



HAL
open science

Conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal humain et impact sur la cholestérolémie

Aline Potiron

► **To cite this version:**

Aline Potiron. Conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal humain et impact sur la cholestérolémie. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA036 . tel-01812929

HAL Id: tel-01812929

<https://pastel.hal.science/tel-01812929>

Submitted on 12 Jun 2018

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

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

Conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal humain et impact sur la cholestérolémie

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à
l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement
(AgroParisTech)

École doctorale n°581 : Agriculture, Alimentation, Biologie,
Environnement et Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Microbiologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 11 décembre 2017, par

Mme Aline Potiron

Composition du Jury :

Claire Janoir, Professeur Faculté de Pharmacie de Chatenay Malabry	Présidente
Corinne Grangette, Directrice de Recherche Institut Pasteur de Lille	Rapporteur
Jean-François Brugère, Maître de Conférences Université Clermont-Auvergne	Rapporteur
Jean-Claude Desfontis, Professeur ONIRIS-Nantes	Examineur
Hervé Guillou, Directeur de Recherche INRA Toulouse	Examineur
Philippe Gérard, Directeur de Recherche INRA Jouy-en-Josas	Directeur de thèse
Moez Rhimi, Chargé de Recherche INRA Jouy-en-Josas	Co-Directeur de thèse
Emmanuelle Maguin, Directrice de Recherche INRA Jouy-en-Josas	Invitée

Vous arrivez devant la nature avec des théories, la nature flanque tout par terre

Pierre-Auguste Renoir

REMERCIEMENTS

Au terme de ces trois années consacrées à la réalisation de ce projet de thèse, le moment est venu de distribuer quelques remerciements.

Tout d'abord, merci à l'INRA, à l'unité Micalis et son directeur Stéphane Aymerich pour m'avoir accueillie. Et en particulier aux départements MICA et AlimH qui ont financé cette thèse me permettant d'effectuer mon travail dans des conditions matérielles et financières confortables. Je me rends compte que ce n'est pas le cas pour tous les thésards.

Je remercie ensuite Moez Rhimi et Philippe Gérard mes co-directeurs, pour m'avoir confié ce projet de thèse et pour m'avoir accompagnée durant ces trois années.

Mes remerciements vont également à Emmanuelle Maguin pour son accueil au sein de l'équipe Ife (Miha maintenant) et ses conseils scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je souhaite remercier Corinne Grangette et Jean-François Brugère d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de recherche. Et aussi Claire Janoir, Jean-Claude Desfontis et Hervé Guillou, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, Hervé Guillou et Philippe Lesnik, pour leur écoute et leurs conseils lors de points ponctuels mais importants pour l'avancée de la thèse.

Je tiens à remercier également Irina Vassileva, responsable de la scolarité à l'ABIES pour son écoute et ses conseils antistress. Ainsi que toutes les personnes impliquées dans l'attribution des bourses de mobilités à l'international qui m'ont permis de participer au 7^{ème} Congrès de la FEMS pour présenter mes travaux.

Je souhaite remercier toutes les plateformes avec lesquelles nous avons travaillé sur ce projet. L'animalerie axénique Anaxem, de l'unité Micalis ; la plateforme ICAN et en particulier Marie Lhomme pour les analyses de GC/MS ; la plateforme de biochimie du CRI de l'hôpital Bichat et Nicolas Sorhaindo pour les analyses sur le plasma ; le CHU St-Antoine et en particulier Lydie Humbert pour les analyses sur les acides biliaires ; la plateforme @Bridge pour la mise à disposition du matériel permettant les analyses de qualité des ARNs et enfin la plateforme d'histologie de l'UMR 1313 GABI et en particulier Abdelhak Boukadiri pour sa patience et ses précieux conseils.

Je remercie aussi l'ensemble des équipes Ife et Amipem pour leur accueil et leurs conseils techniques. Je pense en particulier à Aicha Kriaa que j'ai pu aider dans la construction de l'une des banques génomiques essentielle à mon projet de thèse, Samira Boudebouze pour ses

conseils techniques sur l'extraction d'ADN, de stérols et l'organisation du laboratoire. Et aussi à Maarten, Alex, Rozenn et Sacha pour les pauses café du matin souvent accompagnées de croissants ou de pains au chocolat. Mes pensées vont en particulier à Aurélia Bruneau pour son aide inconditionnelle dans l'expérimentation animale, son accompagnement et son soutien moral durant la fin de cette thèse. Et aussi Na Fei et Magali Monnoye, mes collègues de bureau, toujours présentes pour me donner un coup de main lors des expériences *in vivo* mais aussi pour écouter mes états d'âme de thésarde. Hayatte, Zahra et Sebastian, je vous souhaite bon courage pour la fin de vos thèses.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue et accompagnées durant ces trois années ;

Philip et Pierre mes encadrants de stages de 1^{ère} et 2^{ème} année d'école d'ingénieur, pour avoir cru en moi et en mes capacités à mener une thèse avant tous les autres ;

Rozenn pour ton oreille attentive, ta présence, ton soutien et tes conseils ;

Alex, tu as toute ma gratitude pour m'avoir redonnée le goût de la course à pied, poussée à participer à des trails et surtout à évacuer tout mon stress dans la forêt. Merci aussi pour le soutien, le « remontage » de moral et le renforcement positif, sans toi je ne serais pas arrivée au bout de ces trois années ;

Anne-Laure, alternativement collègue puis soutien moral, conseillère scientifique et de vie en générale et finalement amie à la fin de ces trois années sur le centre de Jouy. Un grand MERCI ;

Christine, Eric, Thibaut, Sophie, Victoria et tous les anciens membres de l'équipe BAC pour l'ambiance et les discussions toujours intéressantes au 440 ;

De même, Nico, Camille, Faby, Tim, Orlane et tous les membres de l'équipe FinE que j'ai pu croiser en pause-café, merci pour les rigolades et les gâteaux au 442 ;

Magali B. pour la relecture de la partie bibliographique de mon manuscrit, les déjeuners partagés et le soutien durant ces derniers mois surtout ;

Ma kiné, Angélique, réparatrice du corps et parfois un peu psy qui m'a suivie pendant plus de deux ans et grâce à qui j'ai récupéré un genou gauche presque fonctionnel ;

Le Club de Judo de Jouy-en-Josas (CAMJJ) avec qui j'ai obtenu ma ceinture noire 1^{er} dan en juin 2017. Et en particulier, le club des 5 ; Seb, Panda, Vanille et Cricri mais aussi tous les autres grâce à qui j'ai pu me défouler : Claude, Xavier, Arthur, Felix, Victor, Erwann, Noémie, Jean, Laurent, Séverine (qui a également eu la gentillesse de relire ce manuscrit), etc. Je vous souhaite une bonne continuation sportive, plein de réussite personnelle et professionnelle ;

Toute l'équipe Doc'J qui permet aux doctorants de Jouy-en-Josas de se rencontrer et de partager des moments ensemble mais je pense aussi à tous les doctorants que j'ai pu croiser au cours de mes formations et congrès. Un grand merci pour les discussions scientifiques ou non, le partage d'expériences et de vision de la science et du monde ;

En particulier, l'équipe « event » 2016-2017, j'ai nommé Gabou, Elise et Yuuki. Merci à vous les loulous pour votre soutien quasi-quotidien surtout durant ces derniers mois, vos petits mots de réconfort et d'encouragement. Je vous souhaite à tous une très bonne fin de thèse et une super vie, dans dix ans on se retrouvera pour manger de la glace ou des sushis (ou les deux Yuuki, ne t'en fait pas) et se raconter nos vies <3.

Merci aussi aux autres, en thèse ou pas : Carole et Laury pour les lundis escalade de ces derniers mois, Tiphany, Lysiane, Clémence, Clémentine, Thérèse, Déborah et Tatiana ; bonne continuation à toutes dans vos projets respectifs ;

Baudoin, pour ton cynisme concordant parfois au mien, les mardis midi running (quand tu en avais encore le courage) et pour nos discussions scientifiques ou non qui m'ont souvent fait réfléchir et avancer dans cette soif inextinguible de compréhension du monde et des humains ;

A tous mes amis en France ou ailleurs qui m'ont soutenue et ont su me redonner espoir et motivation quand j'en avais le plus besoin. A toi Eva pour nos expos et nos brunchs du Dimanche passés à refaire le monde, je te souhaite épanouissement et bonheur dans les nouvelles fonctions qui sont les tiennes, transmet passion et savoir à tous tes étudiants. A toi Louise, à plus de 10 000 km, pour ton soutien indéfectible et ton amitié sans faille. A vous Alice et Oriane, toujours une petite pensée pour moi, même de loin, on se retrouvera pour fêter ça. A toi JF pour nos grandes discussions sur la vie et nos années lycée à E. Pérochon, bon courage pour ta thèse et continues de passionner tes étudiants pour les maths, ce n'est pas si évident. A toi Marine, pour nos discussions passionnantes et parfois épuisantes sur les travers de la conscience humaine. A toi Estelle, amie de toujours, source inépuisable de force et de courage, termine ce que tu as commencé et on trouvera un jour le temps de voyager ensemble ;

A toute ma famille, mes racines, mon port d'attache, vous avez ma profonde gratitude, sans vous je n'aurais jamais pu faire tout ce que j'ai fait jusqu'à présent. A ma mamouche pour tout ce que tu m'as appris. A ma mamoune et mon papou pour m'avoir donné le goût de l'effort et du travail bien fait. Pour m'avoir épaulée dans les joies comme dans les peines, je ne vous remercierais jamais assez d'être les parents que vous êtes. Merci de m'avoir permis de suivre les élans de mon cœur et de me suivre dans toutes les étapes de ma vie. Et merci maman d'avoir pris le temps de lire entièrement (ou presque) ces quelques trois cent pages. Merci Bastien d'être le frère que tu es, toujours égal à toi-même et soutien indéfectible. A toi aussi Emilie, pour rendre mon frère aussi heureux et m'apporter un peu de stabilité dans ce monde toujours changeant ;

Enfin, à tous les optimistes et les rêveurs de ce monde « Nous sommes tous dans le caniveau, mais certains regardent vers les étoiles » - Oscar Wilde...

Et en particulier à toi, Charlie merci d'être à mes côtés depuis plus d'un an, d'avoir su mettre ton enthousiasme et ton optimisme en face de mes moments de cynisme et de découragement. Bon courage pour terminer ta thèse, j'espère être aussi inspirante pour toi que tu l'es pour moi. Et maintenant, voyons ce que l'avenir nous réserve !

LISTE DES ABREVIATIONS

AB	Acides biliaires
ACP	Analyses en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGNE	Acides gras non estérifiés
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BP	Individu bas-producteur de coprostanol
COX	Cholestérol oxydase
DT2	Diabète de type 2
Eh	Potentiel d'oxydo-réduction
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse
HDL	Lipoprotéines à haute densité (High-Density Lipoprotein)
HP	Individu haut-producteur de coprostanol
IMC	Indice de masse corporelle
LDL	Lipoprotéines à faible densité (Low-Density Lipoprotein)
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
RE	Réticulum endoplasmique
TG	Triglycérides
TGI	Tractus Gastro-intestinal
WHO	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique des molécules de cholestérol et de coprostanol	5
Figure 2 : Principales étapes de la synthèse du cholestérol à partir de deux molécules d'acétyl-CoA	6
Figure 3 : Le cycle entéro-hépatique.....	10
Figure 4 : Compartiments du tractus digestif associés à leur charge bactérienne.	13
Figure 5 : Arbre phylogénétique représentant la diversité du microbiote intestinal humain avec entourés en couleur les 4 phyla dominants.....	15
Figure 6 : Schéma des changements du microbiote intestinal au cours de la vie ainsi que les facteurs pouvant l'influencer.....	16
Figure 7 : Evolution technologique des enceintes pour maintenir le statut contrôlé (axénique, monoxénique, gnotobiotique ou SPF) des souris	20
Figure 8 : Impact du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte.....	25
Figure 9 : Pathologies pour lesquelles une implication du microbiote intestinal est envisagée..	43
Figure 10 : Activité BSH sur les acides biliaires (AB).....	46
Figure 11 : Mise en évidence de deux groupes (A et B) corrélés à la production de coprostanol grâce aux méthodes de TTGE (A.) et ACP (B.).....	53
Figure 12 : Micrographie électronique à balayage de la souche <i>Bacteroides</i> sp. D8, première bactérie réduisant le cholestérol en coprostanol à avoir été isolée à partir de selles humaines ..	54
Figure 13 : Présentation des voies directe et indirecte du métabolisme de conversion du cholestérol en coprostanol.....	66
Figure 14 : Concentration du cholestérol plasmatique des groupes de lapins hypercholestérolémiques test (□) et contrôle (Δ).....	68
Figure 15 : Cholestérolémie et profil de production de coprostanol d'une cohorte humaine de 85 personnes (A.) et de 60 souris C57BL/6 ApoE KO traitées aux antibiotiques et associées à un microbiote intestinal issu d'individus bas producteurs de coprostanol, en rouge ou d'individus hauts producteurs de coprostanol, en bleu (B.).....	70
Figure 16 : Isolement de bactéries commensales.....	76
Figure 17 : Principaux composants permettant de maintenir l'anaérobie dans une chambre anaérobie aussi appelée chambre de Freter.....	78
Figure 18 : Représentation schématique de la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse.....	81
Figure 19 : Représentation du Cell-D et des détails du mécanisme de cassage.....	83
Figure 20 : Etapes de la construction de banques génomiques fosmidiques d'après le protocole epicentre CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector.	87

Figure 21 : Principe de détection du cholestérol par le kit Amplex®Red.....	90
Figure 22 : Pipeline d'analyse des données de GC/MS obtenues sur les banques génomiques.....	95
Figure 23 : Schéma de calcul d'une partie des valeurs corrigées.....	95
Figure 24 : Isolateurs utilisés sur la plateforme Anaxem pour maintenir le statut contrôlé (axénique, monoxénique, gnotobiotique ou SPF) des souris.....	97
Figure 25 : Compositions nutritive et énergétique (Atwater) des régimes standard (Safe R04-40, intérieur du diagramme) et riche en cholestérol (Ssniff® E15749-34, extérieur du diagramme)	99
Figure 26 : Diagramme expérimental de la procédure 2.....	100
Figure 27 : Coupe schématique d'une artère.....	102
Figure 28 : Principe de la méthode des sondes TaqMan.	104
Figure 29 : Principe de la représentation de l'ACP avec un cercle des corrélations des variables (A) et une carte des individus (B) fictifs.....	107
Figure 30 : Stratégies expérimentales pour l'isolement de souches commensales coprostanoligènes.....	110
Figure 31 : Effectifs des souches par tranche de production de coprostanol en milieu LYHBHI (A) et Production de coprostanol en milieu LYHBHI des souches en fonction de l'absorbance à 600nm (B).....	112
Figure 32 : Arbre phylogénétique circulaire des régions v3-v4 de l'ARNr 16S des 112 souches commensales nouvellement isolées.....	113
Figure 33 : Stratégie expérimentale mise en place pour l'identification de clones potentiellement positifs pour la production de coprostanol.....	119
Figure 34 : Gels d'électrophorèse des clones de la banque de <i>Bacteroides</i> sp. D8 (A.) et <i>Bacteroides</i> sp. BV (B.) digérés par <i>HindIII</i>	120
Figure 35 : Diagramme en boîtes de Tukey du cholestérol dosé par le kit en fonction du milieu testé	121
Figure 36 : Courbes de croissance de la souche <i>E. coli</i> EPI300 avec et sans pré-culture (A.) et diagramme en boîtes de Tukey des μ_{max} dans ces quatre conditions.....	123
Figure 37 : Nuage de points représentant l'absorbance à 600 nm en fonction de la numération	124
Figure 38 : Courbes de croissance des souches <i>E. coli</i> EPI300 et <i>E. coli</i> EPI300-F4 sur les six différents milieux TB (A) et LYHBHI (B)	125
Figure 39 : Courbes de croissance des souches <i>E. coli</i> EPI300 (A) et <i>E. coli</i> EPI300-F4 (B) en fonction des six milieux testés.....	126
Figure 40 : Histogrammes du ratio des aires de coprostanol (A et B) et de cholestérol (C) par rapport au standard interne en fonction des six milieux testés frais (A, B et C), inoculés avec <i>E. coli</i> EPI300 (A), <i>E. coli</i> EPI 300-F4 (A et B) ou <i>E. coli</i> BL21-COX (C).....	129

Figure 41 : Diagramme en boîtes de Tukey (A) et diagrammes en haricot (B et C) des valeurs du standard interne pour les clones des banques génomiques de *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV avant (A et B) et après (C) l'affinage des données..... 133

Figure 42 : Valeur corrigée du coprostanol en fonction du standard interne pour les clones génomiques de *Bacteroides* sp. D8 (A) et *Bacteroides* sp. BV (B)..... 134

Figure 43 : Résultats en termes de nombres de clones analysés et de clones potentiellement positifs identifiés pour les banques de *Bacteroides* sp. D8 (A) et *Bacteroides* sp. BV (B) 135

Figure 44 : Stratégie expérimentale pour l'étude de la colonisation du TGI et de la production de coprostanol des souches coprostanoligènes chez les souris axéniques..... 137

Figure 45 : Implantation des souches (A.) et production de coprostanol (B.) chez les souris mono-colonisées..... 139

Figure 46 : Suivi de la numération bactérienne sur les selles des souris inoculées avec *B. dorei* et *P. distasonis* au cours du temps 141

Figure 47 : Cholestérol dans les selles en fonction du temps (A) et diagrammes en boîtes de Tukey du cholestérol retrouvé dans les selles des souris conventionnalisées (B), monocolonisées avec *B. dorei* (C) et *P. distasonis* (D)..... 142

Figure 48 : Coprostanol dans les selles en fonction du temps..... 143

Figure 49 : Diagrammes en boîtes de Tukey de la production de coprostanol dans les selles des souris monocolonisées avec *B. dorei* (A) et *P. distasonis* (B)..... 144

Figure 50 : Cercle des corrélations (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur les données retrouvées dans les selles (cholestérol, coprostanol et numération) 145

Figure 51 : Suivi du poids corporel au cours du temps (A), poids finaux (B) gain de poids (C) et consommation alimentaire (D) **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 52 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur le poids des organes 148

Figure 53 : Diagrammes en boîtes de Tukey du ratio poids des organes/poids corporel pour le cœur (A), le foie (B), le pancréas (C) et le caecum total (D) ainsi que de la longueur de l'intestin grêle (E)..... 149

Figure 54 : Cercle des corrélations (A) et carte des individus colorés en fonction du statut bactérien du TGI des souris et du temps de prélèvement (B) sur les axes 1-2 de l'ACP prenant en compte les paramètres plasmatiques ainsi que le cholestérol et le coprostanol retrouvés dans les selles 151

Figure 55 : Diagrammes en boîtes de Tukey de la concentration plasmatique en S0 d'AG non estérifiés (A) et de triglycérides (B) ainsi que du coprostanol retrouvé dans les selles (C) et de la concentration plasmatique en S11 en Alat (D), LDL (E) et cholestérol (F)..... 152

Figure 56 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) pour les axes 1-3 de l'ACP faite sur les paramètres plasmatiques ainsi que le cholestérol et le coprostanol retrouvés dans les selles 154

Figure 57 : Diagrammes en boîtes de Tukey des paramètres plasmatiques, transaminases (A) et lipidiques (B) entre S0 et S11 des souris conventionnalisées..... 156

Figure 58 : Schéma résumant les voies de synthèse des principaux AB détectés dans notre étude 158

Figure 59 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur le dosage des ABs dans la bile (b)..... 159

Figure 60 : Histogrammes de la racine carrée des concentrations en acides biliaires totaux (ABt), primaires (ABI), secondaires (ABII) et ursodérivés (UDCA) dans la bile des souris conventionnalisées et monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*..... 160

Figure 61 : Diagrammes en boîte de Tukey de la racine carré des concentrations en acides biliaires retrouvés dans la bile des souris conventionnalisées (A) et monocolonisées avec *B. dorei* (B)..... 162

Figure 62 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur le dosage des ABs dans les selles (s)..... 164

Figure 63 : Histogrammes de la racine carrée des concentrations en acides biliaires totaux (ABt), primaires (ABI), secondaires (ABII), ursodérivés (UDCA) et tauroconjugés dans les selles des souris conventionnalisées et monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*..... 165

Figure 64 : Diagrammes en boîte de Tukey de la racine carré des concentrations en acides biliaires retrouvés dans la selles des souris conventionnalisées (A), monocolonisées avec *B. dorei* (B) et avec *P. distasonis* (C). 167

Figure 65 : Coupes histologiques du foie. 171

Figure 66 : Coupes histologiques d'iléon..... 172

Figure 67 : Diagramme en boîtes de Tukey de l'aire des granulocytes dans les cellules de Paneth pour les trois groupes de souris 173

Figure 68 : Analyse en composantes principales de l'expression des gènes hépatiques des souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*..... 174

Figure 69 : Gènes hépatiques dont l'expression est significativement différente entre deux ou plusieurs groupes de souris..... 174

Figure 70 : Protéines et mécanismes associés aux gènes différentiellement exprimés dans le foie 175

Figure 71 : Analyse en composantes principales de l'expression des gènes de l'iléon des souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*..... 176

Figure 72 : Gènes de l'iléon dont l'expression est significativement différente entre deux ou plusieurs groupes de souris..... 177

Figure 73 : Protéines et mécanismes associés aux gènes surexprimés dans l'iléon 178

Figure 74 : Schéma bilan des expériences, des principaux résultats et perspectives du travail de thèse 180

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques intestinales anatomiques et physiologiques qui diffèrent entre les souris axéniques et les SPF.	21
Tableau 2 : Animaux produisant du coprostanol recensés dans la littérature.....	49
Tableau 3 : Bactéries coprostanoligènes caractérisées.....	56
Tableau 4 : Les 5 séquences de <i>Bacteroides</i> sp. D8 possédant le pourcentage d'identité le plus élevé avec la séquence BBPR_0519	65
Tableau 5 : Nom et composition des milieux utilisés pour la croissance des souches commensales nouvellement isolées et pour la mesure de production de coprostanol.....	77
Tableau 6 : Extraction des stérols	79
Tableau 7 : Séquences des primers utilisés pour amplifier la région V3-V4 du gène codant pour l'ARNr 16S.....	84
Tableau 8 : Taille possible de l'insert en fonction du type de vecteur	86
Tableau 9 : Composition et protocole de réalisation des milieux supplémentés en cholestérol...	89
Tableau 10 : Milieux utilisés pour le suivi de croissance et les tests préliminaires en GC/MS	92
Tableau 11 : Composition en lipides et en cholestérol des deux régimes alimentaires utilisés dans l'expérimentation animale en mg/kg (d'après les fiches techniques des deux fournisseurs)	99
Tableau 12 : Liste des gènes quantifiés par PCR en temps réel en fonction du tissu	105
Tableau 13 : Caractéristiques <i>in vitro</i> des 22 souches productrices de coprostanol.....	111
Tableau 14 : Etude bibliographique sur les espèces sélectionnées pour l'implantation <i>in vivo</i> .	116
Tableau 15 : Dosage du cholestérol dans les milieux LB et LB.1-4 à l'aide du kit AmplexRed® comparé aux valeurs théoriques attendues.....	121
Tableau 16 : Tableau de synthèse des principaux hypothèses et résultats de la mise au point de la procédure de criblage.....	131
Tableau 17 : Tests réalisés sur les souches bactériennes sélectionnées pour la procédure 1 de l'expérimentation <i>in vivo</i>	138

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

1. Publication dans des revues à comité de lecture

Potiron A., Gérard P., Le Roy T., Lesnik P., Maguin E. and Rhimi M. **Recent patents on hypocholesterolemic therapeutic strategies: an update**, *Recent Advances in DNA and Gene Sequences*, 2015, **9** : 36-44. Disponible en Annexe I.

