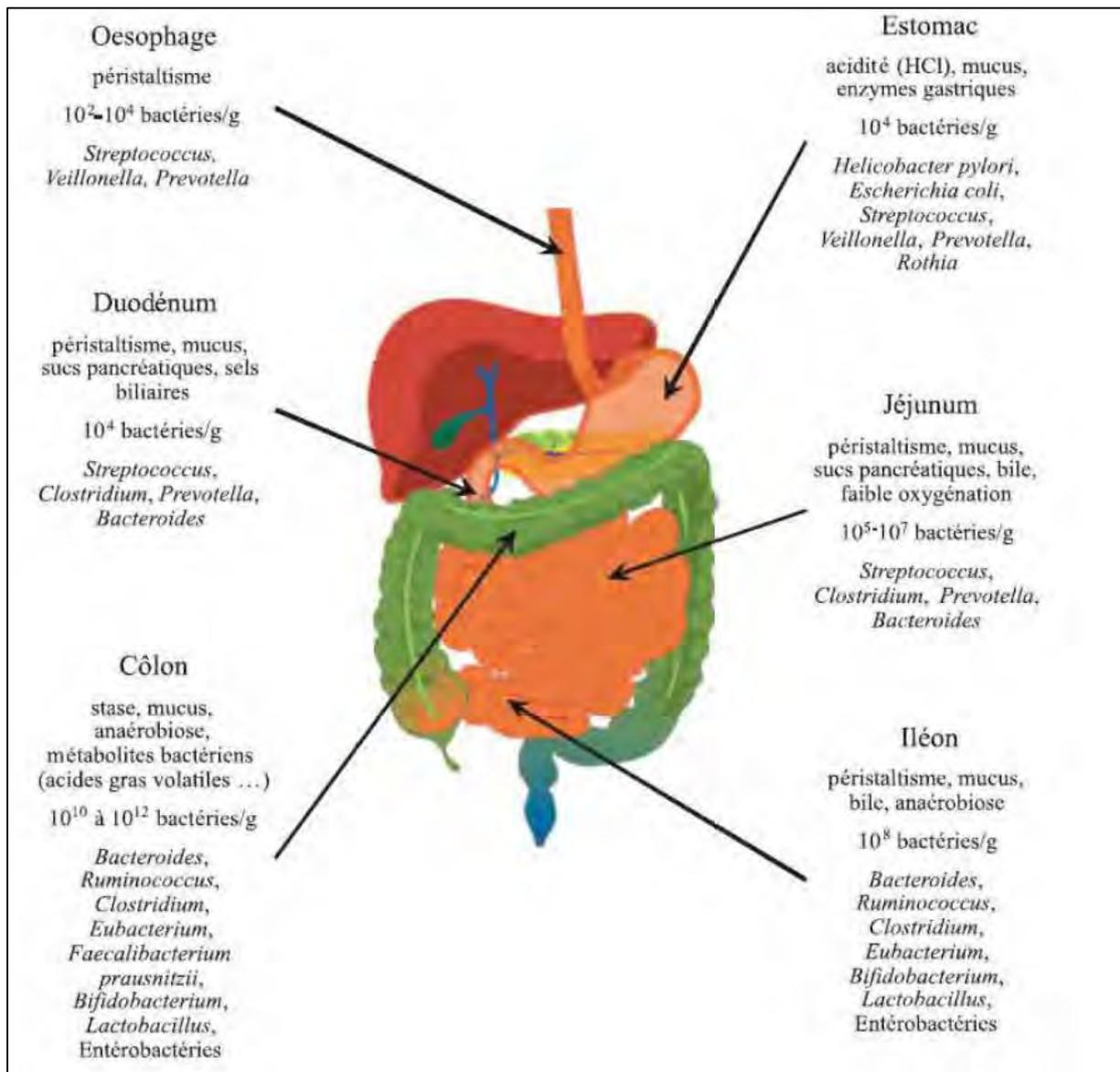


Figure 2 : Le microbiote du tractus digestif [7]

Cette figure illustre les principales espèces bactériennes et leur proportion au cours du tractus gastro-intestinal.

La bouche présente de nombreux germes, il s'agit essentiellement de germes issus des aliments. L'œsophage possède une flore résidente constituée essentiellement de bactéries appartenant au Phylum des Firmicutes (*Streptococcus*) et Bacteroïdètes (*Prevotella*). L'estomac, du fait de son acidité ne présente pas un grand nombre de germes, les plus caractéristiques sont les Proteobactéries avec majoritairement le genre *Helicobacter pylori* (notamment à l'origine des ulcères gastroduodénaux) mais également *Escherichia*.

L'important péristaltisme de l'intestin grêle entraîne une diminution de la teneur en oxygène jusqu'à se retrouver en condition d'anaérobiose au niveau de l'iléon et du côlon ; parallèlement le nombre de bactéries s'intensifie. Le plus grand nombre de bactéries se retrouve au niveau du côlon (de 10^{10} à 10^{12} CFU/g de contenu), d'après Ley et al [8], cela représente 70% des microorganismes du corps humain. Le côlon présente majoritairement les phylums Firmicutes (genre *Clostridium*, *Eubacterium* et *Ruminococcus*) et Bacteroïdètes (genre *Bacteroides*). On trouve également les phylums Actinobacteria (genre *Bifidobacterium*) et Proteobacteria (famille des *enterobactéries*).

En 2005, Eckburg et al [6] ont montré que le microbiote intestinal présentait 5 phylums principaux, majoritairement les Firmicutes et les Bacteroïdètes suivi par les Actinobacteria, Fusobacteria et Proteobacteria.

Cela a été corroboré ultérieurement par d'autres études utilisant des techniques d'analyse différentes. Andersson et son équipe [9], en utilisant une méthode de séquençage récente a retrouvé les mêmes phylums principaux. Le phylum des Firmicutes représentait plus de 80% des bactéries avec une forte proportion du genre Clostridia. Comparé à l'étude précédente, c'est le phylum des Actinobacteria avec une forte représentation du genre *Bifidobacterium* qui suivait les Firmicutes devant les Bacteroïdètes. Cette inversion de l'ordre communément admis pourrait s'expliquer par des variations interindividuelles et par les spécificités de la technique employée qui présentait une affinité pour les Actinobacteria.

Plus récemment, Peris-Bondia [10] en utilisant des techniques modernes de séquençage de la sous unité ribosomique 16S couplé à de la cytométrie en flux a relevé également 4 phylum majoritaires: Firmicutes (86%), Bacteroïdètes (9%), Proteobacteria (1%) et Actinobacteria (1%).

Ces études confirment donc la présence de 4 phylums principaux, toutefois la composition quantitative exacte reste difficile à déterminer et dépendante de la méthode d'analyse employée.

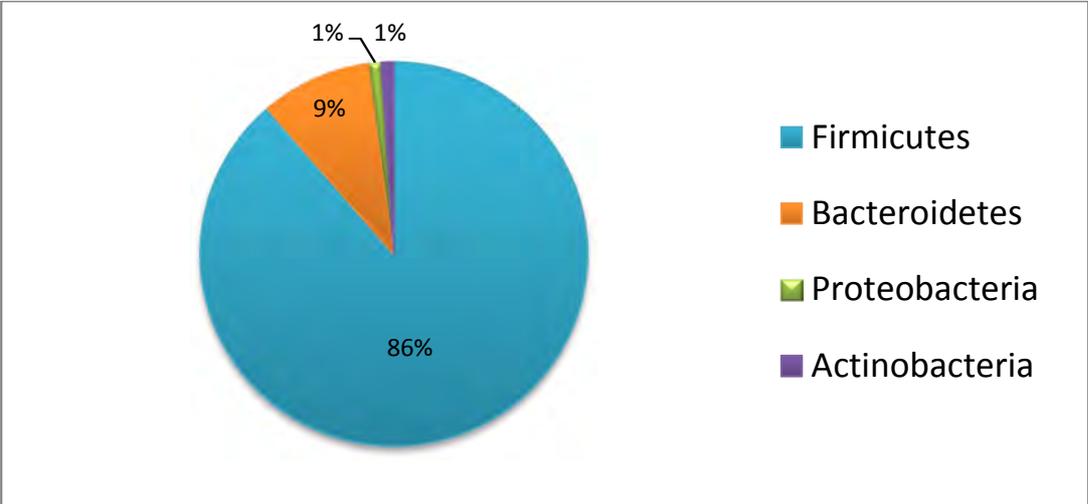


Figure 3 : Phylums principaux

Représentation des 4 phylums principaux du microbiote intestinal dans les proportions décrites par Peris-Bondia.

L'étude MetaHIT [3] a identifié un total de 3,3 millions de gènes différents appartenant à plus de 1000 espèces différentes principalement d'origine bactérienne. Elle a également montré que le microbiote intestinal est propre à chaque individu, il est unique sur le plan quantitatif et qualitatif. Un individu présente environ 160 espèces de bactéries, une moitié est communément retrouvée d'un individu à l'autre, toutefois on distingue trois entérotypes principaux selon la nature des espèces qui prédomine dans le microbiote: *Bacteroides* (phylum des Bacteroidetes) *Prevotella* (phylum des Bacteroidetes) et *Ruminococcus* (ordre des *clostridiales* phylum des Firmicutes). Un entérotype représente une « signature » bactérienne. Chaque individu appartient à un entérotype de même qu'il appartient à un groupe sanguin, cependant il n'est pas dicté par la génétique mais plutôt par notre alimentation, comme nous le détaillerons ultérieurement.

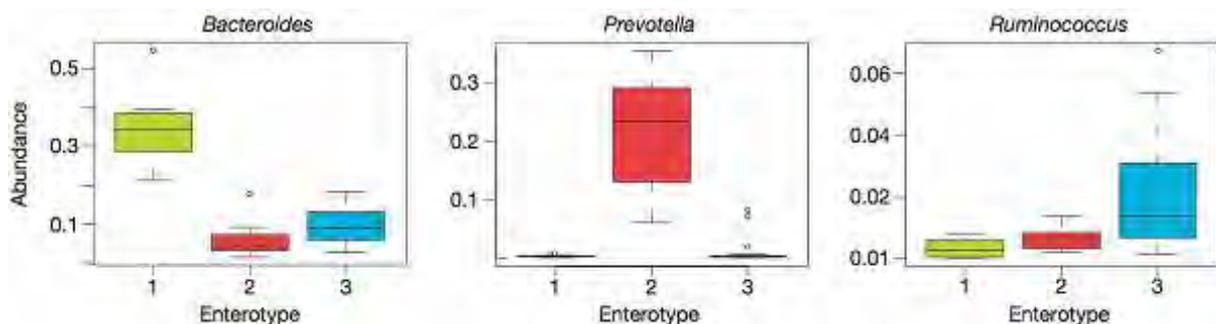


Figure 4 : Entérotypes

Le graphique ci-dessus issu montre l'abondance des 3 grandes familles dont 2 du phylum des Bacteroidetes et une du phylum des Firmicutes dans chacun des 3 entérotypes.

B. Description des principaux phylums

1. Phylum des Firmicutes

Les Firmicutes sont des bactéries à Gram positif. Ce phylum contient trois classes : les Clostridia, les Mollicutes et les Bacilli. Il s'agit du phylum le plus représenté dans le microbiote intestinal.

-Les *clostridiales* : il s'agit d'un ordre appartenant à la classe des Clostridia. Très représentées au sein du microbiote, les *clostridiacées* sont des bacilles anaérobies

strictes et de ce fait sont présentes au niveau du côlon. Certaines espèces sont responsables d'infection grave comme *Clostridium difficile*.

-Les *lactobacillales* : Il s'agit d'un ordre appartenant à la classe des Bacilli. Plusieurs familles sont particulièrement représentées dans le microbiote.

- La Famille des *Lactobacillales* est connue pour son utilisation en tant que

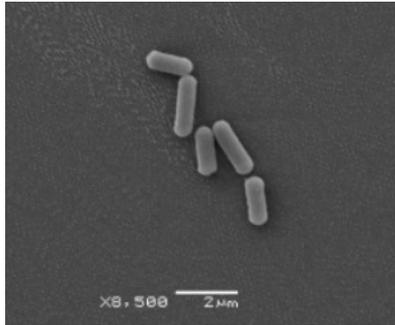


Figure 5 : *Lactobacillus casei*

probiotique, notamment *L.acidophilus*, *L.helveticus* ou *L.casei*. Il s'agit de bactéries à Gram positif commensaux du microbiote vaginal et intestinal. Des études sembleraient prouver le bénéfice de ces bactéries sur la santé humaine, toutefois cela n'a pas été confirmé et les dernières études sur la composition du microbiote n'indiquent pas que ces bactéries soient prédominantes dans le microbiote.

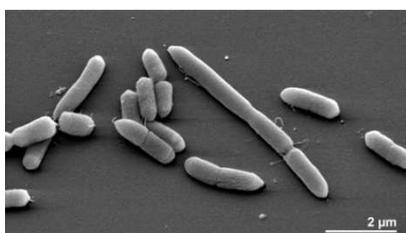
- Famille des *enterococcées* : le genre retrouvé dans le microbiote est le genre *Enterococcus*. Ce sont des cocci à Gram positif, les deux espèces majoritaires sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Ils sont assez résistants aux acides, ce qui leur permet de passer la barrière stomacale. Ce sont des commensaux minoritaires, ils peuvent devenir des pathogènes opportunistes et présentent certaines souches antibiorésistantes.
- Famille des *Streptococcées* : Le genre *Streptococcus* contient de nombreuses espèces commensales de l'intestin, notamment au niveau de la partie haute du système digestif comme *S.salivarius* et *S.mitis*. Certaines espèces ont un fort pouvoir pathogène, *S.pyrogenes*, *S.pneumoniae* ou *S.agalactiae*. Beaucoup d'individus sont porteurs d'espèces pathogènes sans toutefois développer de maladie, ce sont des « porteurs sains ».

2. Phylum des Bacteroïdetes

Le phylum des Bacteroïdetes est le deuxième phylum le plus représenté dans le microbiote intestinal. Il regroupe trois grandes classes : Bacteroïdia, Flavobacteria et sphingobacteria.

-Familles des *Bacteroïdaceés* : ce sont des bacilles à Gram négatif anaérobie strict. Le genre le plus représenté dans le microbiote intestinal est le genre Bacteroïdes. Les espèces majoritaires, commensales, sont *B.fragilis* et *B.thetaiotaomicron*. Cette dernière est notamment utilisée pour recoloniser des souris axéniques dans les études de modification du microbiote intestinal.

-Famille des *Prevotellacées* : ce sont des bacilles à Gram négatif anaérobie strict.



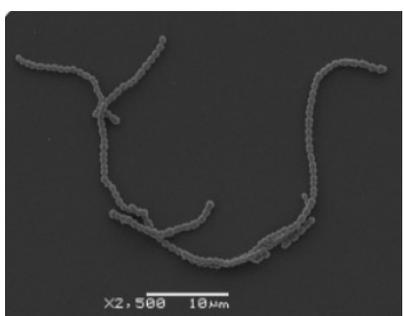
Cette famille était initialement classée avec la famille des Bacteroïdes. On les retrouve essentiellement dans la partie haute du tractus digestif.

Figure 6 : *Prevotella multisaccharivorax*

3. Phylum des Actinobacteria

Ce phylum contient six classes, la plus représentée dans le microbiote intestinal est celle des Actinobacteria avec notamment la famille des *Bifidobactériacées*.

-Famille des *Bifidobactériacées* : le genre le plus représenté dans le microbiote est le



genre *Bifidobacterium*, il s'agit de bactéries à Gram positif anaérobies strictes. Les espèces les plus nombreuses au niveau du microbiote sont *B.longum*, *B.lactis*, *B.bifidum* entres autres. On les retrouve essentiellement au niveau du côlon. Ce genre est très utilisé en tant que probiotique.

Figure 7 : *Bifidobacterium bifidum*

4. Phylum des Proteobacteria

La famille la plus représentée au niveau du microbiote est celle des *Entérobactériacées*. Ce sont des bactéries à Gram négatif. De très nombreux genres appartiennent à cette famille. Les espèces que l'on retrouve au niveau du microbiote

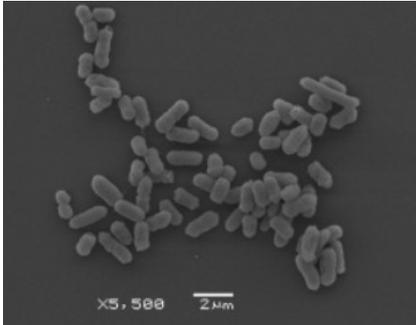


Figure 8 : *Escherichia coli*

sont *Proteus mirabilis*, *Providencia sp...* l'espèce la plus connue est *Escherichia coli*. Cette dernière est commensale mais peut être impliquée dans de nombreuses infections. *Helicobacter pylori* est également une espèce commensale mais est également responsable de colites pseudomembraneuses.

Tableau II : Classification des espèces du microbiote intestinal

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèces
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiacées	Clostridium	<i>C.difficile</i>
			Ruminococcacées	Ruminococcus	<i>R. obeum</i>
	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillacées	Lactobacillus	<i>L.acidophilus,</i> <i>L.helveticus, L.casei</i>
			Enterococcacées	Enterococcus	<i>E. faecalis, E.</i> <i>faecium</i>
			Streptococcacées	Streptococcus	<i>S.salivarius, S.mitis,</i> <i>S.pyrogenes,</i> <i>S.pneumoniae</i>
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidacées	Bacteroides	<i>B.fragilis</i> <i>B.thetaiotaomicron</i>
			Prevotellacées	Prevotella	<i>P.multisaccharivorax</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriacées	Bifidobacterium	<i>B.longum, B.lactis,</i> <i>B.bifidum</i>
Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriacées	Escherichia	<i>E. coli</i>
	Epsilon proteobacteria	Campylobacterales		Helicobacteracées	Helicobacter

IV. Origine et développement du microbiote intestinal

A. Origine du microbiote intestinal

In utero le fœtus baigne dans un environnement stérile. L'établissement du microbiote intestinal va démarrer dès la naissance, par la colonisation du tractus gastro-intestinal au contact du microbiote vaginal, cutané et intestinal de la mère et par les bactéries présentes dans l'environnement. Quelques heures après la naissance les fèces des nouveaux nés présentent des bactéries. [11]

Durant les premières 48 heures, la colonisation du tractus digestif se fait essentiellement par des bactéries aérobies et anaérobies facultatives : streptocoques, entérocoques et des entérobactéries. Cette colonisation provient du microbiote de la mère et de l'environnement. En consommant l'oxygène, ces bactéries vont créer un environnement favorable à la colonisation par les bactéries anaérobies telles que les *Bacteroides*, les *Bifidobacterium* et les *Clostridium* quelques jours après l'accouchement [12].

Un grand nombre de facteurs sont impliqués dans la mise en place de la flore intestinale. Notamment le mode de délivrance, l'alimentation et la charge bactérienne environnante.

B. Facteurs influençant la composition du microbiote

1. Facteurs propres à l'individu

La composition du microbiote serait en partie due à notre génétique. Cela a été étudié sur des jumeaux monozygotes, en effet, ces derniers vivant dans des conditions de vie semblables présentaient un microbiote similaire tandis que des personnes partageant le même environnement mais moins proche génétiquement (frères et sœurs par exemples) présentaient un microbiote plus distinct. [7]

2. Mode d'accouchement

Les chercheurs ont identifiés des différences de composition du microbiote intestinal chez les nourrissons selon qu'ils soient nés par césarienne ou par voie naturelle.

En effet, les enfants nés par voie vaginale présente un microbiote proche du microbiote vaginal et fécal de leur mère tandis que ceux nés par césarienne sont exposés à l'environnement hospitalier et au microbiote cutané de la mère [13] [14]. Ces études ont montré que les enfants nés par voie basse ont une forte proportion de *Lactobacillus* et de *Prevotella*. Les enfants nés par césarienne présentaient une plus faible proportion de *Bifidobactéries* et *Bacteroides fragilis* comparé aux autres et étaient par contre d'avantage colonisés par *Clostridium difficile*.

