

COLLOQUE 2018

**Le microbiote intestinal et son hôte :
entente ou mésentente ?**

**Agir sur le microbiote dans les maladies cardiométaboliques :
pour qui, quoi, quand et comment ?**

Professeur Karine CLÉMENT (Paris)
Sorbonne Université/INSERM, UMRS 1269,
NutriOmique
Hôpital Pitié-Salpêtrière Paris

[Les notes renvoient à la page des références.](#)

MALADIES CARDIOMETABOLIQUES NUTRITIONNELLES, UN PROBLEME ALARMANT DE SANTE PUBLIQUE

Selon l'OMS, l'expansion des maladies chroniques, ou maladies non transmissibles, est alimentée par des phénomènes tels que l'urbanisation rapide et non planifiée, la mondialisation des modes de vie défavorables à la santé ainsi que le vieillissement des populations.^[1] La mauvaise alimentation et la sédentarité qui découlent des modifications du mode de vie se traduisent au niveau individuel par une augmentation de la pression artérielle, de la glycémie et de la lipidémie, qui, en lien avec le développement de l'obésité, contribuent à des modifications pathologiques du métabolisme qui se chronicisent avec le temps. Ces facteurs de risque combinés sont à l'origine de maladies cardiovasculaires, cause principale de décès prématurés et responsables de 17,9 millions de morts par an.^[2]

Les affections cardiométaboliques — vocable qui recouvre maladies cardiovasculaires, métaboliques et maladies hépatiques non alcooliques — sont des pathologies étroitement liées qui en font des problématiques mondiales de santé publique. Elles constituent en effet une importante charge de morbidité, indépendamment du niveau de revenu de la population. Après l'hypertension artérielle, en nombre de décès qui leur sont imputables, le surpoids et l'obésité puis l'hyperglycémie sont aux 2^{ème} et 3^{ème} rangs des principaux facteurs métaboliques responsables d'une morbidité accrue.^[1] En termes d'économie de la santé, la forte prévalence des troubles métaboliques entraîne des coûts considérables.^[3]

Parce qu'ils sont pour certains modifiables, les facteurs de risque cardiométaboliques font l'objet de plans nationaux de prévention, en particulier dans les pays industrialisés où, à un degré variable, des efforts accrus se sont traduits par une réduction de la mortalité cardiométabolique.^[4] Les modifications du style de vie sont des fondements de la prise en charge clinique de ces troubles, étroitement liés mais aussi très hétérogènes,^[5] et qui évoluent au cours de la vie d'un individu. Il est maintenant admis que l'obésité est une maladie^[6] et certains patients obèses ou non, ayant des troubles métaboliques évolueront rapidement vers des complications tandis que d'autres progresseront plus lentement. On ne connaît pas aujourd'hui les facteurs capables de prédire les « progressseurs » rapides ou « progressseurs » lents vers ces complications. Certains sujets montreront un profil de risque métabolique relativement normal – au moins pour un temps - en dépit d'une obésité parfois importante, alors que d'autres n'ayant qu'un surpoids présenteront ou évolueront rapidement vers des complications métaboliques comme le diabète ou des maladies cardiovasculaires.^[7]

Le microbiote intestinal, considéré aujourd'hui comme le second cerveau du corps humain, est aujourd'hui reconnu comme un acteur clé situé à l'interface entre les modifications environnementales et la biologie de l'hôte.^[8]

MICROBIOTE INTESTINAL ET MALADIES CARDIOMETABOLIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE

Les maladies métaboliques (pathologies chroniques), induisent des altérations d'organes et des signaux impliqués dans la communication entre ces organes. Des modifications à la fois de l'inflammation et du système immunitaire s'associent à des anomalies métaboliques majeures. Il existe des interactions entre le microbiote intestinal et ces anomalies multiples et diverses^[9] qui ne surviennent pas au même moment chez tous les patients et qui ont donc des trajectoires d'évolution clinique différentes. Des changements s'opèrent dans la composition du microbiote, à la fois en termes de richesse et en termes de groupes bactériens, enrichis ou « déplétés ». Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal affecte les maladies métaboliques (maladie cardiovasculaire, diabète de type 2) s'articulent autour de plusieurs voies dont les activités biologiques régulent les fonctions de l'hôte comme par exemple :