2. Communications orales

Potiron A., Kriaa A., Le Roy T., Mkaouar H., Boudebouze S., Lesnik P., Gérard P., Maguin E., Rhimi M. **New insight in cholesterol metabolism by human gut microbiota**. 26^{ème} forum de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques, 23-26 mars 2015, Monastir, Tunisie.

Potiron A., Kriaa A., Boudebouze S., Lhomme M., Lesnik P., Gérard P., Maguin E., Rhimi M. **How to preserve hypercholesterolemic people from cardiovascular diseases? - The case of cholesterol to coprostanol conversion**. Journée des doctorants de l'unité Micalis, 27 mai 2016, Jouy-en-Josas, France.

Potiron A., Kriaa A., Boudebouze S., Bruneau A., Lhomme M., Lesnik P., Gérard P., Maguin E., Rhimi M. **How intestinal microbiota can modulate host cholesterol metabolism? - Cholesterol conversion into coprostanol**. Séminaire interne Micalis, 18 novembre 2016, Jouy-en-Josas, France.

Potiron A., Kriaa A., Boudebouze S., Bruneau A., Lhomme M., Lesnik P., Gérard P., Maguin E., Rhimi M. **Cholesterol to coprostanol conversion or how to preserve hypercholesterolemic people from cardiovascular diseases?** Colloque des jeunes chercheurs de l'INRA de Jouy-en-Josas, 2 mars 2017, Jouy-en-Josas, France.

Potiron A., Kriaa A., Boudebouze S., Bruneau A., Lhomme M., Lesnik P., Gérard P., Maguin E., Rhimi M. **How to preserve hypercholesterolemic people from cardiovascular diseases with our gut microbiota?** Journées des doctorants de l'école doctorale ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé), 26 et 27 avril 2017, Paris, France.

Potiron A., Kriaa A., Boudebbouze S., Bruneau A., Lhomme M., Lesnik P., Maguin E., Rhimi M., Gérard P. **How the conversion of cholesterol into coprostanol by intestinal bacteria can modulate host cholesterol metabolism?** Conférence donnée à l'Institut d'Agrochimie et de Technologie Alimentaire (IATA), 14 juillet 2017, Valence, Espagne.

Présentation « My research in 3 minutes » et première place obtenue lors de la participation au concours « Engage your audience ! » du 7^{ème} Congrès de la Fédération des Sociétés Européennes de Microbiologie, 11 juillet 2017, Valence, Espagne.

3. Posters

Potiron A., Kriaa A., Boudebbouze S., Bruneau A., Lhomme M., Lesnik P., Maguin E., Rhimi M., Gérard P. **Cholesterol conversion into coprostanol by bacterial strains isolated from the human gut microbiota can modify host cholesterol metabolism.** 7^{ème} Congrès de la Fédération des Sociétés Européennes de Microbiologie, 9-13 juillet 2017, Valence, Espagne.

AVANT-PROPOS

Dans ce manuscrit, la dénomination complète (genre et espèce) des espèces bactériennes est indiquée dès la première citation, les autres citations sont indiquées en format abrégé : l'initiale du genre puis le nom de l'espèce

TABLE DES MATIERES

Remerciements	III
Liste des abréviations	VII
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	XIII
Valorisation des travaux de thèse	XIV
Avant-propos	XVI
1. Introduction	1
2. Revue bibliographique	3
2.1 Le cholestérol	3
2.1.1 Chimie de la molécule et de ses dérivés.....	3
2.1.2 Métabolisme du cholestérol chez l'hôte.....	5
2.2 Le microbiote intestinal	12
2.2.1 Les caractéristiques du microbiote intestinal.....	12
2.2.2 Les animaux axéniques comme modèle expérimental.....	18
2.2.3 Influence du microbiote intestinal sur l'hôte	22
2.3 Activités du microbiote intestinal ayant un impact sur la cholestérolémie de l'hôte	44
2.3.1 Mise en évidence du lien entre le microbiote intestinal et la cholestérolémie	44
2.3.2 La transformation des acides biliaires	45
2.3.3 La transformation du cholestérol en coprostanol	48
3. Hypothèses et objectifs d'étude	72
4. Matériels et méthodes	75
4.1 Isolement et identification de souches réduisant le cholestérol en coprostanol	75
4.1.1 Isolement des souches commensales	76
4.1.2 Milieux utilisés pour la culture des souches commensales et l'identification de celles produisant du coprostanol.....	77
4.1.3 Identification des souches bactériennes produisant du coprostanol.....	78
4.1.4 Identification taxonomique des souches commensales nouvellement isolées	82

4.2	Les banques génomiques.....	85
4.2.1	Construction des banques génomiques.....	85
4.2.2	Vérification de la robustesse des banques génomiques	87
4.3	Criblage fonctionnel des banques génomiques.....	88
4.3.1	Mise au point du criblage : Choix du milieu	88
4.3.2	Criblage des banques génomiques.....	94
4.4	Etudes <i>in vivo</i>	96
4.4.1	Les animaux utilisés.....	97
4.4.2	Procédure 1 : Implantation de souches bactériennes produisant du coprostanol dans le tractus gastro-intestinal des souris axéniques.....	98
4.4.3	Procédure 2 : Investiguer les effets de la production de coprostanol sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte	98
4.4.4	Méthodes utilisées.....	100
5.	Résultats	109
5.1	Isolement de nouvelles souches transformant le cholestérol en coprostanol	109
5.1.1	Objectifs	109
5.1.2	Stratégie expérimentale	110
5.1.3	Résultats	110
5.1.4	Conclusions et perspectives.....	114
5.2	Criblage fonctionnel des deux banques génomiques de <i>Bacteroides</i> sp. D8 et <i>Bacteroides</i> sp. BV pour la production de coprostanol	118
5.2.1	Objectif.....	118
5.2.2	Stratégie expérimentale	118
5.2.3	Les deux banques construites sont suffisamment robustes pour être criblées....	119
5.2.4	Criblage fonctionnel des banques génomique	120
5.2.5	Identification de 55 clones potentiellement positifs	132
5.2.6	Conclusions et perspectives.....	134
5.3	Résultats des expérimentations <i>in vivo</i>	136
5.3.1	Objectifs	136

5.3.2	Mesure de l'implantation et de la production de coprostanol chez les souris axéniques.....	137
5.3.3	Effet de la production de coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal sur divers paramètres et notamment la cholestérolémie et le métabolisme du cholestérol	140
5.3.4	Conclusions et perspectives.....	179
6.	Discussion générale et perspectives	182
7.	Références bibliographiques	206
8.	Annexes.....	232
I.	Recent Patents on Hypocholesterolemic Therapeutic Strategies: An Update.....	232
II.	Fiches fournisseurs des régimes alimentaires utilisés dans la procédure 2 de l'expérimentation <i>in vivo</i>	241
III.	Analyse en composante principale sur les données dans les selles et la numération bactérienne en fonction du statut bactérien (A) et du statut bactérien et du temps (B).....	243
IV.	Tests univariés sur les paramètres plasmatiques des souris monocolonisées avec <i>B. dorei</i> (A-B) et <i>P. distasonis</i> (C-D).....	244
V.	Tests univariés sur la concentration en acides biliaires dans la bile des souris monocolonisées avec <i>P. distasonis</i>	246

INTRODUCTION

1.INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) touchent environ 200 millions de personnes dans le monde (Leeder et al. 2004) et sont responsables de plus d'un tiers des décès mondiaux (WHO-fact sheet No. 310, May 2014). Les MCV sont un ensemble de dysfonctionnements touchant le cœur et les vaisseaux sanguins et dues à la formation de plaques qui peuvent boucher les artères (athérosclérose). L'un des principaux facteurs de risque pour développer ces maladies est un taux élevé de cholestérol sanguin (défini comme supérieur à 5 mmol/L). Or, plus d'un tiers de la population mondiale (37 % des hommes et 40 % des femmes) présente une hypercholestérolémie (Mendis et al. 2011; Nichols et al. 2012; Go et al. 2014; Yang et al. 2012). La diminution du taux de cholestérol sanguin est donc un objectif santé important. Plusieurs traitements existent ciblant la synthèse de cholestérol dans le foie, son absorption au niveau de l'intestin et/ou son transport qu'il provienne du foie ou de l'alimentation (Potiron et al. 2015). Cependant, les patients se plaignent d'effets secondaires lourds et d'une efficacité contrastée.

Une part importante de ce cholestérol passe par le tractus intestinal où réside plus de 10^{14} bactéries constituant le microbiote intestinal. Spécifique de chaque individu, le microbiote intestinal est de plus en plus étudié comme « nouvel organe » impliqué dans le développement de certaines pathologies comme l'obésité, le diabète de type 2 ou encore les MCV. Dans ce contexte, ce sujet de thèse étudie une autre alternative pour diminuer la cholestérolémie : l'utilisation du microbiote intestinal et plus particulièrement, la transformation du cholestérol en coprostanol. Ce composé est un dérivé très peu absorbé du cholestérol. Dans les années 1980, une équipe japonaise a mis en évidence une corrélation négative entre une forte quantité de coprostanol dans les selles et la cholestérolémie (Sekimoto et al. 1983). En transformant le cholestérol en coprostanol, ces bactéries très peu connues (seulement une identifiée chez l'être humain) du microbiote intestinal pourraient diminuer la quantité de cholestérol disponible à l'absorption et donc à l'entrée dans la circulation sanguine.

Ce travail de thèse s'articule autour de trois objectifs principaux ; dans un premier temps **l'isolement de nouvelles bactéries convertissant le cholestérol en coprostanol**, dans un second temps **l'identification des voies métaboliques bactériennes permettant cette conversion** et dans un troisième temps, **l'étude de l'effet de bactéries possédant cette activité sur la cholestérolémie de l'hôte**. Nous avons tout d'abord isolé de nouvelles souches bactériennes convertissant le cholestérol en coprostanol à partir de selles d'individus produisant beaucoup de coprostanol. Nous avons ensuite construit des banques génomiques à partir de deux de ces souches dans le but d'identifier les gènes responsables de cette conversion. Enfin, nous avons sélectionné deux autres bactéries pour comprendre par des études *in vivo*,

l'effet physiologique sur l'hôte de ce métabolisme bactérien. Nous présentons ici sur six chapitres, le fruit de notre travail.

Ainsi après ce premier chapitre introductif, nous ferons un tour d'horizon de la littérature afin d'expliquer plus en détail le métabolisme du cholestérol chez l'hôte et l'impact du microbiote intestinal sur l'hôte afin de souligner la pertinence de l'étude de ce nouvel « organe » dans le contexte de la cholestérolémie. Enfin, nous terminerons par un focus sur le lien entre le microbiote et le métabolisme du cholestérol de l'hôte ainsi que plusieurs données sur le coprostanol nécessaires à la compréhension du manuscrit et du travail effectué.

Le troisième chapitre est une présentation plus exhaustive des hypothèses et objectifs de la thèse.

Le quatrième chapitre décrit l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour réaliser ce travail.

Le cinquième chapitre expose et discute les résultats obtenus. Il est divisé en trois parties ; la première présente les souches productrices de coprostanol nouvellement isolées ; la seconde est une présentation des résultats obtenus lors du criblage des banques génomiques et les pistes pour l'identification des gènes impliqués dans ce métabolisme ; enfin la troisième et dernière partie reporte les données acquises sur l'impact de ces souches sur la cholestérolémie de l'hôte.

Enfin, le dernier chapitre clos ce mémoire par une discussion générale et ouvre le sujet à d'autres perspectives.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Le cholestérol

Dans le contexte de l'hypercholestérolémie, il est important de comprendre le métabolisme du cholestérol. Ainsi, il sera plus aisé ensuite d'appréhender la pertinence de l'approche microbiote intestinal pour réguler la cholestérolémie. Dans cette partie nous verrons donc la chimie des molécules de cholestérol et de coprostanol, puis nous ferons une présentation du métabolisme du cholestérol chez l'humain.

2.1.1 Chimie de la molécule et de ses dérivés

Dans un premier temps, nous allons présenter la structure chimique des deux stérols les plus importants dans le contexte de cette thèse : le cholestérol et le coprostanol en lien avec leurs propriétés métaboliques.

2.1.1.1 Les stérols et la molécule de cholestérol

Il existe de nombreux stérols d'origine animale (le plus courant est le cholestérol) ou végétale appelés alors phytostérols (les plus courants sont le stigmastérol et le β -sitostérol). Ce sont des composants biologiques indispensables à la compartimentalisation et donc à la vie cellulaire. La présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 3 du noyau stérane distingue les stérols des autres stéroïdes (figure 1).

Le cholestérol ($C_{27}H_{46}O$) en particulier possède un noyau stérane hydrophobe et rigide couplé à un groupement hydroxyle hydrophile. Ses propriétés physico-chimiques lui confèrent une nature amphiphile et une orientation spécifique adaptée à son intégration dans les membranes cellulaires (Ohvo-Rekilä *et al.* 2002 ; Róg *et al.* 2009). En tant que composant principal des membranes cellulaires, il joue un rôle important dans l'organisation, la compartimentalisation et la signalisation cellulaire. Il est de plus un précurseur de plusieurs molécules importantes comme les hormones stéroïdiennes (progestérone, œstrogène, etc.), la vitamine D et les acides biliaires (Li & Chiang 2009 ; Bertolotti *et al.* 2012). Cependant, un taux de cholestérol sanguin élevé représente un facteur de risque important pour le développement des maladies cardiovasculaires (MCV) (Mendis *et al.* 2011). Chez l'être humain et les mammifères omnivores, le cholestérol peut provenir de deux origines : endogène par biosynthèse à partir de deux molécules d'acétyl-CoA ou exogène via l'alimentation avec un ratio de 70 :30 environ, ce ratio variant entre individus selon leur prédisposition génétique et l'apport alimentaire en cholestérol (Ikonen 2008).

La molécule de cholestérol, au-delà de son implication dans le développement des MCV, possède un rôle métabolique et physiologique important. Maintenant, nous allons nous intéresser à la molécule de coprostanol, second stérol d'intérêt dans ce projet de thèse.

2.1.1.2 La molécule de coprostanol

Le coprostanol, un autre stérol possède une composition très proche de celle du cholestérol : $C_{27}H_{48}O$. Ces deux hydrogènes supplémentaires (figure 1) confèrent des propriétés différentes au noyau stérane qui est moins rigide sans sa double liaison 5-6. Dès la fin du XIXème siècle, Bondzynski et Humnicki ont considéré ce composé comme une réduction du cholestérol par les bactéries de l'intestin des omnivores (Bondzynski & Humnicki 1896). Plus tard, cette hypothèse a été étoffée par le travail de Dorée et Gardner. En effet, ni le cholestérol ni ses dérivés ne sont retrouvés dans les selles d'animaux herbivores, à moins d'être administrés en tant que tels et dans ce cas ils sont retrouvés dans les fèces inchangés (Dorée & Gardner 1908). La conversion du cholestérol en coprostanol par les selles humaines a été reportée dès 1934 (Dam 1934). De plus, cette molécule a été retrouvée dans les fèces de plusieurs mammifères supérieurs notamment les babouins et les porcs (Rosenfeld & Hellman 1971). Le rôle biologique de ce composé n'a pas été identifié à ce jour.

Le cholestérol et le coprostanol sont deux molécules très proches chimiquement ; pourtant elles ont des métabolismes différents. Le premier est un composant indispensable à la vie cellulaire, venu de l'alimentation et produit par l'hôte comme nous allons le voir dans la partie suivante. Le second est un produit du métabolisme des bactéries du microbiote intestinal comme détaillé dans la dernière partie de ce chapitre.

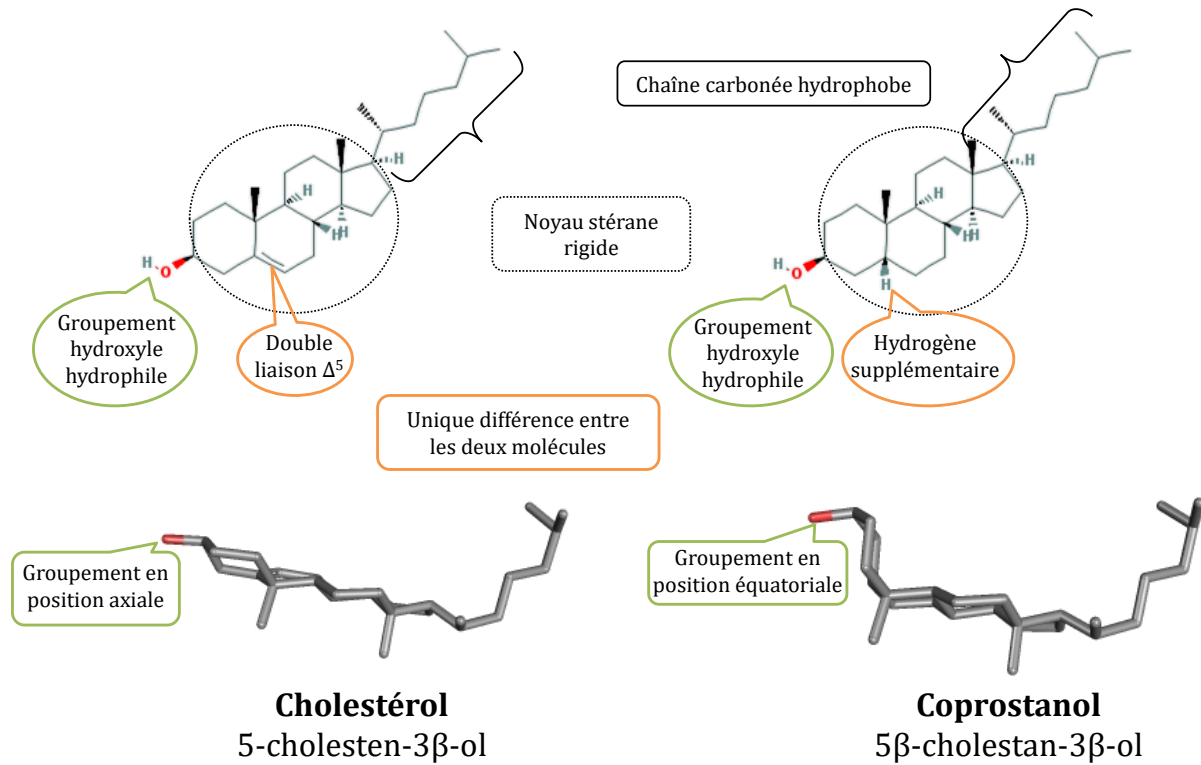


Figure 1 : Structure chimique des molécules de cholestérol et de coprostanol

2.1.2 Métabolisme du cholestérol chez l'hôte

Nous allons maintenant entrer dans le détail de l'origine du cholestérol chez l'humain. En fait, le cholestérol provient en moyenne à 70 % de la synthèse endogène et à 30 % de l'alimentation. Nous détaillerons ensuite le transport de cette molécule entre les différents organes et son élimination par la voie entéro-hépatique et l'efflux trans-intestinal.