Le terme de la grossesse semble également jouer un rôle dans la mise en place du microbiote intestinal. Les enfants nés prématurément ont un microbiote moins diversifié et les espèces anaérobies strictes semblent s'implanter plus tardivement que chez les nourrissons nés à terme. Toutefois, cela pourrait être dus au fait que les prématurés naissent souvent par césarienne et reste hospitalisés plus longtemps avec souvent un traitement antibiotique.

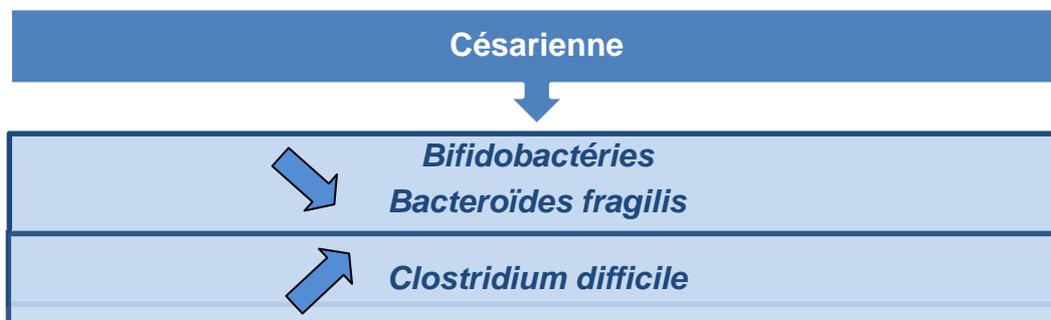


Figure 9 : Influence de l'accouchement sur la composition du microbiote

3. L'alimentation

a) Lait maternel et lait infantile

L'alimentation contribue aussi à l'instauration du microbiote. Des études se sont intéressées à la différence de composition du microbiote intestinal de nourrissons nourris au lait maternel ou avec des préparations infantiles.

Les enfants nourris au sein présentent un microbiote riche en *Bifidobactéries* et *Lactobacilles* et une proportion moindre d'*Escherichia coli* et de *Clostridium difficile*. [13]

Les enfants nourris au lait infantile ont un microbiote plus complexe, les *Bifidobactéries* sont toujours très présentes mais en plus faible proportion que chez les enfants allaités et on retrouve une abondance importante de *Bacteroides*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. [15]

Le lait maternel, contrairement au lait de vache, est très riche en lactose. Le lactose entraîne une forte production d'acide lactique grâce au métabolisme microbien, ce milieu acide va favoriser la croissance des *Bifidobactérium* et *Lactobacillus*. Les oligosaccharides (prébiotiques) du lait maternel sont également bifidogènes. [16] Le lait maternel est de plus naturellement riche en bactéries commensales telles que des *Staphylocoques*, *Streptocoques* et *Bifidobactéries*. [16]

Il a été observé que les enfants nourris au sein présentaient moins risque de développer des diarrhées infectieuses et des allergies.

Toutefois, les préparations infantiles tendent à se rapprocher de la composition du lait maternel. Avec l'avènement du rôle du microbiote intestinal, on trouve désormais de nombreuses préparations enrichies en probiotiques ou prébiotiques pour favoriser la digestion des nourrissons et conférer à l'enfant nourri avec ces laits un écosystème intestinal proche de celui des enfants nourris au sein.

Tableau III : Composition du microbiote selon l'alimentation du nouveau-né

Lait maternel	Lait infantile
Bifidobactéries +++	Bifidobactéries ++
Lactobacillus +++	Bacteroïdes +
Bacteroïdes +	Clostridium +
	Staphylocoques +

Une étude présentée en 2016 par la Society for Maternal-Fetal Medicine d'Atlanta [17] s'est intéressée à l'impact que pouvait avoir l'alimentation de la mère allaitante sur le microbiome du nourrisson. Dans cette étude, 2 cohortes de femmes allaitant leurs bébés suivaient deux régimes alimentaires différents. La première cohorte (7 femmes) recevait 60% de leur apport calorique quotidien en glucose ou en galactose, Dans la seconde cohorte (7 femmes) les femmes ont reçu soit un régime riche en graisse, soit riche en glucides. Des échantillons de lait ont été analysés à la fin de chaque régime. Il a été montré que le microbiome du lait maternel varie suivant l'alimentation maternelle et semble corrélé au métabolisme de l'alimentation consommée.

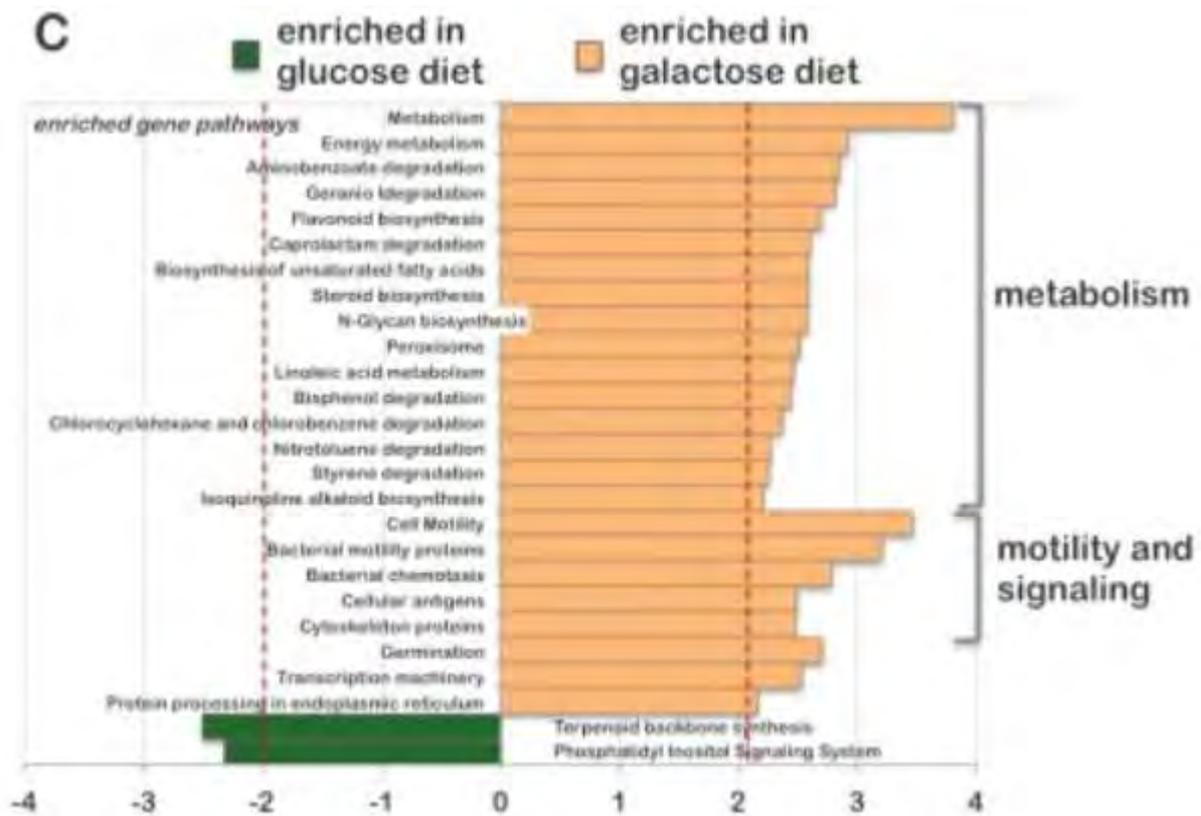


Figure 10 : Le régime alimentaire modifie le microbiome du lait maternel

L'analyse du microbiome du lait de femme montre qu'un régime enrichi en galactose augmente l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme, la signalisation, et la motilité si on compare au microbiome des femmes consommant un régime enrichi en glucose (figure 10).

b) Alimentation de l'adulte

Lors de la diversification alimentaire, les différences de composition initiale du microbiote intestinal tendent à disparaître. Le microbiote va se complexifier avec notamment un enrichissement en *Bacteroides*, *Enterocoques*, et *Streptocoques*. On considère que le microbiote est « adulte » vers l'âge de 2 ans.[18]

Le microbiote reste assez stable dans le temps, chaque individu a une « signature » qui lui est propre. Nous avons vu précédemment la notion d'entérotipe, caractérisé par l'abondance relative en *Bacteroides* (entérotipe 1), *Prevotella* (entérotipe 2) ou *Ruminococcus* (entérotipe 3). L'entérotipe pourrait être lié aux habitudes

alimentaires sur le long terme. D'après l'étude du Perelman School of Medicine de Philadelphie, un régime riche en graisses et protéines animales (Western diet) conduit aux entérotypes 1 et 3, tandis qu'un régime riche en sucre et carbohydrates (type régime végétarien) conduit à un entérotyp 2.

Une alimentation riche en fibres conduit à un microbiote riche, c'est-à-dire présentant une plus grande diversité et stabilité dans le temps.

Une étude de 2014 [19] a montré que la composition du microbiote intestinal s'adaptait très rapidement au type de régime alimentaire. Pour cela il a étudié la composition du microbiote de 11 sujets qui passaient successivement d'un régime omnivore à un régime végétarien puis à un régime ne contenant que des produits d'origine animale. Le microbiote passait ainsi d'un entérotyp 2 pour le régime végétarien à un entérotyp 1 pour le régime carnivore. Ces données laissent à penser que l'on pourrait moduler notre microbiote intestinal avec notre alimentation.

4. L'environnement

L'environnement de l'enfant joue un rôle dans le développement de son microbiote, en effet il détermine l'exposition aux bactéries. Les procédures d'hygiène strictes dans les maternités pourraient être à l'origine d'une exposition diminuée de l'enfant aux microorganismes et entraînerait une colonisation retardée par les *Bacteroidetes* et *Bifidobacterium* [20]

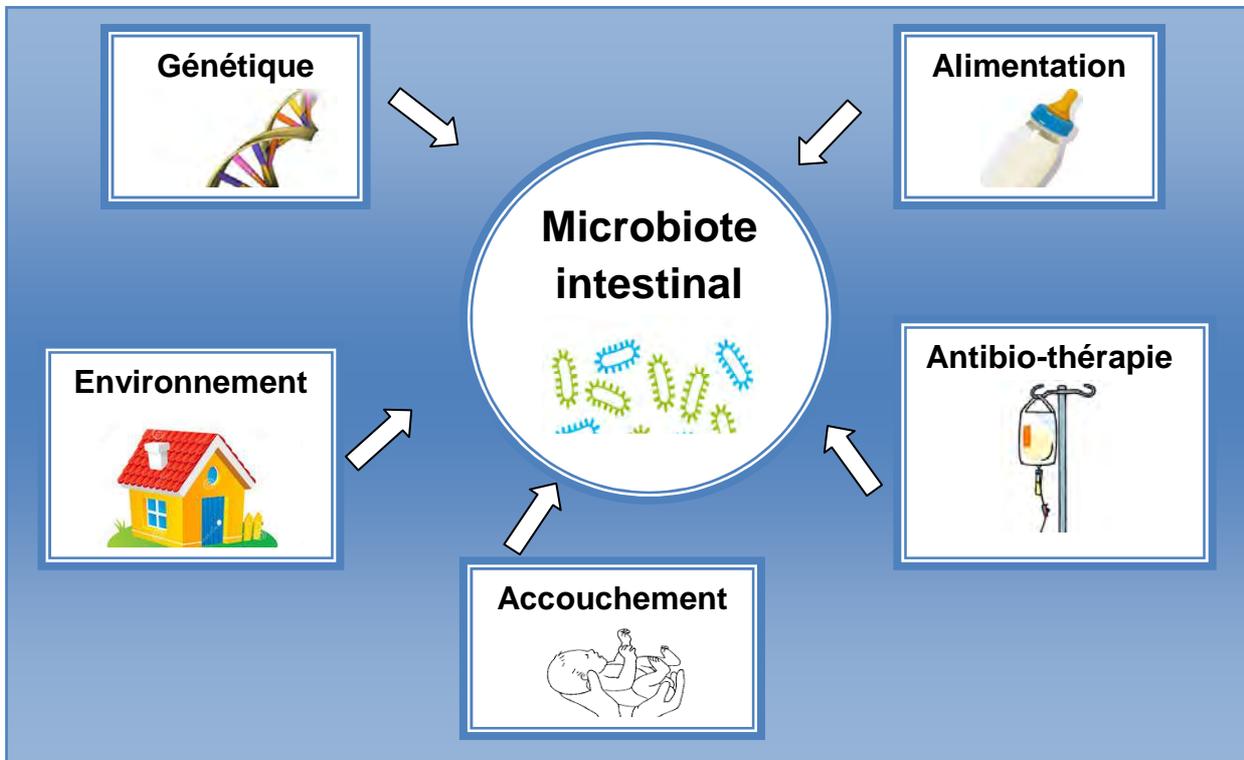
Une étude a également mis en évidence qu'un nouveau-né ayant des frères et sœurs plus âgés présentait une abondance de *Bifidobactéries* plus élevée que les enfants uniques.[13]

Une enfance dans un environnement de type ferme, avec présence d'animaux permettrait d'enrichir le microbiote et favoriserait la diversité. [13]

5. Exposition aux antibiotiques

L'antibiothérapie a pour effet délétère d'altérer considérablement le microbiote intestinal. Une étude réalisée par Penders et al [13] a montré que l'administration

d'antibiotiques chez l'enfant durant le premier mois de vie entraîne une diminution de l'abondance de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides fragilis*. De plus, cette altération du microbiote peut favoriser par la suite la colonisation par des espèces pathogènes opportunistes résistante aux antibiotiques.



Le microbiote intestinal est désormais considéré par la communauté scientifique comme un organe à part entière. Il se met en place dès les premières minutes de vie et deviendra une véritable signature individuelle stable au cours des années. À l'âge adulte, des traitements médicamenteux, ou un régime alimentaire ponctuel peuvent le modifier temporairement, mais notre écosystème bactérien a une aptitude à être résilient et à retrouver rapidement son état d'équilibre. Toutefois, de mauvaises habitudes alimentaires sur le long terme pourraient entraîner une modification durable du microbiote. Nous verrons en suivant que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans différentes fonctions physiologiques et qu'il peut également être impliqué dans certaines pathologies.

Chapitre 2 - Le microbiote intestinal impliqué dans la santé de l'hôte

I. Les fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un acteur à part entière de notre santé. En effet, les bactéries intestinales sont impliquées dans de nombreuses fonctions bénéfiques à l'hôte : fonctions nutritive et métabolique, protectrice et immunologique.

La figure 12 ci-dessous [21] représente les trois grandes fonctions du microbiote.

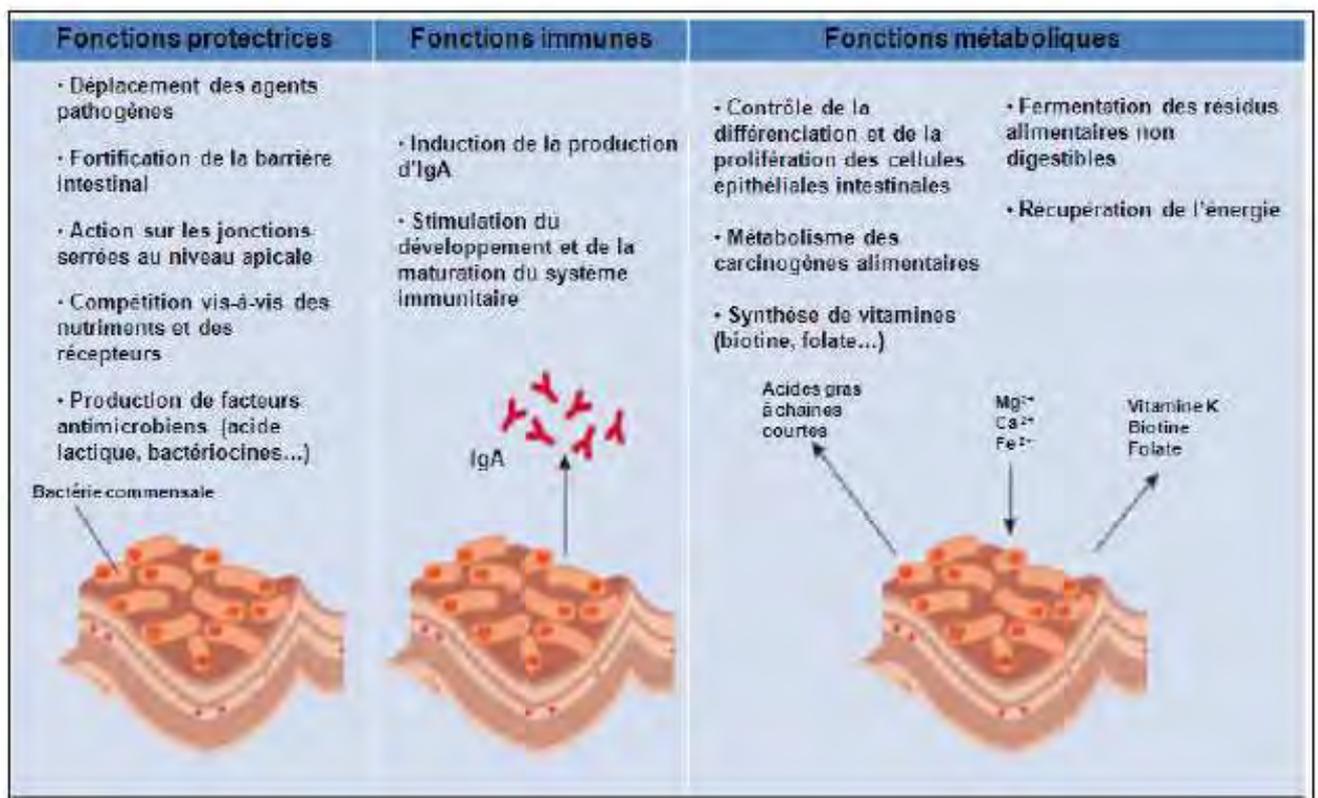


Figure 12: Fonctions du microbiote intestinal [21]

A. Fonction protectrice

1. Maintien de l'intégrité cellulaire

L'impact du microbiote intestinal sur la physiologie du système digestif a été mis en évidence sur des souris axéniques [22]: le temps de transit gastro-intestinal était ralenti, le caecum très volumineux et la muqueuse intestinale moins développée. Les études réalisées sur les tissus ont confirmé que le renouvellement de l'épithélium était diminué. Le microbiote intestinal assure également le maintien de l'intégrité et le développement de la structure intestinale. En effet, les animaux axéniques présentent un épithélium intestinal immature, et le réseau sanguin qui l'irrigue est moins dense que chez l'animal normal. De plus, les produits de la fermentation microbienne constituent une énergie importante pour la croissance des cellules épithéliales. Les *Bifidobactéries* jouent un rôle important dans l'intégrité de la barrière intestinale. Nous verrons plus loin qu'une diminution de ces bactéries entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale. A l'inverse, la colonisation de souris axéniques par un microbiote complexe permettait de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales ainsi que la production de mucus. [23]

2. Protection contre les bactéries pathogènes

Les bactéries du microbiote intestinal forment une barrière contre la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries exogènes pouvant être potentiellement pathogènes. Elles empêchent également le développement excessif de bactéries pathogènes faiblement représentées. Cette fonction protectrice est permise par deux mécanismes, d'une part il y a compétition pour les nutriments et d'autre part une compétition pour l'occupation des sites d'adhérence épithéliaux, cela signifie que les bactéries commensales en étant plus nombreuses, vont utiliser les nutriments disponibles et occuper les emplacements disponibles ne laissant que peu de nourriture et de place pour les pathogènes [24].

Les bactéries du microbiote intestinal vont produire des composés antimicrobiens comme des bactériocines qui détruisent les bactéries pathogènes.

La muqueuse intestinale est recouverte de mucus principalement constitué de mucines et contenant également des agents antibactériens comme le lysozyme, les immunoglobulines A sécrétées et les défensives produits par les cellules

épithéliales. Le microbiote intestinal, en modulant l'expression des gènes des cellules épithéliales régule la composition du mucus [25].

