

COLLOQUE 2018

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

**Quelle place pour une entité chimique visant une cible
intestinale spécifique du microbiote ?
L'exemple des maladies cardiovasculaires et métaboliques**

Professeur Rémy Burcelin, PhD (Toulouse)
Directeur de Recherche Inserm
I²MC, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires,
Inserm U 1048, Rue Jean Poulhès, 31400 Toulouse, France
Directeur de l'Equipe 2 « Facteurs de risques intestinaux, diabète »

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

INTRODUCTION

Il est maintenant avéré que l'activité métabolique et la structure moléculaire même du microbiote intestinal contrôlent le développement des maladies métaboliques et cardiovasculaires.^[1-6] De la bouche à l'anus, les bactéries qui colonisent les épithélia correspondants métabolisent les nutriments mais aussi les composants alimentaires non absorbables par l'homme et les résidus et productions cellulaires. De même, elles synthétisent de nouvelles molécules à partir de celles produites par l'hôte tels que les acides biliaires secondaires.

Ainsi, les constituants moléculaires de type lipopolysaccharides, peptidoglycanes et flagelline, les produits du métabolisme, notamment fermentaire, tels qu'acides gras à chaîne courte, molécules nitrosylées, sulfonylées, les dérivés de molécules eucaryotes (acides biliaires déconjugés), ainsi que les hormones intestinales dérivées de la sérotonine, pour n'en citer que quelques-uns, sont des voies de communication entre l'hôte et le microbiote. Une solution thérapeutique telle qu'une entité chimique visant une cible intestinale spécifique du microbiote peut-elle être entrevue dans le domaine des maladies cardiométaboliques ?

VERS UNE SOLUTION THERAPEUTIQUE VIA LE MICROBIOTE INTESTINAL DANS LES MALADIES CARDIOMETABOLIQUES ?

Les prérequis

Une réponse à certaines questions importantes est un prérequis essentiel avant d'envisager une solution thérapeutique :

1. Le microbiote intestinal diffère-t-il entre patients porteurs d'une maladie donnée telle que le diabète ou l'obésité et les sujets non-atteints ? La dysbiose des patients diabétiques diffère-t-elle par rapport à celle des sujets non-diabétiques ?
2. Une dysbiose du microbiote est-elle causale ?
3. Peut-on en identifier les mécanismes moléculaires ?

Toutes ces questions sont largement actuelles et débattues.

Validation dans le diabète de type 2

Dysbiose du microbiote intestinal dans le diabète de type 2 chez l'homme

Dans le diabète de type 2, différentes études ont mis en évidence l'importance de la dysbiose du microbiote intestinal, notamment celle de Qin et al^[7] qui a identifié et validé environ 60 000 marqueurs associés au diabète de type 2, ouvrant la voie à de nombreux travaux. Dans cette dysbiose, une liste de candidats a été proposée : les bactéries associées positivement au diabète de type 2 et celles associées négativement.^[7] Il a néanmoins été opposé aux auteurs le fait que cette liste établie à partir du microbiote fécal n'était pas pertinente dans le diabète de type 2 qui, d'un point de vue causal, est plutôt associé à une dysbiose du microbiote iléal ou de la première moitié du tractus digestif.