2.1.2.1 Synthèse endogène du cholestérol

La biosynthèse de cholestérol prend place principalement dans les hépatocytes et les entérocytes bien que toutes les cellules nucléées du corps soient capables de le synthétiser (Ikonen 2008). Ce métabolisme est assez complexe mais globalement, il peut être divisé en quatre étapes comme présenté en figure 2 :

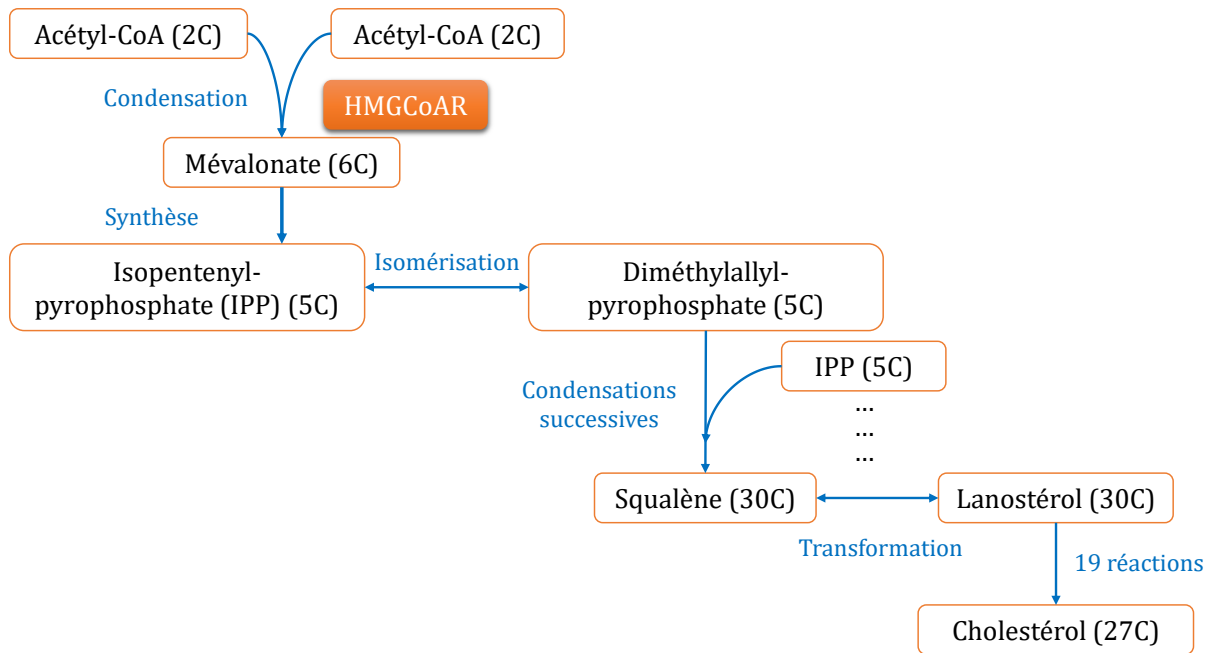


Figure 2 : Principales étapes de la synthèse du cholestérol à partir de deux molécules d'acétyl-CoA
L'action de l'Hydroxy-Méthyl-Glutaryl CoA Réductase (HMGCAR) rend cette étape irréversible. C'est une enzyme clé de la synthèse du cholestérol.

La majorité de ces réactions prennent place dans le réticulum endoplasmique (RE). Le cholestérol est alors associé à des triglycérides et à une apolipoprotéine (apoB100) pour former les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), riches en cholestérol. Les VLDL empruntent ensuite le circuit des vésicules de l'hépatocyte pour rejoindre l'appareil de Golgi et être finalement excrétés dans le système circulatoire. Cette circulation a pour but de délivrer le cholestérol aux organes périphériques. En plus du sang, du cholestérol est sécrété par le foie dans le duodénum par l'intermédiaire de la bile.

Bien que cette synthèse représente généralement la majeure partie de l'apport de cholestérol au corps humain, le cholestérol contenu dans l'alimentation rejoint également le pool de cholestérol du corps humain. Celui-ci nous intéresse dans le contexte de l'étude de l'effet du microbiote intestinal sur la cholestérolémie.

2.1.2.2 Apport exogène et absorption intestinale du cholestérol

Le cholestérol exogène provient de l'alimentation. Chaque jour, le régime alimentaire humain de type occidental apporte de 200 à 600 mg de cholestérol (Charlton-Menys & Durrington 2008 ; Kruit et al. 2006). Lorsque ce cholestérol atteint l'intestin grêle et en particulier sa partie proximale appelée duodénum (figure 3), il rencontre les sels biliaires sécrétés par le foie. Ces molécules vont permettre la solubilisation du cholestérol sous forme de micelles. Les transporteurs protéiques trans-membranaires appelés Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) présents à la surface apicale des entérocytes vont alors prendre en charge le cholestérol. Bien que les mécanismes précis du transport du cholestérol de la membrane

plasmique au RE ne soient pas bien décrits, il semblerait qu'une fois entré dans la cellule, le cholestérol soit rapidement estérifié. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acyl-coenzyme A:cholestérol acyltransférase-2 (ACAT2) et permet de rendre le cholestérol plus soluble et donc plus facile à transporter. Il est ensuite associé à des triglycérides et à une apolipoprotéine (apoB48) dans le RE formant ainsi les chylomicrons (CM). Puis, ceux-ci sont sécrétés dans la lymphe en suivant le système endomembranaire de la cellule (Charlton-Menys & Durrington 2008 ; Kruit et al. 2006 ; Ikonen 2008).

Le cholestérol venu de la synthèse dans le foie ou de l'alimentation doit être transporté du foie vers les organes et de l'intestin vers le foie et les tissus périphériques. La molécule étant amphiphile, son transport nécessite des transporteurs particuliers, appelés lipoprotéines qui circulent dans le sang.

2.1.2.3 Le transport du cholestérol dans l'organisme : les lipoprotéines

Le transport du cholestérol au sein de l'organisme est dû principalement à la circulation dans le sang et dans la lymphe de macromolécules appelées lipoprotéines. Elles sont formées de lipides et d'apolipoprotéines liées de manière non covalente. Leur composition précise varie en fonction de leur origine et de leur rôle. Les VLDL et les CM formées respectivement après la synthèse du cholestérol par le foie et après l'absorption intestinale sont riches en cholestérol. En circulant dans le sang, ces lipoprotéines vont échanger des composés (cholestérol, triglycérides, phospholipides, etc.) avec les organes et les tissus mais aussi entre elles. Les VLDL deviennent des IDL (Intermediate Density Lipoprotein) puis des LDL (Low Density Lipoprotein) lorsque leur quantité de cholestérol devient plus importante que celle des triglycérides. Les CM deviennent quant à eux des CM remnants (CMr). LDL et CMr viennent se fixer sur les récepteurs aux LDL (LDLr) du foie. Ils sont ensuite internalisés et dirigés vers le RE. Le cholestérol et les autres composés intéressants (acides gras et acides aminés) sont recyclés et associés à l'apoprotéine A1 (apoA1) pour former les HDL naissantes (High Density Lipoprotein) (Ikonen 2008). Cependant, en cas de forte concentration sanguine de LDL, celles-ci peuvent subir des modifications (et notamment une oxydation) qui vont provoquer leur dépôt à des sites anormaux comme les artères par exemple. Les LDL ainsi modifiées vont s'accumuler dans la paroi des vaisseaux sanguins et initier la formation de plaques d'athérome. Celles-ci sont les marqueurs de l'athérosclérose. En cas de rupture, elles peuvent provoquer l'obstruction des vaisseaux sanguins ou la formation de caillots menant à l'apparition clinique de l'athérosclérose : les MCV.

Les HDL naissantes sont synthétisées principalement par les hépatocytes mais aussi par les entérocytes. Les tissus périphériques jouent également un rôle important dans le métabolisme du cholestérol et notamment son élimination. En effet, les HDL sont responsables

du transport appelé « reverse » du cholestérol, *ie* des tissus vers le foie. Les HDL naissantes vont aller se charger en cholestérol auprès des tissus. Cet efflux de cholestérol se fait grâce au transporteur ATP-Binding Cassette transporter (ABC) type A1 (ABCA1) exprimé de manière ubiquitaire au niveau des membranes de toutes les cellules. Ils contrôlent l'association du cholestérol à l'apolipoprotéine A1 lors du transfert du cholestérol vers les HDL (Oram & Lawn 2001). Un second transporteur ABC, de type G1 (ABCG1), semble agir en synergie avec ABCA1 pour charger les HDL en cholestérol (Gelissen *et al.*, 2008 et Vaughan *et al.*, 2009). Comme toutes les autres lipoprotéines, les HDL retournent au foie où elles sont reconnues par le récepteur scavenger receptor B-1 (SRB1). Les HDL sont pauvres en cholestérol et peuvent échanger des composants avec les CM et les VLDL grâce à différentes enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol (Ikonen 2008).

Après avoir vu la synthèse et le transport du cholestérol, nous allons voir le devenir du cholestérol et surtout sa transformation en acides biliaires.

2.1.2.4 Métabolisme et rôle des acides biliaires

Le cholestérol n'est pas seulement une molécule utilisée par les cellules, il est aussi le précurseur de nombreux autres composés comme les acides biliaires. Chez l'Homme, la synthèse des acides biliaires (AB) prend place dans le foie. Ils sont formés après l'action de la cholestérol-7 α -hydrolase (CYP7A1), une enzyme proche du cytochrome P450 (Li & Chiang 2009 ; Bertolotti *et al.* 2012). Ces AB, appelés AB primaires (ABI) sont de deux types chez l'Homme : l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. Ils sont ensuite conjugués avec de la glycine ou de la taurine formant ainsi les acides glyco- et tauro-choliques et les acides glyco- et tauro-chénodésoxycholiques. Sécrétés dans la bile grâce au système vésiculaire des hépatocytes, leurs propriétés amphiphiles leur permettent de s'associer avec des phospholipides et du cholestérol pour former des micelles. Cet ensemble appelé sels biliaires est ensuite sécrété dans le duodénum (Li & Chiang 2009). Les AB peuvent ainsi jouer un double rôle concernant les composés hydrophobes : améliorer l'absorption intestinale de ceux utiles à l'hôte (cholestérol et autres lipides) et éliminer ceux issus du métabolisme de l'hôte (bilirubine par exemple) ou ceux qui ne lui sont plus utiles (cholestérol, phospholipides, etc.). Ces déchets hydrophobes vont être solubilisés grâce aux AB créant des micelles excrétées ensuite dans les fèces (Hofmann & Eckmann 2006). Avant d'atteindre l'anus, les AB passent par le côlon où ils rencontrent les bactéries du microbiote intestinal qui vont modifier les ABs : déconjugaison, oxydation, épimérisation, désulfatation, etc. Les molécules ainsi générées sont alors appelées acides biliaires secondaires (ABII).

De plus en plus d'études montrent que les AB n'ont pas seulement un rôle d'émulsifiant lipidique mais également de molécules signal. Le récepteur au farnesoïde X (FXR), celui de la

vitamine D (VDR), du pregnane X (PXR) et constitutif de l'androstane (CAR) sont autant de récepteurs nucléaires sensibles aux AB. Ils activent également les récepteurs cytoplasmiques comme le récepteur aux AB couplé à une protéine G (TGR5), les récepteurs muscariniques et le récepteur shingosine 1-phosphate 2 (S1PR2). Les nombreux métabolismes régulés par ces récepteurs sont donc sujets à des modifications *via* l'activation par certains AB. Par exemple, le récepteur FXR joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol et des AB mais aussi sur celui des triglycérides et du glucose. Ces nouvelles données tendent à montrer un rôle important des AB dans la régulation du métabolisme énergétique de l'hôte. Cependant, la spécificité des AB et leur mécanisme d'action restent un vaste sujet d'étude à approfondir pour mieux les comprendre (Vítek & Haluzík 2016). La diversité des AB générée par l'action du microbiote intestinal et développée dans le paragraphe 2.3.2 n'est pas à sous-estimer dans ces réactions.

2.1.2.5 Cycle entéro-hépatique

Le foie synthétise donc à la fois la majorité du cholestérol endogène et les acides biliaires. Ces deux principaux constituants sont stockés dans la vésicule biliaire et rejoignent la bile. Celle-ci est sécrétée dans le duodénum via le canal biliaire (figure 3). Comme expliqué plus haut, elle va aider à la solubilisation du cholestérol et des lipides en général et donc à leur absorption intestinale. Une partie des composants de la bile sont recyclés. Ils sont réabsorbés au niveau de l'iléon terminal et rejoignent le foie en empruntant la veine porte (figure 3). Ce cycle est appelé cycle entéro-hépatique. Une partie du cholestérol alimentaire (entre 15 et 85 % en fonction des individus) n'est pas absorbée au niveau duodénal et peut donc également emprunter cette voie en atteignant l'iléon terminal.

Ce cycle est indispensable à l'absorption de certains composants alimentaires (cholestérol et lipides) mais il joue également un rôle important dans l'élimination du cholestérol de l'organisme.

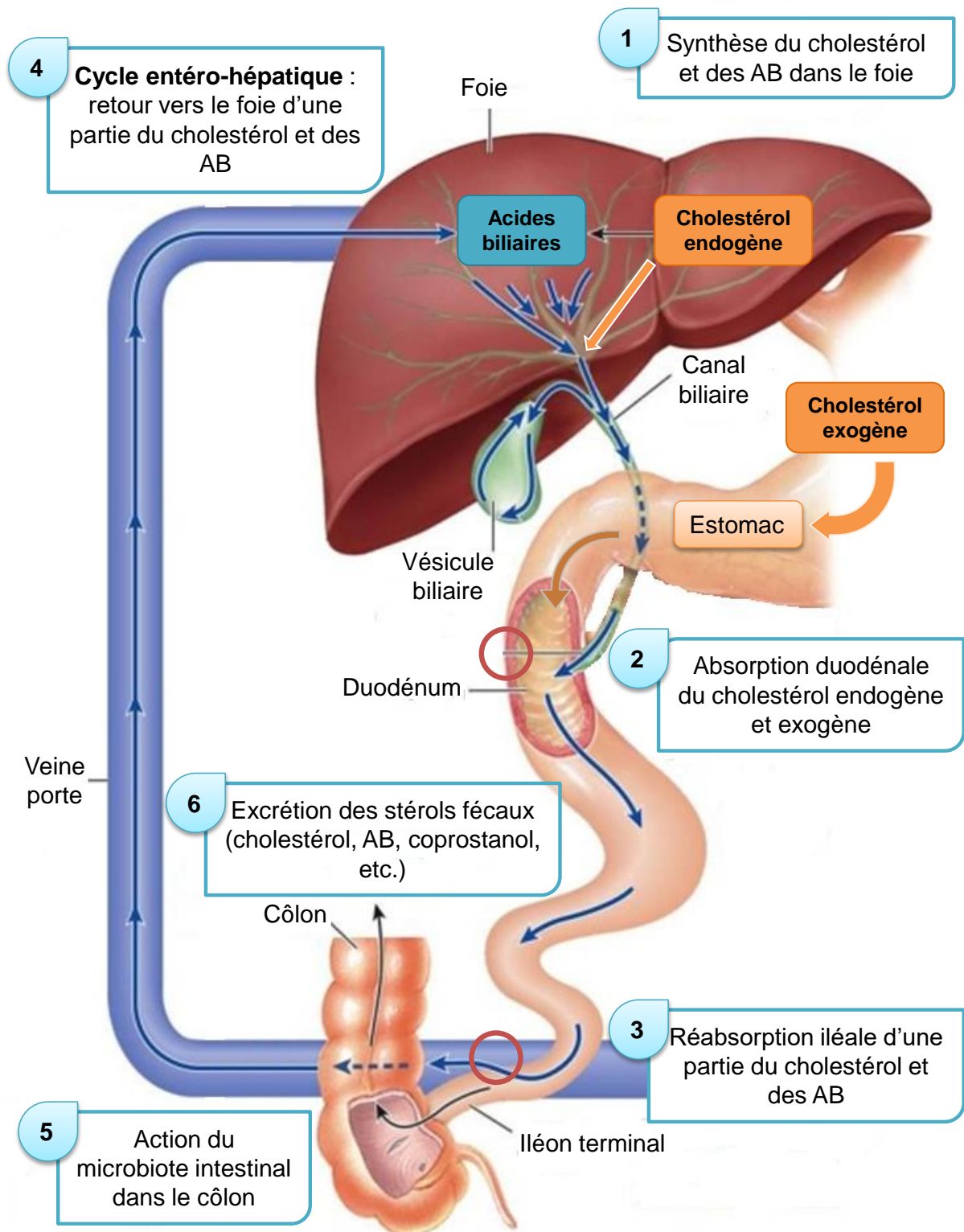


Figure 3 : Le cycle entéro-hépatique

Illustration réalisée à partir d'une image disponible sur : <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/85/29/2b/85292be5b467ca1aac00a7cea5987398.jpg>.

2.1.2.6 Elimination du cholestérol

La voie principale d'élimination du cholestérol est la voie hépatobiliaire. D'une part, il est envoyé dans les canalicules où son transport actif grâce au complexe formé par deux transporteurs ABC de type G5 et G8 (ABCG5/G8) permet son élimination dans la bile sous forme libre (Ikonen 2008). D'autre part, il peut être converti en AB et sécrété de la même manière dans la bile. Le cholestérol ainsi que les AB sont soit réabsorbés (cycle entéro-hépatique) ou atteignent le côlon et sont éliminés dans les selles. Cependant il existe une autre voie d'élimination du cholestérol. D'abord observé chez la souris, l'efflux trans-intestinal du cholestérol (TICE) (van der Velde et al. 2010) trouve de plus en plus d'échos chez l'Homme. C'est un transport actif du cholestérol sanguin vers la lumière intestinale. Les mécanismes moléculaires sont encore peu connus mais le complexe ABCG5/G8 semble intervenir au niveau des entérocytes pour la sortie du cholestérol de la cellule vers la lumière intestinale. Ce cholestérol peut ensuite réintégrer le pool de cholestérol intestinal et atteindre le côlon.

La participation relative de ces deux mécanismes au pool de cholestérol retrouvé dans les selles semble dépendante du fond génétique chez la souris et n'est pas connue chez l'Homme. En effet, van der Veen et al. (2009) ont estimé que 33 % du cholestérol fécal proviendrait du TICE et 17 % de la voie hépatobiliaire chez des souris C57BL/6 (van der Veen et al. 2009). Cependant, une autre étude montre que la contribution relative du TICE à l'excrétion fécale de cholestérol est de seulement 20 % chez les souris FVB (« Friend virus B-type ») (Kruit et al. 2005). Chez l'Homme, le TICE pourrait être à l'origine de plus de 30 % des pertes totales des stérols neutres chez les personnes modérément hypercholestérolémiques (Blanchard et al. 2014).

A l'entrée du côlon, les quantités d'AB et de cholestérol sont respectivement comprises entre 200 et 300 mg/jour et entre 550 mg et 1 g/jour (Charlton-Menys & Durrington 2008 ; Gérard 2012). Ce cholestérol provient des deux voies énoncées plus haut mais aussi du cholestérol alimentaire non absorbé et de la desquamation des cellules (Charlton-Menys & Durrington 2008). Une fois dans le côlon, le microbiote va métaboliser une partie du cholestérol et des AB en de nouvelles molécules (majoritairement les AB secondaires). Toutes ces molécules (cholestérol, AB et celles nouvellement formées) vont venir augmenter le pool de stérols fécaux (figure 3). Ceux-ci rassemblent les stérols d'origine animale, végétale (phytostérols) et bactérienne modifiés ou non lors du passage dans le tractus digestif humain et/ou par le microbiote intestinal.

Le métabolisme du cholestérol est donc intimement lié au foie et à l'intestin. La présence du cholestérol dans la lumière intestinale et notamment au niveau du côlon, en fait un substrat accessible pour les bactéries du microbiote intestinal. Mais avant d'entrer dans les détails des

effets du microbiote intestinal sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte, il est important de présenter ce nouvel « organe ».

2.2 Le microbiote intestinal

Dans cette partie, nous allons présenter les notions de bases à la compréhension du microbiote intestinal allant de sa définition à son rôle en tant que partenaire du maintien de l'homéostasie générale de l'hôte afin de mettre en évidence l'intérêt de son étude dans le contexte des maladies cardiovasculaires. Dans un premier temps, nous établirons les caractéristiques du microbiote intestinal en tant qu'écosystème microbien, ensuite nous présenterons le modèle des animaux axéniques permettant la mise en relation du microbiote intestinal et des métabolismes de l'hôte. Ceux-ci seront décrits dans deux conditions : normale et pathologique et détaillés dans une dernière partie.

2.2.1 Les caractéristiques du microbiote intestinal

Tout d'abord, avant de comprendre l'intérêt de cibler le microbiote intestinal dans le contexte de l'hypercholestérolémie, il est important d'appréhender sa définition, de connaître ses caractéristiques compositionnelles et fonctionnelles.

2.2.1.1 Définition

Un microbiote représente l'ensemble des micro-organismes (bactéries, champignons, archées, levures et virus) peuplant un environnement donné, c'est-à-dire un espace physiquement tangible régi par des contraintes physico-chimiques. En particulier, toutes les surfaces en contact avec « l'extérieur » sont susceptibles de constituer un environnement colonisable par des micro-organismes. Le microbiote intestinal (autrefois appelé flore intestinale) désigne plus particulièrement l'ensemble des micro-organismes hébergés dans le tractus digestif des animaux. En particulier, le tractus digestif humain est constitué de différents segments (figure 4) qui possèdent chacun leurs caractéristiques physico-chimiques propres (Oxygène, pH, potentiel d'oxydo-réduction, vitesse de transit, etc.). Ces paramètres imposent des conditions environnementales particulières qui contraignent sa colonisation par les bactéries et engendrent des compositions adaptées à chaque segment. En effet, leur présence n'est pas homogène le long de ce tube digestif (figure 4). C'est dans la partie distale et plus particulièrement le côlon que se regroupent le plus de bactéries : 10^{11} UFC/g de contenu ce qui en fait l'un des écosystèmes microbiens les plus densément peuplés de la planète (Whitman et al. 1998).

Le microbiote intestinal est donc l'ensemble des micro-organismes contenu dans l'intestin des animaux et en particulier de l'Homme.