B. Fonctions métaboliques et nutritionnelles

Le microbiote intestinal est capable de récupérer l'énergie ingérée mais non digérée par l'hôte. Chez l'homme, la majorité des nutriments (environ 85% de glucides, 66% à 95% de protéines et toutes les graisses) sont absorbés avant d'entrer dans le gros intestin. Les hydrates de carbone non digestibles et les protéines que le côlon reçoit représentent de 10% à 30% de l'énergie ingérée totale et, sans l'activité de la flore microbienne colique, seraient généralement éliminés par les selles sans absorption supplémentaire car le gros intestin humain a une la capacité digestive limitée.

La première mise en évidence du rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie énergétique est venue des travaux de Backhed et al [26]. Ces études ont montré que les souris axéniques (exemptes de flore intestinale) présentaient un tissu adipeux 40% inférieur aux souris conventionnelles. De plus, les souris axéniques à la naissance, puis colonisées par une flore intestinale émanant de souris normales, ont développée d'avantage de masse grasse (environ +60%) et présentaient une diminution de la sensibilité à l'insuline deux semaines après l'instauration de la flore.

1. Métabolisme des glucides

Les glucides fermentescibles sont principalement constitués d'amidons résistants aux α -amylases de l'hôte, de polysaccharides végétaux (cellulose, hémicellulose et certaines pectines) ainsi que d'autres types de glucides (des édulcorants, des oligosides...). Le côlon reçoit environ 10 à 60 grammes par jour de glucides non digestibles selon les habitudes alimentaires [27].

La dégradation des sucres complexes présents dans nos aliments s'effectue au niveau du côlon par l'intermédiaire d'une grande variété d'enzymes appelées *carbohydrate-active enzymes* ou CAZymes[28] On retrouve deux grandes familles, les glycoside-hydrolases (GH) et les polysaccharide-lyases (PL), ubiquitaires, qui catalysent la coupure des polysaccharides. En effet, le génome humain ne code que

pour 8 à 17 GH qui présentent des capacités digestives limitées pour les sucres complexes. En comparaison, il a été estimé qu'un microbiote de 1 000 espèces peut produire environ 56 000 GH et PL ce qui permet aux bactéries d'assurer leur source de carbone en dégradant les substrats alimentaires non digérés [29]. La dégradation des polysaccharides nécessite donc la contribution de plusieurs espèces bactériennes, possédant un grand nombre d'activités enzymatiques différentes et complémentaires.

Les principales espèces bactériennes pour lesquelles une activité hydrolytiques a été démontrée appartiennent aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi qu'aux *Clostridium*, *Eubacterium*, et *Enterococcus*.

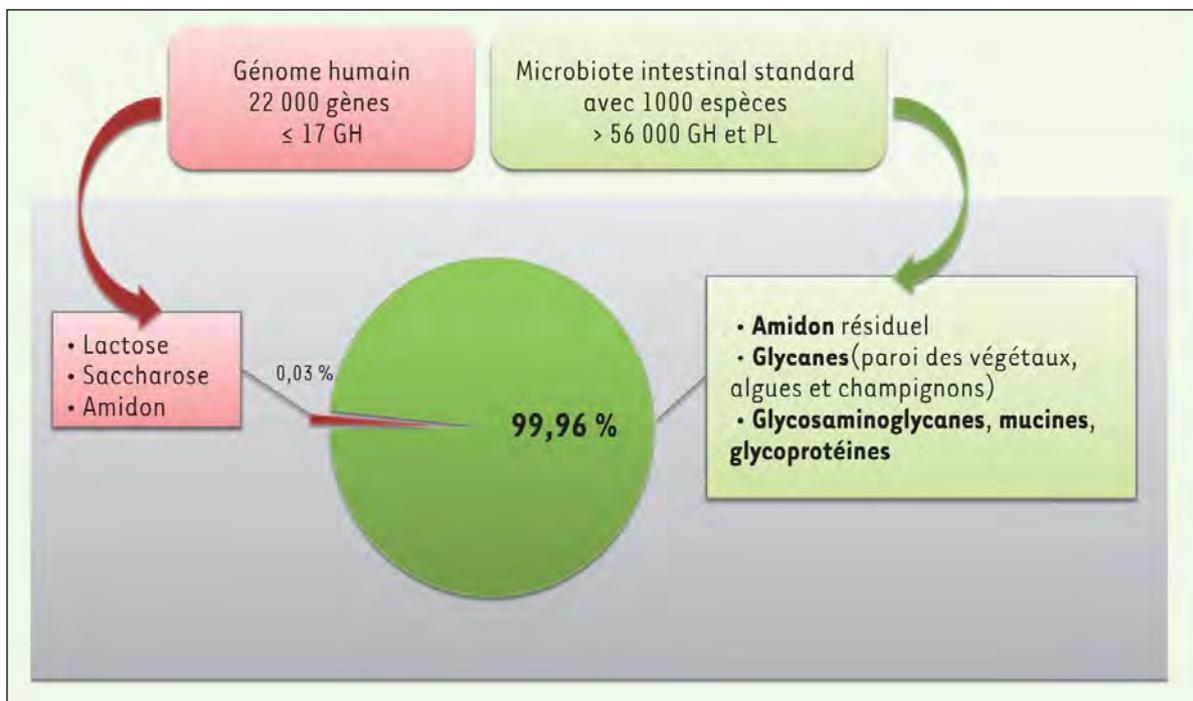


Figure 13: Potentiel digestif du microbiote humain [29]

Sur cette figure on peut voir que les CAZymes d'origine humaine ne permettent la digestion que de seulement 0,03% des oses (essentiellement le lactose, saccharose, et une partie de l'amidon) tandis que l'intervention des CAZymes bactériennes permettent la dégradation de 99,96% des polysaccharides restants (amidon, glycanes, glycoaminoglycanes, mucines et glycoprotéines).

La digestion proprement dite consiste, d'abord, en une coupure par les enzymes bactériennes des polysaccharides en leurs sucres simples constitutifs, puis en la fermentation bactérienne de ces sucres simples en acides gras à courtes chaînes

(AGCC), il y aura également production de gaz tels que le CO₂, le CH₄ et H₂. Les principaux AGCC produits sont l'acétate, le propionate, et le butyrate [30]. Le type et la quantité d'AGCC et de gaz produit dans l'intestin dépendent de plusieurs facteurs, notamment l'âge, le régime alimentaire, surtout la disponibilité des glucides non digérés, la composition de la communauté intestinale microbienne, le temps de transit intestinal, le pH du côlon, et le segment du côlon. Cette digestion est représentée sur la figure ci-dessous :

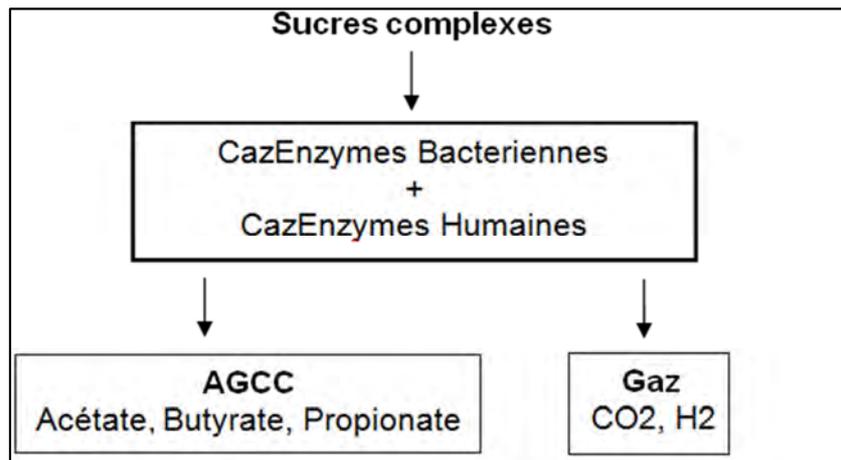


Figure 14 : Schéma de la digestion des glucides
La dégradation des polysaccharides conduit à la formation de produits de fermentation bactérienne

Comme une grande partie de l'intestin est anaérobie, l'élimination du H₂ produit lors de la fermentation va interagir avec le microbiote. Le H₂ sera en partie éliminé par la respiration. Une partie est consommée par trois groupes de microorganismes : les méthanogènes, les acétogènes (homo-acétogènes) et les sulfates-réducteurs qui coexistent dans le côlon en proportion différentes. On notera que l'accumulation de H₂ dans le côlon inhibe la fermentation. Parmi les acétogènes détectés dans l'intestin humain, beaucoup appartiennent au phylum des Firmicutes.

L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure 15 ci-dessous :

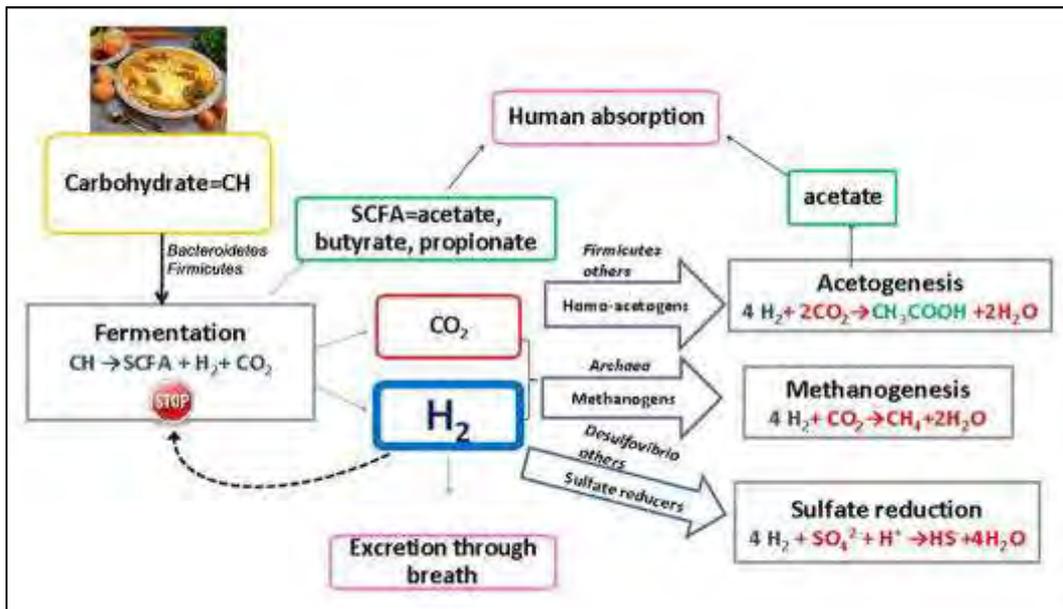


Figure 15: Produits issus de la fermentation [30]

On peut voir les glucides (carbohydrates) qui sont fermentés, produisant des AGCC (SCFA en anglais) qui seront assimilés par l'intestin et des gaz (CO_2 , H_2) qui seront à leur tour utilisés par les microorganismes pour conduire à la formation de l'acétate, du méthane et permettre la sulforéduction.

2. Métabolisme des lipides

Les acides gras alimentaires sont majoritairement absorbés au niveau de l'intestin grêle, et par conséquent 5 à 8 grammes de lipides totaux par jour arrivent dans le côlon. De nombreuses espèces bactériennes possèdent des lipases et vont permettre d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues. Les acides gras subiront alors plusieurs modifications (hydrolyse, oxydation, réduction...) grâce aux bactéries du microbiote.

Par ailleurs, le microbiote est capable de métaboliser le cholestérol en coprostanol qui est éliminé via les fèces. Chez la majorité des individus, 70% du cholestérol est métabolisé par le microbiote, toutefois les bactéries responsables de ce métabolisme sont méconnues [31]. En 2007, une étude a identifié le rôle d'une souche

bactérienne proche de l'espèce *Bacteroides dorei* dans le métabolisme du cholestérol. [32]

3. Métabolisme des protéines

La dégradation des protéines dans le côlon fait intervenir de nombreuses espèces bactériennes possédant des activités enzymatiques complémentaires (protéases, désaminases, transaminases...). Certaines bactéries utilisent principalement les acides aminés comme source d'énergie, par exemple les genres *Clostridium*, *Acidaminococcus*, *Peptococcus*.

Les acides aminés sont majoritairement fermentés par désamination, cela va conduire à la production d'AGCC et d'ammoniaque. L'ammoniaque est un composé potentiellement toxique pour l'hôte, il est rapidement assimilé et métabolisé en urée par le foie puis excrété dans l'urine. Il pourrait être impliqué dans l'initiation du cancer colique.

4. Mécanismes de régulation de la balance énergétique

Les AGCC produits par les bactéries de l'intestin lient des récepteurs couplés à une protéine G (GPR 41/43) retrouvés sur les adipocytes et l'épithélium intestinal. Il est observé que le propionate et le butyrate ont une activité plus élevée que l'acétate sur le récepteur GPR41. Ces 3 molécules partagent une activité égale sur le GPR43.

D'après Samuel BS *et al* [33], la stimulation de GPR41 exprimé sur les cellules intestinales conduit à la sécrétion locale de peptide YY (PYY) qui diminue la motilité intestinale et permet aux bactéries d'être plus longtemps au contact du contenu fécal et donc une meilleure digestion des polysaccharides intestinaux (figure 18). Par ailleurs les AGCC sont des substrats pour la lipogenèse au niveau du foie : ils permettent la synthèse des triglycérides qui sont inclus dans les VLDL et sécrétés par le foie dans la circulation sanguine.

Outre cet effet sur la motilité intestinale, les bactéries de l'intestin régulent le métabolisme énergétique de l'hôte en diminuant l'expression du FIAF (Fast-Induced adipocyte Factor) par les cellules de l'épithélium intestinal (figure 16).

Backhed et al [26] a montré dans une première expérience que le fait de coloniser l'intestin de souris axéniques avec une flore conventionnelle induit une augmentation généralisée de l'activité de la LPL et de la masse grasse des animaux. Il y a donc un lien entre le microbiote et l'activité de la LPL. Une des hypothèses serait que le microbiote intestinal agirait sur l'expression du peptide FIAF en le diminuant, ce qui entrainerait une augmentation de l'activité de la LPL et favoriserait la libération des acides gras des lipoprotéines circulantes.

Ces acides gras sont stockés dans les tissus adipeux au cours du repas. Des souris axéniques déficientes pour l'expression du FIAF sont susceptibles de devenir l'obèse sous l'effet d'un régime alimentaire. Cette observation est liée au fait que la suppression du FIAF s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras.

D'autre part les adipocytes en détectant l'augmentation des niveaux d'AGCC produits par fermentation microbienne intestinale, réagissent en sécrétant, deux hormones : la leptine et l'adiponectine. L'augmentation des taux circulants de leptine induit un signal satiétogène au cerveau ce qui diminue l'entrée d'énergie dans l'organisme. L'adiponectine quant à elle, active une enzyme, l'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase), qui stimule l'oxydation des acides gras dans les tissus périphériques (dont le muscle et le foie). Ainsi, une étude montre que des souris axéniques présentant une activité AMPK élevée sont protégées de l'obésité induite par le régime [69]

En conclusion, ces travaux montrent que le microbiote intestinal intervient dans l'homéostasie énergétique.

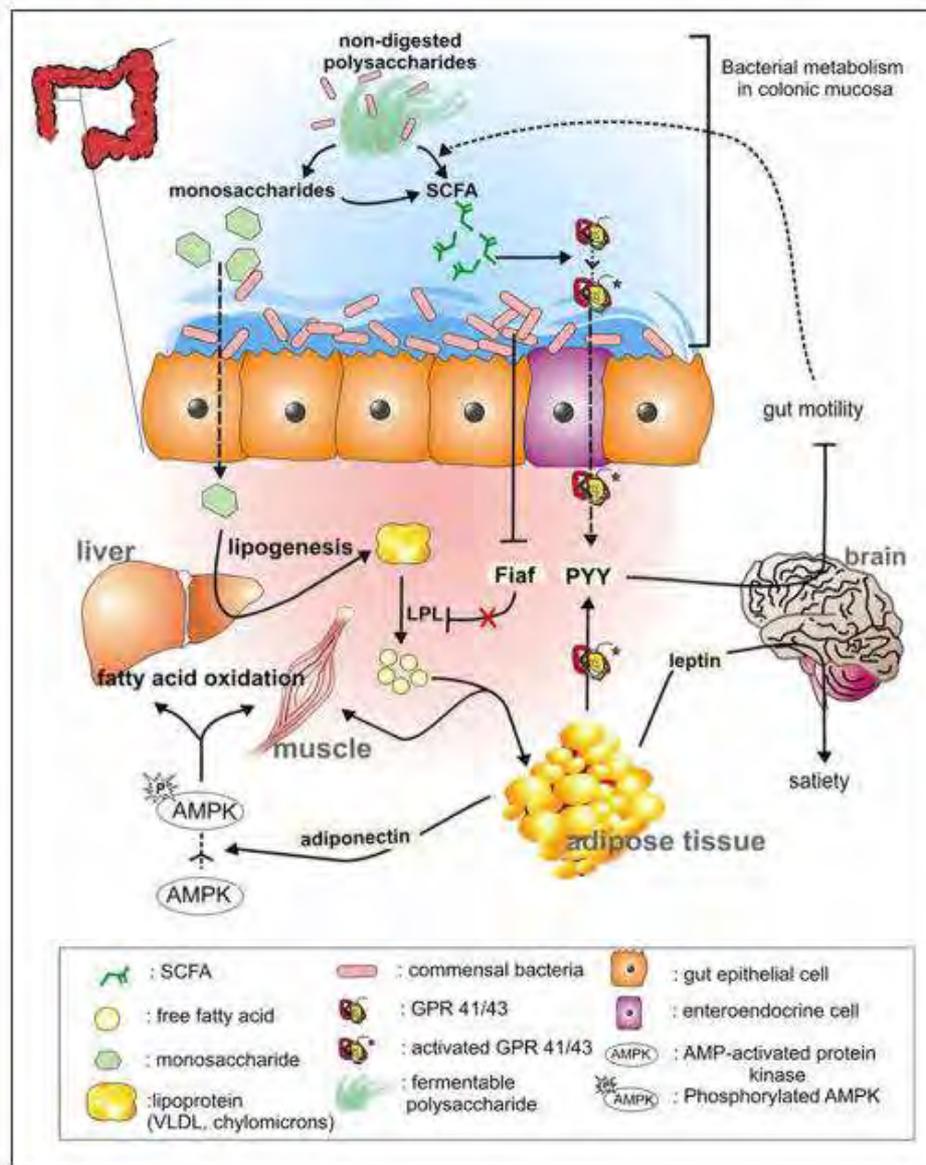


Figure 16: Mécanismes de régulation du métabolisme énergétique par le microbiote intestinal [30]

Cette figure généralise les mécanismes énoncés plus haut :

- Les monosaccharides passent la barrière intestinale et favorisent la lipogenèse hépatique et l'expansion du tissu adipeux.
- Les AGCC interagissent avec le récepteur GPR41 conduisant à la stimulation du peptide PYY intervenant sur la motilité intestinale et la satiété.
- La suppression du FIAF induit la libération d'acide gras des lipoprotéines
- Les adipocytes sécrètent des hormones intervenant sur la satiété et les niveaux énergétiques cellulaires

5. Synthèse de facteurs vitaminiques

Le microbiote intestinal participe à l'apport indispensable d'acides aminés et à la synthèse des vitamines. Le tableau IV résume ci-dessous les vitamines synthétisées par le microbiote ainsi que leur rôle dans la physiologie cellulaire et à l'échelle des tissus.

Tableau IV : Synthèse vitaminique du microbiote

Vitamine	implication
K	coagulation sanguine, métabolisme des os.
B12	synthèse de neuromédiateurs, synthèse de l'ADN, synthèse des acides gras
B9	synthèse de l'ADN, synthèse de certains acides aminés
B6	métabolisme des acides aminés, réaction d'hydrolyse du glycogène en glucose
B8	métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la biosynthèse des vitamines B9 et B12.
B2	transformation des aliments simples (glucides, lipides et protéines) en énergie, métabolisme de réparation des muscles

C. Fonction immunologique

Le tractus gastro-intestinal est une véritable porte ouverte aux bactéries extérieures. C'est pourquoi la muqueuse intestinale doit être capable d'assurer la protection de l'organisme face à ces agressions extérieures.