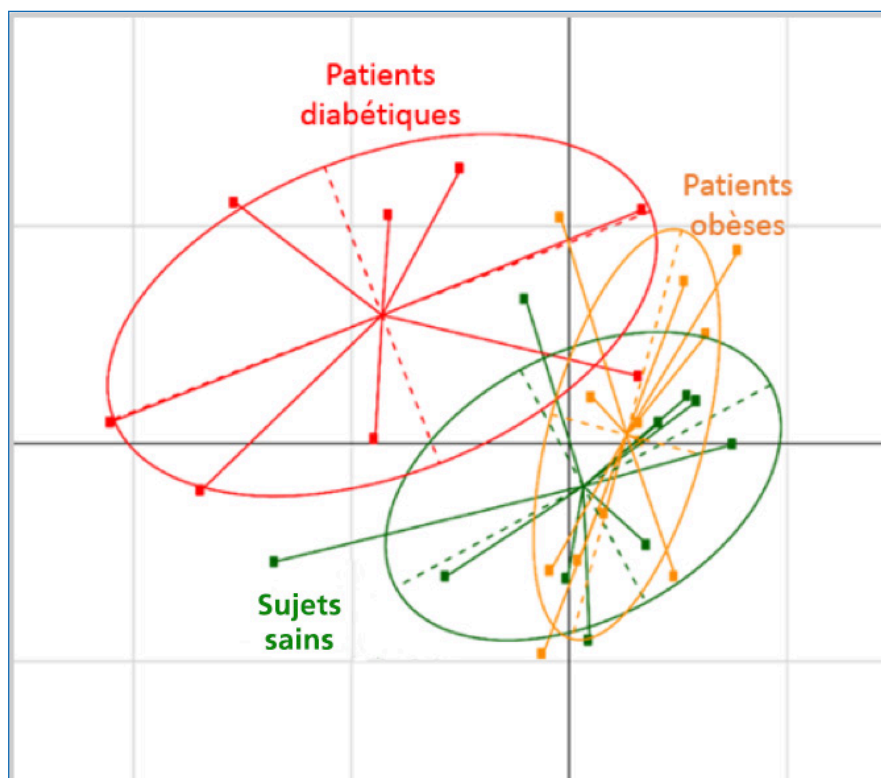
Des données préliminaires de notre laboratoire obtenues à partir du microbiote de la muqueuse de l'iléon, montrent que le séquençage de l'ADN bactérien a permis de séparer patients obèses diabétiques, obèses non-diabétiques et sujets témoins. Ces résultats indiquent que les microbiotes et la dysbiose de la muqueuse

intestinale des patients obèses diabétiques et obèses non-diabétiques diffèrent fortement de ceux des sujets du groupe contrôle (Figure 1 : données personnelles), dans une localisation de l'intestin potentiellement causale. Cette causalité a été montrée chez l'homme mais également chez l'animal.

Ces observations valident le prérequis 1 : c'est un microbiote malade qu'il faut traiter et cette certitude permet d'envisager de nouvelles étapes vers une stratégie thérapeutique ciblant le microbiote dans certaines maladies métaboliques.

Figure 1. Séquençage de l'ADN bactérien de microbiotes de l'iléon de sujets sains, de patients diabétiques de type 2 et de patients obèses non-diabétiques : trois microbiotes différents.

Données personnelles



Fonctions du microbiote dans le diabète de type 2

Dans l'étude de Qin et al,^[7] une analyse des gènes bactériens spécifiques du diabète de type 2 a identifié des voies moléculaires et révélé l'existence de métabolismes différentiels tels qu'acides aminés branchés, aromatiques, sulfatase réductase, stress oxydatif et transport membranaire (sucres). Ainsi, au-delà des noms et des taxons que représente la carte d'identité, les analyses de fonction permettent d'identifier des voies métaboliques associées aux phénotypes, susceptibles de générer un substratum thérapeutique. Ce résultat suggère qu'il serait possible de traiter le diabète de type 2 en traitant le microbiote et/ou ses cibles.

Une dysbiose du microbiote est-elle causale ?

Pour comprendre le diabète de type 2 et répondre à cette question, la comparaison de sujets diabétiques vs des non-diabétiques, comme cela a été réalisé dans l'étude de Qin et al,^[7] n'est en réalité que peu pertinente. Une comparaison « avant-après » apporterait un éclairage plus intéressant. Cependant, le diabète ne se développant que lentement, cette comparaison apparaît peu réaliste, sinon irréalisable. Evaluer la rémission chez des sujets déjà diabétiques pourrait constituer une piste intéressante. Utiliser une molécule qui cible le microbiote intestinal d'un patient diabétique de type 2 et contrôle sa glycémie en est une autre.