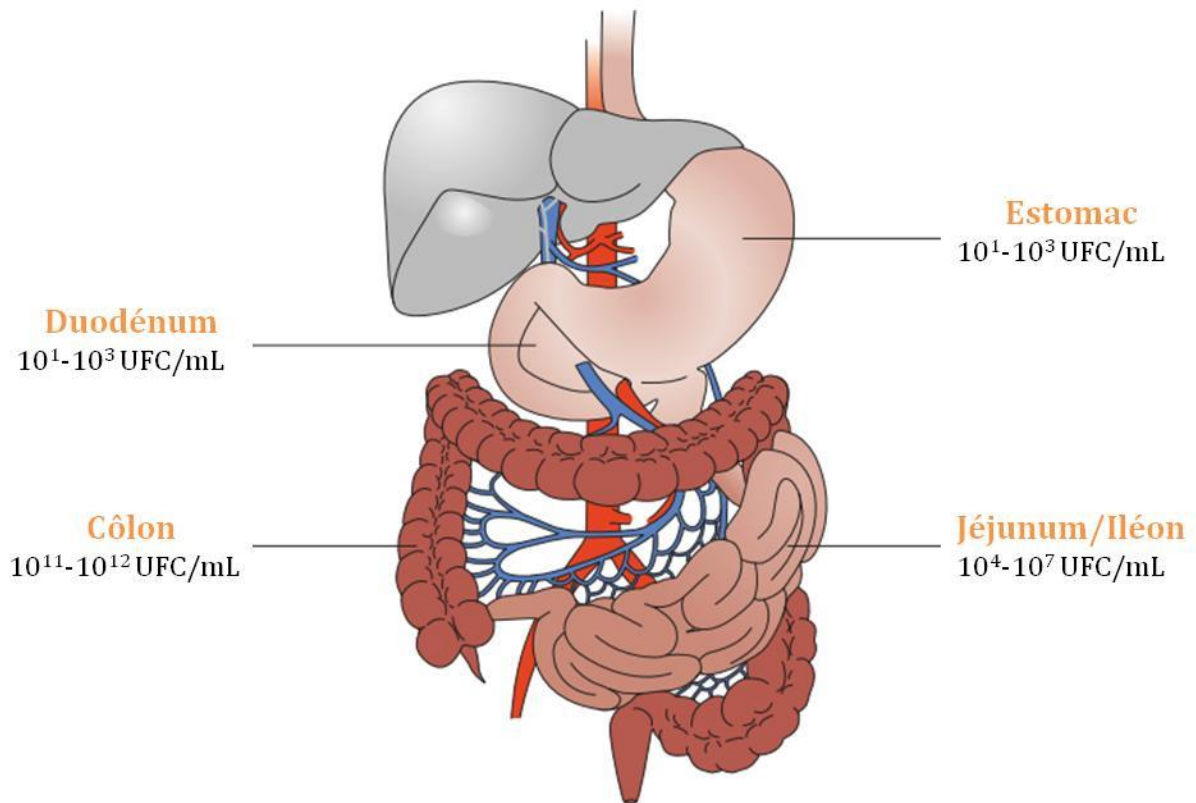


Figure 4 : Compartiments du tractus digestif associés à leur charge bactérienne.
D'après O'Hara & Shanahan (2006)

2.2.1.2 Composition « normale »

Le microbiote intestinal humain est un écosystème complexe et dynamique résultant d'une coévolution avec l'hôte et l'environnement (Ley et al. 2008; Yatsunenکو et al. 2012). La majorité des bactéries du microbiote intestinal étant anaérobies strictes et les conditions du tractus digestif étant difficiles à mimer, seulement 30 % du microbiote intestinal « dominant » (bactéries présentes entre 10^9 et 10^{11} UFC/g de fèces) ont été mis en évidence par les essais en culture classique. La culture en anaérobiose a tout de même permis la découverte de 400 espèces dont 25 à 40 appartenant au microbiote « dominant ». Cette méthode est également adaptée aux bactéries en sous-dominance ($10^6 - 10^8$ UFC/g de fèces) et aux bactéries en transit ($<10^6$ UFC/g de fèces venant de l'alimentation ou de l'environnement, elles ne font que passer dans le tractus digestif) qui peuvent être anaérobies facultatives (Marteau & Doré 2017). Une part importante des micro-organismes composant cet écosystème demeure donc difficile voire impossible à isoler et cultiver selon les méthodes traditionnelles de microbiologie.

Les avancées technologiques de séquençage ont permis l'avènement de nouvelles techniques dites de métagénomique pour l'étude des écosystèmes composés de micro-

organismes. Elles sont basées sur l'analyse d'un seul gène : ADN ribosomal 16S ou de tous les gènes constituant une communauté. La première technique a permis l'identification d'environ 1000 OTUs dominantes par microbiote individuel, OTU signifiant « Operational Taxonomic Units » et correspondant plus ou moins aux espèces définies par la taxonomie classique. La seconde a permis de créer dans un premier temps un catalogue de 3,3 millions de gènes sur les échantillons fécaux de 124 individus grâce au projet Européen MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) (Qin et al. 2010). Dans un second temps, un deuxième catalogue de 10 millions de gènes a été créé en regroupant plusieurs études pour atteindre environ 1800 échantillons fécaux (Li et al. 2014). Ces gènes, déjà annotés ou proches de gènes aux fonctions connues, permettent d'avoir une idée des fonctionnalités de l'ensemble de ces génomes appelés « métagénomes ». De plus, la métagénomique dite « quantitative » permet, grâce au développement d'outils bioinformatiques, d'avoir une idée de la richesse en gènes et en espèces de l'écosystème intestinal. Cette technique a permis l'identification d'un « noyau métagénomique » ; en effet, environ 50 % des gènes dominants du métagénome d'un individu sont partagés par environ 50 % des individus qui l'entourent.

Ce noyau commun est composé de 4 phyla bactériens (figure 5) : *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Verrucomicrobia* (Eckburg et al. 2005; Qin et al. 2010; Doré et al. 2017). Les *Bacteroidetes* sont les bactéries Gram négatives dominantes représentées principalement par les genres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* et apparentés. Ils représentent 9 à 42 % des bactéries totales et partagent la dominance avec les *Firmicutes* qui sont les bactéries Gram positives dominantes (figure 5). Le groupe *Clostridium* cluster XIVa notamment représente 14 à 31 % des bactéries fécales selon les études (Rajilić-Stojanović et al. 2007) ; les genres dominants incluent : *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*. Le phylum *Actinobacteria* est quant à lui représenté par les genres *Bifidobacterium* (0.7 à 10 %) et le groupe *Collinsella-Atopobium* (0.3 à 3.7 %). Enfin, le genre *Akkermansia* appartient au phylum *Verrucomicrobia* présent à des niveaux comparables à celui des *Actinobacteria* (Doré et al. 2017). Moins souvent observées mais toujours présentes ou presque, les entérobactéries (appartenant au phylum des *Proteobacteria*) font aussi partie du microbiote intestinal (Lay et al. 2005).

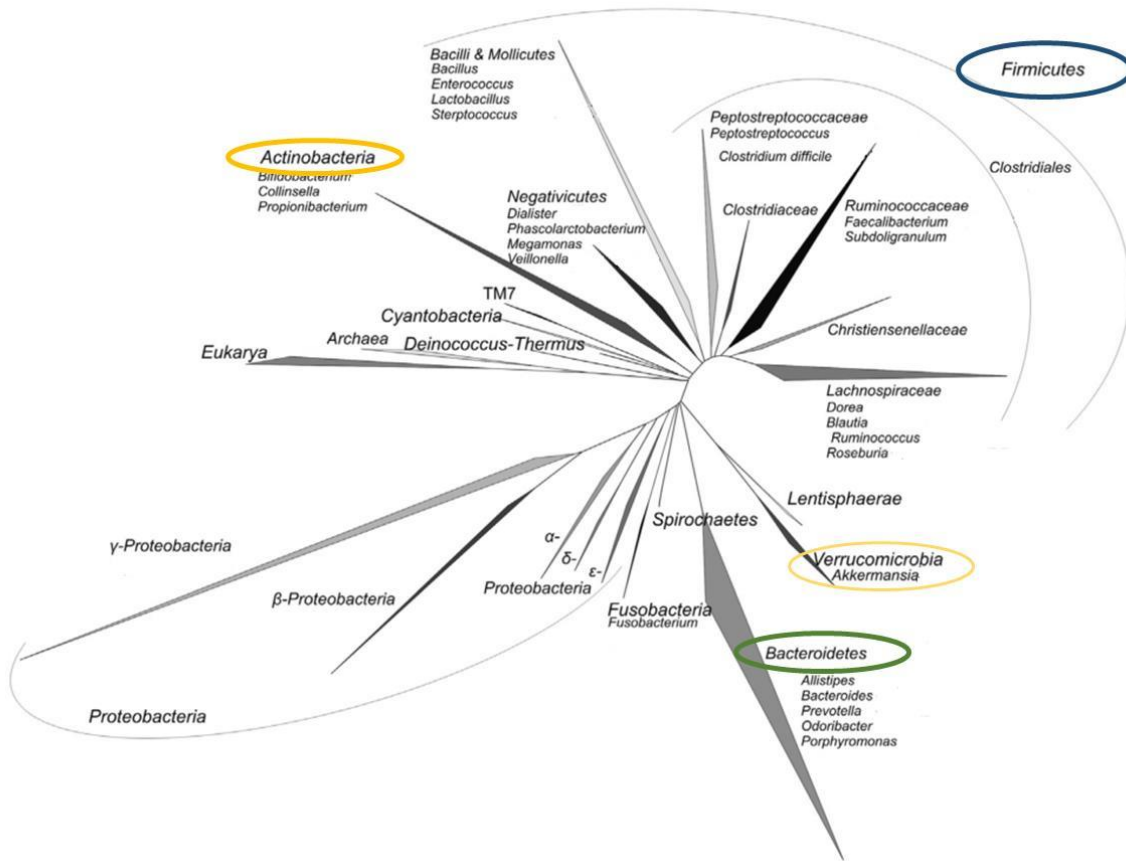


Figure 5 : Arbre phylogénétique représentant la diversité du microbiote intestinal humain avec entourés en couleur les 4 phyla dominants.
D'après Rajilić-Stojanović (2013)

La composition du microbiote intestinal varie beaucoup durant les premiers stades de la vie (figure 6). Le tractus intestinal du fœtus peut être considéré comme stérile même si de récentes études montrent une primo-colonisation par le transfert de bactéries à travers la barrière placentaire (Aagaard et al. 2014). La première colonisation se fait dès la naissance par le contact du nouveau-né avec les muqueuses vaginales, de l'anus et de la peau de la mère. Les bactéries sont d'abord anaérobies facultatives et particulièrement des entérobactéries, streptocoques et staphylocoques puis anaérobies strictes : *Bacteroides*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Campeotto et al. 2007). Ces microbiotes varient entre un accouchement par voie basse (bactéries du vagin et de l'anus principalement) et une naissance par césarienne (peau de la mère et bactéries de l'environnement) (Dominguez-Bello et al. 2010; Biasucci et al. 2010). Ce microbiote évolue durant les deux ou trois premières années avec une diversification et une stabilisation progressive des populations vers un microbiote adulte (Yatsunenکو et al. 2012). Il demeure relativement stable au cours de la vie, surtout le microbiote dominant, même s'il peut subir des changements ponctuels ou plus profonds sous la pression d'un changement de régime alimentaire, d'environnement et/ou de mode de vie (Palmer et al. 2007). L'utilisation d'antibiotiques peut également altérer la composition taxonomique et génomique du microbiote

intestinal ainsi que ses capacités fonctionnelles de manière rapide (Dethlefsen et al. 2008) et parfois persistante (Modi et al. 2014). Le système immunitaire et le métabolisme de l'hôte influencent également la composition du microbiote intestinal (Sommer & Bäckhed 2013) tandis que le vieillissement entraîne un déclin de la diversité microbienne (Faith et al. 2013), (figure 6).

Plus localement et comme expliqué plus haut, le tube digestif des mammifères possèdent des propriétés physico-chimiques particulières (pH, Eh, péristaltisme) auxquelles les bactéries du microbiote intestinal se sont adaptées. Il existe une variation de la population microbienne le long de l'axe formé par le tractus gastro-intestinal en termes de quantité (figure 4) et de composition. Il existe également des différences entre les bactéries adhérant à la surface de l'épithélium intestinal et celles retrouvées dans la lumière intestinale (Eckburg et al. 2005). Ceci s'explique par l'hétérogénéité des facteurs biotiques (nutriments, hormones, cytokines, etc.) et abiotiques. Notamment, le gradient d'oxygène existant entre le mucus et le lumen modifie le ratio des bactéries anaérobies/aérobies alors plus faible à la surface de la muqueuse que dans le lumen (O'Hara & Shanahan 2006).

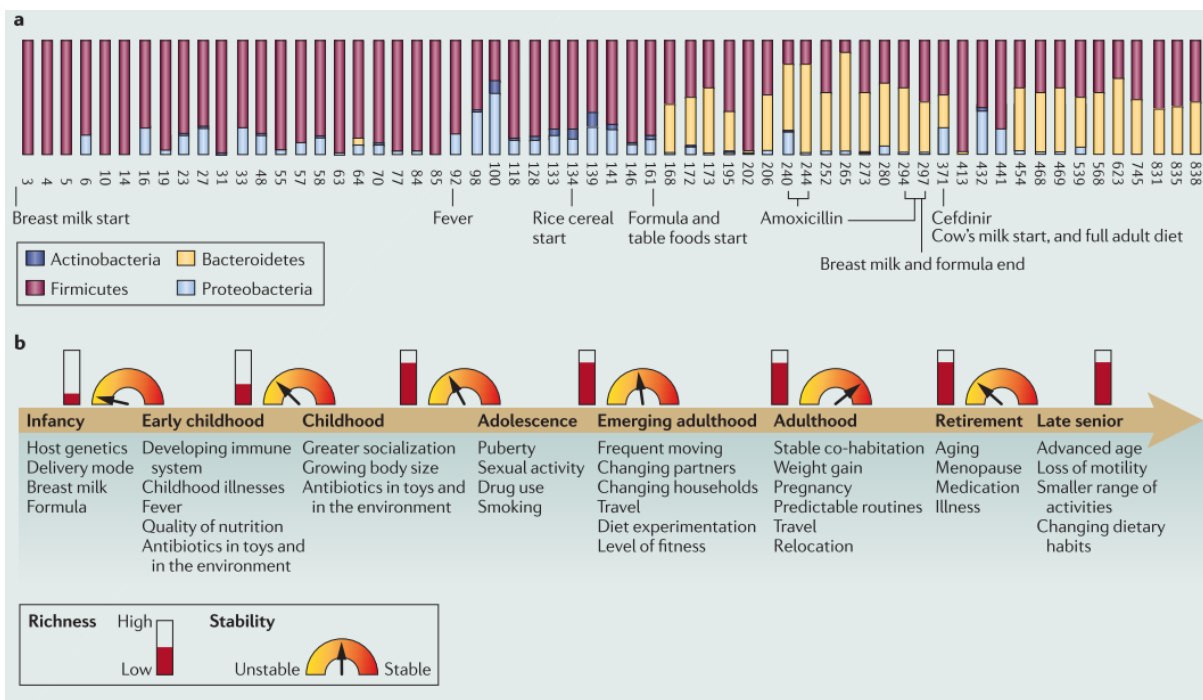


Figure 6 : Schéma des changements du microbiote intestinal au cours de la vie ainsi que les facteurs pouvant l'influencer.
D'après Spor et al. (2011)

Les scientifiques utilisent des critères descriptifs pour caractériser ces microbiotes. La première est une stratification par « entérotypes » (Arumugam et al. 2011; Ding & Schloss 2014). L'étude d'Arumugam et al. (2011) a pu répartir la population en trois groupes en fonction de la composition de leur microbiote intestinal. Ces trois communautés bactériennes sont représentées par la dominance de certaines bactéries : *Ruminococcus*, *Prevotella* et *Bacteroides* (Arumugam et al. 2011). La seconde est une stratification en fonction de la diversité/richeesse en

gènes et en espèces. Dans ce contexte, les scientifiques observent une distribution bimodale des populations étudiées entre les personnes ayant un microbiote avec une forte (autour de 800 000 gènes dans le métagénome dominant) diversité de gènes/espèces et ceux avec une faible (autour de 300 000 gènes dans le métagénome dominant) diversité (Doré et al. 2017).

Le microbiote intestinal, bien que spécifique de chaque individu est constitué de quatre phyla dominants en situation « normale » ou non pathologique (figure 5). Il varie en fonction de l'âge, du régime alimentaire et de bien d'autres facteurs internes ou externes. Malgré les difficultés rencontrées pour l'étudier, les nouvelles technologies et l'intérêt croissant des chercheurs à son égard ont permis de mieux caractériser sa composition.

2.2.1.3 Dégradation et production de composés à partir des substrats disponibles dans la lumière intestinale

Le microbiote intestinal individuel avec environ 1000 espèces et plus de 10^{14} bactéries possède au moins 20 fois plus de gènes que le génome humain (Qin et al. 2010). Ceci constitue le potentiel métabolique d'un organe complet capable de consommer, stocker et redistribuer l'énergie. Les mêmes fonctions sont exprimées par des micro-organismes plus ou moins phylogénétiquement éloignés. Les substrats proviennent à la fois de l'alimentation et de l'hôte (mucus, cellules épithéliales, enzymes, etc.). Les sucres, les protéines et les lipides constituent les composants majeurs du régime alimentaire humain et leur dégradation par le microbiote intestinal est présentée ici.

De nombreux micro-organismes du microbiote intestinal peuvent dégrader les sucres simples d'origine animale ou végétale en une ou deux molécules métaboliques principales (Tremaroli & Bäckhed 2012). En revanche, les sucres complexes ne sont dégradés que par des bactéries avec un métabolisme plus spécifique (Robert & Bernalier-Donadille 2003; Ramirez-Farias et al. 2009; Rajilić-Stojanović 2013). Ces fermentations transforment les sucres en gaz (H_2 et CO_2), éthanol, acides gras à chaîne courte (AGCC) (acétate, butyrate, propionate) et en acides (formique, lactique ou succinique)(Rajilić-Stojanović 2013).

La transformation des protéines animales et végétales se fait au niveau du côlon distal. La première étape de dégradation des protéines en petits peptides et acides aminés libres est réalisée par des enzymes appelées protéases et portées par de nombreuses espèces bactériennes. Les modifications sont ensuite diverses et nombreuses : production d'AGCC, ammoniacque, amines, composés phénoliques, N-nitrosidiques (groupement amine des acides aminés réagissant avec les nitrates à des pH faibles) et sulfure d'hydrogène (H_2S) (Rajilić-Stojanović 2013). La décarboxylation et la désamination menant à la production de CO_2 et d'ammoniacque sont des produits communs de la dégradation de tous les acides aminés ; les autres produits de fermentation sont dépendants de la chaîne latérale (Smith & Macfarlane

1997). En plus d'utiliser les résidus protéiques de l'hôte, le microbiote intestinal peut également synthétiser des acides aminés qui peuvent être utilisés par l'Homme (Rajilić-Stojanović 2013).

De nombreuses espèces bactériennes possèdent des lipases qui permettent l'hydrolyse des TG à chaîne longue (Jaeger et al. 1994). Ces composés peuvent ensuite être transformés en AGCC. Dans les années 1930 ; la conversion du cholestérol en coprostanol a été reportée dans des échantillons de selles humaines (Dam 1934). *Bacteroides* sp. D8 est la seule bactérie provenant du microbiote intestinal humain connue à ce jour capable de faire cette conversion (Gérard et al. 2007). Les acides biliaires subissent différentes modifications par le microbiote intestinal (*cf* paragraphes 2.3.2.1 et 2.3.2.2).

Enfin, le microbiote intestinal est également une source importante de vitamines en particulier les vitamines K2 (ménaquinone), B12 (cobalamine) et B8 (biotine) (Bernalier-Donadille & Pochart 2017).

Les micro-organismes composant le microbiote intestinal sont donc capables d'utiliser tous les types de substrats disponibles dans la lumière intestinale. Ils ne fonctionnent pas par individualité (un seul micro-organisme n'a pas la capacité métabolique d'utiliser tous les substrats rencontrés) mais par coopération (positive ou négative). L'utilisateur final des métabolites produits peut être un autre micro-organisme ou l'hôte.

2.2.2 Les animaux axéniques comme modèle expérimental

Cette partie nous permet de présenter les animaux axéniques en tant que modèle indispensable à l'évaluation des effets du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte et à l'identification des mécanismes d'action du microbiote intestinal sur l'hôte. De plus, il présente une technique utilisée dans la partie expérimentale de cette thèse.

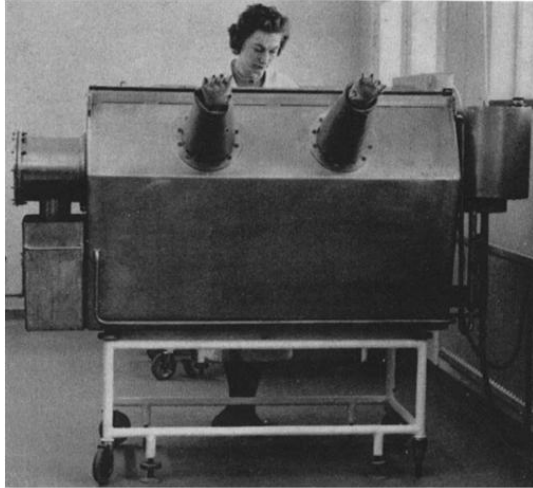
2.2.2.1 Présentation du modèle

Les animaux axéniques sont des animaux exempts de tous micro-organismes vivants (virus, bactéries, levures, protozoaires et parasites) pouvant se trouver à l'intérieur (tractus digestif, respiratoire, urogénital, etc.) ou à l'extérieur (peau) de l'animal. Dans le cadre d'études sur le microbiote intestinal, ces animaux peuvent être colonisés sélectivement par une espèce bactérienne, ils sont alors appelés animaux « monoxéniques » ou plusieurs, animaux « gnotobiotiques » du grec « gnotos », signifiant connu et « bios » qui veut dire vie. Ils peuvent également être « conventionnalisés » lorsque le microbiote d'un animal conventionnel (non élevé dans des conditions stériles) ou SPF (specific pathogen-free) est transféré à des animaux axéniques par gavage ou par coprophagie lors de la mise en présence de ces deux types d'animaux.