1. Le système immunitaire intestinal

Le système immunitaire périphérique comporte des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses appelés MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), dans le cas de la muqueuse intestinale ces tissus sont dénommés GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue). Le GALT se concentre à différents endroits du tractus gastro-intestinal, notamment au niveau des plaques de Peyer, dans des agrégats lymphoïdes de l'œsophage, du gros intestin, de l'estomac, et dans la Lamina propria de l'intestin (tissu conjonctif situé sous l'épithélium).

Lors d'une agression extérieure, notre organisme possède deux types de réponse immunitaire : l'immunité innée, qui est une réponse immédiate mais non spécifique ; et l'immunité adaptative, réponse très spécifique qui se met en place après quelques jours.

L'immunité intestinale peut schématiquement être séparée en une composante innée constituée des cellules épithéliales et des cellules présentatrices de l'antigène, et une composante adaptative constituée des lymphocytes. Cette seconde composante peut être séparée en sites inducteurs et en sites effecteurs de la réponse. Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés représentent les sites inducteurs tandis que les sites effecteurs sont constitués des cellules immunitaires qui peuplent la hauteur de la muqueuse.

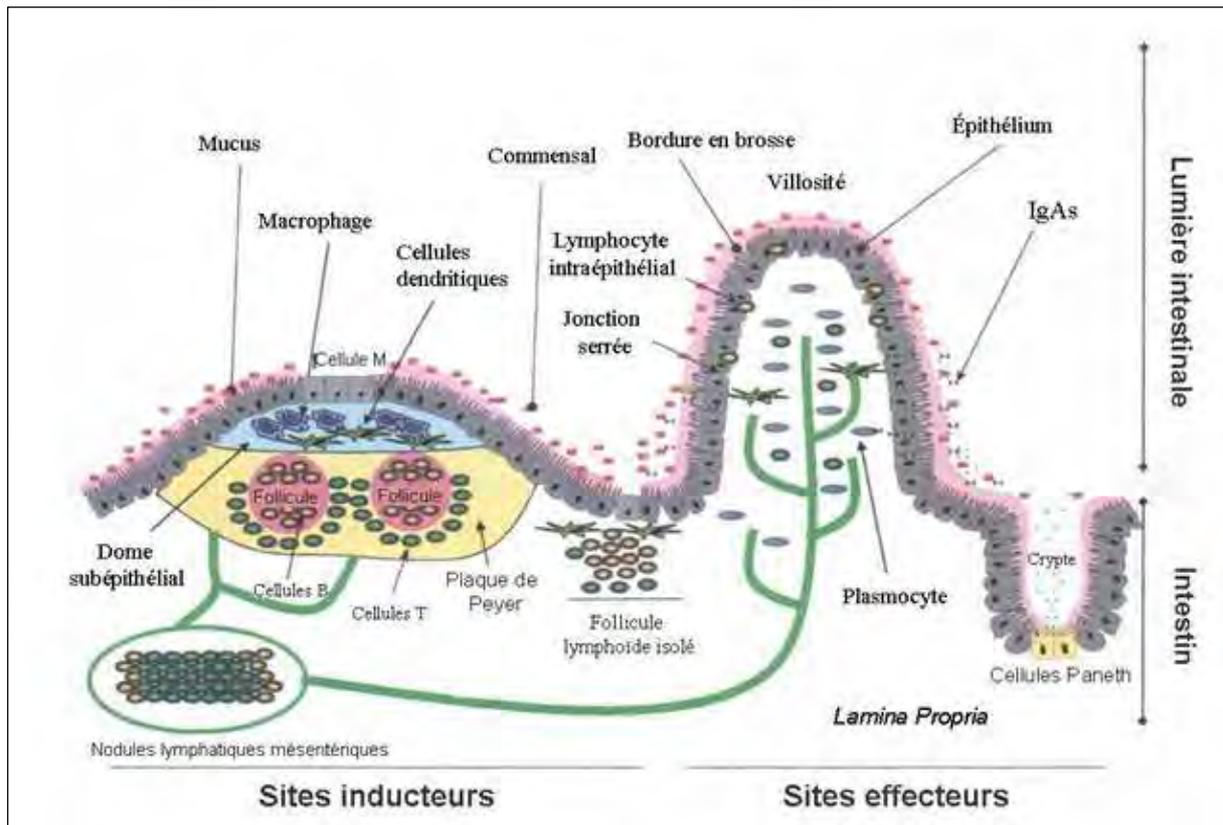


Figure 17: Système immunitaire intestinal (Magalhaes et al 2007)

Sur le schéma est représenté les cellules intervenant dans la composante adaptative de l'immunité au sein des plaques de Peyer.

a) Immunité innée

Les bactéries pathogènes présentent à leur surface des motifs moléculaires qui leur sont propres appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Les récepteurs capables de reconnaître ces motifs sont les Toll-like receptors (TLR). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales et par les cellules présentatrices d'antigène. Les NOD-like receptors sont également une importante famille de récepteurs reconnaissant les PAMP. L'ensemble des récepteurs reconnaissant les PAMP sont des PRR (Pattern Recognition Receptor). L'activation des PRR induit une cascade de signaux intracellulaires conduisant à l'activation et/ou modulation de la réponse immunitaire. Au niveau des cellules épithéliales intestinales cela induit notamment la production de peptides antimicrobiens, la sécrétions de cytokines pro-inflammatoires et recrutement de polynucléaires neutrophiles et macrophages.

Au niveau des plaques de Peyer, les cellules M endocytent les antigènes présents dans la lumière intestinale et les transfèrent aux cellules dendritiques qui ont alors le rôle de Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA). Ces cellules jouent le rôle d'intermédiaire entre immunité innée et immunité adaptative.

b) Immunité adaptative

Les CPA présentent alors l'antigène apprêté aux lymphocytes B qui vont se différencier en plasmocytes et produire des Immunoglobulines A (IgA) spécifiques de cet antigène. Les CPA vont également présenter l'antigène aux lymphocytes T présents dans la lamina propria. Ces lymphocytes seront alors activés et prendront selon l'environnement inflammatoire soit un phénotype pro-inflammatoire (lymphocytes T effecteurs Th1 Th2 et Th17) soit un phénotype anti-inflammatoire (lymphocytes régulateurs Treg).

2. Immunité et microbiote intestinal

Le rôle du microbiote intestinal dans la maturation du système immunitaire a été mis en évidence sur des animaux axéniques ou gnotoxénique (désigne la colonisation d'un animal axénique avec un microbiote sélectionné) [34]

Les études ont montré que les animaux axéniques présentent moins de plaques de Peyer et leur développement est incomplet : elles contiennent moins de cellules M et de lymphocytes et sont riches en cellules dendritiques immatures [35]. La lamina propria contient moins de lymphocytes T et de plasmocytes producteurs d'IgA et diminution des populations de lymphocytes intra épithéliaux ainsi que leur activité.

Le rôle de la flore intestinale ne s'arrête pas au GALT. En effet il a été montré chez les animaux axéniques une diminution du taux de LT CD4+ au niveau de la rate et des ganglions mésentériques. On retrouve également une réduction des taux d'IgA et d'IgG sériques. Le microbiote participe donc au développement du système immunitaire dans son ensemble.

La colonisation de ces animaux axéniques par un microbiote normal permet de maturer le système immunitaire et de retrouver en quelques semaines un état presque normal.[36]

A la naissance, le système immunitaire est immature. La colonisation du tube digestif par les bactéries environnementales va stimuler le développement du système immunitaire par l'interaction entre les motifs microbiens très conservés MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern) et les PRR. Le système immunitaire intestinal doit coexister à la fois avec la densité très élevée de bactéries et les antigènes alimentaires, c'est-à-dire qu'il doit à lutter contre les agressions mais sans induire de réponse immunitaire excessive type réaction allergique, intolérance digestive (maladie cœliaque) ou emballement du système immunitaire (maladie de Crohn). Il y a donc un phénomène de tolérance.

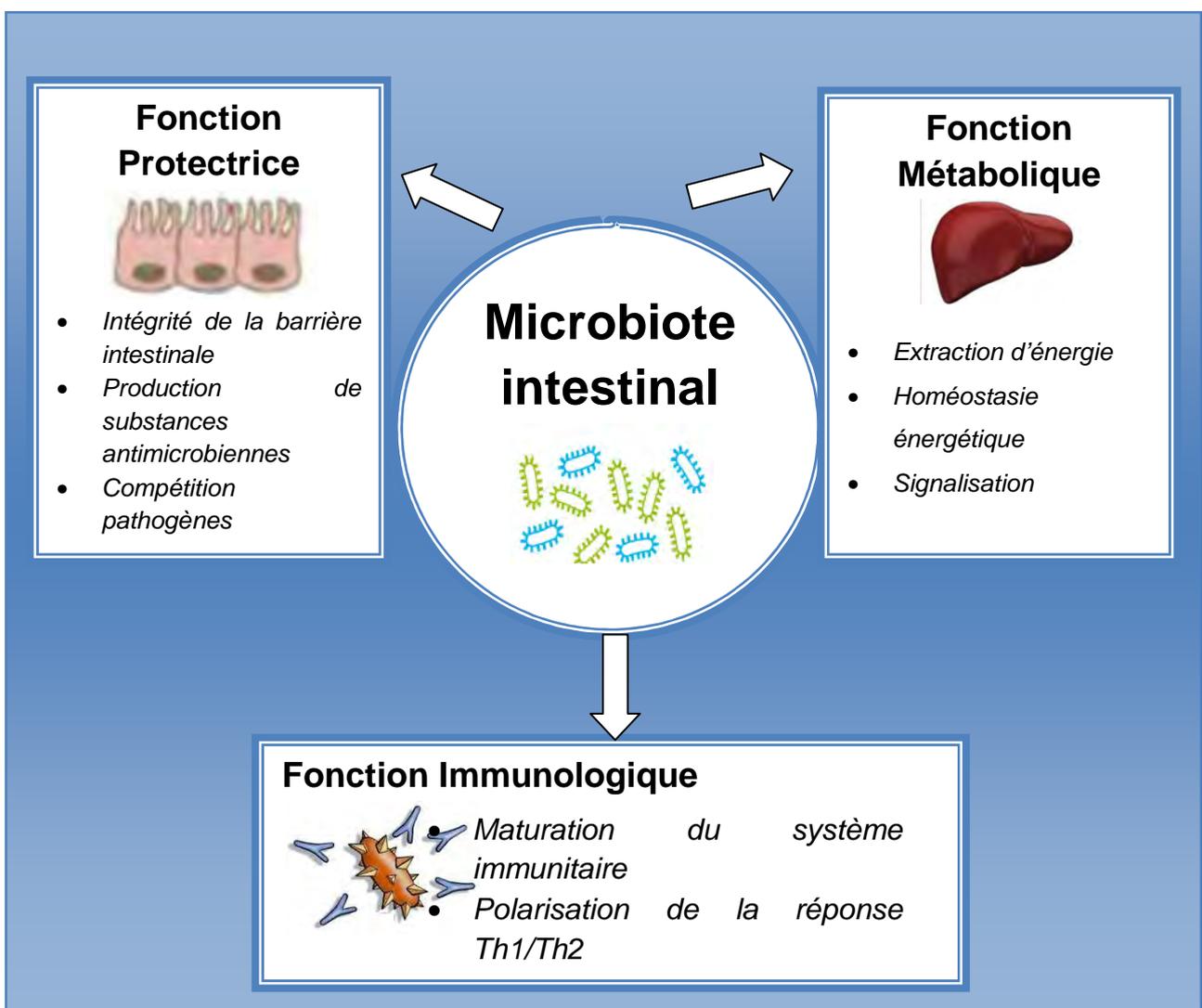


Figure 18 : Fonctions du microbiote intestinal

Nous venons de voir que le microbiote intestinal possède des fonctions protectrices, immunologiques et métaboliques essentielles pour la santé. Nous verrons en suivant qu'un dérèglement de ces fonctions est retrouvée dans l'obésité et dans les phénomènes d'allergies alimentaires

II. Dysbioses et pathologies

A. L'obésité

1. Définition

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité se définit comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé.

Chez l'adulte, l'obésité et le surpoids sont définis par l'index de masse corporelle (IMC ou BMI en anglais). Il correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimé en kg/m^2 . L'OMS définit le surpoids par un IMC égal ou supérieur à 25 et l'obésité par un IMC égal ou supérieur à 30.

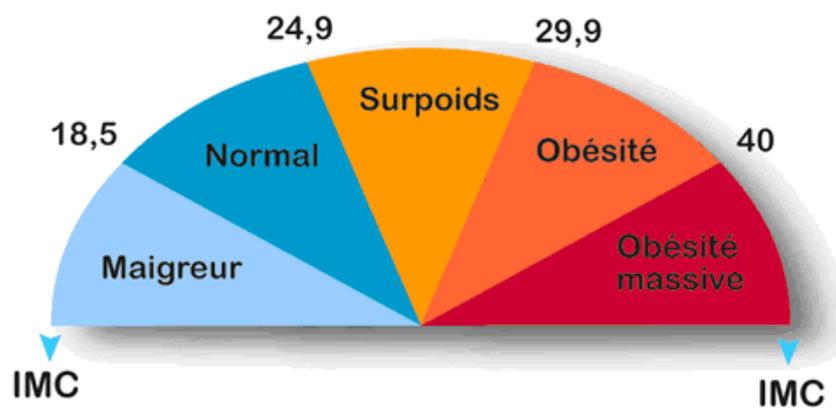


Figure 19 : Echelle IMC

2. Epidémiologie

D'après les estimations mondiales récentes, environ 13% de la population adulte mondiale (11% des hommes et 15% des femmes) est obèse. En 2014, on estimait que 41 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses. La prévalence de l'obésité a plus que doublé au niveau mondial entre 1980 et 2014.

3. Facteur causal et facteur de risque

La hausse de l'IMC est un facteur de risque majeur pour certaines maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires (principalement les cardiopathies et les accidents vasculaires cérébraux), qui étaient déjà la première cause de décès en 2012, le diabète, et certains cancers.

Les facteurs classiquement associés au développement de l'obésité sont un excédent énergétique apporté par une alimentation trop riche couplé à un manque d'activité physique. Toutefois, on peut observer au sein d'une population type des susceptibilités individuelles, seuls certains individus développeront une obésité tandis que d'autres sont moins sensibles aux altérations métaboliques. Ces particularités peuvent être liées au génome, mais également au microbiote intestinal propre à l'individu.

4. Le microbiote intestinal dans l'obésité

Une des premières découvertes a été de mettre en évidence des modifications qualitatives du microbiote intestinal chez la souris obèse. Les souris présentant une obésité d'origine génétique (ob/ob) possédaient deux fois moins de Bacteroïdètes et une augmentation proportionnelle de Firmicutes par rapport à leurs congénères sauvages [8]. Ces mêmes auteurs ont réalisé une étude sur 12 sujets humains obèses. Premièrement, à l'instar des observations réalisées chez l'animal, les sujets obèses présentaient une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroïdètes. Deuxièmement, après 52 semaines de régime faible en calorie ce ratio diminue pour s'approcher de celui des individus minces, comme présenté sur la figure ci-dessous :

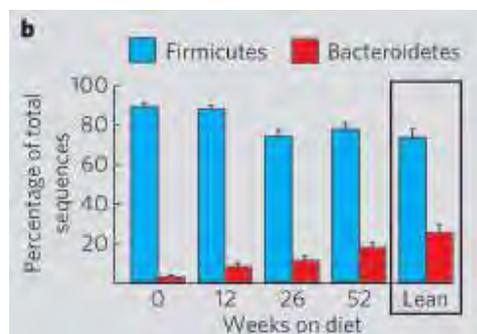


Figure 20 : Ratio firmicutes/bacteroïdètes
Sujets obèses suivant un régime sur 52 semaines

Ces résultats obtenus à la fois chez l'animal et chez l'homme, suggèrent que la composition de la flore intestinale est altérée dans l'obésité. Cependant, plusieurs études n'ont pas confirmé ce résultat, ces discordances proviendraient des différentes méthodes d'analyses employées pour analyser le microbiote.

Toutefois, ces modifications observées ne sont probablement pas une simple conséquence de l'obésité. En effet, dans une autre étude [37] les chercheurs ont montré que la flore elle-même participerait à un changement de comportement alimentaire et métabolique. La colonisation de souris axéniques par un microbiote intestinal provenant de souris conventionnelles aboutit à la normalisation de leur poids et une augmentation de la masse grasse malgré une réduction de la prise alimentaire de 30% ; la colonisation par une flore provenant de souris obèses (ob/ob) a mené à une prise de poids pathologique et ces souris axéniques sont devenues obèses. La colonisation par un microbiote de type « obèse » a donc transmis le phénotype obèse, cela indique donc que la population microbienne joue un rôle dans les mécanismes de l'obésité. A l'instar de la poule et l'œuf, les études ne permettent pas d'affirmer à ce jour si c'est la modification de la flore intestinale qui déclenche l'obésité ou si c'est l'obésité qui provoque les altérations de la flore.

Le consortium international MetaHit [3] a analysé le génome bactérien intestinal de 292 adultes danois comprenant 123 personnes non-obèses et 169 obèses. Les résultats distinguent deux groupes d'individus selon la diversité de leur microbiome. Un quart des individus de la cohorte sont « pauvres » en espèces bactériennes, tandis que les trois-quarts possèdent une flore intestinale « riche » en bactéries (c'est-à-dire plus diversifiée).

Les résultats montrent que les individus avec une flore « pauvre » présentent une adiposité plus importante, une résistance à l'insuline, une dyslipidémie ainsi qu'un phénotype inflammatoire plus marqué que les individus avec une flore « riche ». 80% des obèses de l'étude étaient dans le groupe avec une flore intestinale « pauvre ».

Les chercheurs ont montré que 46 genres différaient significativement entre les deux groupes : *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus* (*R. torques* and *R. gnavus*), *Campylobacter*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* et *Anaerostipes* étaient

d'avantage présent chez les « flore pauvre », et *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyrivibrio*, *Alistipes*, *Akkermansia*, *Coprococcus* et *Methanobrevibacter*, étaient significativement associés au « flore riche ».

5. Mécanismes

a) Mécanismes métaboliques

Nous avons précédemment vu que le microbiote est capable d'extraire de l'énergie des aliments non digestibles par l'hôte, conduisant en la production d'acides gras à courtes chaînes.

Turnbaugh et al [37] ont montré lors d'une étude que la colonisation de l'intestin de souris axénique par un microbiote obèse conduisait à une augmentation des métabolites issus de la fermentation microbienne, comme l'acétate, à une augmentation de la suppression du FIAF et une augmentation de l'activité de la LPL ce qui entraînait une augmentation du stockage des acides gras dans le tissu adipeux.

L'abondance des AGCC et leur concentration dans le côlon est corrélée à l'obésité chez les humains [38]. Schwartz et al [39] ont montré que les selles de patient adultes obèses présentaient une augmentation de la concentration totale d'AGCC, en particulier de propionate, comparé aux selles de patients minces. Cette étude a été confortée par une autre réalisée sur un groupe d'enfants obèses qui ont été comparé à des enfants dont le poids est normal : les concentrations fécales de butyrate et de propionate étaient retrouvées significativement plus hautes chez les enfants obèses [40].

Comme expliqué précédemment, ces AGCC sont ensuite impliqués dans des mécanismes de régulation énergétique tels que le stockage des acides gras dans le tissu adipeux. De plus, une abondance des AGCC dans l'intestin favoriserait la lipogenèse hépatique.

b) Inflammation de bas grade

Il a été établi que l'obésité est liée à un état inflammatoire de bas grade, cet état pourrait être corrélé au niveau de Lipopolysaccharide (LPS) plasmatique (ou

circulant). Le LPS est un composant de la paroi des cellules des bactéries à Gram-négatif et circule à un faible niveau de concentration dans le plasma des sujets en bonne santé. Le LPS est capable de déclencher un processus inflammatoire (en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires) en se liant aux CD14 des récepteurs Toll-like de type 4 (complexe CD14/TLR4) présent à la surface des cellules immunitaires innées (dont les macrophages).