La metformine est une molécule utilisée depuis longtemps pour contrôler la glycémie du diabétique de type 2. On en découvre encore aujourd'hui les différents modes d'action. L'un d'entre eux est un mode d'action clé : la metformine altère le microbiote intestinal.^[8] En témoignent les plaintes des patients qui la supportent difficilement d'un point de vue digestif. On sait maintenant que ces troubles digestifs prouvent l'action thérapeutique de la metformine.^[8]

En effet, une étude récente de Wu et al^[8] a comparé des patients diabétiques de type 2 naïfs de traitement et soumis à des règles hygiéno-diététiques classiques pendant 4 mois vs des patients diabétiques traités par metformine. Cette étude a mis en évidence une dysbiose perceptible, évoluant néanmoins vers une amélioration (3ème population). L'approche au moyen d'OMICS - ou « omiques »^[9] comme les analyses métagénomique, transcriptomique, métabolomique, ... - a permis d'identifier certaines fonctions bactériennes révélant des cibles thérapeutiques potentielles, telles que des petites molécules ciblant les gènes du microbiote.^[8] Ce résultat suggère quelques pistes susceptibles d'apporter une démonstration de la causalité.

Dans cette étude, le transfert chez des souris axéniques d'échantillons fécaux (obtenus avant traitement et 4 mois après le traitement) issus de donneurs sous metformine a montré que la tolérance au glucose était améliorée chez les souris recevant un microbiote altéré par la metformine.^[8] Il apparaît donc possible d'améliorer le diabète de type 2 par l'utilisation de bactéries intestinales.

Des analyses moléculaires ont été également effectuées dans cette étude, à la recherche de corrélations pouvant déterminer plus précisément ce qui s'associe à l'impact glycémique dans l'effet de la metformine.^[8] Plusieurs bactéries candidates positivement associées ont été identifiées, difficilement « ciblables » dans leur ensemble. Un regroupement en clusters a permis d'en limiter le nombre et d'identifier trois groupes bactériens, suggérant la possibilité d'en dériver trois molécules différentes. L'existence de réseaux d'interactions entre bactéries candidates a conduit à s'interroger sur l'existence potentielle de fonctions bactériennes communes. Celle-ci a été confirmée par une analyse métagénomique et microbiomique. Les auteurs concluent que le métabolisme des métalloprotéases et des transporteurs de métaux serait une des cibles privilégiées de l'action de la metformine sur le microbiote. La conséquence de cette action sur l'hôte reste à déterminer.

Validation dans la stéatose hépatique induite par l'obésité

Une approche phénotypique (transcriptomique hépatique, métabolomique plasmatique et urinaire, et métagénomique) a été réalisée par Hoyles et al^[10] dans le cadre du développement de la stéatose hépatique, chez le sujet obèse avec ou sans insulino-résistance. L'existence de corrélations entre stéatose et taxons bactériens a été recherchée. L'analyse taxonomique en fonction de marqueurs cliniques montre des taxons associés à la maladie. Les auteurs rapportent une grande diversité taxonomique (394 espèces) et ont analysé la richesse métagénomique (comparaison avec 10 millions de gènes) et les fonctions géniques microbiennes. Parmi le petit nombre de métabolites libérés dans le sang circulant ou dans l'urine, des candidats potentiels ont été identifiés tels que l'acide phényl-acétique ou phénylacétate.^[10] Cette molécule pourrait être un des vecteurs traduisant la signature microbienne associée à la signature du phénotype « stéatose hépatique » et susceptible de générer une petite molécule susceptible d'être un médicament potentiel. Le métabolisme des acides aminés branchés et/ou aromatiques pourrait donc être une cible dans la stéatose hépatique et servir de support à la mise en place d'une solution thérapeutique sur la base de petites molécules.