Dès 1885, Louis Pasteur évoque les animaux axéniques, ou sans-germes, en tant que concept d'étude. Cependant, il conclut qu'une existence sans bactéries serait impossible. Quelques années plus tard, en 1895, Nuttle et Thierfelder réussissent à maintenir en vie pendant 13 jours des cochons d'Inde axéniques nourris avec du lait de vache stérilisé. D'autres scientifiques ont développé des animaux sans germes : poulets et chèvres à la fin du XIX^{ème} siècle réfutant la théorie de Pasteur. Dans les années 40, le laboratoire Lobund de l'Université de Notre-Dame (Indiana, Etats-Unis) a mis en place un programme pour développer la création et le maintien de colonies d'animaux axéniques (rats et poulets) (Wostmann 1981). En 1946, l'équipe de Reyniers élève la première colonie de rats axéniques maintenue en bonne santé et pouvant se reproduire (Reyniers et al. 1946). Par la suite, les premières souris axéniques sont produites par Pleasants en 1959 (Pleasants 1959). Il aura donc fallu attendre 50 ans pour que les connaissances sur ces animaux soient suffisantes (notamment sur le régime alimentaire) afin de les maintenir en vie convenablement et de manière durable (Yi & Li 2012).

Leur statut sans germes est maintenu grâce à leur manipulation dans des chambres confinées appelés isolateurs (figure 7). Les premiers étaient faits en acier inoxydable (Gustafsson 1959) puis les améliorations technologiques ont permis l'utilisation d'isolateurs en plastique flexible, moins lourds et plus maniables comme ceux utilisés sur la plateforme Anaxem de l'Institut Micalis (figure 7). Malgré le contrôle des entrées et des sorties (air, litière, cages, matériel expérimental, etc.) de ces enceintes, le maintien de la stérilité est difficile. Les isolateurs sont stérilisés avec une vapeur antibactérienne composée d'acide peracétique avant le transfert de souris à l'intérieur de l'enceinte. Le statut sans germes des animaux est vérifié de manière régulière (au moins une fois par semaine) par prélèvement de fèces. Elles sont diluées et mises en culture dans différents milieux liquides et solides pour vérifier qu'aucun micro-organisme n'est établi dans le tractus digestif. Pour plus de détails sur le système des isolateurs, voir le paragraphe 3.4.3.1 du chapitre « Matériel et Méthodes ».

L'obtention de souris axéniques nécessite que le fœtus demeure stérile hors de l'utérus. C'est pourquoi, lors de la production d'une nouvelle lignée de souris axéniques, les souriceaux sont extirpés de la mère par une césarienne stérile puis transférés alors qu'ils sont toujours dans le sac utérin à une mère nourricière axénique. Les colonies axéniques sont ensuite maintenues grâce aux isolateurs, à l'alimentation et l'eau stériles. Leur mère ayant un statut conventionnel, il est possible qu'une faible quantité de bactéries soient passées par le placenta pour coloniser le fœtus (Aagaard et al. 2014). C'est pourquoi, en général la deuxième génération et les suivantes sont utilisées pour les expérimentations (Al-Asmakh & Zadjali 2015).



Enceinte en acier inoxydable



Enceinte en plastique souple

Figure 7 : Evolution technologique des enceintes pour maintenir le statut contrôlé (axénique, monoxénique, gnotobiotique ou SPF) des souris

Bien que relativement ancienne (1960) l'utilisation des animaux axéniques a nécessité de nombreuses mises au point avant leur apparition quasi systématique dans les nouvelles études sur le microbiote intestinal. Cela reste une procédure lourde en temps et en matériel. En soulignant les différences entre ces animaux et ceux élevés de manière conventionnelle, l'utilisation d'animaux axéniques a permis et permet encore de faire de grandes avancées dans l'identification des rôles du microbiote intestinal dans le développement et la santé de l'hôte.

2.2.2.2 Caractéristiques des animaux axéniques

Les souris et les Hommes partagent 99 % de leurs gènes et leurs microbiomes intestinaux ont des similarités qui partent de certains phyla et descendent jusqu'à certaines familles. Les souris constituent donc un modèle intéressant pour évaluer les interactions microbiote-hôte applicables à la biologie humaine (Spor et al. 2011).

Dans de bonnes conditions d'élevage et d'alimentation, les souris axéniques vivent plus longtemps que celles dit conventionnelles (Gordon et al. 1966). Cependant ces animaux montrent un nombre important de différences physiologiques et de développement comparés aux animaux conventionnels (Kostic et al. 2013; Wostmann 1981; Al-Asmakh & Zadjali 2015). Une liste non exhaustive des différences des caractéristiques intestinales des souris axéniques comparées aux souris conventionnelles est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques intestinales anatomiques et physiologiques qui diffèrent entre les souris axéniques et les SPF.

Caractéristiques intestinales	Différences observées chez les souris axéniques
Morphologie	Réduction de la masse intestinale totale et augmentation de la taille du caecum Sous-développement de l'intestin grêle : moins de surface, villosités irrégulières, cryptes plus petites, lamina propria (tissu conjonctif lâche situé sous l'épithélium intestinal) plus fine, avec moins de cellules et un renouvellement de ses cellules plus lent
Motilité	Réduction de la motilité et augmentation du temps de transit
Physiologie	Augmentation du potentiel d'oxydoréduction dans l'intestin grêle
Fonctions	<i>Les différences énoncées plus haut impliquent des modifications des fonctions intestinales :</i> Diffusion passive et absorption par transporteurs semblent facilitées bien que toutes les études ne montrent pas une différence claire Moins d'acides gras et pas d'acides gras cycliques ou à chaîne dans le contenu intestinal, sécrétion d'acides gras insaturés primaires (non modifiés par le microbiote intestinal) Augmentation de la concentration en AB primaires conjugués dans l'intestin grêle corrélée à une augmentation de leur réabsorption iléale. Diminution de la quantité totale d'AB dans les fèces Diminution de la sécrétion de stérols neutres dans les fèces

Tableau réalisé d'après (Al-Asmakh & Zadjali 2015; Wostmann 1981)

D'autres différences ont été mises en évidence notamment en ce qui concerne l'anatomie de certains organes comme le foie, les poumons, le tissu adipeux ou encore le cœur en lien avec leur développement et leurs fonctions métaboliques. La physiologie de ces animaux et le développement du système immunitaire sont également différents et seront discutés par comparaison avec les animaux conventionnels dans les paragraphes suivants. Ces animaux sont un modèle de choix pour mettre en évidence l'impact que peut avoir le microbiote intestinal sur l'hôte.

2.2.3 Influence du microbiote intestinal sur l'hôte

Dans cette troisième et dernière partie sur le microbiote intestinal, nous allons présenter le rôle du microbiote dans la physiologie de l'hôte en condition non pathologique puis en conditions pathologiques. Le but est non pas d'être exhaustif mais de souligner l'importance du microbiote intestinal dans le développement de nombreuses maladies afin de placer cette thèse dans ce contexte.

2.2.3.1 Lien entre le microbiote intestinal et la physiologie de l'hôte

Considérant l'importance quantitative et qualitative du microbiote intestinal; la perspective qu'il ait un effet sur les fonctions physiologiques de l'hôte apparaît d'autant plus plausible. En effet, le microbiote intestinal a un rôle dans la fonction barrière de l'épithélium intestinal mais aussi dans les fonctions métaboliques de l'hôte (production d'AGCCs par exemple), dans le développement du système immunitaire intestinal et global ainsi que dans le développement du cerveau.

2.2.3.1.1 Rôle du microbiote intestinal dans la fonction barrière de l'épithélium intestinal

L'intégrité de l'épithélium intestinal dépend beaucoup de sa capacité à se régénérer. Certains micro-organismes peuvent moduler des protéines du cycle cellulaire. Un phénomène de ralentissement de ce cycle et une diminution de la prolifération des cellules épithéliales ont été observés chez des porcelets axéniques comparés aux animaux conventionnels (Chowdhury et al. 2007). Une autre preuve du rôle important des micro-organismes dans ces événements a été apportée par Tomas *et al.* dans deux articles montrant que l'implantation d'un microbiote complexe à des rats axéniques favorisait la prolifération des cellules épithéliales (Tomas et al. 2013; Tomas et al. 2015). Chez les souris axéniques, la colonisation du tractus digestif implique une restructuration de l'épithélium intestinal avec un développement des villosités et une augmentation de la surface d'échange. Ces modifications nécessitent un important apport en oxygène afin de favoriser le développement de nouvelles cellules épithéliales. Ce phénomène stimule l'angiogénèse et participe à l'intégrité morphologique de l'intestin (Reinhardt et al. 2012; Stappenbeck et al. 2002). Il faut également noter que l'homéostasie de l'épithélium intestinal est un équilibre entre prolifération et différenciation/exfoliation cellulaire. Les micro-organismes du microbiote intestinal ont également un rôle à jouer dans ces phénomènes (Tomas et al. 2013). Un composé comme l'ammoniaque par exemple, formé par la dégradation des protéines alimentaires et des substrats endogènes serait susceptible d'altérer la synthèse des acides nucléiques et de changer les propriétés des cellules intestinales (morphologie, métabolisme et durée de vie) (Vissek 1978).

Le microbiote possède donc un rôle dans le maintien d'un intestin fonctionnel. Ceci participe au rôle de barrière joué par l'épithélium intestinal qui est renforcé de manière indirecte par une activation de certains mécanismes dans les cellules épithéliales de l'hôte. Le microbiote intestinal favorise la production de la couche de mucus et régule les gènes codant les mucines (protéines constituant le mucus) (Kandori et al. 1996). Il active la production de peptides antimicrobiens, d'immunoglobulines A (IgA), et de claudines (protéines participant à la formation des jonctions serrées) par les cellules épithéliales. De manière plus directe, le microbiote intestinal va produire des composés régulant les populations présentes et réduisant la possibilité d'établissement de bactéries pathogènes (Sokol 2017). L'effet direct se caractérise par une compétition pour les nutriments, pour l'occupation de l'espace et pour les liaisons aux récepteurs épithéliaux. Les bactéries commensales vont de plus modifier l'environnement à leur avantage empêchant l'établissement de nouvelles bactéries (Duncan & Edberg 1995). Certaines bactéries du microbiote intestinal peuvent également produire des composés toxiques pour d'autres bactéries plus ou moins proches de la bactérie productrice : bactériocines (toxines protéiques), acides biliaires secondaires (Sorg & Sonenshein 2008). En revanche, les composés phénoliques issus de la fermentation des acides aminés aromatiques entraînent une augmentation de la perméabilité intercellulaire et une diminution de la fonction barrière de l'épithélium (McCall et al. 2009).

2.2.3.1.2 Autres rôles du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte

Le microbiote intestinal utilise les composés présents dans la lumière intestinale comme substrat et source d'énergie (*cf* paragraphe 2.2.1.3). Le propionate, le butyrate et l'acétate sont les trois AGCCs majeurs retrouvés dans les selles des mammifères. Le butyrate peut être utilisé comme source d'énergie par les cellules épithéliales du côlon. Les AGCCs sont capables de moduler les taux de différents peptides intestinaux dont le glucagon-like peptide-2 (GLP-2) impliqué dans la fonction barrière de l'intestin par un renforcement de l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées. Ils peuvent aussi moduler la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline en modifiant les taux du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et du peptide YY (PYY) impliqués dans l'homéostasie énergétique (glucides et lipides) (Cani et al. 2013). L'acétate est de plus un précurseur du cholestérol et des acides gras à chaîne longue dans le foie (Wong et al. 2006).

Le microbiote participe également à la maturation du système immunitaire intestinal et global. Le rôle du système immunitaire porté par l'intestin dans les réponses immunitaires globales a longtemps été sous-estimé. En fait, il se développe en même temps que le microbiote intestinal (durant les deux ou trois premières années de la vie) et ce qui est connu découle des comparaisons entre animaux axéniques et animaux conventionnels. Les souris axéniques ont

une déficience dans tous les phénotypes immunitaires intestinaux. Leur épithélium intestinal n'est pas développé normalement, et la taille et le nombre de plaques de Peyer sont diminués. De même, les études montrent une diminution du nombre de cellules immunitaires et une diminution de l'expression des récepteurs Toll-like (TLR) impliqués dans la reconnaissance des motifs microbiens. Il est difficile de connaître les mécanismes précis qui permettent ce dialogue entre bactéries et cellules hôtes mais la colonisation de souris axéniques avec *Bacteroides fragilis* restaure plusieurs de ces phénotypes (Mazmanian et al. 2005). D'où l'hypothèse de l'importance des micro-organismes pour le développement du système immunitaire avec un/des rôles particuliers pour certaines souches. Le microbiote intestinal représente une source importante de molécules pro-inflammatoires qui peuvent passer la barrière intestinale et venir initier un processus inflammatoire. Les LPS composant la paroi des bactéries Gram négatives notamment, ont été proposés comme molécule vecteur de l'inflammation. Reconnus par les TLR4 ils sont responsables d'une inflammation basale et globale de l'hôte, maintenant son système immunitaire en alerte (Cani et al. 2007). Ils induisent également une insulino-résistance couplée à une stéatose hépatique chez l'humain (Lassenius et al. 2011). Le microbiote intestinal a également un rôle à l'âge adulte, notamment dans le nombre de cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques et monocytes). De plus, si les bactéries ont le pouvoir d'influencer le système immunitaire de l'hôte ; celui-ci joue un rôle dans la composition du microbiote intestinal en sécrétant des molécules qui vont sélectionner préférentiellement certaines bactéries aux dépens des autres (Martin-Gallausiaux et al. 2017).

Enfin, la mise en évidence d'un lien entre microbiote intestinal et fonctionnalités cérébrales s'est faite une fois de plus grâce à la comparaison des animaux axéniques et conventionnels. Les animaux axéniques ont une augmentation de la neurogénèse au niveau de l'hippocampe (Ogbonnaya et al. 2015) et une hypermyélination du cortex préfrontal (Hoban et al. 2016). Les études montrent également une augmentation de la perméabilité au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) chez les animaux axéniques (Braniste et al. 2014). Il existe également des différences entre ces animaux sur les taux et la nature des neurotransmetteurs retrouvés dans le cerveau (Heijtz et al. 2011). Les mécanismes ne sont pas connus mais pourraient faire intervenir les composants bactériens, les métabolites produits, une action de ces composés sur le système parasympathique reliant intestin et cerveau ou par l'intermédiaire du système immunitaire qui en modifiant les proportions de cytokines pro- et anti-inflammatoires modifie également le fonctionnement du cerveau (Rabot et al. 2017).

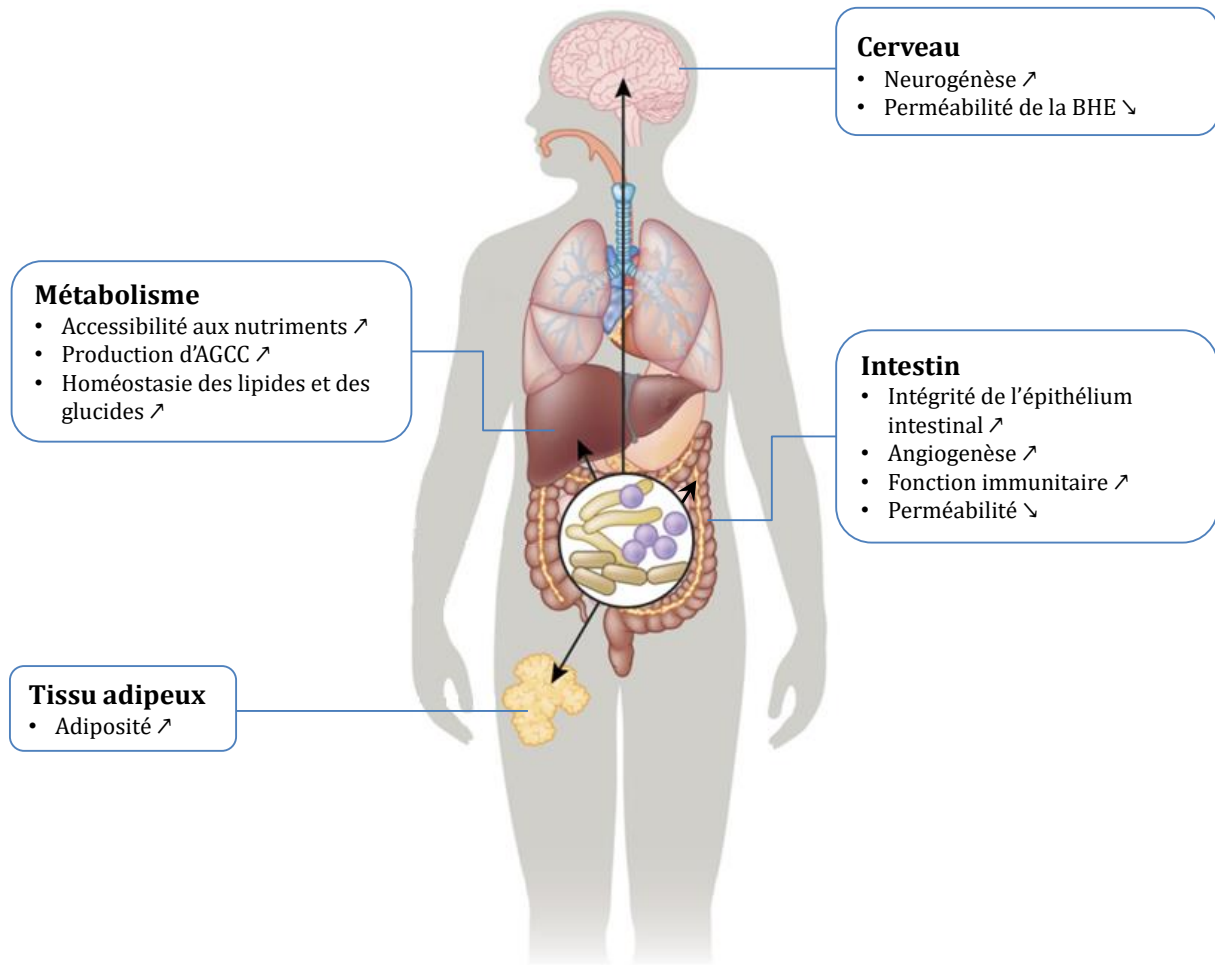


Figure 8 : Impact du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte.
Illustration adaptée de Sommer & Bäckhed (2013)

Le microbiote intestinal a donc de nombreux liens avec le développement et l'état physiologique de l'hôte en condition non pathologique, résumés sur la figure 8. Nous allons maintenant présenter ces relations en conditions pathologiques.

2.2.3.2 Lien entre le microbiote intestinal et les pathologies de l'hôte

Nous verrons tout d'abord la notion de dysbiose puis en quoi elle est reliée aux pathologies de l'hôte. Pour cela nous présenterons des exemples dans lesquels un déséquilibre du microbiote intestinal a été relié à des dysfonctionnements dans la physiologie de l'hôte.

2.2.3.2.1 La notion de dysbiose

Une dysbiose se caractérise par un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal. Ce déséquilibre peut combiner l'un ou plusieurs de ces facteurs : excès de micro-organismes potentiellement délétères pour l'hôte ; manque de micro-organismes bénéfiques ; perte de structure de l'écosystème avec impact sur la biodiversité et/ou la richesse microbienne. Ces dysbioses compositionnelles ont des conséquences fonctionnelles qui peuvent être médiées directement par les bactéries ou par modulation de molécules présentes dans la lumière

intestinale. Ces déséquilibres ont été corrélés à des pathologies humaines plus ou moins graves et développées dans les paragraphes suivant. Il est souvent difficile de déterminer si ce déséquilibre est la cause ou une conséquence de ces maladies. L'utilisation d'animaux axéniques et notamment le transfert de microbiotes peut démontrer la relation de cause à effet.

2.2.3.2.2 Les maladies du tractus digestif

Les maladies du tractus digestif regroupent un ensemble de dysfonctionnements du système gastro-intestinal (diarrhées, problème de motricité intestinale, maladies coéliqua et inflammatoire). Dans cette partie, nous ne détaillerons pas la physiologie de ces différentes pathologies mais nous essaieront de mettre en exergue la participation bénéfique ou délétère du microbiote intestinal.

2.2.3.2.2.1 Les diarrhées

Les diarrhées infectieuses et dues aux antibiotiques sont très fréquentes. Bien que rarement mortelles, elles ont un fort impact en santé publique. Une dizaine de groupes microbiens a été associée aux diarrhées chez des enfants vivant dans des pays pauvres (Pop et al. 2014). Plus généralement, plusieurs micro-organismes peuvent être responsables directement ou *via* la modification du microbiote intestinal, de l'établissement de diarrhées infectieuses : *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* toxigène, amibes, virus, etc. Les diarrhées faisant suite à des traitements aux antibiotiques (10 % des cas après ou pendant le traitement) peuvent d'une part s'expliquer par la diminution de la capacité fermentaire du microbiote et donc l'augmentation de la rétention d'eau dans le côlon conduisant à une diarrhée osmotique. D'autre part, cela peut s'expliquer par l'éradication par les antibiotiques d'un microbiote « stable » et protecteur au profit de l'établissement de souches sous-dominantes et ayant un potentiel pathogène : *Clostridium difficile* et *Klebsiella oxytoca* par exemple. Dans l'étude de Pop *et al.* (2014), les sujets sains présentaient plus d'échanges de signaux et de métabolites entre les différentes communautés bactériennes (réseaux plus interconnectés) que les sujets atteints de diarrhées (Pop et al. 2014). Dans les deux types de diarrhées, le microbiote intestinal subit des perturbations écologiques (dominance des membres de la communauté change, interactions et réseaux moins denses, etc.). En fonction de l'infection, les perturbations ne sont pas les mêmes mais des dysbioses sont observées et la dynamique des résiliences est différente (Marteau 2017a).