1. Les métabolites bactériens dérivés du microbiote, tels que les acides gras à chaîne courte (SCFA), le triméthylamine (TMAO) ou plus récemment le propionate d'imidazole, sont impliqués à des degrés divers dans des processus métaboliques (métabolisme des lipides, des glucides, insulino-résistance) ainsi qu'inflammatoires. Pour le TMAO produit par le foie, il est associé dans certaines populations à un risque accru de maladie chronique (événements cardiovasculaires ou maladies rénales).
2. La réponse immunitaire innée aux composants structurels des bactéries tels que le lipopolysaccharide, entraîne inflammation, insulino-résistance et contribue au syndrome métabolique. D'autres composants membranaires peuvent aussi être en interaction avec des modifications inflammatoires et immunitaires.^[10,11] Le microbiote buccal a également un rôle dans le diabète et les pathologies cardiovasculaires, mais son rôle doit être précisé.^[12,13]

AGIR SUR LE MICROBIOTE : LE MICROBIOME PEUT-IL ETRE UN TRAITEMENT POUR DES MALADIES METABOLIQUES HUMAINES SI COMPLEXES? DE NOMBREUSES QUESTIONS SE POSENT

Quoi ? De nombreuses questions se posent depuis l'explosion des résultats scientifiques sur l'étude du microbiote intestinal aux nombreuses actions proposées pour le moduler. Elles sont fondées sur les enjeux de l'alimentation, des pré- et probiotiques, du rôle des métabolites bactériens, du transfert fécal, ou éventuellement des combinaisons de ces facteurs.

Qui ? A qui s'adresserait ce type de démarche ? Quel type de patient pourrait bénéficier d'une intervention sur le microbiote ? La principale problématique est l'hétérogénéité clinique des patients, avec :

1. Des différences individuelles au niveau de la pathologie et de ses stades de progression: « le diabète » ou « l'obésité » diffèrent d'un patient à l'autre,
2. Des altérations d'organes et des signaux inter-organes qui interviennent à des stades différents de la progression de ces pathologies.

Pourquoi, quand et sur quelle cible ? On peut aussi, dans certaines pathologies, se demander pourquoi agir sur le microbiote. Ainsi par exemple, dans le diabète de type 2 pour lequel on dispose d'un arsenal thérapeutique important, quelle serait l'efficacité d'une telle action ? Faut-il intervenir plus précocement avant l'installation de la pathologie ? Dans le domaine de l'obésité, pour laquelle nous manquons cruellement de traitement efficace, une modulation du microbiote peut-elle agir directement sur le poids ou être plutôt efficace sur les complications par l'intermédiaire par exemple d'une action sur l'inflammation ? Faut-il intervenir directement sur le microbiote ou sur la barrière intestinale avec les enjeux de la perméabilité ? Peut-on agir sur des molécules produites par le microbiote (par exemple les métabolites) et sur quelle cible de l'hôte, notamment avec les stratégies combinées ? A quel moment de la trajectoire individuelle et donc à quel stade de la pathologie devrait-on envisager une action sur le microbiote comme type de traitement ?

Autant de questions auxquelles les scientifiques devront répondre.

RICHESSE BACTERIENNE ET PHÉNOTYPES CLINIQUES DANS L'OBESITE

Dans de nombreuses pathologies dont les maladies métaboliques, le séquençage du microbiote montre qu'une fraction de la population présente une diminution de la diversité microbienne. Dans le cadre des problèmes pondéraux, on peut rencontrer une diversité diminuée dans une fraction de personnes non obèses (autour de 15%) ou, à l'inverse, une diversité conservée chez un sujet obèse.^[14] La caractérisation phénotypique du surpoids ou de l'obésité montre qu'ils ne s'associent pas forcément à des complications métaboliques et qu'un IMC normal peut être associé à des complications.^[15,16] La diminution de la richesse du microbiote est une des caractéristiques de la dysbiose qui s'associe aussi à un changement des groupes bactériens avec une perte ou un enrichissement de certaines bactéries. Ainsi, il a été décrit un appauvrissement en groupes bactériens avec un bénéfice métabolique et des propriétés plutôt anti-inflammatoires ainsi qu'un enrichissement en bactéries dont les propriétés sont pro-inflammatoires.^[15,16] Les sujets porteurs de cette dysbiose ont davantage de facteurs de risque cardiométaboliques (dyslipidémie importante, augmentation du gras corporel, de la distribution abdominale des graisses, de l'insulinorésistance, et de l'inflammation de bas grade).^[15,16]