Une nouvelle approche par OMICS dans le sang circulant a été réalisée. L'analyse transcriptomique de la stéatose a permis d'approcher plus de 2 000 gènes entre les stades bas et stades élevés de stéatose. Néanmoins, en conjuguant transcriptomique, microbiomique et métabolomique, un petit nombre d'hypothèses a pu être formulé. Parmi ces 30 hypothèses, 4 groupements de fonctions géniques (« core centers » ou centres moléculaires), ont été identifiés : l'inflammation centrée sur les LPS, la lipogénèse, le métabolisme des acides aminés et les réactions de défense immunitaire.^[10] En dépit du fait qu'il s'agit là de grands systèmes biologiques, ces centres moléculaires peuvent être hiérarchisés, conduisant à une solution thérapeutique potentielle.

COMMENT APPROCHER CETTE STRATEGIE THERAPEUTIQUE

Approche sans *a priori*

Les observations issues de ces études chez l'homme suggèrent la possibilité de mettre au point une stratégie thérapeutique fondée sur une approche sans *a priori*. Cette approche consiste à ajouter à une compilation de données des algorithmes prédictifs afin d'obtenir des cibles en petites quantités mais extrêmement affinées.

En l'occurrence :

- 1/ cibler une bactérie ou un groupe de bactéries,
- 2/ cibler un groupe de fonctions bactériennes (métalloprotéases...),
- 3/ cibler une molécule produite par les bactéries et interagissant avec son ligand,
- 4/ cibler l'interaction hôte-microbiote.

Hypothèses avec *a priori*

Parmi les hypothèses *a priori*, celle qui semble prévaloir est celle de l'intestin perméable comme étant responsable de l'inflammation métabolique. L'objectif est de déterminer le dialogue (« crosstalk ») entre le microbiote et son hôte. Cette hypothèse se base sur la translocation du microbiote dysbiotique dans l'organisme sous forme de fragments (LPS, peptidoglycanes, flagelles, ...) ou sous forme de bactéries entières, pris en charge par le système immunitaire pour être délivrés dans un tissu ciblé de manière fonctionnelle (tel que le foie, localisé juste derrière l'intestin), induisant ainsi une réaction inflammatoire.^[1] Il est aussi possible de partir de la présence de molécules telles que les LPS, pour suggérer une première solution thérapeutique moléculaire fondée sur des LPS anti-inflammatoires dont l'action serait contraire à celle des LPS pro-inflammatoires délétères pour l'organisme. Le blocage du mécanisme de translocation intestinale par ces LPS anti-inflammatoires préviendrait la modification du microbiote tissulaire induit par la dysbiose intestinale.

Une autre hypothèse prépondérante est celle de l'immunité intestinale altérée : pour que des bactéries subissent une translocation, il est nécessaire que celle-ci soit « autorisée ». Dans le cadre de la maladie métabolique, une altération du système immunitaire intestinal est associée à une dysbiose du microbiote. Des acteurs moléculaires ont pu être identifiés. La cellule présentatrice de l'antigène bactérien et son interaction avec le système immunitaire adaptatif ont été approchées par analyse transcriptomique. Ceci a permis de restreindre les hypothèses moléculaires à la co-activation immunitaire avec un certain nombre de gènes clés.^[1] Une fois restaurée, la co-activation immunitaire permettrait d'induire des défenses naturelles contre le passage de bactéries susceptibles de générer une inflammation. Cibler la co-activation immunitaire par des petites molécules pour éviter la perméabilité de l'intestin, pourrait constituer une autre solution.

Des outils

Des biomarqueurs sanguins et/ou tissulaires sont nécessaires à un diagnostic « qui, pourquoi et comment ? ». En effet, l'ADN bactérien ou le « microbiote tissulaire » pourrait être un vecteur fonctionnel de l'inflammation d'un tissu comme le tissu adipeux, le foie et les cellules β pancréatiques. Dans le sang, l'ADN bactérien serait un biomarqueur diagnostique de l'efficacité thérapeutique, de la classe de patients, ou encore de la prédiction du devenir du patient. Ainsi, sur la base d'une simple prise de sang et d'un biomarqueur d'ADN bactérien séquencé dans le sang, il serait possible de diagnostiquer certaines maladies telles que le cancer ou la fibrose hépatique, tel que rapporté récemment,^[12] et de proposer une action thérapeutique.