2.2.3.2.2.2 Les problèmes de motricité intestinale

Les fonctions motrices intestinales dépendent de la présence d'un microbiote intestinal. En effet, les animaux axéniques présentent une gastroparésie, c'est-à-dire un ralentissement du transit et une dilatation caecale. L'implantation d'un microbiote rétablit un phénotype proche de la normale avec une vidange gastrique constituée de différentes phases et la production de gaz

et d'AGCC qui modulent la motricité gastrique. Des dysbioses semblent être corrélées aux troubles moteurs intestinaux mais les arguments liant le microbiote intestinal au syndrome de l'intestin irritable (touchant 10 % de la population, il est le plus prévalent) restent pour la plupart indirects (Ducrotté 2017).

2.2.3.2.2.3 La maladie cœliaque

La maladie cœliaque est une maladie inflammatoire intestinale consécutive à l'ingestion de gluten par des patients génétiquement prédisposés. Chez ces patients, une dysbiose est observée avec une abondance de *Firmicutes* et de *Proteobacteria* (Collado et al. 2009; Nistal et al. 2012; Sánchez et al. 2013). Le microbiote intestinal va en fait agir sur la maladie en modulant l'inflammation soit en la favorisant (diminution de l'effet barrière, production de cytokines pro-inflammatoires, activation des cellules immunitaires) ou au contraire en l'inhibant (meilleure digestion du gluten). Il est possible que les facteurs génétiques de prédisposition sélectionnent un certain type de microbiote expliquant ces différences observées (De Palma et al. 2010).

2.2.3.2.2.4 Les maladies chroniques de l'intestin

Les désordres intestinaux inflammatoires les plus connus sont les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies sont multifactorielles et l'un des facteurs est le microbiote intestinal. En effet, dans la plupart des modèles murins, la présence d'un microbiote intestinal est indispensable au développement de ce type de pathologies (Elson et al. 2005). Les dysbioses recensées pour ces maladies sont une instabilité de la composition du microbiote dominant dans le temps, une restriction de la biodiversité des bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes*, une diminution de la richesse microbienne et de la proportion de certains groupes bactériens tels que *Clostridium leptum* et une augmentation de la proportion des bactéries Gram négatives (en particulier des entérobactéries) (Malamut 2017).

Le microbiote intestinal semble donc être impliqué dans les maladies du tractus digestif. Plusieurs études ont essayé de caractériser les dysbioses associées à ces maladies mais elles semblent être dépendantes de la pathologie. De manière générale, nous pouvons toutefois remarquer que les déséquilibres compositionnels impliquent et impactent l'écosystème dans son ensemble. Ceci modifie probablement les interactions et les fonctions qui le caractérisent.

2.2.3.2.3 Les maladies psychiatriques et neurodégénératives

Plusieurs données expérimentales mais peu de données cliniques tendent à montrer un lien entre certains troubles psychiatriques et neuro-dégénératifs et une dysbiose du microbiote intestinal. Chez les souris et les rats axéniques, l'absence de microbiote intestinal tend à intensifier la réactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) (Crumevolle-Arias et al. 2014) impliqué dans de nombreuses maladies psychiatriques. Ce phénomène peut être

corrigé si les animaux sont colonisés à l'adolescence mais pas à l'âge adulte indiquant une importance cruciale de l'établissement correct du microbiote intestinal dès le jeune âge pour la maturation de l'axe HHS. L'implication du microbiote intestinal dans les troubles anxieux et dépressifs est également avérée mais le sens de son impact reste discuté. En effet, certaines études tendent à montrer que le microbiote aggrave ces symptômes (Neufeld et al. 2011; Heijtz et al. 2011), d'autres à les atténuer (Crumevolle-Arias et al. 2014). Ces résultats peuvent s'expliquer par des méthodes différentes utilisées pour mesurer l'anxiété mais aussi par un fond génétique différent des animaux utilisés.

En ce qui concerne les données chez l'Homme, une dysbiose a été mise en évidence chez les personnes souffrant de dépression. Deux études montrent une surreprésentation du genre *Alistipes* (Naseribafrouei et al. 2014; Jiang et al. 2015). La première observe également une sous-représentation des *Lachnospiraceae* (Naseribafrouei et al. 2014) et une surreprésentation des *Bacteroidetes*; la seconde observe une diminution du genre *Feacalibacterium* (Jiang et al. 2015). L'administration de souches probiotiques (*Lactobacillus helveticus* R0052, *Bifidobacterium longum* R0175 et *Lactobacillus casei* Shirota) améliorerait l'auto-perception de l'humeur et du niveau d'anxiété (Messaoudi et al. 2011; Benton et al. 2007). Les mécanismes d'actions restent à définir. De même, les troubles du spectre de l'autisme ont été associés à une dysbiose chez l'enfant sans pour autant trouver un consensus dans les profils observés. Chez l'adulte, une dysbiose associée à une modification des activités métaboliques a également été mise en évidence.

Une première étude analysant le gène de l'ADN ribosomal 16S observe que le microbiote de patients finlandais atteints de la maladie de Parkinson montre une diminution de l'abondance de *Prevotellaceae*. De plus, une abondance des *Enterobacteriaceae* a été corrélée positivement à la sévérité des problèmes d'équilibre et des difficultés de marche des patients (Scheperjans et al. 2015). Une seconde étude utilisant les mêmes techniques d'analyse, réalisée sur des patients américains montre une augmentation de bactéries à potentiel « pro-inflammatoires » (principalement protéobactéries) dans les selles des patients comparés aux témoins (Keshavarzian et al. 2015). La relation entre la maladie d'Alzheimer et le microbiote intestinal repose sur des preuves indirectes, en revanche, le microbiote intestinal semble impliqué dans le développement de la sclérose en plaque (SEP). En effet, les souris axéniques atteintes d'encéphalomyélite auto-immune (modèle pour les SEP) ne développent pas de sclérose en plaque (Lee et al. 2011). Il existe peu de données chez l'Homme mais une étude de Miyake et al. (2015) montre une diminution des groupes IV et XIVa de *Clostridium* chez les patients atteints de SEP (Miyake et al. 2015).

Dans l'ensemble, les preuves sont nombreuses liant le microbiote intestinal au développement de maladies psychiatriques et neurodégénératives mais les mécanismes par lesquels le microbiote influence ces pathologies restent pour la plupart inconnus et il est difficile de déterminer si les dysbioses observées sont la cause ou la conséquence de la pathologie.

2.2.3.2.4 Le syndrome métabolique

La définition du « syndrome métabolique » change au cours du temps et de la zone géographique considérée. Globalement les patients atteints de ce syndrome présentent un surpoids, une hypercholestérolémie accompagnée d'un faible taux de HDL, une hypertension, un taux élevé de triglycérides, une glycémie et une insulïnémie élevées (insulino-résistance). Ces symptômes s'accompagnent d'une augmentation de l'inflammation systémique globale et en particulier dans certains tissus participant au développement de nombreuses maladies telles que l'obésité, le diabète de type 2 (désordres de l'homéostasie du glucose avec intolérance au glucose et insulino-résistance) et les dyslipidémies (désordres de l'homéostasie lipidique) (Everard & Cani 2017).

2.2.3.2.4.1 Lien entre microbiote intestinal et symptômes du syndrome métabolique chez la souris

Une première étude comparant les souris conventionnelles et les souris axéniques soumises à un régime standard montre que ces dernières ont une adiposité réduite concordante avec une dépense énergétique augmentée et ce, malgré une prise alimentaire également augmentée (Bäckhed et al. 2004). Une seconde étude montre que les souris axéniques grossissent moins que les souris conventionnelles en régime hyperlipidique (Rabot et al. 2010). Dans cette étude, les souris axéniques ont de plus, une meilleure sensibilité à l'insuline avec une amélioration de la tolérance au glucose et une insulïnémie réduite par rapport aux souris conventionnelles sous le même régime alimentaire. Ces paramètres s'accompagnent d'un niveau du facteur de nécrose tumorale α (TNF α , cytokine marqueur de l'inflammation) plasmatique inférieur chez les axéniques comparées aux conventionnelles (Rabot et al. 2010). Le traitement à la vancomycine de souris conventionnelles nourries avec un régime riche en lipides diminue le niveau de TNF α dans le plasma et améliore la tolérance au glucose suggérant un rôle causal pour le microbiote intestinal dans le développement de l'insulino-résistance (Murphy et al. 2013). De plus, une autre étude montre que les souris axéniques soumises à un régime riche ou pauvre en lipides, ont une expression iléale du TNF α qui ne diffère pas entre les deux régimes. En revanche, elle est plus élevée chez les souris conventionnelles nourries avec un régime riche en lipides comparée aux souris conventionnelles nourries avec un régime pauvre en lipides (Ding et al. 2010). La combinaison d'un régime riche en lipides et du microbiote intestinal promeut donc l'inflammation au niveau intestinal (Janssen & Kersten 2015; Ding et al. 2010) et plasmatique

(Rabot et al. 2010; Murphy et al. 2013). Ces observations sur les symptômes du syndrome métaboliques montrent que les souris axéniques soumises à ce type de régime sont en fait protégées contre le développement de l'obésité (Bäckhed et al. 2007; Rabot et al. 2010). Cependant, leur conventionnalisation par transfert de microbiote induit une rapide prise de poids et de masse grasse ainsi que le développement d'une insulino-résistance, d'une hypertrophie des adipocytes et d'une augmentation de la glycémie sans changement significatif des apports alimentaires. Le microbiote intestinal semble donc impliqué dans le stockage énergétique (Bäckhed et al. 2004). Plus précisément, pour expliquer l'augmentation de la masse grasse, il a été suggéré que l'angiopoïétine like-4 (Angptl4), inhibiteur circulant des lipoprotéines lipases (LPL) ait un rôle important. En effet, les souris conventionnelles expriment de manière moins abondante le gène *Angptl4* au niveau intestinal que les souris axéniques (Bäckhed et al. 2004). Cette suppression promeut l'activité des LPL qui transfèrent les TG vers les tissus périphériques augmentant ainsi leur stockage (Bäckhed et al. 2004; Velagapudi et al. 2010).

Dans ce contexte, une bactérie, *Akkermansia muciniphila*, semble jouer un rôle protecteur. En effet, parallèlement à la dégradation des mucines constituant le mucus, elle envoie des signaux à l'hôte pour augmenter sa production renforçant la barrière intestinale (Everard et al. 2013). De fait, l'administration de cette bactérie à des animaux conventionnels soumis à un régime hyperlipidique permet de diminuer le gain pondéral, d'améliorer la glycémie et l'insulino-résistance et de diminuer l'inflammation (Org et al. 2015; Everard et al. 2013; Shin et al. 2014). De plus, cette bactérie a été inversement corrélée à des paramètres du syndrome métabolique tels que la glycémie à jeun ou encore la taille des adipocytes chez des souris conventionnelles soumises à un régime riche en lipides (Schneeberger et al. 2015). Chez l'Homme, *A. muciniphila* a été inversement corrélée à des paramètres du syndrome métabolique tels que la glycémie à jeun ou encore la taille des adipocytes chez des patients en surpoids et obèses. Les patients atteints de DT2 et d'obésité dont le microbiote est riche en *A. muciniphila* montrent une meilleure amélioration des paramètres liés au syndrome métabolique suite à un régime pauvre en calories (Dao et al. 2016). Cette bactérie n'a cependant pas pu être reliée de manière causale au déclenchement ou à la protection du syndrome métabolique et des maladies associées (Everard & Cani 2017).

Ces modifications dans le poids, les métabolismes lipidiques et glucidiques ainsi que dans l'inflammation définissent les pathologies telles l'obésité et le DT2.

2.2.3.2.4.2 L'obésité

Les souris génétiquement modifiées (*ob/ob*) par une mutation sur le gène de la leptine ne produisent pas cette hormone impliquée dans la satiété et développent en conséquence, une obésité indépendamment du régime alimentaire. Le microbiote intestinal de ces souris soumises à un régime riche en polysaccharides présente une diminution de *Bacteroidetes* proportionnelle à une augmentation des *Firmicutes* comparé au microbiote de souris sauvages non obèses soumises au même régime alimentaire (Ley et al. 2005). Après ce constat, les auteurs ont cherché à lier ces changements taxonomiques à des modifications dans les capacités métaboliques du microbiote intestinal. Pour cela, ils ont utilisé une approche de métagénomique (méthode abordée dans le paragraphe 2.2.1.2 de ce chapitre). Ils ont montré que les souris obèses (*ob/ob*) avaient plus de gènes impliqués dans l'extraction de l'énergie contenue dans l'alimentation (gènes codant pour des enzymes de dégradation des polysaccharides notamment) que les souris minces. Ces résultats ont été confirmés par des approches biochimiques montrant une augmentation de la production de butyrate et d'acétate (produits de fermentation des polysaccharides, cf § 2.2.1.3 de ce chapitre) dans le caecum des souris obèses comparés au caecum des souris axéniques. Ceci est cohérent avec le niveau d'énergie (kcal/g de fèces) mesuré dans les selles. En effet, celui-ci est supérieur chez les souris minces comparées aux souris obèses supportant l'hypothèse selon laquelle les souris obèses auraient un microbiote capable d'extraire plus d'énergie de l'alimentation. Pour renforcer leurs conclusions, ils ont transféré le microbiote des souris obèses (*ob/ob*) et des souris non obèses chez des souris C57BL/6J axéniques non modifiées génétiquement. Lorsque l'on compare les deux groupes receveurs, celui ayant reçu le microbiote des souris obèses a une augmentation plus importante de la masse grasse malgré une consommation alimentaire similaire. Il y a donc un transfert du phénotype entre souris donneuses et souris receveuses indépendamment du fond génétique. De plus, les différences dans le ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* observées chez les souris donneuses (Ley et al. 2005) ont été retrouvées chez les souris receveuses (Turnbaugh et al. 2006).

Ces études montrent un lien entre la présence du microbiote intestinal et le développement des désordres métaboliques précurseurs de l'obésité chez l'animal. Chez l'humain, la relation de cause à effet est plus complexe à démontrer.

Ridaura *et al.* (2013) ont publié une étude dense sur les liens entre obésité, microbiote et régime alimentaire. Ils ont pris les selles de plusieurs paires de jumelles discordantes pour l'obésité (*ie* l'une des jumelles est obèse, l'autre mince) et les ont transférées chez des souris C57BL/6J axéniques. Ils ont vu une transmission du phénotype obèse/mince ainsi que des paramètres métaboliques associés. Ils ont également observé des différences dans la composition du microbiote avec une surreprésentation des *Bacteroidetes* chez les souris minces

comparées aux souris obèses (Ridaura et al. 2013). Ceci est cohérent avec plusieurs autres études montrant un ratio *Firmicutes/ Bacteroidetes* augmenté chez les patients obèses (Armougom et al. 2009; Santacruz et al. 2010; Furet et al. 2010; Ley et al. 2006). Cependant, d'autres études ne rapportent pas ces différences et parfois trouvent une relation inverse ne permettant pas de conclure quant à la significativité de ces changements (Collado et al. 2009; Jumpertz et al. 2011; Schwartz et al. 2010; Duncan et al. 2008). Ridaura *et al.* (2013) ont également observé des différences dans les activités métaboliques du microbiote intestinal avec une production d'acides aminés branchés diminuée, une production de butyrate et de propionate augmentée et une modification des acides biliaires plus importante (plus d'ABII) chez les souris minces comparées aux souris obèses (Ridaura et al. 2013). Les résultats sur les AGCCs semblent contraires aux données observées chez les humains obèses. En effet, une augmentation des AGCCs totaux et du propionate en particulier a été observé dans les selles de 33 individus obèses (Schwartz et al. 2010).

En fait, le rôle des AGCCs est controversé. Chez la souris conventionnelle, le propionate et le butyrate limitent la prise de poids induite par un régime riche en graisse et diminuent la lipogenèse et la synthèse de cholestérol (Lin et al. 2012). Le mécanisme sous-jacent est l'induction de la néoglucogenèse intestinale (NGGI) par l'activation de l'expression des gènes impliqués dans cette voie métabolique. Alors que le butyrate utilise un mécanisme adénosine monophosphate (AMP) cyclique dépendant dans les entérocytes, le propionate en étant lui-même substrat de la NGGI va produire des molécules de glucose qui vont devenir un signal au niveau de la veine porte activant ensuite des systèmes cérébraux par l'intermédiaire du système nerveux périphérique. Le résultat est un effet positif sur la prise alimentaire (diminution), la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose (De Vadder et al. 2014). Toujours chez la souris, l'acétate quant à lui peut réduire la consommation alimentaire en agissant sur les mécanismes de régulation de l'appétit (Frost et al. 2014). Il a cependant été impliqué dans l'établissement du syndrome métabolique et de l'obésité chez le rat conventionnel en favorisant l'hyperphagie, l'hypertriglycéridémie, les dépôts ectopiques de lipides et l'insulino-résistance dans le foie et les muscles squelettiques (Perry et al. 2016). Chez l'Homme, le propionate diminue l'appétit et la prise alimentaire (Chambers et al. 2015). Les données physiologiques entre animaux et humains sont donc parfois contradictoires, rendant les conclusions difficiles à établir (den Besten et al. 2013).

Ridaura *et al.* (2013) mettent également en place une stratégie intéressante pour essayer de comprendre les échanges de microbiotes par un système de « co-housing ». En effet, après 5 jours de colonisation bactérienne et sous un régime pauvre en matière grasse et riche en polysaccharides issus de plantes, une partie des souris obèses est mise dans la même cage et le même isolateur qu'une partie des souris minces. Les souris obèses élevées avec les souris

minces perdent alors du poids et de la masse grasse et augmentent leur production d'acides gras à chaîne courte. De plus, les auteurs observent une invasion du tractus digestif de ces souris par les *Bacteroidetes* des souris minces. Ils recommencent l'expérience avec l'objectif de montrer l'impact du régime alimentaire sur l'efficacité de la « récupération de phénotype » c'est-à-dire sur la possibilité pour les souris obèses de devenir minces. Pour cela, deux nouveaux groupes de souris axéniques sont gavés avec le même type de selles que les premières. Elles sont soumises à deux régimes alimentaires différents tout au long de l'expérience. Le premier est riche en acides gras saturés et pauvre en fruits et légumes (HiSF-LoVF) et le second est pauvre en acides gras saturés et riche en fruits et légumes (LoSF-HiVF). Ces régimes ont été composés selon une enquête sur la consommation alimentaire des américains réalisée entre 2003 et 2008. La récupération du phénotype observée dans les premiers essais n'est reproductible que dans l'essai en régime LoSF-HiVF. Cette étude montre l'importance de l'interrelation microbiote/hôte/alimentation (Ridaura et al. 2013).

Chez l'Homme, la transplantation fécale est envisagée comme solution thérapeutique. Bien que le protocole précis puisse varier entre les études, le principe reste le même. Les selles du donneur, en bonne santé, sont récoltées et recouvertes d'une solution saline pour maintenir la composition bactérienne et éviter l'exposition à l'oxygène. Après broyage et filtration, cette « infusion » est donnée au patient dont l'intestin a été lavé, par voie duodénale ou orale (Vrieze et al. 2012). Ainsi, six semaines après le transfert de microbiote d'une personne mince en bonne santé chez un patient présentant un syndrome métabolique, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline du patient est concomitante avec une faible augmentation du nombre de bactéries produisant du butyrate et de la diversité bactérienne (Vrieze et al. 2012). En fait, comme expliqué rapidement dans le paragraphe 2.2.1.2, la population en générale peut être séparée en deux groupes ; le premier ayant un faible nombre de gènes comparé au second qui présente un fort nombre de gènes. Le premier groupe montre une prévalence élevée de complications dues au syndrome métabolique (insulino-résistance, dyslipidémie, MCV) et présente un enrichissement en *Proteobacteria* et en *Bacteroidetes* comparé aux individus du second groupe qui eux ont un enrichissement en *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* et *Euryarchaeota*. Ces derniers présentent également un microbiote enrichi en *Faecalibacterium prausnitzii* et une meilleure sensibilité à l'insuline (Cotillard et al. 2013; Le Chatelier et al. 2013).

La sensibilité à l'insuline est un paramètre important dans les maladies métaboliques. Elle constitue une indication sur l'état de santé du patient et l'avancée du syndrome métabolique. En particulier, l'insulino-résistance est un stade où le corps n'est plus sensible à l'insuline produite par le pancréas conduisant à une insulïnémie et une glycémie élevées, précurseurs du diabète de type 2 (DT2).