Il a été montré sur des souris qu'après 4 semaines de régime riche en graisse, le niveau de LPS circulant dans le sang augmentait d'un facteur 2 à 3. Cet état était appelé « endotoxémie métabolique » [41]. Ces souris avaient une inflammation du tissu adipeux visible par une augmentation de la taille des dépôts adipeux. Des injections sous-cutanées de LPS conduisaient aux mêmes troubles métaboliques que ceux induits par un régime hyper lipidique : prise de poids, diminution de la tolérance au glucose, augmentation du degré de stéatose dans le foie, augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans le foie, les muscles et le tissu sous cutané et viscéral. Par contre, les souris dont le récepteur au LPS était inactivé (souris déficientes en CD14 ou CD14-/-) étaient résistantes à la fois aux effets du régime hyper lipidique et à l'injection en sous cutané de LPS. De plus, ces souris CD14-/- se sont révélées hyper sensibles à l'insuline quel que soit le régime : le récepteur CD14 pourrait moduler la sensibilité des tissus à l'insuline même en condition physiologique. L'ensemble de ces observations suggèrent un rôle du LPS, un extrait bactérien, comme facteur déclenchant des désordres métaboliques.

Chez l'humain, le rôle du LPS dans l'inflammation de bas grade a été évalué. Une faible dose de LPS provoque une augmentation du niveau d'insulino-résistance et de la concentration en $TNF\alpha$ dans le tissu adipeux [42]. Il a également été observé qu'un repas riche en lipides et glucides entraîne une augmentation significative de LPS. Il est important de noter que ces augmentations n'ont pas été observées après un repas riche en fibres et en fruits [43]. Ces observations ont été confirmées par d'autres études qui montraient également qu'un repas riche en lipides était bien corrélé à l'augmentation des niveaux de LPS et une signalisation pro-inflammatoire.

Il semble donc évident que l'endotoxémie est impliquée dans le développement de l'inflammation de bas grade présente dans l'obésité et qu'elle est causée, du moins en parti, par l'alimentation.

Parallèlement, l'augmentation de LPS plasmatique était couplée à une diminution drastique des *Bifidobactéries* dans l'intestin. Ces bactéries sont normalement impliquées dans le renforcement de la barrière intestinale. La diminution de ces bactéries entrainerait une perméabilité accrue de la barrière intestinale ce qui permettrait le passage du LPS dans le sang.

Nous retrouvons donc dans l'obésité une modification de la composition du microbiote intestinal ainsi qu'une altération des fonctions protectrice et métabolique décrites plus haut : d'un point de vu métabolique, on trouve une augmentation de l'abondance d'AGCC indiquant une forte extraction d'énergie et une augmentation de l'activité de la LPL conduisant à un stockage adipeux ; d'un point de vu barrière intestinale, son altération causée par la diminution des *Bifidobactéries* entraine via le passage du LPS l'état inflammatoire caractéristique de l'obésité.

B. Les allergies alimentaires

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe un phénomène de tolérance de notre système immunitaire vis-à-vis des aliments. Cependant chez certains individus, des réactions immunitaires inappropriées peuvent s'initier contre certaines protéines alimentaires. Ces réactions vont entraîner des réactions inflammatoires à l'origine de la symptomatologie clinique de l'allergie alimentaire.

1. Définition

L'allergie est une réponse inappropriée et excessive du système immunitaire lorsque l'organisme est mis en contact avec une substance étrangère identifiée à tort comme dangereuse par l'organisme.

On distingue l'allergie alimentaire « vraie » qui implique le système immunitaire en réponse à un allergène alimentaire de l'allergie « fausse » ou « intolérance alimentaire » pour laquelle le système immunitaire n'intervient pas. Les manifestations cliniques peuvent toutefois être similaires.

L'Académie Européenne d'Allergologie et d'Immunologie Clinique (EAACI) définit l'allergie comme étant une réaction d'hypersensibilité initiée par un mécanisme immunologique dirigé par des immunoglobulines (IgE et IgG) ou des cellules (Lymphocytes T). Les allergies impliquant les IgE sont les plus fréquentes.

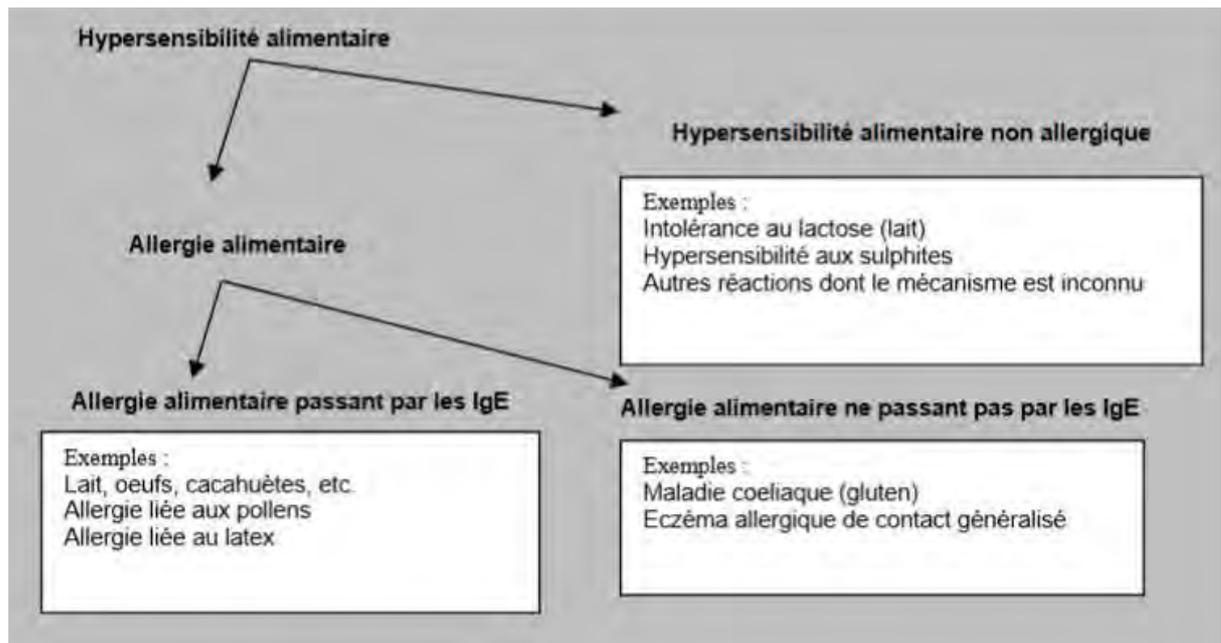


Figure 21 : Définition de l'allergie alimentaire (d'après l'OMS)

Distinction entre les hypersensibilités alimentaires et les allergies alimentaire « vraies ».

2. Epidémiologie et prévalence

Selon l'OMS, en 2050, 50 % de la population mondiale sera affectée par au moins une maladie allergique. L'OMS classe l'allergie au 4ème rang mondial des maladies après le cancer, les pathologies cardiovasculaires et le sida. Au cours des 20 dernières années, le nombre de personnes allergiques a doublé.

La prévalence des allergies alimentaires dans la population générale a été grossièrement estimée à environ 1-3 % chez l'adulte et 4-6 % chez l'enfant. Il est cependant difficile d'estimer la prévalence de ces allergies parce que les diverses études se servent de méthodologies différentes et que ces allergies alimentaires évoluent avec le temps. Les allergies aux œufs et au lait sont les allergies alimentaires les plus courantes chez le nourrisson mais elles disparaissent souvent en grandissant. L'allergie aux fruits de mer est plus fréquente chez l'adulte que chez l'enfant, tandis que l'allergie aux cacahuètes est tout aussi fréquente chez l'enfant que chez l'adulte.

3. Signes cliniques

Les manifestations cliniques des allergies alimentaires se produisent généralement dans l'heure qui suit l'ingestion de l'aliment en cause. Les symptômes vont de la gêne passagère à des réactions graves engageant le pronostic vital. Ces symptômes sont très variés et touchent souvent plusieurs organes.

Tableau V : Manifestations cliniques de l'allergie alimentaire (Ancelin 2004)

Type de réactions	Tableau clinique	Organe cible	Symptomatologie
Cutanées	Dermatite atopique	Peau	- Lésions d'eczéma (mal limitées, érythémateuses) sur le visage, faces d'extension des membres, siège, plis de flexion. - Prurit
	Urticaire	Peau	- Dermatose éruptive due à un œdème dermique secondaire à une vasodilatation et à une augmentation de la perméabilité capillaire. - Présence de papules roses, œdémateuses, prurigineuses
	Œdème de Quincke	Muqueuses	- Dermatose due à un œdème hypodermique pouvant être fatal s'il touche les muqueuses pharyngo-laryngée. - Tuméfaction blanc rosé, non prurigineuse mais accompagnée d'une sensation de tension.
Oro-pharyngées	Syndrome oral de Lessof	Muqueuse buccale	- Prurit et œdème labial, gingival, buccal, voire un œdème laryngé
	Rhinite	Muqueuse nasale	- Rhinorrhée, obstruction et prurit nasal (inflammation de la muqueuse), éternuements parfois accompagnés de conjonctivite ou de toux.
Respiratoires	Asthme	Poumon	- Constriction bronchique conduisant à une gêne respiratoire, avec dyspnée. L'asthme aigu grave a un pronostic vital.
Gastro-intestinales	Varié	Tube digestif	- Epigastralgies - Nausées, vomissements - Douleurs abdominales - Episodes diarrhéiques
Systémiques	Choc anaphylactique		- Choc hypovolémique avec collapsus cardiovasculaire, provoqué par une vasodilatation primitive périphérique liée à la libération massive de médiateurs. - Mise en jeu du pronostic vital

Ce tableau représente bien les différentes atteintes possibles. On peut retrouver des symptômes au niveau de la sphère cutanée (rougeur, tuméfaction...), au niveau de la sphère digestive (nausées, vomissement, douleur, diarrhée), respiratoire, oculaire et même dans les cas les plus grave une atteinte systémique. Chez l'enfant, la principale manifestation de l'allergie alimentaire est la dermatite atopique, il s'agit d'une dermatose prurigineuse et inflammatoire (figure 22).



Figure 22 : Enfant atteint de dermatite atopique

4. Implication du microbiote

a) Profil du microbiote

Des études ont montré chez les souris une différence au niveau du microbiote selon qu'elles présentent des allergies alimentaires ou non. Les souris allergiques présentaient des modifications relatives d'abondance de certaines familles de bactéries, notamment les *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Rikenellaceae*, et *Porphyromonadaceae* [44].

De plus, des travaux réalisés sur des souris axéniques montre qu'en transférant le microbiote d'une souris allergique à une souris axénique on transfère également cette susceptibilité allergique.

Une étude menée par Azad *et al* en 2015 [45] sur 166 enfants a montré que le microbiote intestinal des nourrissons de 3 mois était significativement peu diversifié lorsque les enfants présentaient des allergies alimentaires; toutefois cette différence ne persistait pas à 12mois. Les échantillons fécaux des enfants allergiques montraient une sur-représentation des *Enterobactériacées* alors que les *Bacteroidacées* étaient diminuées.

Dans une autre étude, Bunyavanich *et al* (2016) [46] ont comparé la composition du microbiote intestinal chez des enfants allergiques au lait de vache dont l'allergie persistait ou se résolvait à 8ans. Les enfants devenant tolérants au lait présentaient un enrichissement en Firmicutes et Clostridia tandis que ceux dont l'allergie persistait possédaient une sur-représentation de Bacteroïdetes et Enterobacter.

De précédentes études [47] s'accordaient sur le fait que les enfants atopiques présentaient une réduction du genre *Bifidobacterium* et *Lacobacillus*, notamment des espèces *Lactobacillus rhamnosus*, *L.casei*, et *L.paracasei*.

Cependant ces études sont limitées par le faible nombre de patients inclus et le fait que toutes les variables pouvant influencer sur le microbiote ne sont pas prise en compte telles que le mode d'accouchement, la prise d'antibiotique, environnement...

b) Mécanisme

Nous avons précédemment vu que la colonisation du tractus digestif chez le nourrisson permettait ensuite d'initier le phénomène de tolérance immunitaire. La théorie hygiéniste propose que nos conditions de vie modernes (environnement nettoyé et désinfecté, prise d'antibiotiques) entraînent une modification dans l'initiation de ce phénomène ce qui conduit à l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques. Une étude [48] a montré que les enfants grandissant dans un environnement de type ferme étaient en contact avec une plus grande diversité de microbes ce qui réduisait les risques de développer de l'asthme ou des allergies. A l'inverse, d'autres études ont prouvé que les souris traitées dès les premiers jours de leur vie par des antibiotiques détruisant en partie leur microbiote développaient une plus grande sensibilité aux allergies.

Une fois activés, les lymphocytes T se différencient selon l'environnement inflammatoire en lymphocytes effecteurs Th1, Th2, Th17 ou en lymphocytes régulateurs Treg.

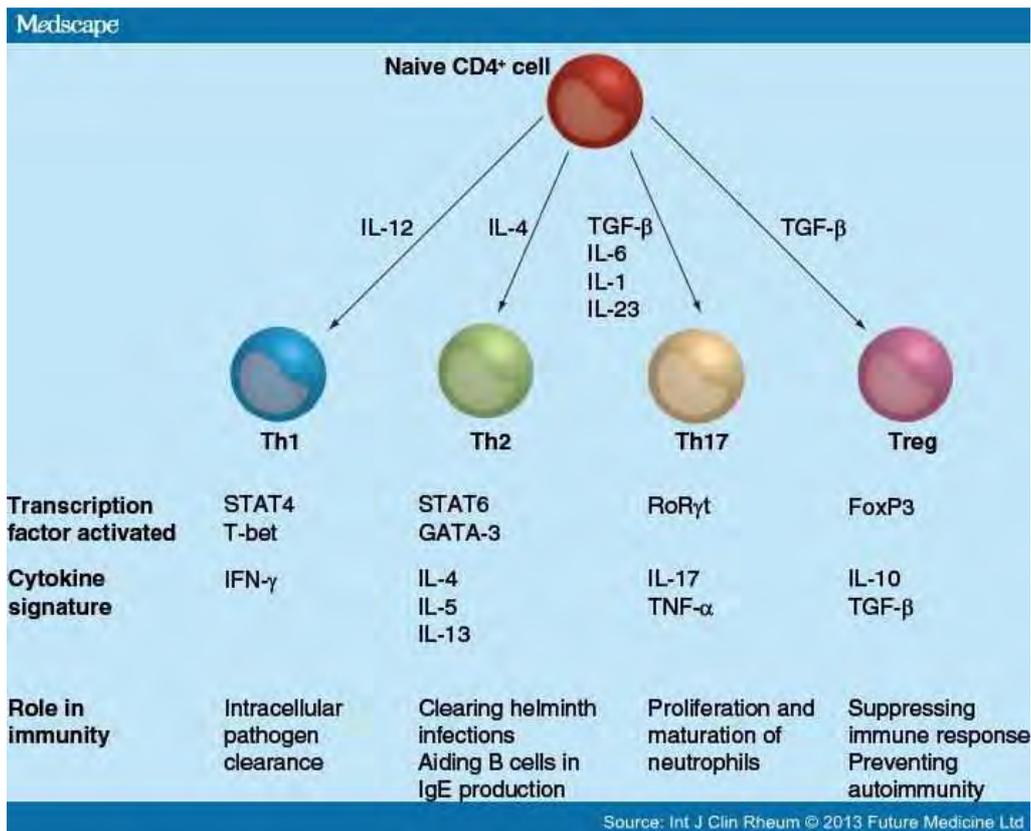


Figure 23 : Profil des réponses immunes

Dans le cas des allergies, les réponses immunitaires sont déséquilibrées vers un profil Th2. La façon dont le microbiote régule la réponse Th2 est encore floue, on ne connaît pas à ce jour de régulation directe, toutefois, il a été montré dans une étude que le microbiote intestinal promeut la différenciation en Th17 (produisant de l'interleukine 17) et en Treg (produisant de l'interleukine 10) [49]. Il a récemment été trouvé une sous-population de Treg, caractérisée par le fait qu'elle exprime le récepteur d'hormone nucléaire ROR γ t (Retinoid-related Orphan Receptor gamma t). Or, ce récepteur est classiquement un facteur de transcription clé pour la différenciation des cellules TH17. Ces cellules Treg ROR γ t⁺ produisent non pas de l'IL-17 mais de l'IL-10 et possèdent des fonctions régulatrices. Les Treg ROR γ t⁺ sont extrêmement réduits chez les souris axéniques ou traitées par antibiotiques. La recolonisation par un microbiote normal permet de restaurer le nombre de Treg ROR γ t⁺. Nous avons vu précédemment que les AGCC produits par le microbiote pouvaient agir sur le récepteur GPR43, c'est justement par l'intermédiaire de ce récepteur, exprimé à la surface des cellules épithéliales que le microbiote intervient

dans la régulation des Treg RoRyt⁺. Il a été montré qu'en l'absence de ces cellules Treg RoRyt⁺, la réponse Th2 devient prépondérante.

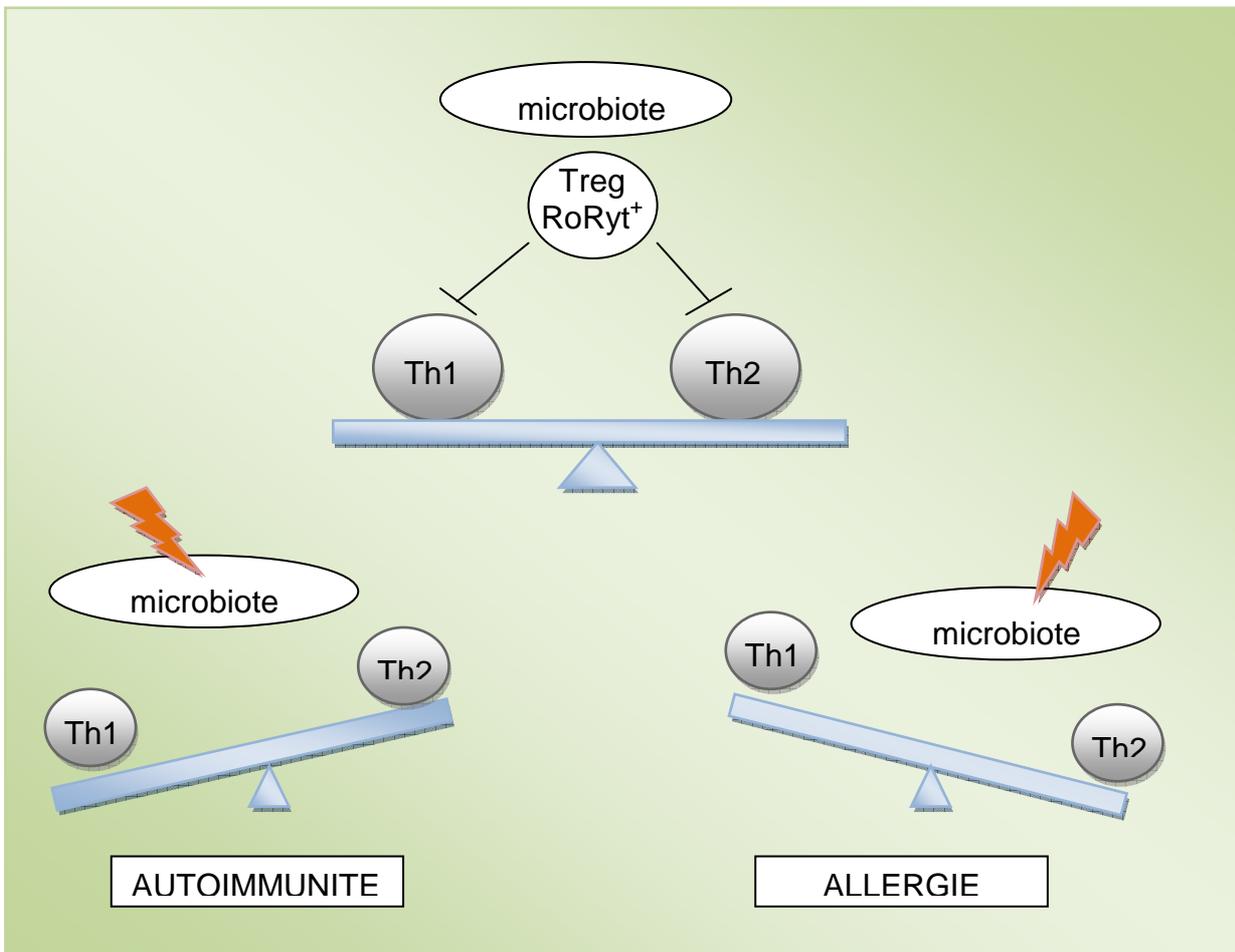


Figure 24 : Equilibre des réponses Th1/Th2

Le microbiote régule l'équilibre des réponses Th1/Th2 par l'induction de cellules régulatrices, les Treg RoRyt⁺ qui permettent l'équilibre de la réponse immunitaire.