Dans le cadre de l'obésité, le séquençage du stroma vasculaire (cellules qui entourent les adipocytes chez l'homme) révèle l'augmentation dans le tissu de certaines bactéries susceptibles d'être causales, pouvant donc servir de cibles. La bactérie *Ralstonia*, en particulier, est un candidat potentiel. Les vecteurs de fonctionnalité de ces bactéries sont les LPS qui ont des activités anti-inflammatoires pour certains, et pro-inflammatoires pour d'autres.

CONCLUSION SUR LES « STRATÉGIES PETITES MOLÉCULES »

Ainsi, il apparaît aujourd'hui que l'analyse systématique du microbiote intestinal permet de proposer des fonctions bactériennes génératrices de molécules associées à des phénotypes cliniques. La validation préclinique de ces molécules bactériennes permettra de générer de nouvelles cibles pour des classes thérapeutiques chimiques dérivées de ces circuits. Cependant, du fait que l'étiologie des maladies, notamment les pathologies chroniques de type métabolique et cardiovasculaire, fait intervenir de nombreuses causes issues du microbiote intestinal, il est important de classer les patients grâce à un diagnostic prédictif, classifiant et compagnon de solutions thérapeutiques. L'ADN bactérien circulant est un biomarqueur adapté à cette étiologie car sa quantification est peu invasive et sa diversité reflète des index de perméabilité intestinale et de défaut du système immunitaire, voire de dysbiose du microbiote, causes du développement de ces maladies. Il en va de même pour les maladies hépatiques, voire auto-immunes, telles que le diabète de type I auto-immun.

Ainsi, l'identification de ces molécules permettra de produire des dérivés qui affecteront dans un premier temps l'intestin de manière topique et peu risquée mais qui surtout, en activant des cascades de réactions physiologiques très en amont, agiront sur de nombreuses facettes de la physiologie humaine.

Ainsi, le microbiote intestinal peut interagir avec l'hôte de trois manières :

1. Il peut sécréter des molécules qui agissent directement après absorption par l'intestin sur les cellules cibles. Les LPS sont un exemple de production bactérienne qui interagit avec les cellules souches du tissu adipeux pour induire une réaction inflammatoire locale.
2. Il peut agir sur des cellules intestinales qui elles-mêmes transmettront le signal bactérien vers des tissus cibles. Les acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate interagissent avec les cellules L intestinales sécrétrices d'insuline. Ces dernières, qui activent la sécrétion d'insuline, pourraient contrôler le diabète.
3. Les bactéries, voire des fragments bactériens, peuvent être transloqués au travers de l'épithélium intestinal pour cibler certains tissus. Ainsi, notamment dans le foie et le tissu adipeux, bactéries et ADN bactériens sont retrouvés, localisés dans le stroma vasculaire de ces tissus.

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

1. Burcelin R, Nicolas S, Blasco-Baque V. Microbiotes et maladies métaboliques. De nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. Med Sci 2016; 32:952-960.
2. Burcelin R. Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease. Biol Aujourd'hui 2017;211(1):1-18.
3. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. Circ Res 2017; 120(7):1183-1196.
4. Ahmadmehrabani S, Tang WHW. Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. Curr Opin Cardiol 2017; 32(6):761-766.
5. 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.
6. 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.
7. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature 2012; 490(7418):55-60.
8. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. Nat Med 2017; 23(7):850-858.
9. www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/?sequence=30
10. Hoyles L, Fernández-Real JM, Federici M, Serino M, Abbott J, Charpentier J, et al. Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. Nat Med 2018; 24(7):1070-1080.
11. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes 2007; 56(7):1761-72.

12. Lelouvier, B., F. Servant, S. Paise, A. C. Brunet, S. Benyahya, M. Serino, C. Valle, M. Rosa Ortiz, J. Puig, M. Courtney, M. Federici, J. Manuel Fernandez-Real, R. Burcelin and J. Amar. Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. Hepatology. 2016 Dec; 64(6): 2015-2027
-