Au vu du continuum et de la progression de l'obésité vers des formes plus sévères, on peut s'interroger sur l'évolution de la richesse bactérienne. Dans une étude française récente (étude Microbaria), un effondrement du microbiote et une faible richesse de gènes étaient observés chez 75% de patients avec obésité sévère, candidats à la chirurgie bariatrique.^[17] Ce constat suggère une relation étroite entre l'obésité compliquée et un effondrement de la richesse bactérienne.^[17] Des modifications cliniques apparaissent également associées. Ainsi, pour un même IMC, on observe chez les patients présentant un effondrement du comptage de gènes *versus* ceux ayant une richesse bactérienne élevée, une augmentation de leur masse tronculaire ainsi que davantage de complications liées à leur obésité : hypertension, diabète, dyslipidémie et même syndrome d'apnée du sommeil.^[17] La relation entre la richesse de gènes et les caractéristiques des selles était également examinée dans cette étude. Le résultat de cette analyse confirme le caractère inflammatoire de l'effondrement de la richesse bactérienne, en particulier des bactéries qui produisent le butyrate, un acide gras à chaîne courte, important dans les processus métaboliques.^[17]

Il est également possible, par des techniques plus simples que le séquençage, telles que l'approche métabolomique, de repérer des personnes présentant un effondrement de la richesse bactérienne. Il existe une relation positive entre la richesse bactérienne et le taux d'hippurate circulant. Par l'étude des métabolites bactériens, il est possible de mettre en relation les changements d'espèces métagénomiques et certains métabolites dont on sait qu'ils sont produits par les bactéries.

L'étude MetaCardis^[18] est un projet de recherche, mené dans six pays européens, qui a pour objectif d'étudier le rôle du microbiote intestinal dans les maladies cardiométaboliques. L'étude utilise une approche métagénomique qui permet d'évaluer les relations à long terme entre le régime alimentaire et ces pathologies. Les informations collectées à différents stades de progression des maladies cardiométaboliques étaient examinées à la recherche d'éventuelles signatures bactériennes. Une base de données contenant les informations cliniques et les phénotypes moléculaires, métagénomiques et métabolomiques, issus d'une cohorte de plus de 2 000 sujets français, allemands et danois, a fait l'objet d'une publication récente décrivant les caractéristiques alimentaires.^[19] Cette étude confirme l'effondrement de la richesse bactérienne associée à une aggravation de l'obésité, indiquant une signature métabolique d'obésité très forte. De même, il est noté que des personnes non obèses porteuses d'un diabète de type 2 présentent également un effondrement de la richesse et de la diversité bactérienne. Ainsi, chez la personne très obèse, la capacité à discriminer le diabète se perd et la bascule vers la dysbiose indique la probable évolution de la maladie.

Dans une étude belge menée dans la maladie de Crohn, il était également observé une relation entre certains entérotypes et le nombre des bactéries qui peuvent être comptées (« *microbial load* » ou « charge microbienne »).^[20] Cette étude a permis d'identifier la charge microbienne comme un facteur clé des altérations du microbiote observées chez les patients atteints de la maladie de Crohn, associée ici à un entérotipe (appelé entérotipe 2) à faible nombre de germes du genre *Bacteroides*.^[20]

UNE QUESTION DE TRAJECTOIRE INDIVIDUELLE

A quel moment de la trajectoire individuelle et de la progression de la maladie (aggravation, phase aiguë, rechute) est-on à un stade de réversibilité et peut-on envisager une action sur le microbiote comme type de traitement ? Est-il possible d'inverser le phénotype d'altération microbienne et d'effondrement de la richesse bactérienne ? La nutrition, la chirurgie bariatrique, les futurs probiotiques dont *Akkermansia* sont envisagés dans ce sens.^[12,16,21-27]

Interaction de l'alimentation, des fonctions microbiennes et du métabolisme de l'hôte