2.2.3.2.4.3 Le diabète de type 2

L'étude de Pedersen et al. (2016) a relié les métabolites présents (métabolome) dans le sérum humain de personnes atteintes d'insulino-résistance (IR), précurseur du diabète de type 2 à des fonctionnalités particulières du microbiote intestinal. La cohorte comprend les échantillons sériques et fécaux de 277 Danois non-diabétiques et 75 Danois atteints de DT2. Les individus IR ont un enrichissement en gènes bactériens impliqués dans la biosynthèse des acides aminés branchés et un appauvrissement en gènes impliqués dans le transport de ces composés comparés aux microbiotes intestinaux des personnes insulino-sensibles (Pedersen et al. 2016). Il est intéressant de noter ici que ces résultats sont différents de ceux de l'étude de Qin *et al.* (2012) qui montrent au contraire un enrichissement de gènes impliqués dans le transport de ces composés chez les personnes atteintes de DT2 (Qin et al. 2012). Au niveau taxonomique, la biosynthèse des acides aminés branchés est fortement corrélée à l'abondance de *Prevotella copri* et de *Bacteroides vulgatus* chez les individus IR. Cependant, ces deux souches sont anti-corrélées *ie* lorsque l'une est abondante chez un individu, l'autre ne l'est pas. Mais l'abondance de chacune est corrélée positivement à l'IR. L'appauvrissement en gènes de transport des acides aminés branchés est quant à lui corrélé positivement à un appauvrissement du microbiote intestinal des individus IR en *Eubacterium siraeum* et *Butyrivibrio crossotus*. Le bilan final est une augmentation du pool d'acides aminés branchés au niveau intestinal corrélée à la présence de ces composés dans le sérum des individus IR (Pedersen et al. 2016). Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Ridaura *et al.* (2013) présentée dans le paragraphe 2.2.3.2.4.1 sur l'obésité. En effet, elle montre une augmentation des acides aminés branchés dans le sérum des souris ayant reçu le microbiote intestinal d'individus obèses et une augmentation des gènes impliqués dans la dégradation de ces composés dans le microbiote intestinal des souris ayant reçu le microbiote intestinal d'individus minces (Ridaura et al. 2013). Pour vérifier l'impact de *P. copri* sur le métabolome sérique de l'hôte, Pedersen *et al.* (2016) réalisent une expérience chez la souris conventionnelle en régime hyperlipidique. Ils gavent les souris deux fois par semaine avec la bactérie *P. copri*. Au bout de deux semaines, ces souris présentent une aggravation de l'intolérance au glucose et une augmentation des acides aminés branchés sériques comparées aux souris élevées dans les mêmes conditions mais avec un gavage contrôle (1 % glycérol dans un tampon PBS). De plus, au bout de trois semaines de gavage, les souris ont une diminution de la sensibilité à l'insuline. Cette étude montre qu'une dysbiose du microbiote intestinal peut impacter le métabolome sérique de l'hôte et dans ce cas particulier, contribuer à l'IR et au développement du DT2.

En fait, des dysbioses compositionnelles et fonctionnelles du microbiote intestinal ont été mises en relation avec les maladies métaboliques et le DT2 chez l'Homme (Cani et al. 2007; Bäckhed et al. 2004; Turnbaugh et al. 2008). D'une part, il semblerait que la diminution de la

diversité du microbiote intestinal favorise les désordres métaboliques et le développement du DT2 (Everard & Cani 2017). Une autre étude a montré une diminution de la richesse en gènes dans le microbiote de personnes atteintes de DT2 comparées à des individus contrôles non diabétiques mais aussi comparées à des individus atteints de diabète de type 1 (Forslund et al. 2015). En fait, cette étude compare les selles de différentes populations (Danemark, Suède et Chine) dont 199 patients atteints de DT2 et 554 personnes non diabétiques. Les genres bactériens producteurs d'AGCCs sont diminués chez les personnes atteintes de DT2 notamment *Roseburia*, *Subdoligranulum* et un cluster de *Clostridiales* spp (Forslund et al. 2015). Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Qin *et al.* (2012) comparant les selles de 145 individus dont 71 atteints de DT2 (Qin et al. 2012) et celle de Karlsson *et al.* (2014) comparant 145 femmes âgées de 70 ans dont 53 atteintes de DT2 (Karlsson et al. 2012). Cependant, Qin *et al.* (2012) observent un enrichissement en *Clostridium* du microbiote intestinal des patients alors que Karlsson *et al.* (2012) observent plutôt un enrichissement en *Lactobacilli* dans leur population de personnes atteintes de DT2 (Qin et al. 2012; Karlsson et al. 2013).

En plus de ces analyses compositionnelles, les études de Qin *et al.* (2012) et Forslund *et al.* (2015) ont analysé les différences fonctionnelles entre les microbiotes des personnes saines et celles atteintes de DT2 (métagénomique quantitative). La première étude montre un nombre de gènes impliqués dans le transport des acides aminés branchés et des sucres, dans le métabolisme des xénobiotiques et des glucides, augmenté chez les patients. Ceux-ci présentent également une augmentation des enzymes réductrices de sulfate en relation avec l'augmentation des bactéries réduisant ce composé. En revanche, le nombre des gènes impliqués dans la motilité cellulaire, la synthèse du butyrate (cohérent avec la taxonomie), le métabolisme des cofacteurs et des vitamines est diminué (Qin et al. 2012). La seconde étude montre une augmentation des catalases, des modules fonctionnels impliqués dans la dégradation du ribose, de la glycine et des acides aminés dont le tryptophane chez les patients atteints de DT2. Ces observations sont concomitantes avec une diminution des fonctions de dégradation de l'arginine, la thréonine et des capacités de pyruvate synthase (Forslund et al. 2015).

De manière intéressante, l'étude de Forslund *et al.* (2015) compare également les microbiotes intestinaux et ses fonctions chez les personnes diabétiques (DT2) sous traitement à la metformine (n=93) ou non (n=106). Ce médicament est l'un des plus utilisés dans le traitement du diabète, il inhibe la synthèse de glucose dans le foie mais au moins 30 % des patients se plaignent d'effets négatifs comme des diarrhées, nausées et ballonnements. D'après cette étude, ce médicament augmente le potentiel de production des AGCCs chez les patients traités mais aussi l'abondance de *Escherichia* spp. (sauf dans la population chinoise). En revanche, il diminue l'abondance de *Intestinibacter* dans toutes les populations testées. Cette

étude montre que la pathologie du DT2 mais aussi le traitement à la metformine ont des signatures différentes au niveau du microbiote intestinal (Forslund et al. 2015).

2.2.3.2.5 Les maladies hépatiques

2.2.3.2.5.1 Les maladies hépatiques métaboliques

Les stéatopathies métaboliques ou maladies du foie non alcoolique (NAFLD) regroupent les lésions hépatiques observées au cours du surpoids et de l'obésité. Ces lésions sont la source de maladies hépatiques plus graves comme la stéatohépatite non alcoolique (NASH) conduisant souvent à une fibrose puis à la cirrhose et enfin au carcinome hépatocellulaire (CHC) (Kleiner et al. 2005). Le premier stade, la stéatose, est une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes ; l'hépatite se déclenche lorsque des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles et lymphocytes) s'infiltrent dans le tissu. L'altération de la barrière intestinale est une étape précoce au développement des maladies hépatiques (Szabo 2015). En effet, la perméabilité de cette barrière permet la translocation de composés pro-inflammatoires comme les LPS mais aussi de bactéries entières (Seki & Schnabl 2012). Les NAFLD touchent 30 % de la population non obèse et jusqu'à 75 % des sujets obèses et 20 % développeront une NASH puis potentiellement une cirrhose et un CHC (Cassard et al. 2017).

Les patients atteints de NAFLD et de NASH ont une perméabilité intestinale augmentée (Miele et al. 2009). Le lien de cause à effet entre le microbiote intestinal et les NAFLD a été démontré chez la souris par l'équipe Amipem dans l'étude de Le Roy *et al.* (2013). Deux souris soumises à un régime hyperlipidique présentant des gains de poids similaires ont été choisies comme donneuses de microbiote intestinal. L'une d'elle présente une hyperglycémie et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires plasmatiques et est appelée « répondeuse » ; l'autre présente une glycémie normale et un niveau d'inflammation plus faible que la première et est appelée « non-répondeuse ». Le transfert de microbiote de ces deux souris chez des souris axéniques montre un transfert de phénotype. Les souris recevant le microbiote de la souris « répondeuse » sont de plus, plus enclines à développer une stéatose hépatique. Cette étude montre une présence plus accrue de la souche *Bacteroides vulgatus* chez les souris « non-répondeuses » comparées aux souris « répondeuses » qui elles présentent une abondance de la souche *Barnesiella intestinihominis* (Le Roy et al. 2013). Des dysbioses ont été observées mettant en évidence une proportion plus faible de *Ruminococcaceae* chez les patients atteints de NAFLD ou de NASH et une augmentation des *Enterobacteriaceae*, productrices d'éthanol chez les adolescents obèses ayant une NASH (Zhu et al. 2013). Chez les patients atteints de NASH, une augmentation de *C. coccoides* par rapport à des sujets sains a également été observée (Mouzaki et al. 2013).

2.2.3.2.5.2 Les maladies hépatiques alcooliques

Chez l'Homme, tout comme pour les NAFLD et les NASH, une perméabilité intestinale accrue a été observée chez les patients atteints de stéatohépatite alcoolique (ASH) (Miele et al. 2009; Rao 2009). Le microbiote de patients atteints de cirrhose alcoolique comparé à celui d'individus sains montre de plus une augmentation des *Fusobacteria* (Chen et al. 2011). La consommation d'alcool induit en fait une prolifération bactérienne intestinale (Pande et al. 2009). Elle est également associée à des dysbioses et notamment à une diminution de la diversité bactérienne, une surreprésentation de *Proteobacteria* et de *Enterobacteriaceae* et une sous-représentation des *Bacteroidetes* chez des personnes consommant de l'alcool avec stéatohépatite ou non comparées à des personnes saines (Mutlu et al. 2012). En particulier, un lien entre la composition du microbiote intestinal et la sévérité des lésions hépatiques chez des patients alcooliques a été mis en évidence dans l'étude de Llopis *et al.* (2016). Le microbiote intestinal associé aux hépatites alcooliques aiguës sévères (sASH) est différent en terme de composition comparé à celui des patients alcooliques sans hépatite (noASH) malgré des consommations d'alcool similaires. Les patients atteints de sASH ont une surreprésentation des bifidobactéries, streptocoques et entérobactéries comparés aux patients noASH. La transplantation de ces microbiotes complexes à des souris axéniques aboutit à un transfert du degré de susceptibilité à développer des maladies hépatiques sous régime alcoolique (3 % d'éthanol). Chez les souris transplantées avec le microbiote sASH, l'inflammation du foie est associée à une inflammation généralisée. De plus ces souris présentent une diminution de la production de mucus corrélée à une plus forte inflammation intestinale et à une augmentation de la translocation de bactéries. En comparant leur abondance chez les souris noASH et sASH, les auteurs font l'hypothèse d'un rôle délétère de l'espèce *Bilophila wadsworthia* et de certaines souches de *Clostridium* du cluster XIVa (surreprésentées chez les souris sASH) et au contraire un effet protecteur pour *Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii* (surreprésentées chez les souris noASH) (Llopis et al. 2016). Les perturbations du microbiote entraînent des modifications dans les métabolites que celui-ci produit. L'étude de Llopis *et al.* (2016) montre une modification des dérivés d'acides biliaires avec des taux plus élevés d'acide chénodésoxycholique (ABI) et d'acide urso-désoxycholique (ABII) dans les selles des souris noAH comparées aux souris sAH (Llopis et al. 2016). Le rôle des ABII a également été mis en évidence dans le cas de la cirrhose où les chercheurs observent que l'importance de leur diminution est corrélée à la gravité de la cirrhose mais les mécanismes liant les deux restent inconnus (Kakiyama et al. 2013; Ridlon et al. 2013). L'acétaldéhyde est un autre exemple de métabolite de l'éthanol issu du microbiote intestinal qui serait responsable de l'altération de la barrière intestinale (Ferrier et al. 2006) mettant à disposition des composés pro-inflammatoires, notamment les LPS (Cassard et al. 2017).

2.2.3.2.6 Cancer colorectal, allergies et autres exemples de maladies

Le microbiote intestinal en plus d'être lié à toutes les maladies pré-citées est également relié à d'autres pathologies et notamment le cancer colorectal (CCR), les allergies, les arthrites et rhumatismes et les problèmes de peau (psoriasis et acné).

2.2.3.2.6.1 Le cancer colorectal

Les dysbioses liées au CCR sont de diverses natures. Une diminution de la stabilité dans le temps et une augmentation de la diversité bactérienne ont été observées chez les patients atteints de CCR (Scanlan et al. 2008). Le microbiote est également altéré dans sa composition puisqu'une surreprésentation des *Bacteroidetes* est observée (Sobhani et al. 2011; Zeller et al. 2014). De plus Zeller *et al.* (2014) montrent que le microbiote de patients atteints de CCR présente une diminution de la représentation de certaines espèces de *Prevotella* ou de bifidobactéries concomitante avec une augmentation d'espèces pro-inflammatoires (Zeller et al. 2014). Plus particulièrement, certaines espèces bactériennes ont été corrélées au développement du CCR : *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* et *Bacteroides fragilis* (Marchesi et al. 2016). En particulier, la bactérie adhérente à la muqueuse *Fusobacterium nucleatum* est particulièrement présente au niveau des lésions dues au CCR (Han et al. 2000).

2.2.3.2.6.2 Les allergies

De plus en plus d'études montrent des modifications du microbiote intestinal chez les personnes allergiques. Cependant ces dysbioses ne sont pas concordantes en fonction des études (méthodes d'analyses du microbiote et nombres de sujets dans les études différents). Un rôle précurseur du microbiote a également été envisagé en observant des désordres dans le microbiote intestinal avant l'apparition de l'allergie (études prospectives). De la même manière que pour les allergies déclarées, les associations bactéries-allergies ne sont pas consensuelles entre les études (Waligora-Dupriet & Chatel 2017). Cependant, un rôle important de la diversité du microbiote a été mis en évidence. Le risque de sensibilisation et d'allergie cutanée ainsi que les allergies alimentaires et respiratoires ont été associés à une faible diversité du microbiote intestinal durant les premières semaines de vie du nourrisson (Azad et al. 2015; Wang et al. 2008; Bisgaard et al. 2011; Abrahamsson et al. 2014).

2.2.3.2.6.3 Les arthrites et rhumatismes

Les spondylo-arthropathies (SpA) et les polyarthrites rhumatoïdes (PR) sont des maladies multifactorielles influencées par la génétique de l'hôte, le mode de vie, l'environnement mais aussi le microbiote intestinal. Plus précisément, chez l'humain, les SpA sont en partie dépendantes d'une mutation sur le gène HLA-B27. Des rats ayant la même mutation ne développent une SpA qu'en présence d'un microbiote intestinal en statut SPF (Rath et al. 1996), les rats axéniques possédant cette mutation n'ont pas d'arthrite (Taurog et al. 1994). De même,

des souris génétiquement modifiées (récepteur à l'IL-10 KO et modèle K/BXN spécialement développé pour l'étude de ces pathologies) pour être sensibles au développement de l'arthrite ne sont pas malades en condition axénique mais le deviennent en présence d'un microbiote intestinal (Wu et al. 2010; Abdollahi-Roodsaz et al. 2008). Malgré l'observation d'une augmentation des bactéries réduisant le sulfate chez 15 patients atteints de SpA comparés à 15 individus sains (Stebbing et al. 2002), il est difficile de relier une dysbiose particulière aux SpA. Plusieurs études ont révélé des résultats contradictoires notamment sur l'abondance relative de *Klebsellia* et de *Bacteroides vulgatus* entre patients et individus sains (Yeoh et al. 2013). En ce qui concerne les PR, il n'est pas non plus évident de mettre en évidence des dysbioses (Taneja 2014). Cependant, une première étude montre une forte corrélation entre la présence de *Prevotella copri* dans le microbiote et la maladie. De plus une surabondance de *Prevotella* est couplée à une diminution des *Bacteroides* chez les patients (n=44) (Scher et al. 2013). Plus récemment, des dysbioses du microbiote oral et intestinal ont été mises en évidence dans les PR. Il semblerait que le microbiote intestinal des patients atteints de PR (n=77) ait une sous-représentation de *Haemophilus* spp. et au contraire, une surreprésentation de *Lactobacillus salivarius* comparées aux personnes saines (n=80). D'un point de vue fonctionnel, le microbiote des patients a une altération de l'environnement oxydo-réductif avec des modifications dans le transport et le métabolisme du fer, soufre, zinc et arginine (Xuan Zhang et al. 2015).

2.2.3.2.6.4 Les problèmes de peau

Les problèmes dermatologiques ne sont pas seulement liés au microbiote de la peau mais également au microbiote intestinal. En effet, les personnes souffrantes d'un psoriasis ont une restriction de la diversité bactérienne et une diminution de *Coprococcus*. Lorsque le psoriasis s'accompagne d'une arthrite, d'autres caractéristiques viennent compléter les premières : une diminution de l'abondance de *Ruminococcus* et de *A. muciniphila* (Scher et al. 2015). Le développement de l'acné est de plus en plus vu comme multifactoriel et non seulement comme une manifestation dermatologique du stress ou d'une poussée hormonale. Dans ce sens, l'hypothèse de l'existence d'un « axe intestin-cerveau-peau » est de plus en plus soutenue. Les modèles animaux montrent une modulation de la repousse des poils grâce à l'administration de lactobacilles chez des souris soumises à un stress (Arck et al. 2010). Les sujets humains souffrant d'acné ont un taux de LPS sanguin élevé et une réactivité accrue à ces composés couplés à une augmentation de la fréquence des désordres psychologiques (Marteau 2017b).

2.2.3.2.7 Les maladies cardio-vasculaires

Comme indiqué dans l'introduction générale, les MCV touchent environ 200 millions de personnes dans le monde (Leeder et al. 2004). Elles ont également un poids socio-économique important coûtant presque 200 milliards d'euros à l'Union Européenne (Nichols et al. 2012) et

plus de 400 milliards de dollars aux Etats-Unis en 2009 (Lloyd-Jones et al. 2010). Elles sont le résultat symptomatique du développement sous-jacent de l'athérosclérose. Ce phénomène est dû à l'accumulation de composés et notamment de LDL chargées de cholestérol dans la paroi de l'artère. Ceci engendre une cascade de réactions inflammatoires qui vont initier la mise en place d'un cercle vicieux entre inflammation (macrophages au niveau de la paroi artérielle notamment) et accumulation lipidique jusqu'à l'établissement d'une plaque d'athérome plus ou moins stable. Les mécanismes initiateurs de la rupture de cet équilibre et responsables de l'expression symptomatique des MCV ne sont pas connus. Une fois encore, la comparaison des animaux axéniques aux animaux conventionnels apportent des indications sur le rôle du microbiote intestinal dans ces maladies.

Les souris génétiquement modifiées par une déficience en apolipoprotéine E (ApoE KO) sont plus sensibles au développement de l'athérosclérose que les souris sauvages. Ces modèles animaux permettent d'augmenter le phénotype de la pathologie afin de mieux l'étudier. Des souris axéniques ApoE KO ont des lésions athéromateuses moins étendues que ces mêmes souris conventionnelles. Ces observations sont corrélées avec une diminution des LPS plasmatiques et des cytokines pro-inflammatoires au niveau de l'aorte et des macrophages (Kasahara et al. 2017). D'autres études ont analysé l'impact des dérivés de produits d'origine animale (viande, poissons, œufs et produits laitiers) sur le développement de l'athérosclérose. Dans un premier temps Wang *et al.* (2011) montrent que la choline et l'oxyde de triméthylamine (TMAO), deux composés dérivés de la phosphatidylcholine alimentaire, induisent des dépôts athérosclérotiques dans l'aorte de souris C57BL/6J ApoE KO conventionnelles. De plus, la taille de ces plaques est positivement corrélée au niveau de TMAO plasmatique. Lorsque les souris sont traitées aux antibiotiques, la choline alimentaire n'induit pas d'athérosclérose (Wang et al. 2011). Dans un second temps, Koeth *et al.* (2013) font les mêmes observations avec la carnitine (liée au développement de l'athérosclérose seulement en présence d'un microbiote intestinal). De plus, le traitement aux antibiotiques abolit la présence de TMAO dans le plasma (Koeth et al. 2013). Ces études montrent que la présence d'un microbiote intestinal est nécessaire au développement de l'athérosclérose. De plus, l'effet des dérivés des produits animaux (choline, phosphatidylcholine et carnitine) est médié par le microbiote intestinal qui joue un rôle dans la formation du TMAO. En fait, le microbiote utilise ces dérivés pour produire la triméthylamine qui est ensuite transporté jusqu'au foie où il est oxydé en TMAO (Wang et al. 2011; Tang & Hazen 2014). Les mécanismes d'actions du TMAO ne sont pas encore très clairs mais il semblerait que la choline *via* sa transformation en TMAO induise une accumulation du cholestérol dans les macrophages qui viennent alors s'accumuler au niveau de la paroi artérielle initiant l'athérosclérose (Wang et al. 2011). De plus, une autre analyse montre que le TMAO

inhibe l'efflux de cholestérol des organes vers le foie et la synthèse des acides biliaires au niveau du foie (Koeth et al. 2013).

Dans tous les modèles génétiques de souris, la concentration plasmatique en TMAO est proportionnelle à la taille des plaques d'athérome dans l'aorte. Cependant, certaines lignées sont plus sensibles que d'autres au développement de l'athérosclérose (Gregory et al. 2015). Gregory *et al.* (2015) ont sélectionné les phénotypes extrêmes : les NZW/LacJ (lignée la moins susceptible) et C57BL/6J (lignée la plus susceptible). Ils ont ensuite prélevé les microbiotes intestinaux de ces souris pour inoculer des souris C57BL/6J ApoE KO traitées aux antibiotiques. Les auteurs soumettent les souris receveuses à deux types de régime : un pauvre (« chow ») et un riche (1,06 %) en choline. Les souris receveuses du microbiote des souris C57BL/6J développent une athérosclérose dépendante de la présence de choline dans le régime alimentaire. Ces souris ont également une quantité de TMAO plasmatique positivement corrélée à l'aire des plaques athéromateuses. La susceptibilité à développer de l'athérosclérose peut donc se transmettre par transfert de microbiote. Une analyse des microbiotes des deux groupes de souris donneuses et des quatre groupes de souris receveuses montrent que les microbiotes individuels sont plus dépendants de l'origine du microbiote que du régime alimentaire. Les auteurs identifient dix taxons représentatifs des souris donneuses, quatre chez les C57BL/6J et six chez les NZW/LacJ. Parmi ces dix taxons, le taxon *Allobaculum* est plus important chez les souris donneuses et receveuses d'un microbiote « pro-athérogénique », alors que c'est le taxon *Bacteroides* chez les autres microbiotes. Les *Prevotella* sont corrélés positivement au taux de TMAO plasmatique dans tous les groupes étudiés et à l'athérosclérose seulement dans le groupe de souris receveuses « pro-athérogéniques » avec un régime riche en choline. Finalement, les microbiotes sont très spécifiques des individus et il est difficile de trouver des genres ou taxons corrélés positivement ou négativement avec le TMAO plasmatique et l'athérosclérose (Gregory et al. 2015). Cette étude montre à quel point la susceptibilité à l'athérosclérose est une interaction dynamique entre la génétique de l'hôte, l'environnement et le microbiote intestinal.