Chapitre 3 - Approches thérapeutiques

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, le microbiote intestinal est au cœur de nombreuses fonctions essentielles à la bonne marche de l'organisme et son implication a été montrée dans diverses pathologies. La modulation du microbiote par différentes approches constitue une piste sérieuse comme thérapie.

A. Probiotiques, Prébiotiques et Symbiotiques

1. Définition

a) Les probiotiques

L'Organisation Mondiale de la Santé décrit les probiotiques comme des microorganismes (bactéries ou levures) vivants produisant des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante.

Les probiotiques peuvent se trouver naturellement dans certains aliments tels que les produits laitiers ou être rajoutés (par exemple les préparations destinées à l'alimentation des nourrissons), on les trouve aussi sous forme de comprimés, gélules, ou sachet contenant des bactéries lyophilisées. Les probiotiques les plus connus sont les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus*) et les *Bifidobactéries*. On trouve également quelques espèces de *Bacillus* et *E.coli* ainsi que la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

b) Les prébiotiques et symbiotiques

Les prébiotiques, à la différence des probiotiques, ne sont pas des micro-organismes mais des substances non digérées par les enzymes humaines. Ce sont généralement des sucres de petite taille. Leur fermentation stimule la croissance et l'activité de certaines espèces microbiennes. Les prébiotiques les plus communs sont: L'oligofructose, l'inuline, les galacto-oligosaccharides, le lactulose, les oligosaccharides du lait maternel

Les symbiotiques sont une association de prébiotiques et probiotiques : Les prébiotiques accroissent la croissance et l'activité des probiotiques. Ils sont le substrat des probiotiques.

2. Réglementation

En France, la grande majorité de probiotiques disponibles sur le marché sont considérés comme des compléments alimentaires et non des médicaments. Les compléments alimentaires sont « des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constitue une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés » c'est-à-dire qu'ils n'ont pas d'allégations thérapeutiques mais seulement des « allégations santé », cela signifie qu'il ne peuvent pas prétendre traiter ou soulager une pathologie. Certains probiotiques sont toutefois classés comme médicament, nous les verrons ultérieurement.



Figure 25 Exemples de compléments alimentaires probiotiques

ERGYPHILUS Confort® et LACTIBIANE® sont des compléments alimentaires, leurs allégations santé sont « pour le confort digestif » (ERGYPHILUS) et « contribue à renforcer la flore » (LACTIBIANE).

3. Classifications et propriétés

La classification d'un probiotique repose obligatoirement sur le genre, l'espèce et la souche. Par exemple, *Bifidobacterium longum* BB536.

Pour pouvoir exercer son activité bénéfique un probiotique doit d'une part pouvoir atteindre son site d'action vivant et d'autre part être en quantité suffisante.

La résistance du probiotique a son passage dans le tractus digestif va dépendre de la souche mais également de facteurs propres à l'hôte comme l'acidité gastrique et la sécrétion de sels biliaires. La présence de probiotiques viables en quantité requise pour obtenir l'effet escompté doit être garantie dans les produits jusqu'à leur date de péremption.

La majorité des probiotiques se trouve à un dosage de 10^9 UFC/dose. Toutefois, le dosage efficace va varier selon la souche utilisée et la forme employée. Des concentrations de probiotiques supérieures ou égales à 10^6 UFC/mL dans l'intestin grêle et à 10^8 UFC/mL dans le côlon sont considérées comme suffisantes pour produire un « effet sur la santé » (Baelde D, 2005)

4. Utilisations actuelles des probiotiques

Ces dernières années, l'engouement des probiotiques en entrainer une multiplication des recherches sur leur efficacité. A ce jour, le marché du probiotique est très développé et couvre une large palette d'indications, de la digestion au système immunitaire en passant par la mémoire. Bien que ces études soient prometteuses sur l'efficacité des probiotique, encore peut ont été réalisées de façon clinique, c'est-à-dire de façon randomisées, en double aveugle contre placebo sur un grand nombre de patient.

En France, quelques spécialités de probiotiques ont le statut de médicament et sont indiqués en complément de la réhydratation et/ou des mesures diététiques dans le traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée chez l'adulte et l'enfant de plus de six ans :

- Lactéol® 340mg : composé de *Lactobacillus acidophilus* 10^{10} germes par gélule.

- Ultra-levure® 50, 100 ou 200mg : Composé de *Saccharomyces boulardii*
- Bacilor ® gélule 250mg : composé de *Lactobacillus casei* variété *rhamnosus*, culture lyophilisée titrant au minimum 8.10^8 germes par gramme
- Lyobifidus : composé de *Bifidobacterium bifidum*



Figure 26 Exemples de médicaments probiotiques

Lactéol® et Ultra Levure® sont deux spécialités pharmaceutiques disponibles en officine

Toutefois, l'utilisation de ces spécialités n'entre pas en premières lignes de stratégie thérapeutiques, leur Service Médical Rendu a même été jugé insuffisant par la commission de la transparence pour l'indication de traitement.

L'intérêt des probiotiques est actuellement étudié dans de nombreuses pathologies : le syndrome de l'intestin irritable, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, l'entérocolite ulcéro-nécrosante du nourrisson et la diarrhée infectieuse du nourrisson.

5. Mode d'action

Les probiotiques exercent leurs effets par deux moyens. Le premier est physique, c'est-à-dire qu'ils vont coloniser le tractus digestif et entrer en compétition avec les microorganismes résidents. Cela va permettre de recoloniser avec de « bons » microorganismes un microbiote déséquilibré. Par exemple, après un traitement

antibiotiques, le microbiote est altéré, cela peut entraîner un développement des pathogènes qui sont normalement « contenus » par les bactéries commensales. L'ingestion de probiotiques permet dans ce cas d'éviter la propagation des pathogènes et permettre aux bactéries résidentes de se redévelopper petit à petit.

Le deuxième moyen d'action, moins connu, passe par le microbiome des probiotiques. En effet, les microorganismes vont directement exercer leurs effets par l'expression de leurs gènes en interférant sur le métabolisme de l'hôte.

6. Obésité et allergies

a) Probiotiques et obésité

Des études menées chez les souris ont montré que l'ingestion de probiotiques avec des effets anti obésité pourraient aider à la perte de poids : Kondo.S [50] s'est intéressé aux effets de *Bifidobacterium breve B3* sur des souris rendues obèses par un régime riche en graisse et Takemura.N a montré que *Lactobacillus plantarum 14* permettait une diminution de la masse grasseuse chez des souris nourries par un régime gras [51].

Par la suite, des études ont montré que *Lactobacillus rhamnosus PL60* et *Lactobacillus plantarum PL62* diminuaient la masse grasseuse des souris grâce à leur capacité à produire de l'acide linoléique conjugué [52] [53]. La capacité de l'acide linoléique conjugué à réduire la masse grasseuse a également été montrée chez l'humain.

L'acide linoléique conjugué (ALC ou CLA en anglais) est un dérivé de l'acide linoléique, un acide gras essentiel de la famille des oméga-6. On trouve plusieurs isomères qui semblent avoir plus ou moins d'action.

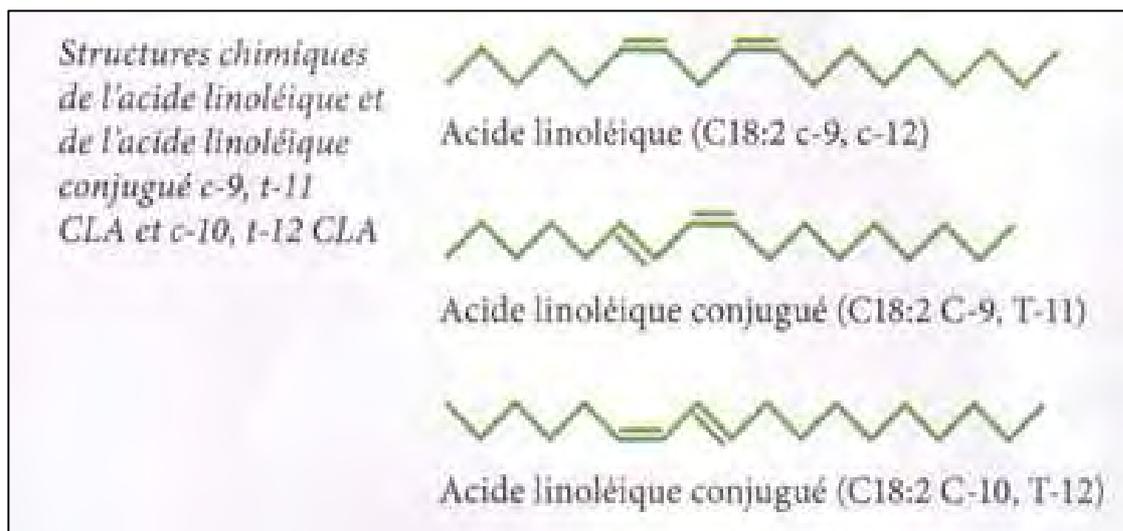


Figure 27 Structure chimique de l'acide linoléique et ALC

L'acide linoléique conjugué signifie que 2 doubles liaisons sont séparées par une liaison simple, les carbones portant les doubles liaisons sont ici les carbones 9 et 11 sur la 2^{ème} représentation et les carbones 10 et 12 sur la troisième. Les symboles C et T signifie « cis » et « trans » cela représente l'isomérisation de la molécule

Le corps humain n'est pas capable de produire seul une quantité suffisante d'ALC pour obtenir un effet significatif, cette supplémentation doit se faire par l'alimentation (produits laitiers) ou l'ingestion de probiotiques tels que des espèces de *Lactobacillus*.

Il a également été rapporté que *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium dentium* sont capables de produire de l'ALC.

La perte de poids et diminution de masse graisseuse induite par une supplémentation en *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* a été constatée dans différentes études sur la souris mais pas encore chez l'humain.

Les mécanismes d'action par lesquels l'ALC conduit à la perte de poids ne sont pas élucidés. L'ALC augmenterait la lipolyse (dégradation des lipides) ainsi que l'oxydation des acides gras au niveau du tissu adipeux et des muscles et favoriserait le métabolisme du glucose [70]

b) Prébiotiques et obésité

Les effets de l'ingestion de prébiotiques tels que l'inuline et l'oligofructose ont été étudiés.

Une étude réalisée par Parnell [54] s'est intéressée aux effets de l'ingestion d'oligofructose sur le métabolisme de sujets en surpoids et obèses. 48 adultes dont l'IMC était >25 ont été inclus dans l'étude. Après randomisation, une cohorte recevait 21g d'oligofructose tandis que l'autre recevait un placebo pendant 12 semaines. Les résultats ont montré une perte de poids chez les sujets ayant été supplémentés en oligofructose. Cette perte de poids était corrélée à une diminution du glucose sanguin et une augmentation de la sécrétion du peptide YY anorexigène par les cellules intestinales. Ainsi, la supplémentation en oligofructose conduirait à une augmentation du peptide YY avec pour conséquence une diminution de la prise alimentaire entraînant perte de poids et augmentation du métabolisme du glucidique chez les personnes en surpoids. Cette étude n'a pas analysé l'évolution de la composition du microbiote intestinal chez les sujets. Néanmoins, elle s'appuie sur une précédente étude mettant en évidence que l'oligofructose est fermenté par le microbiote intestinal et entraîne une augmentation d'AGCC.

Un régime riche en fibre semble être favorable à la stabilité et diversité du microbiote intestinal. Cela serait également bénéfique sur l'inflammation associée à l'obésité [56]. De récentes études réalisées par des chercheurs du CNRS, de l'Inserm et de l'Université Claude Bernard Lyon 1 se sont intéressées aux mécanismes par lesquels les fibres alimentaires exerçaient leurs actions bénéfiques pour l'organisme. [57] Ils ont mis en évidence que les fibres alimentaires sont fermentées par le microbiote en propionate et butyrate. Or, l'intestin est capable d'utiliser le propionate pour produire du glucose entre les repas. Ce glucose est détecté par le système nerveux présent dans les parois de la veine porte et envoie un signal nerveux au cerveau qui déclenche en retour une signalisation protectrice contre le diabète et l'obésité: la sensation de faim diminue, la dépense énergétique de repos augmente, et enfin, le foie produit moins de glucose.

Nous avons vu précédemment qu'un régime hyper lipidique conduit à une augmentation du LPS circulant couplé à une forte diminution des *Bifidobactéries*. Une étude réalisée par Cani et al [41] a mis en évidence que l'utilisation de

prébiotiques (fructo-oligosaccharides) permettait de restaurer le nombre de *Bifidobactéries* de souris nourris par un régime hyper lipidique. Ceci était corrélé à une baisse des taux plasmatiques de LPS et une diminution de l'inflammation. On retrouvait également une augmentation du nombre de cellules L intestinales et de leurs produits de sécrétion, le peptide YY et le Glucagon-like peptide 1, tous deux participant au maintien de la glycémie et au sentiment de satiété. Une autre étude a également montré que l'ingestion d'inuline entraînait une modification favorable du microbiote avec un enrichissement en *Bifidobacterium* chez l'enfant et l'adulte [55].

La figure 28 ci-dessous représente ces mécanismes : on peut voir que la supplémentation en prébiotiques enrichi le microbiote intestinal en *Bifidobactéries* ce qui a pour effet de diminuer l'inflammation dans le foie, dans le tissu adipeux et dans les muscles ; on observe également l'action sur le métabolisme avec une baisse de la lipogenèse, et une augmentation de la sensibilité des tissus à l'insuline.

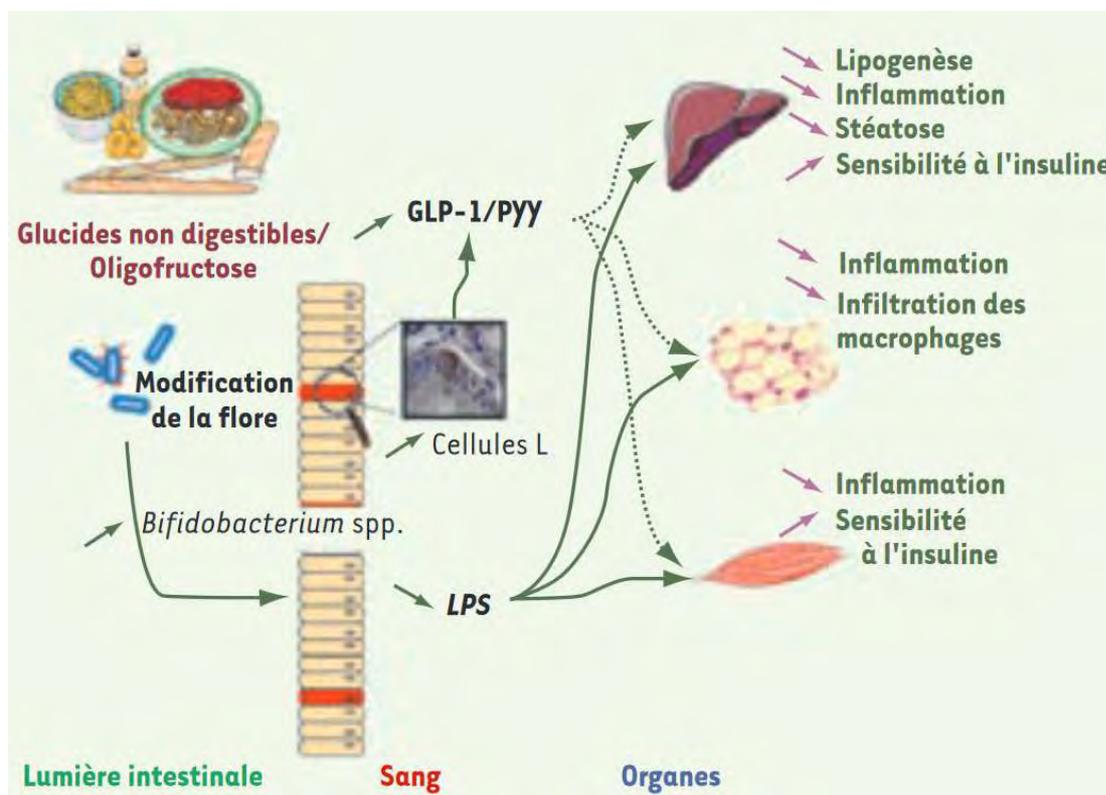


Figure 28 : Les prébiotiques diminuent l'inflammation [41]

Actions des prébiotiques sur le métabolisme de souris nourris avec un régime hyper lipidique

c) Probiotiques et allergies

Les études menées sur l'efficacité des probiotiques dans la prévention de l'eczéma et des allergies alimentaires conduisent à des données contradictoires.

Une étude clinique [58] prospective chez des enfants allergiques au lait de vache s'est intéressée à l'acquisition d'une tolérance aux protéines de lait de vache chez ces enfants. Il s'agit d'une étude clinique randomisée menée sur 55 enfants âgés de 1 à 12 mois. Les enfants allergiques au lait de vache reçoivent du lait infantile caractérisé par une hydrolyse poussée des protéines de lait de vache (caséine). Cette hydrolyse permet d'obtenir des petits peptides et acides aminés qui ne sont plus allergisants, le lait peut ainsi être donné aux enfants allergiques. Ce type de préparation est dénommée EHCF (extensively hydrolyzed casein formula).

Le premier groupe d'enfant recevait du lait infantile type EHCF tandis que le deuxième groupe recevait du lait EHCF supplémenté en *Lactobacillus GG*. Après 6 et 12 mois, on réalisait un test d'allergie qui consistait à administrer oralement des doses de protéines de lait de vache et à mesurer la réaction sur les plans cutané, digestif et respiratoire afin d'évaluer le niveau d'allergie de l'enfant. L'absence de signes cliniques témoignait de l'acquisition d'une tolérance aux protéines de lait de vaches.