Les métabolites alimentaires dérivés du microbiote intestinal, comme ceux issus de la consommation de protéines, pourraient jouer un rôle clé dans la régulation du métabolisme de l'hôte.^[28] Diverses études ont évalué ces interactions : la production des acides gras à chaîne courte dans le côlon (via la fermentation bactérienne de fibres alimentaires), bénéfiques en termes de sensibilité à l'insuline^[29-31], la régulation par les acides biliaires de la glycémie et du métabolisme^[32-34], la production d'acides aminés à chaîne ramifiée par le microbiote de faible richesse bactérienne^[35,36], la production de TMAO (un métabolite bactérien de la choline et de la L-carnitine) corrélée au risque d'accident cardiovasculaire.^[37-39]

Koh et al^[40] ont observé que l'histidine, un acide aminé essentiel fourni par l'alimentation, peut-être transformée en propionate d'imidazole par le microbiote intestinal. Ce processus serait augmenté dans le diabète de type 2. Cette observation suggère que l'absorption de protéines alimentaires par le patient diabétique de type 2 induit une re-dérivation du métabolisme bactérien vers la production de propionate d'imidazole. De plus, la souris qui est exposée à ce métabolite développe une intolérance au glucose et une insulino-résistance.^[40]

Ces résultats posent la question de la nécessité éventuelle de reconsidérer l'apport en protéines dans les maladies cardiométaboliques, en particulier dans le diabète de type 2. De fait, diverses études observationnelles ou cas-témoins rapportent un risque accru de diabète de type 2 lié à l'augmentation de la consommation de protéines.^[41-44] En revanche, les études d'intervention nutritionnelle rapportent des résultats extrêmement hétérogènes, liés à l'enjeu de la perte de poids induite par le régime hypocalorique. Les réponses métaboliques diffèrent en fonction du profil bactérien et de la consommation alimentaire.

Néanmoins, nous disposons aujourd'hui d'éléments en faveur de :

1. L'existence d'une interaction entre nutriments et phénotypes cardiométaboliques.
2. La relation entre résistance à l'insuline et apports en protéines animales.
3. L'association entre apports en protéines animales et marqueurs de résistance à l'insuline chez les individus de faible richesse bactérienne ayant un entérotypage *Bacteroides*.

INTERVENTION : PEUT-ON REVERSER LA DYSBIOSE ?

La chirurgie bariatrique est un facteur important de résolution du diabète de type 2. C'est néanmoins une solution transitoire, car plusieurs années de recul ont montré qu'il est certes possible de retarder la progression du diabète de type 2, mais que la maladie n'est probablement pas réversible.

L'évolution du microbiote chez des sujets ayant subi une chirurgie bariatrique montre qu'en dépit de son augmentation avec le temps, la richesse bactérienne reste basse, de même que la diversité. Il n'y a donc pas de restauration complète du profil microbien. Ce constat pose la question clinique de la possibilité de restaurer cette diversité et de sauvegarder l'amélioration métabolique par des techniques plus invasives, telles que le transfert de microbiote.

RÉFÉRENCES (Les références soulignées renvoient aux abstracts correspondants sur PubMed)