La figure suivante représente les résultats obtenus :

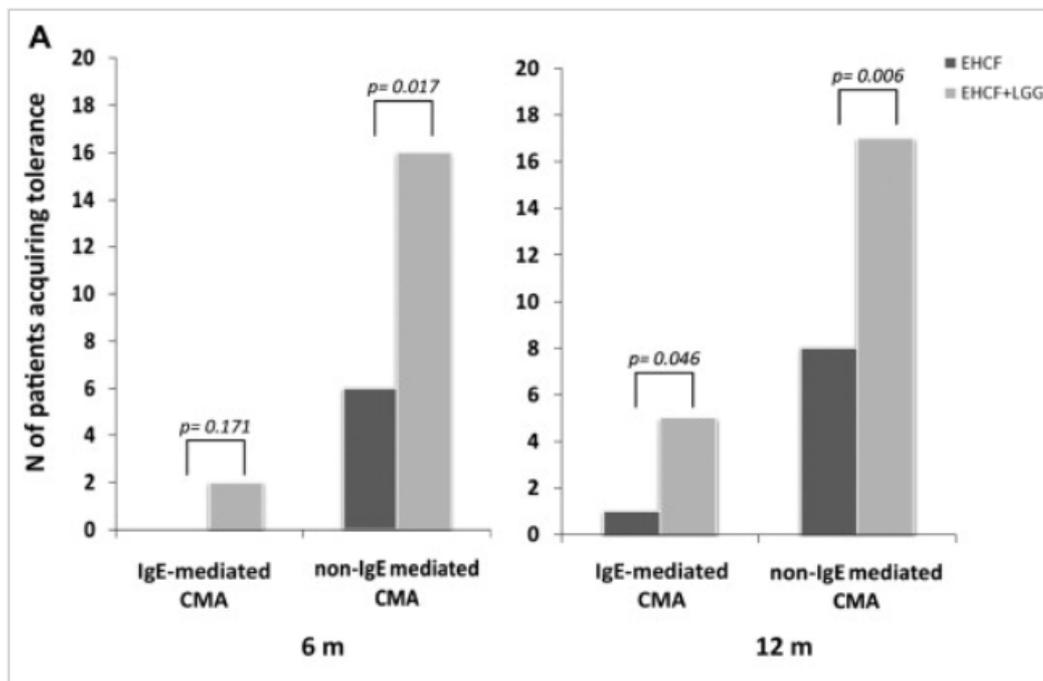


Figure 29 : Effet de *Lactobacillus GG* sur l'acquisition de la tolérance chez les enfants allergiques au lait de vache.

Cette figure représente le nombre de patients ayant acquis une tolérance à 6 et 12 mois aux protéines de lait de vache dans les 2 groupes de l'étude. Les bâtons gris clairs représentent le groupe des enfants ayant été supplémentés en *Lactobacillus GG*. CMA signifie Cow Milk Allergy (allergie au lait de vache)

Les résultats montrent que les enfants supplémentés en *Lactobacillus GG* devenaient plus rapidement tolérants aux protéines de lait de vache. *Lactobacillus GG* pourrait être impliqué dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires libérées lors des réactions allergiques qu'elles soient médiées par des IgE ou non.

Une autre étude clinique [59], placebo-contrôlée et en double aveugle, a été réalisée sur 119 enfants allergiques au lait de vache. La méthode appliquée est la même que précédemment mais avec une souche probiotique différente. Il s'agit ici d'une combinaison de *Lactobacillus casei* et *Bifidobacterium lactis*. Cette étude n'a pas mis en évidence d'augmentation de l'acquisition de la tolérance dans le groupe supplémentés en probiotiques.

Dans une autre étude clinique randomisée [60], 129 enfants à haut risque de développer des allergies étaient nourris soit avec une formule standard (lait de vache non hydrolysé) soit avec une formule enrichie en *Bifidobacterium breve* et *Streptococcus thermophilus*, de leur naissance jusqu'à l'âge de 1an. On évaluait

ensuite les manifestations allergiques apparaissant lors des tests cutanés réalisés avec des allergènes alimentaires et aériens et un test alimentaire était réalisé pour les protéines de vache. Les résultats n'ont pas montré de différence dans l'incidence de survenue d'épisode d'allergie au lait de vache dans les deux groupes.

Une méta analyse récente [61] de 17 essais contrôlés a montré que lorsque les probiotiques sont administrés à la fois prénatalement à la femme enceinte et postnatalement à la mère allaitante ou directement au nouveau-né, ils pourraient avoir un effet bénéfique sur la prévention des maladies atopiques et des hypersensibilités alimentaires.

Les résultats contradictoires de ces études pourraient être causés par les méthodologies différentes des études, le dosage et la durée de prise des probiotiques ainsi que la souche du probiotique lui-même.

Plus récemment, en 2015, le World Allergy Organization (WAO) [62] a également étudié les études cliniques réalisées sur l'utilisation des probiotiques pour la prévention des allergies afin d'établir des recommandations. Ses conclusions sont qu'à ce jour, il n'existe pas de preuves que la supplémentation de la mère et de l'enfant en probiotiques réduit efficacement le développement d'allergies durant l'enfance. Toutefois, l'utilisation de probiotiques pourrait être bénéfique pour la prévention primaire de la dermatite atopique. Le WAO recommande donc l'utilisation de probiotiques dans trois cas :

- Chez les femmes enceintes à haut risque d'avoir un enfant allergique
- Chez les femmes allaitant un enfant à haut risque de devenir allergique
- Chez les nourrissons à haut risque de devenir allergique.

Il s'agit toutefois de recommandations, les probiotiques n'ayant une place que marginale dans l'approche thérapeutique, l'étude de la WAO spécifie bien que le bénéfice attendu n'est que faible au vu des études peu significatives.

d) Prébiotiques et allergies

D'autres études ont recherché l'efficacité des prébiotiques sur les allergies. Les chercheurs ont d'abord réalisé une étude chez la souris [63]. Des souris en gestation ont quotidiennement ingéré des prébiotiques (galacto-oligosaccharides et inuline) puis pendant la phase d'allaitement des souriceaux. Trois semaines après leur sevrage, les souriceaux ont été exposés à des protéines de blé potentiellement allergisantes, il a alors été constaté que les enfants nés de mères ayant reçu des prébiotiques réagissent moins que les autres aux allergènes, de plus, chez les allergiques, les réactions étaient moins sévères.

L'équipe a obtenu un financement en 2015 pour une étude multicentrique (Nantes, Angers, la Roche sur Yon, Tours), en double insu, randomisée versus placebo, visant à évaluer chez 374 femmes enceintes avec un risque élevé d'allergie chez le futur enfant, l'efficacité d'une supplémentation maternelle anténatale en prébiotiques GOS/Inuline pendant la fin de la grossesse (à partir de 20 semaines d'aménorrhée jusqu'à l'accouchement) sur la survenue d'une dermatite atopique à un an chez le nourrisson à risque d'atopie.

7. Conclusion sur l'utilisation des prébiotiques et probiotiques.

Le marché des probiotiques et en pleine expansion, on en trouve actuellement pour une multitude de troubles. Toutefois, seules quelques indications ont fait l'objet de preuves scientifiques rigoureuses.

Concernant les pathologies présentées dans cette thèse, l'obésité et les allergies alimentaires, on ne peut pas affirmer à ce jour l'efficacité des prébiotiques ou probiotiques comme thérapie à part entière. Les études réalisées sont prometteuses, notamment l'action d'un régime alimentaire riche en fibre ou la supplémentation en prébiotiques pour l'obésité. L'action des prébiotiques et probiotiques semble également prometteuse pour la prévention de la dermatite atopique chez l'enfant.

a) Conseil à l'officine et discussion

A l'officine, les pré/probiotiques ne sont pas présentés comme thérapie à part entière de l'obésité ou des allergies, ils peuvent être conseillés par le pharmacien en complément de la stratégie établie par le médecin. Les probiotiques peuvent être utilisés par les enfants, nourrissons, adultes, femmes enceintes et allaitantes.

Concernant l'obésité : des études ont montré un rôle favorable des probiotiques dans la perte de poids. Toutefois il n'y a pas à ce jour d'étude de grande ampleur chez l'homme pour soutenir l'efficacité des probiotiques dans la perte de poids. Une piste prometteuse est l'utilisation de prébiotiques afin de rétablir le niveau en *Bifidobactéries*, diminué chez les patients obèses. Le pharmacien peut conseiller un régime alimentaire riche fruits, légumes et céréales pour leur apport en fibres ainsi que la supplémentation en prébiotiques avec des compléments alimentaires à base d'inuline ou de fructo-oligo-saccharides.

Concernant les allergies : comme vu précédemment il n'y a pas de preuves à ce jour que les probiotiques sont efficaces pour réduire les manifestations allergiques mais il semblerait qu'ils exercent une action bénéfique pour la prévention de la dermatite atopique chez l'enfant. Les souches de probiotiques utilisées dans ces études étaient essentiellement des *Lactobacillus*. Le pharmacien peut conseiller aux femmes enceintes et allaitantes à haut risque d'avoir un enfant allergique l'utilisation de ces souches. L'utilisation des prébiotiques pourrait également être conseillée mais il manque d'étude sur leur efficacité dans les allergies.

Pour le nourrisson nourris avec des préparations infantiles, il existe une large gamme de produits enrichis en pré/probiotiques sur le marché dont des laits infantiles, le pédiatre peut conseiller leur emploi. Ces laits sont enrichis afin de mimer la composition du lait maternel et de conférer aux nourrissons nourris au lait de vache un écosystème bactérien proche de celui des enfants exclusivement nourris au sein.

Pour les nourrissons nourris au sein, la mère peut améliorer la composition de son lait maternel par le biais d'une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes pour leur apport en fibres notamment. Elle peut compléter par une supplémentation avec des compléments alimentaires. Dans tous les cas, il est essentiel qu'elle prenne soin

de son alimentation car son comportement alimentaire influera sur le microbiome du lait maternel et donc sur le microbiome de l'enfant.

B. La transplantation de microbiote fécal

1. Définition et contexte

La transplantation de microbiote fécal consiste en l'introduction des selles d'un donneur sain dans le tube digestif d'un patient receveur afin de rééquilibrer la flore intestinale altérée de l'hôte.

La transplantation du microbiote fécal a été particulièrement étudiée et a montré de très bons résultats dans les cas d'infection à *Clostridium difficile* réfractaires à un traitement antibiotique conventionnel. Des recommandations internationales (comme la société savante European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease) proposent ce traitement dans les infections à *Clostridium difficile* multi récidivantes. La transplantation du microbiote fécal constitue une approche thérapeutique potentielle pour toutes les pathologies liées à un désordre de microbiote intestinal telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les troubles fonctionnels intestinaux, l'obésité, les maladies métaboliques et auto-immunes, les désordres neuropsychiatriques.

Les études actuelles n'ont pas clairement établie la balance bénéfique/risque, cette technique est donc réservée aux pathologies graves, réfractaires au traitement conventionnel et/ou en l'absence d'alternative thérapeutique.

2. Réglementation

A l'échelle mondiale, le microbiote fécal n'a pas le même statut dans les différents pays. Les Etats-Unis considèrent qu'il s'agit d'un médicament alors que certains Etats membres (Royaume-Uni, Danemark et Pays-Bas) ne le qualifient pas comme tel (certains comme un tissu).

En France, le Code de la Santé Publique ne prévoit pas de statut particulier pour le microbiote fécal. Toutefois, dans la mesure où le microbiote fécal est utilisé à visée

curative à l'égard de maladies humaines, il doit être considéré comme un médicament conformément à l'article L. 5111-1 du Code de la Santé publique :

« toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. [...] »

Pour mieux évaluer la balance bénéfique/risque, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), encourage la mise en place d'essais cliniques contrôlés. Cela permettra d'évaluer les effets escomptés mais également les risques immédiats (infectieux, allergique...) ou des risques à long terme plus méconnus, liés au remplacement d'une communauté complexe de micro-organismes par une autre.

Le microbiote fécal répond à la définition d'un médicament et sa préparation sera sous la responsabilité d'une Pharmacie à Usage Intérieur (PUI).

.

3. La transplantation

La première étape essentielle à la transplantation est le choix du donneur. Celui-ci peut être une personne familière ou un anonyme. Afin d'éliminer le risque de transmission d'agents pathogènes, les donneurs sont tout d'abord minutieusement interrogés puis des tests de dépistage en laboratoire sur les selles sont réalisés.

Le questionnaire est réalisé sur la base de celui d'un don de sang afin de prévenir le risque infectieux. Certains critères en plus sont spécifiques au don de selles, ils sont présentés sur la figure ci-dessous :

Tableau VI : Questionnaire de présélection (ANSM)

INFORMATIONS	CRITERES DE NON INCLUSION ABSOLUE	CRITERES DE NON INCLUSION « RELATIVE » (à justifier)
Co-morbidités	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Donneur avec une pathologie chronique connue ▪ Antécédent de fièvre typhoïde ▪ Troubles digestifs (diarrhée aiguë ou chronique) dans les 3 mois précédant le don 	Donneurs avec antécédents familiaux : <ul style="list-style-type: none"> - MICI (lien de parenté) - maladies auto-immunes (lien de parenté) - cancer colique (lien de parenté et âge d'apparition)
Traitement médicamenteux	Donneur suivant un traitement curatif au long cours	Donneur traité par anti-infectieux au cours des 3 mois précédant le don ³
Voyages	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Séjour en zone intertropicale au cours des 3 mois précédant le don ▪ Résidence de plusieurs années en zone intertropicale ▪ Hospitalisations à l'étranger de plus de 24h dans les 12 derniers mois (y compris membres de l'entourage du donneur)¹ 	
Âge	Donneur mineur ²	Donneur âgé (>65 ans) ⁴
Statut pondéral	Non limitant mais 	Donneur avec IMC>30 ⁵

L'hospitalisation à l'étranger est proscrite afin d'éviter le risque de portage de bactéries multi résistantes. Les donneurs mineurs ne sont pas autorisés en accord avec la législation régissant le don de produit du corps humain. Les donneurs âgés et obèses sont à éviter : les personnes âgées peuvent avoir un microbiote modifié et le risque de comorbidités est plus important. Chez les obèses, non seulement leur microbiote est altéré mais des résultats scientifiques ont montré qu'il est possible de transférer via le microbiote des pathologies comme l'obésité et le diabète.

A la suite du premier questionnaire, un prélèvement de selles est réalisé pour effectuer des tests de dépistage de maladie transmissibles.

Tableau VII : Liste des agents infectieux à dépister chez les donneurs (ANSM)

	SANG	SELLES
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Treponema pallidum</i> 	Coproculture standard et orientée: <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Clostridium difficile</i> ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> ▪ <i>Vibrio cholerae</i> / <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ▪ <i>Salmonella</i> ▪ <i>Shigella</i> ▪ Bactéries multirésistantes aux antibiotiques
Virus ¹	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ▪ Virus T-lymphotropique humain (HTLV) ▪ Virus des hépatites B et C (HVB HVC) ▪ Cytomégalovirus (CMV) / Virus Epstein-Barr (EBV) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adénovirus ▪ Astrovirus ▪ Calcivirus (norovirus, sapovirus) ▪ Picornavirus (entérovirus, Virus Aichi) ▪ Rotavirus ▪ Virus des hépatites A et E
Parasites	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Strongyloïdes stercoralis</i> ▪ <i>Toxoplasma gondii</i>³ ▪ <i>Trichinella sp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Strongyloïdes stercoralis</i> ▪ <i>Cryptosporidium sp.</i> ▪ <i>Cyclospora sp.</i> ▪ <i>Entamoeba histolytica</i> ▪ <i>Giardia intestinalis</i> ▪ <i>Isospora sp.</i> ▪ <i>Microsporidies</i>

Cette liste est exhaustive et permet d'éviter toute contamination du receveur.

Lorsque le questionnaire de présélection et les tests de dépistage ont permis d'écartier tout risque, le don peut être réalisé.

Un deuxième questionnaire est réalisé immédiatement avant le don pour prévenir le risque de contamination entre la présélection et le jour du don.

Tableau VIII : Questionnaire de sélection (ANSM)

CRITERES DE NON INCLUSION	INCLUSION SUR LA BASE D'UNE APPRECIATION INDIVIDUELLE
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Episode de diarrhée (>3 selles molles à liquide /j) chez le donneur ou les membres de son entourage ▪ Situations à risque de contamination : <ul style="list-style-type: none"> - Voyage à l'étranger - Contact avec du sang humain (piercing, tatouage, piqûre, plaie, projection, soins dentaires...) - Comportement sexuel à risque - Présence de lésions anales (afin de limiter le risque de transmission du virus du papillome humain et des virus de l'herpès) 	<p>Recherche des événements suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Consultation médicale (motif) ▪ Maladie contractée (laquelle, date et durée) ▪ Prise de médicaments (lesquels, date de la dernière prise)

Ces critères doivent exclure le donneur potentiel car ils traduisent soit un risque d'infection ou de microbiote altéré (diarrhées) ou des risques d'avoir été exposé à une contamination.

Le don destiné à la transplantation doit être administré, une fois préparé, dans le délai le plus court possible, le jour de l'émission de selles.

La préparation en elle-même ne pose pas de difficulté, il s'agit de mettre en suspension les selles fraîches dans une solution saline, d'homogénéiser et filtrer. Cette préparation relève de la responsabilité de la PUI.

L'implantation de la préparation dans le tractus intestinal du malade se fait soit par sonde naso-duodénale, soit par lavement ou coloscopie. La difficulté de la première technique est le risque important de vomissements causé par l'impact psychologique. La coloscopie présente l'avantage d'intégrer directement la préparation au niveau du colon.

Le patient transplanté fera l'objet d'une surveillance étroite à la suite de la procédure. De plus, une coprothèque doit être réalisée sur les selles du donneur.

4. La transplantation fécale dans l'obésité.

La transplantation fécale dans l'obésité a été principalement réalisée sur des souris. C'est de cette façon qu'il a été démontré que le phénotype obèse pouvait être transféré par le microbiote. En effet, en 2013, Gordon et Coll. ont transféré le microbiote de jumelles dont une seule était obèse à des souris axéniques : les souris ayant reçu le microbiote de la jumelle obèse sont devenues obèses tandis que celles ayant reçues le microbiote de la jumelle mince sont restées minces. A partir de là, l'idée de transplanter le microbiote d'un donneur sain vers une personne malade s'est grandement développée.

Une première étude a été menée chez les rats [64]. Des rats nourris par un régime riche en fructose développent un syndrome métabolique, dont la survenue est une caractéristique des maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète. Ces rats étaient ensuite séparés en deux groupes, l'un était traité par antibiotique, l'autre par transplantation fécale provenant de rats sains. Les résultats ont montré que la transplantation fécale permettait de diminuer les marqueurs du syndrome métabolique et de l'inflammation. De plus, deux genres bactériens, *Coprococcus* et *Ruminococcus* étaient significativement augmentés chez les rats nourris par un régime haut en fructose puis étaient réduits par le traitement antibiotique et par la transplantation fécale. Ces données suggèrent que le développement du syndrome métabolique est directement corrélé au microbiote intestinal.

A ce jour, un seul rapport d'étude est disponible sur des sujets humains présentant un syndrome métabolique [65]. L'étude recherchait les effets d'un transfert de microbiote fécal de donneurs sains et minces vers des patients receveurs atteints de syndrome métabolique en observant les répercussions sur la composition du microbiote et le métabolisme du glucose.

Les receveurs étaient placés de façon randomisée dans deux groupes : un groupe qui recevait une transplantation de microbiote fécal de donneur sain (allogreffe), l'autre groupe recevait une transplantation de son propre microbiote fécal (autogreffe). Trois paramètres étaient mesurés avant puis six semaines après la transplantation :

-La sensibilité à l'insuline

- La composition du microbiote du colon (échantillon fécaux) et de l'intestin (biopsie duodénale)

-Le taux d'acides gras courtes chaînes (AGCC) présent dans les feces.

Les résultats montrent que les patients ayant reçu une allogreffe présentent une amélioration de la sensibilité des tissus à l'insuline : Le taux moyen de d'utilisation du glucose par les tissus insulino-dépendants passait de 26.2 à 45.3 $\mu\text{mol/kg/min}$. Ce chiffre traduit une augmentation de l'utilisation du glucose donc de la sensibilité des tissus à l'action de l'insuline).

L'étude de leur microbiote fécal n'a pas montré de modification du nombre total de bactéries dans les fèces, toutefois, la diversité du microbiote était significativement augmentée dans le cas de l'allogreffe tandis qu'il n'y avait pas de changement dans le groupe ayant reçu l'autogreffe. 16 groupes bactériens étaient particulièrement augmentés, notamment ceux capables de produire du butyrate comme *Roseburia intestinalis* qui était augmenté de 2,5 fois.

Concernant le taux d'AGCC présents dans les fèces, il était diminué chez les patients ayant reçu l'allogreffe (pour l'acétate, le butyrate et le propionate) tandis qu'il n'y avait pas de modifications significatives dans l'autre groupe.

Les conclusions de cette étude montrent d'une part que le transfert de microbiote fécal de donneurs minces augmente la diversité du microbiote avec notamment une augmentation de bactéries produisant du butyrate et d'autre part que cela améliore la sensibilité des tissus à l'insuline. Cette étude a mis en évidence le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la régulation du métabolisme du glucose via la production de butyrate.