1. OMS 2018, Maladies non transmissibles. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
2. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388(10053):1659-1724.
3. World Health Organization. GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases 2014.
4. Di Cesare M, Bennett JE, Best N, Stevens GA, Danaei G, Ezzati M. The contributions of risk factor trends to cardiometabolic mortality decline in 26 industrialized countries. *Int J Epidemiol* 2013; 42(3):838-48.
5. Hardy R, Lawlor DA, Kuh D. A life course approach to cardiovascular aging. *Future Cardiol.* 2015;11(1):101-13.
6. Després JP, Pascot A, Lemieux I. Facteurs de risque associés à l'obésité : le point de vue du métabolicien. *Ann Endocrinol* 2000 ; 61(6):S31-S38.
7. Organisation Mondiale de la Santé. Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. Consultation OMS sur l'obésité (1997 : Genève, Suisse). OMS Série de Rapports techniques ; 894.
8. Ochoa-Repáraz J, Kasper LH. Gut microbiome and the risk factors in central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett.* 2014;588(22):4214-22.
9. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012; 489(7415):242-9.
10. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 Suppl 1:4592-8.
11. Hyvärinen K, Mäntylä P, Buhlin K, Paju S, Nieminen MS, Sinisalo J, Pussinen PJ. A common periodontal pathogen has an adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2012; 223(2):478-84.
12. Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes* 2012; 2012:879151.
13. Brown JM, Hazen SL. The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annu Rev Med* 2015; 66:343-59.
14. Ahima RS, Lazar MA. Physiology. The health risk of obesity: better metrics imperative. *Science* 2013; 341(6148):856-8.
15. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500(7464):541-6.
16. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 2013; 500(7464):585-8.
17. Aron-Wisnewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, Verger EO, Hedjazi L, Bouillot JL, Chevallier JM, Pons N, Le Chatelier E, Levenez F, Ehrlich SD, Dore J, Zucker JD, Clément K. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut* 2019; 68(1):70-82.
18. www.metacardis.net
19. Verger EO, Armstrong P, Nielsen T, Chakaroun R, Aron-Wisnewsky J, Gøbel RJ, Schütz T, Delaere F, Gausseres N, Clément K, Holmes BA; MetaCardis Consortium. Dietary assessment in the MetaCardis study: development and relative validity of an online food frequency questionnaire. *J Acad Nutr Diet* 2017; 117(6):878-888.
20. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* 2017; 551:507-511.
21. Kong LC, Holmes BA, Cotillard A, Habi-Rachedi F, Brazeilles R, Gougis S, et al. Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbiota in overweight and obese subjects. *PLoS One* 2014; 9(10):e109434.
22. Kong LC, Willemin PH, Bastard JP, Sokolovska N, Gougis S, Fellahi S, et al. Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach. *Am J Clin Nutr* 2013; 98(6):1385-94.
23. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016; 65(3):426-36.
24. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Mariat D, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 2010; 59(12):3049-57.
25. Aron-Wisnewsky J, Clément K. The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep* 2014; 16(11):454.

26. Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kiaf B, et al. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 2015; 125(4):1752-62.
 27. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling. *Cell Metab* 2015; 22(1):113-24.
 28. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science* 2013; 341(6150): 10.1126/science.1241214.
 29. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009 29; 461(7268):1282-6.
 30. Chambers ES, Viardot A, Psychas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015; 64(11):1744-54.
 31. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Oreši M, Bäckhed F. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013; 17(2):225-35.
 32. Li H, Liu Y, Zhang X, Xu Q, Zhang Y, Xue C, Guo C. Medium-chain fatty acids decrease serum cholesterol via reduction of intestinal bile acid reabsorption in C57BL/6J mice. *Nutr Metab (Lond)* 2018; 15:37.
 33. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab* 2016; 24(1):41-50.
 34. Lee CC, Watkins SM, Lorenzo C, Wagenknecht LE, Il'yasova D, Chen YD, Haffner SM, Hanley AJ. Branched-chain amino acids and insulin metabolism: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care* 2016; 39(4):582-8.
 35. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BA, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 2016; 535(7612):376-81.
 36. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; 368(17):1575-84.
 37. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472(7341):57-63.
 38. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19(5):576-85.
 39. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; 535(7610):56-64.
 40. Koh A, Molinaro A, Ståhlman M, Khan MT, Schmidt C, Mannerås-Holm L, et al. Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mTORC1. *Cell* 2018; 175(4):947-961.e17.
 41. Sluijs I, van der Schouw YT, van der A DL, Spijkerman AM, Hu FB, Grobbee DE, Beulens JW. Carbohydrate quantity and quality and risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Netherlands (EPIC-NL) study. *Am J Clin Nutr* 2010; 92(4):905-11.
 42. Aune D, Ursin G, Veierød MB. Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* 2009; 52(11):2277-87.
 43. van Nielen M, Feskens EJ, Mensink M, Sluijs I, Molina E, Amiano P, Ardanaz E, et al. Dietary protein intake and incidence of type 2 diabetes in Europe: the EPIC-InterAct Case-Cohort Study. *Diabetes Care* 2014; 37(7):1854-62.
 44. Shang X, Scott D, Hodge AM, English DR, Giles GG, Ebeling PR, Sanders KM. Dietary protein intake and risk of type 2 diabetes: results from the Melbourne Collaborative Cohort Study and a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr* 2016; 104(5):1352-1365.
-