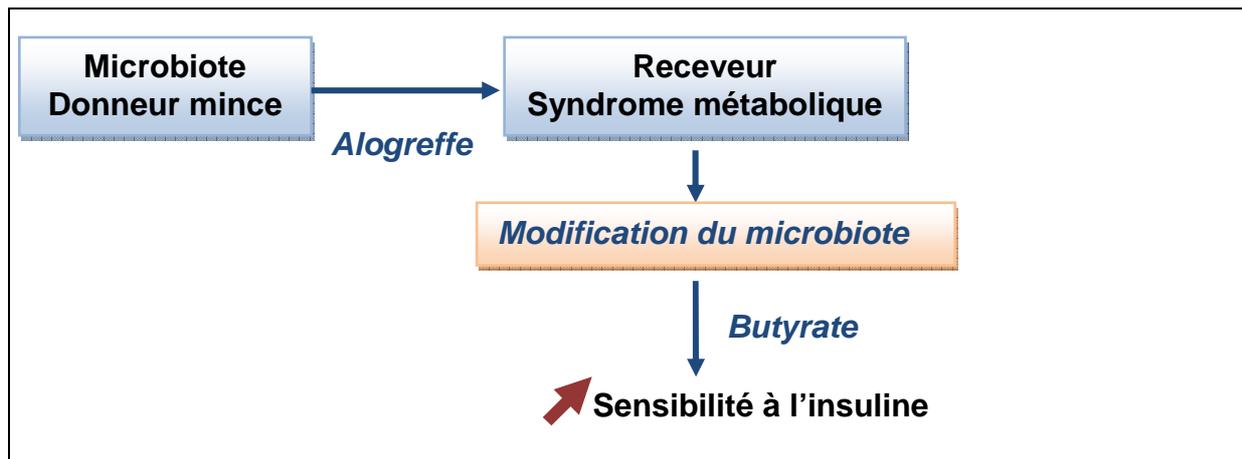


Figure 30 : Effet du transfert de flore fécale

Le transfert d'un donneur mince vers un patient atteint de syndrome métabolique entraîne une modification de microbiote ce qui augmente de la sensibilité des tissus à l'insuline

Des données cliniques supplémentaires sont nécessaires pour valider l'effet du transfert de microbiote fécal dans l'obésité. Plusieurs études cliniques, contrôlées versus placebo sont actuellement en cours :

- Une étude clinique de phase 2 est en cours pour évaluer l'impact du transfert de microbiote fécal sur la réduction de poids de personnes obèses. [66]
- Une autre étude Clinique de phase 3 évalue l'efficacité du transfert de microbiote fécal sur l'insulino-résistance combiné aux règles hygiéno-diététiques chez les patients présentant un syndrome métabolique. [67]
- Une étude clinique de phase 3 évalue l'efficacité du transfert de microbiote fécal chez les patients présentant un diabète de type 2. [68]

Ces études cliniques permettront de déterminer si cette technique peut être envisagée dans la thérapie des maladies métaboliques dont l'obésité.

5. La transplantation fécale dans les allergies

On ne trouve pas à ce jour dans la littérature de rapport concernant l'efficacité de la transplantation fécale dans les allergies. Cela s'explique probablement par le fait que l'implication du microbiote dans les manifestations allergiques a été découverte plus tardivement comparé aux données dans la régulation du métabolisme énergétique. De plus, la compréhension des mécanismes par lesquels il intervient dans les allergies n'est pas aussi avancée.

Les données scientifiques actuelles indiquent que l'intervention du microbiote dans les allergies se fait d'avantage en amont, dans la maturation du système immunitaire et son fonctionnement plus que sur la crise allergique en elle-même. C'est pourquoi il est d'avantage recherché des pistes pour moduler le microbiote très tôt, afin de prévenir le développement des allergies chez l'enfant, en passant par la mère allaitante ou les préparations infantiles. Pour cela, l'utilisation des prébiotiques et probiotiques est préférable chez l'enfant tandis que la transplantation de microbiote fécale est plus invasive. La balance bénéfice/risque n'est donc favorable à l'utilisation de cette technique dans les allergies.

Conclusion

Le microbiote intestinal, jusqu'alors peu connu, constitue un élément incontournable de notre organisme. La communauté scientifique le considère même comme un organe à part entière. Il est alors primordial d'identifier cet organe du point de vue de sa composition et de son activité métabolique.

Le microbiote est une communauté complexe de microorganismes, propre à chaque individu. Le progrès des techniques moléculaires combiné au lancement de projets de grande ampleur tel MetaHit [3] en Europe nous a permis de comprendre sa composition, et aussi son rôle. Les données montrent que le microbiote d'un individu peut être classé dans un des trois entérotypes identifiés, dont la composition dépend en partie du régime alimentaire. Cependant d'autres facteurs contribuent à la composition d'un microbiote définitif et stable : la façon dont nous sommes nés ainsi que l'environnement dans lequel nous vivons au quotidien.

Le microbiote intestinal agit sur notre santé en exerçant des fonctions bénéfiques. Cependant, si un microbiote intestinal équilibré est un signe de bonne santé, les travaux chez l'animal et l'homme font état d'un lien entre une modification de la flore intestinale et la survenue de pathologies. Ainsi, le microbiote intestinal est une des étiologies de l'obésité et des manifestations allergiques.

Devant ces constatations, de nombreuses études se sont intéressées à la modulation du microbiote intestinal comme approches thérapeutiques. Nous avons présenté deux approches : la supplémentation avec des prébiotiques ou probiotiques, ainsi que le transfert de flore fécale.

Les probiotiques et prébiotiques sont actuellement confrontés à un paradoxe : le marché est en pleine expansion avec une gamme très large et un marketing important tandis que les études scientifiques, très prometteuses, ne sont néanmoins pas encore suffisamment significatives pour donner aux pré- et probiotiques leur place dans les stratégies thérapeutiques. Devant ce constat, le pharmacien a un rôle clé, il doit guider et conseiller le patient sur le choix de la souche et son indication. On voit actuellement dans les officines des patients souhaitant prendre des probiotiques « parce que c'est bon pour la santé », le pharmacien doit pouvoir

expliquer ce qu'est un probiotique ou prébiotique, pour qu'elle indication le prendre et comment le prendre. Les études s'avèrent toutefois prometteuses et leur utilisation pourrait devenir une réelle approche thérapeutique. Il est donc absolument nécessaire d'avoir une bonne connaissance pour les utiliser au meilleur de leur potentiel.

Le transfert de flore fécale, employée uniquement à ce jour pour des infections à *Clostridium difficile* réfractaires, est une technique très prometteuse pour les autres pathologies pour lesquelles le microbiote intestinal est impliqué. Toutefois à ce jour, il n'y a pas assez de données cliniques pour statuer sur son efficacité.

Les années à venir seront riches en résultats d'études cliniques et peut être sommes-nous à l'aube d'une toute nouvelle approche thérapeutique : intervenir sur les facteurs déterminants du microbiote afin d'en prévenir sa dérégulation et le corriger si besoin.

Bibliographie

- [1] Moore WEC, Holdeman LV. Human Fecal Flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiology*. Mai 1974; 27(5):961-979
- [2] Moore WEC, Holdeman LV. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr*. Dec 1974;27(12):1450-1455.
- [3] MetaHIT consortium. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. 2010 Mar 4;464(7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821.
- [4] NIH Human Microbiome Project [Internet]. Disponible sur <http://www.hmpdacc.org/>
- [5] B.-S. Kim, Y.-S. Jeon, and J. Chun, "Current Status and Future Promise of the Human Microbiome," *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, vol. 16, no. 2, pp. 71–79, Jun. 2013.
- [6] Paul B. Eckburg, Elisabeth M. Bik, Charles N. Bernstein, Elizabeth Purdom, Les Dethlefsen, Michael Sargent, Steven R. Gill, Karen E. Nelson, and David A. Relman. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 2005 Jun 10; 308(5728): 1635–1638.
- [7] Coudeyras S, Forestier C. Microbiota and probiotics: effects on human health. *Can J Microbiol*. 2010 Aug;56(8):611-50. doi: 10.1139/w10-052.
- [8] Ley, Ruth E, Peter J Turnbaugh, Samuel Klein, et Jeffrey I Gordon. « Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity ». *Nature* 444, no. 7122 (décembre 21, 2006): 1022-1023.
- [9] Anderson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS ONE* 3(7): e2836. doi:10.1371/journal.pone.0002836
- [10] Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, Moya A, D'Auria G (2011) The Active Human Gut Microbiota Differs from the Total Microbiota. *PLoS ONE* 6(7): e22448. doi:10.1371/journal.pone.0022448
- [11] Del Chierico F, Vernocchi P, Bonizzi L, Carsetti R, Castellazzi AM, Dallapiccola B, de Vos W, Guerzoni ME, Manco M, Marseglia GL, Muraca M, Roncada P, Salvatori G, Signore F, Urbani A, Putignani L. Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: the central role of combined meta-omics-based approaches. *J Proteomics*. 2012 Aug 3;75(15):4580-7. doi: 10.1016/j.jprot.2012.02.018. Epub 2012 Feb 23.

- [12] Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. De Vos & A. D. Akkermans (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*, 68, 219-26.
- [13] Penders J., THIJSS C. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Maastricht : American Academy of Pediatrics, 2006.
- [14] Biasucci G¹, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010 Jul;86 Suppl 1:13-5. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004. Epub 2010 Feb 4.
- [15] R. Cibik, F. Marcille, G. Corthier, and J. Dore, "Bacterial intestinal flora: development, characteristics and influence of the type of feeding" *Arch. Pédiatrie*, vol. 11, no. 6, pp. 573–575, Jun. 2004.
- [16] Agence Science Presse [internet] A la découverte des cellules du lait maternel. Disponible sur <http://www.sciencepresse.qc.ca/>
- [17] Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Annual Meeting 3 Feb, 2016 Maternal Diet Alters the Breast Milk Microbiome and Microbial Gene Content
- [18] Yatsunencko et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227(14 June 2012)doi:10.1038/nature11053
- [19] Lawrence A. David, Corinne F. Maurice , Rachel N. Carmody, David B. Gootenberg, Julie E. Button. « Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome". *Nature* 505, 559–563 (23 January 2014) doi:10.1038/nature12820
- [20] Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont & M. J. Butel (2007) "Establishment of the intestinal microflora in neonates". *Gastroenterol Clin Biol*, 31, 533-42.
- [21] Ann M O'Hara and Fergus Shanahan. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006 Jul; 7(7): 688–693. doi: 10.1038/sj.embor.7400731
- [22] Gerard, P et Bernalier-Donadille, A. Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 42,pp28-36. 2007
- [23] Cherbuy C, Honvo-Houeto E, Bruneau A, Bridonneau C, Mayeur C, Duée PH, Langella P, Thomas M. Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Aug;299(2):G348-57. doi: 10.1152/ajpgi.00384.2009. Epub 2010 May 13.
- [24] C. V. Srikanth and Beth A. McCormick. Interactions of the Intestinal Epithelium with the Pathogen and the Indigenous Microbiota: A Three-Way Crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008; 2008: 626827. Published online 2008 Oct 29. doi: 10.1155/2008/626827

- [25] Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*. 2001 Jun;73(6):1131S-1141S.
- [26] Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. Epub 2004 Oct 25.
- [27] Cummings, JH, Macfarlane, GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991, 70(6), pp.443-459.
- [28] Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS One* 2012 ; 7 : e28742.
- [29] El Kaoutari A, Armougom F, Gordon JI, *et al*. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2013 ; 11 : 497–504.
- [30] Krajmalnik-Brown R, Ilhan ZE, Kang DW, DiBaise JK. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr Clin Pract*. 2012 Apr;27(2):201-14. doi: 10.1177/0884533611436116. Epub 2012 Feb 24.
- [31] Veiga, P. *et al*. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. 2005, *FEMS microbiology letters*, 242(1),pp.81-86.
- [32] Gerard,P., Lepercq,P *et al*. *Bacteroides* sp.strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 73 (18), pp5742-5749.
- [33] Samuel, Buck S, Abdullah Shaito, Toshiyuki Motoike, Federico E Rey, Fredrik Backhed, Jill K Manchester, Robert E Hammer, *et al*. « Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 43 (octobre 28, 2008): 16767-16772.
- [34] Foligne B, Nutten S, Granette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 14;13(2):236-43.
- [35] Yamanaka T, Helgeland L, Farstad IN, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol*. 2003 Jan 15;170(2):816-22.
- [36] Bry,L,P.G.Falk,T.Midtvedt &J.I Gordon. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. 1996 *Science*, 273,1380-3.

- [37] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* 2006 ; 444 : 1027-31.
- [38] Arora T, Sharma R. Fermentation potential of the gut microbiome: implications for energy homeostasis and weight management. *Nutr Rev.* 2011; 69(2):99–106. [PubMed: 21294743]
- [39] Schwartz, Andreas, David Taras, Klaus Schäfer, Silvia Beijer, Nicolaas A Bos, Christiane Donus, et Philip D Hardt. « Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18, no. 1 (janvier 2010): 190-195.
- [40] Payne AN, Chassard C, Zimmermann M, Muller P, Stinca S, Lacroix C. The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutr Diabetes.* 2011; 1:e12. [PubMed: 23154580]
- [41] P.D. Cani, J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo : « Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance" *Diabetes*, 56 (2007), pp. 1761–1772
- [42] Anderson, PD et al. Innate Immunity modulates adipokines in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007. 92(6), pp.2272-2279.
- [43] Ghanim, H et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal implications for insulin resistance. *Diabetes care* 2009, 32(12), pp.2281-2287.
- [44] Rima Rachid and Talal A.Chatila. The role of the gut microbiota in food allergy. *Curr Opin Pediatr* 28 (6), 748-753. 12 2016.
- [45] Azad MB, Konya T, Guttman DS, et al. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy* 2015; 45:632–643.
- [46] Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol* 2016; pii: S0091- 6749(16)30268-8. [Epub ahead of print]
- [47] Johansson MA, Sjögren YM, Persson JO, Nilsson C, Sverremark-Ekström E. Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PLoS One.* 2011;6(8):e23031. doi: 10.1371/journal.pone.0023031. Epub 2011 Aug 1.
- [48] Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011; 364:701–709.

- [49] I.I.Ivanov, R. L. Frutos, N. Manel, K. Yoshinaga, D. B. Rifkin, R. B. Sartor, B. B. Finlay, D. R. Littman. "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine". *Cell Host Microbe* 4, 337–349 (2008). doi:10.1016/j.chom.2008.09.009 pmid:18854238
- [50] Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, et al. "Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity". *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 74(8):1656–1661. [PubMed: 20699581]
- [51] Takemura N, Okubo T, Sonoyama K. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp Biol Med*. 2010; 235(7):849–856.
- [52] Lee HY, Park JH, Seok SH, et al. "Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2006; 1761(7):736–744.
- [53] Lee K, Paek K, Lee HY, Park JH, Lee Y. "Antiobesity effect of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice." *J Appl Microbiol*. 2007; 103(4):1140–1146. [PubMed: 17897219]
- [54] Parnell JA, Reimer RA. "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):1751–1759. [PubMed: 19386741]
- [55] Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr*. 2009; 101(4):541–550. [PubMed: 18590586]
- [56] Al-Lahham S, Roelofsen H, Rezaee F, et al. Propionic acid affects immune status and metabolism in adipose tissue from overweight subjects. *Eur J Clin Invest*. 2011 Aug 23.
- [57] Filipe De Vadder, Petia Kovatcheva-Datchary, Daisy Goncalves, Jennifer Vinera, Carine Zitoun, Adeline Duchamp, Fredrik Bäckhed, Gilles Mithieux. "Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits". *Cell* 9 janvier 2014
- [58] Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, et al. Effect of *Lactobacillus GG* on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *J Allergu Clin Immunol* 2012; 19:580-582; 2 e1-5
- [59] Hol J, van Leer EH, Elink Schuurman BE, de Ruiter LF, Samsom JN, Hop W, Neijens HJ, de Jongste JC, Nieuwenhuis EE. The acquisition of tolerance toward cow's milk through probiotic supplementation: a randomized, controlled trial. *J Allergy*

Clin Immunol. 2008 Jun;121(6):1448-54. doi: 10.1016/j.jaci.2008.03.018. Epub 2008 Apr 24.

[60] Morisset M, Aubert-Jacquin C, Soulaines P, Moneret-Vautrin DA, Dupont C. A non-hydrolyzed, fermented milk formula reduces digestive and respiratory events in infants at high risk of allergy. *Eur J Clin Nutr.* 2011 Feb;65(2):175-83. doi: 10.1038/ejcn.2010.250. Epub 2010 Nov 17.

[61] Zhang GQ, Hu HJ, Liu CY, Zhang Q, Shakya S, Li ZY. Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine (Baltimore).* 2016 Feb;95(8):e2562. doi: 10.1097/MD.0000000000002562.

[62] Fiocchi A et al, "World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics." *World Allergy Organ J.* 2015 Jan 27;8(1):4. doi: 10.1186/s40413-015-0055-2. eCollection 2015.

[63] G. Bouchaud et coll. Maternal exposure to GOS/Inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy, édition en ligne* du 1er octobre 2015

[64] Di Luccia B, Crescenzo R, Mazzoli A. et al. Rescue of Fructose-Induced Metabolic Syndrome by Antibiotics or Faecal Transplantation in a Rat Model of Obesity. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134893.

[65] Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology.* 2012 Oct;143(4):913-6.e7. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.031. Epub 2012 Jun 20.

[66] Site internet ClinicalTrials.gov, ID NCT02530385 disponible sur <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02530385>

[67] Site internet ClinicalTrials.gov, ID NCT02050607 disponible sur <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02050607>

[68] Site internet ClinicalTrials.gov, [NCT01790711](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01790711) disponible sur <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01790711>

[69] Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI, Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 16;104(3):979-84.

[70] Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. *Lipids*. 2001 Aug;36(8):773-81.

AUTEUR : Laure FRAYSSINHES

TITRE : IMPLICATION DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA SANTE ET ENJEUX THERAPEUTIQUES

DIRECTEUR DE THESE : Mme Cendrine CABOU DI BARADAT

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 3 février 2017

RESUME

Le microbiote intestinal est un ensemble de microorganismes complexe vivant en symbiose avec l'hôte. L'évolution récente des techniques moléculaires a permis de mieux connaître la composition du microbiote et d'identifier trois groupes appelés entérotypes. L'alimentation, le mode d'accouchement et l'environnement sont des facteurs modulant la composition bactérienne. Il existe aujourd'hui un réel engouement de la recherche pour décrire la nature des interactions hôte-microbiote et leurs conséquences en matière de santé. On sait désormais que le microbiote joue un rôle dans la protection de la physiologie intestinale, ainsi que dans les fonctions métaboliques et immunitaires. Ainsi, un déséquilibre de cette flore est impliqué dans l'obésité et les manifestations allergiques. L'utilisation de pré- et probiotiques et le transfert de flore fécale, pourraient, en modulant le microbiote intestinal, devenir de nouvelles approches thérapeutiques.

TITLE : IMPLICATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN THE HEALTH AND THERAPEUTIC STAKES.

SUMMARY

The intestinal microbiota is a complex set of microorganisms living in symbiosis with the host. The recent evolution of molecular technical has improved our knowledge of the composition of the microbiota and three groups have been identified, called enterotypes. Diet, mode of delivery and environment are factors that modulate bacterial composition. There is now a real interest in research to describe the nature of host-microbiote interactions and their impact on health. It is now known that the microbiota plays a role in protection of intestinal physiology, digestive and immune functions. Thus, an imbalance of this flora is implicated in obesity and allergic manifestations. The use of pre- and probiotics and the transfer of faecal flora could, by modulating the intestinal microbiota, become new therapeutic approaches.

MOTS-CLES : microbiote intestinal - flore – obésité – allergie – probiotiques

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier – Toulouse 3
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, Chemin des Maraîchers
31062 Toulouse Cedex 9

Directeur de thèse : Mme Cendrine CABOU DI BARADAT