Chez l'Homme, les taux plasmatiques de choline, TMAO et bétaine (également dérivé de la phosphatidylcholine) sont corrélés aux MCV (Wang et al. 2011). De plus, les personnes ayant une MCV ont une concentration moyenne de TMAO sanguin supérieure aux contrôles sains (Tang et al. 2013). Les individus omnivores (n=30) possèdent une concentration plasmatique en TMAO supérieure à celle des individus végétariens (végétaliens avec un mode de vie respectueux des animaux) et végétariens (n=23). De plus, lorsque ces deux dernières populations reçoivent un challenge en L-carnitine, leur taux de TMAO plasmatique n'augmente pas. Les individus ayant une forte concentration de TMAO plasmatique (omnivores) ont des microbiotes intestinaux dominés par l'entérotipe *Prevotella* alors que ceux ayant une concentration en TMAO plus faible (végétariens/végétaliens) ont une dominance de l'entérotipe *Bacteroides*. De plus, les concentrations

plasmatiques en TMAO des deux populations sont corrélées positivement à une augmentation des taxons *Peptostreptococcaceae*, *Clostridiaceae* et *Clostridium* et négativement au taxon *Lachnospiraceae* (Koeth et al. 2013). Une différence de régime alimentaire peut donc en partie expliquer les différences de TMAO plasmatiques entre individus omnivores et végétariens/végétariens. Par l'absence de consommation de produits dérivés animaux, les végétariens/végétariens modifient la quantité de substrat (choline, carnitine, etc.) disponible à la transformation en TMAO. Cette différence de TMAO plasmatique est médiée par une modification du microbiote intestinal qui tend à une adaptation aux régimes alimentaires.

La production de TMAO par le microbiote intestinal est corrélée à certaines signatures compositionnelles du microbiote intestinal. Mais le microbiote n'agit pas seulement sur l'athérosclérose par la production de composés ; il peut également agir directement. En effet, plusieurs études montrent la présence d'ADN bactérien dans les plaques d'athérome (Ott et al. 2006 ; Karlsson et al. 2012 ; Koren et al. 2011). Il correspond à plus de 50 genres et espèces différents, et en particulier *Staphylococcus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et *Streptococcus* qui sont couramment retrouvés dans les microbiotes buccal et intestinal suggérant une transmission entre ces deux sites (Ott et al. 2006 ; Arora & Bäckhed 2016). Karlsson *et al.* (2012) montrent des différences de composition des microbiotes intestinaux entre des patients atteints d'athérosclérose symptomatique (plaque d'athérome dans l'artère carotidienne ayant conduit à un accident cérébro-vasculaire) et des contrôles sains (sans accident cardio-vasculaire). Les patients présentent une surreprésentation du genre *Collinsella* par rapport aux contrôles alors que ceux-ci présentent une surreprésentation en *Roseburia*, *Eubacterium* et trois espèces de *Bacteroides*. En plus des différences de compositions, les auteurs trouvent également des différences de fonctions avec plus de gènes impliqués dans la synthèse des peptidoglycanes chez les patients comparés aux individus sains (Karlsson et al. 2012). Emoto *et al.* (2016) observent dans le microbiote fécal d'une cohorte de 39 patients atteints de maladies des artères coronaires (CAD) une augmentation des *Lactobacillales* et une diminution des *Bacteroidetes*. Ces caractéristiques s'accompagnent d'une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Tous ces paramètres sont corrélés aux CAD indépendamment des autres facteurs comme le tabac, le DT2, les dyslipidémies et l'hypertension. En revanche, les médicaments semblent être un facteur confondant constituant la limite de cette étude et restreignant les auteurs quant à la solidité du lien entre microbiote et CAD (Emoto et al. 2016).

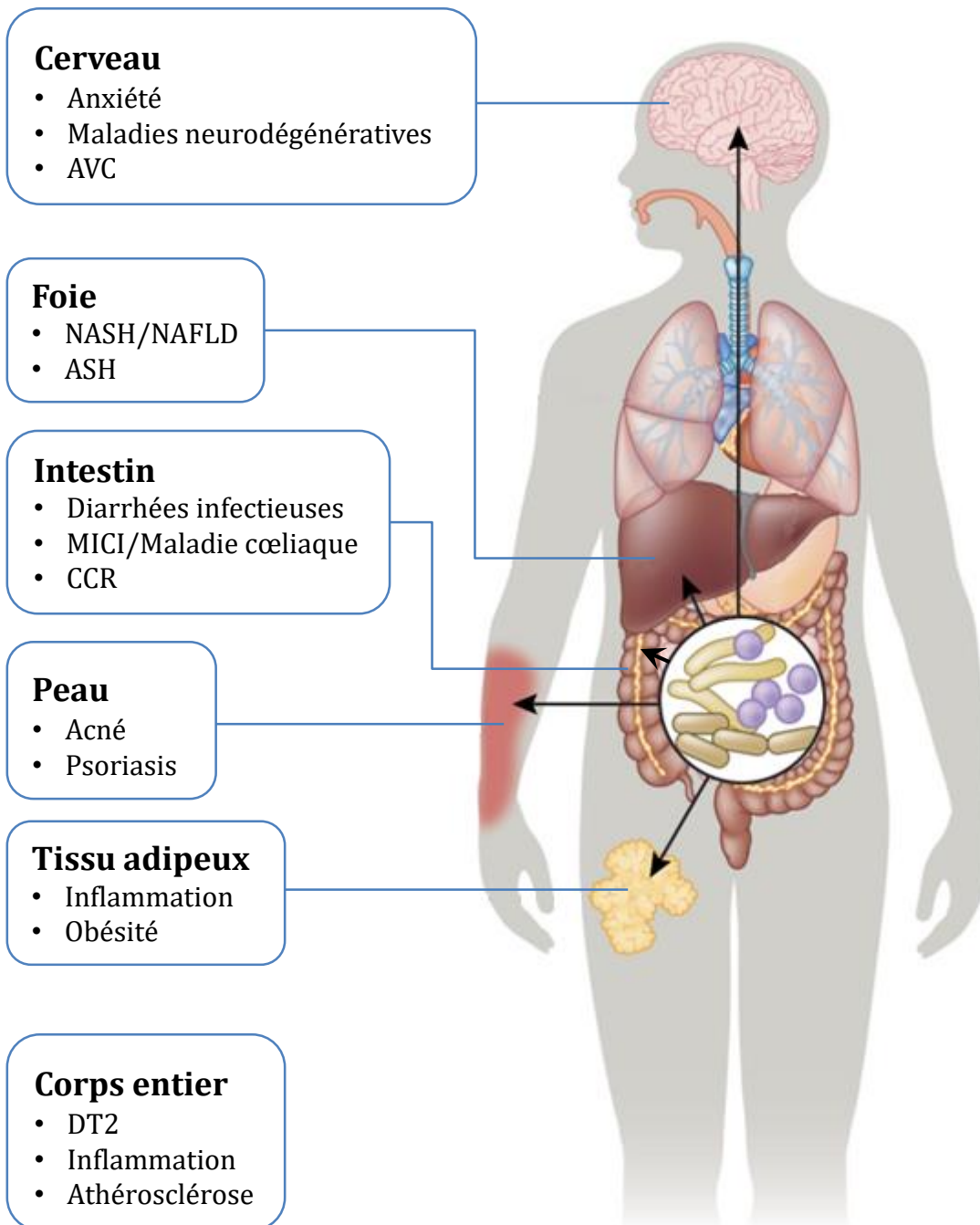


Figure 9 : Pathologies pour lesquelles une implication du microbiote intestinal est envisagée.
Illustration d'après Schroeder & Bäckhed (2016)

Les dysbioses du microbiote intestinal impliquées dans ces exemples de pathologies sont difficiles à décrire précisément et de manière unanime. De plus, dans beaucoup de cas, une fragilité de la barrière intestinale est mise en cause, laissant passer plus de composés pro-inflammatoires et parfois des bactéries entières qui vont promouvoir l'inflammation impliquée dans de nombreuses maladies. Même s'il est difficile d'identifier clairement des modifications dans les phyla/genres bactériens couplés à des pathologies ; souvent, une diminution de la diversité du microbiote est observée. Enfin, les modifications compositionnelles sont toujours couplées à des modifications fonctionnelles impactant le métabolisme de l'hôte.

Le microbiote communique avec l'hôte à la manière d'un organe. Les études récentes ne sont que le commencement de la compréhension de ce dialogue. Le microbiote est lié à la physiologie de l'hôte de diverses manières. Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons à son rôle sur la cholestérolémie de l'hôte.

2.3 Activités du microbiote intestinal ayant un impact sur la cholestérolémie de l'hôte

Dans cette troisième et dernière partie de la revue bibliographique, nous allons aborder le cœur du sujet. Dans un premier temps, nous présenterons les preuves d'un lien entre la cholestérolémie de l'hôte et le microbiote intestinal. Puis, nous présenterons les différents mécanismes connus pour expliquer ce lien. Enfin nous mettrons l'accent sur la transformation du cholestérol en coprostanol par certaines bactéries du microbiote intestinal.

2.3.1 Mise en évidence du lien entre le microbiote intestinal et la cholestérolémie

Les premières expériences sur les animaux axéniques ont montré un métabolisme du cholestérol différent comparé à celui des animaux conventionnels. Dans les années 70, Wostmann a observé que les rats axéniques présentent une meilleure absorption du cholestérol de 25 % environ par rapport aux animaux conventionnels (Wostmann 1973). De plus, Eyssen et Parmentier (1974) constatent une augmentation de la concentration du cholestérol dans le sérum de 11 % sous régime riche en cholestérol (1 %) pour les rats axéniques comparés aux conventionnels (Eyssen & Parmentier 1974). Kellogg fait la même observation sur les concentrations de cholestérol sérique avec des rats axéniques et conventionnels sous régimes contenant soit 20 % d'huile de carthame ou 20 % d'huile de coco. Indépendamment des régimes, les rats axéniques présentent un taux de cholestérol plus élevé dans le sérum (environ 20 % de plus) (Kellogg 1974). Par ailleurs, toutes ces études montrent une augmentation de l'accumulation de cholestérol dans le foie de 18 % (Eyssen & Parmentier 1974) à deux et trois fois plus (Kellogg 1974; Wostmann 1973) chez les animaux axéniques comparés aux animaux conventionnels.

L'accumulation de cholestérol dans le foie peut être due à différents facteurs comme une forte activité de synthèse, une forte absorption intestinale, une diminution de l'élimination du cholestérol par incorporation dans la bile. Cependant, une étude mesurant l'activité de l'enzyme HMGCoAR a montré qu'elle était 40 % moins active chez les rats axéniques que chez les rats conventionnels (Einarsson et al. 1977). De plus, la physiologie des animaux axéniques en

favorisant la réabsorption des AB (tableau 1) permettrait également une meilleure absorption du cholestérol par la formation de micelles. (Wostmann 1981). Seul ce critère a été comparé dans l'étude de Wostmann et ni l'activité de l'enzyme HMGCoAR ni l'absorption du cholestérol ou des AB n'ont été mesurées dans les études de Kellogg (1974) et Eyssen et Parmentier (1974). L'augmentation du cholestérol plasmatique dans cette dernière étude peut être due à une plus forte sensibilité des rats axéniques au cholestérol exogène, provenant de l'alimentation et donc à la meilleure absorption intestinale.

En ce qui concerne les souris, une étude récente montre que sous régime riche en lipides, les souris C57BL/6J axéniques ont une cholestérolémie plus faible, une augmentation du cholestérol fécal, et une accumulation de cholestérol hépatique modérée en comparaison à des souris conventionnelles (Rabot et al. 2010).

En conclusion, même si les données ne convergent pas toujours en fonction du modèle animal, ces études montrent que le microbiote intestinal a bien un impact sur la cholestérolémie. En fait, il existe au moins deux mécanismes par lesquels les bactéries du microbiote intestinal sont susceptibles d'avoir une influence sur le taux de cholestérol sanguin : l'action sur les acides biliaires et la transformation du cholestérol en coprostanol.

2.3.2 La transformation des acides biliaires

Nous allons d'abord présenter un aperçu des actions du microbiote intestinal sur les acides biliaires en mettant en exergue les hydrolases d'acides biliaires car ce sont celles qui ont le plus d'effet sur la cholestérolémie.

2.3.2.1 Les hydrolases d'acides biliaires

Les acides biliaires servent à la solubilisation du cholestérol et des molécules lipidiques dans l'intestin grêle permettant leur meilleure absorption (Hofmann & Eckmann 2006). Une partie de ces acides biliaires atteint la région du côlon où les bactéries présentes vont pouvoir les modifier pour former les AB déconjugés et les ABII (cf 2.1.2.4 de ce chapitre).

Les hydrolases d'acides biliaires (BSH) catalysent l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine et/ou la taurine formant des résidus d'acides aminés et des acides biliaires déconjugés (figure 10). La plupart des BSH hydrolysent les deux types d'acides biliaires conjugués alors que certaines montrent une forte spécificité. Cette activité a été détectée au départ chez les genres *Bifidobacterium* sp. et *Lactobacillus* sp. mais des analyses de métagénomique sur les bactéries du microbiote intestinal ont montré que cette capacité était largement partagée au sein des divisions bactériennes et archées (Jones et al. 2008). Plusieurs pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (Begley et al. 2006) et *Brucella abortus* (Delpino et al.

2007) possèdent également des BSH. En fait, la déconjugaison des AB faciliterait la colonisation du tractus gastro-intestinal par les bactéries en leur fournissant un environnement moins toxique pour elles (Jones et al. 2008). De plus, les bactéries peuvent également se servir des AB comme source de carbone, azote et même soufre (Gérard 2014).

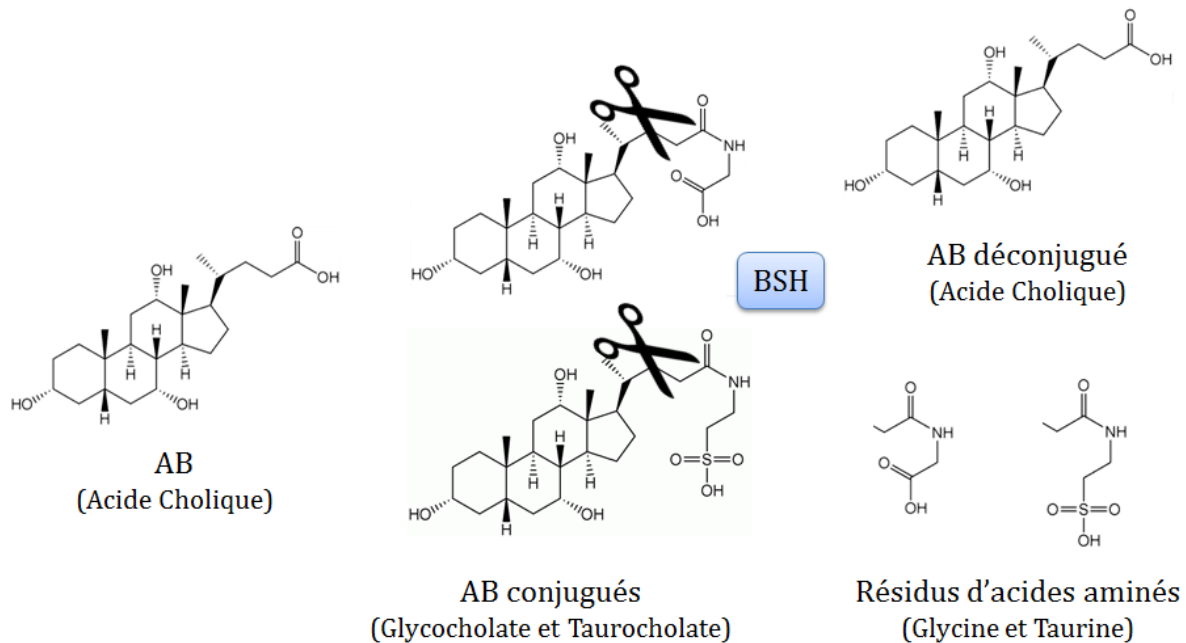


Figure 10 : Activité BSH sur les acides biliaires (AB)

L'exemple est pris sur l'acide cholique, l'AB le plus abondant avec l'acide chénodésoxycholique (De Aguiar Vallim et al. 2013).

Les BSH séparent les ABs et les résidus d'acides aminés. En fait, elles permettent un retour des ABs à leur état initial, avant conjugaison et plus hydrophobes. Il existe d'autres réactions sur les AB qui sont présentées ci-après.

2.3.2.2 Les autres activités sur les acides biliaires

Il existe d'autres activités portées par le microbiote intestinal : i) l'oxydation et l'épimérisation des groupes hydroxyles (-OH) des carbones C3, C7 et C12 du noyau stéroïde, ii) la 7-déhydroxylation et iii) l'estérification et la désulfatation.

Les déshydrogénases d'hydroxystéroïdes (HSDHs) réalisent l'oxydation réversible des groupes hydroxyles (-OH) en groupes oxo (=O). Cette réaction se fait en deux étapes : d'abord l'épimérisation puis l'oxydation (Ridlon et al. 2006). Les enzymes capables de réaliser cette transformation sur le carbone 3 du noyau stéroïde (3-HSDHs) ont été détectées dans plusieurs bactéries du microbiote intestinal appartenant au phylum des Firmicutes mais aussi *Peptostreptococcus productus*, *Clostridium perfringens* et *Eggerthella lenta* (Gérard 2014). Les HSDHs capables d'oxyder les groupements hydroxyles en position C7 (7-HSDHs) ont été détectée dans plusieurs membres des genres *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia*

et *Ruminococcus* (Lepercq et al., 2004a ; Lepercq et al., 2004b). La même réaction effectuée en C12 est plus rare dans les selles humaines ; cependant des 12-HSDHs ont été détectées chez plusieurs Firmicutes (Gérard 2014).

La 7 α -déhydroxylation est en fait une succession d'étapes réalisées par un système enzymatique inductible par les acides biliaires et appelé bai. Etudié chez *Clostridium scindens* et *Clostridium hylemonae* (Ridlon et al. 2006), cette activité est également présente chez d'autres espèces des genres *Clostridium* et *Eubacterium*. Cette réaction ne peut avoir lieu qu'après la déconjugaison des AB mettant en évidence une coopération entre les bactéries du microbiote intestinal. Quantitativement elle est la réaction la plus présente chez l'humain et la plus significative d'un point de vue physiologique (Hamilton et al. 2007).

Les esters d'acides biliaires comptent pour environ 10 à 30 % du contenu total en acides biliaires des selles humaines. L'estérification du groupe carboxyle en C-24 forme des oligomères d'acide désoxycholique, détectés dans les selles humaines mais pas dans la bile. L'estérification des AB a été détectée chez des bactéries des genres *Bacteroides*, *Eubacterium* et *Lactobacillus* (Ridlon et al. 2006).

Les AB pouvant subir une désulfatation sont ceux portant un groupement sulfate en position 3 α - ou 3 β - et un groupement carboxyle libre en C24 ou C26. Les genres *Clostridium*, *Peptococcus*, *Fusobacterium* et *Pseudomonas* provenant du microbiote intestinal ont montré une activité sulfatase (Ridlon et al., 2010).

Il existe donc de nombreuses réactions de transformation des ABs portées par le microbiote intestinal. La partie suivante s'intéresse à l'effet des nouvelles molécules formées sur la physiologie de l'hôte.

2.3.2.3 Effets sur la santé des acides biliaires modifiés

Les AB déconjugés sont moins solubles et donc moins réabsorbés par la voie entéro-hépatique que les AB conjugués. Ils sont alors plus éliminés dans les selles. Cette déplétion du pool hépatique d'acides biliaires conduit à leur synthèse *de novo* à partir de cholestérol aux dépens de sa circulation dans le sang, faisant diminuer le taux de cholestérol sanguin.

En ce qui concerne les autres transformations des acides biliaires ; elles ont une importance physiologique mais pas dans le cadre de la cholestérolémie. Certains ABII ainsi formés ont été rapportés comme ayant un effet délétère. Par exemple l'acide lithocholique (formé par la déshydroxylation de l'acide chenodésoxycholique) est toxique pour les cellules du foie et associé au risque de cancer du côlon. A l'inverse, l'acide ursodésoxycholique (formé par l'épimérisation du groupe 7 α -hydroxyle de l'acide chénodésoxycholique) est utilisé pour traiter les calculs biliaires (Gérard 2014).

Les AB déconjugés ont donc un impact sur le taux de cholestérol sanguin de l'hôte. Mais comme énoncé en conclusion de la partie 2.3.1, ce mécanisme n'est pas le seul à pouvoir influencer la cholestérolémie. C'est pourquoi le paragraphe suivant s'intéresse à la transformation du cholestérol en coprostanol, mécanisme d'étude choisi dans cette thèse.

2.3.3 La transformation du cholestérol en coprostanol

Dans cette partie, nous allons étudier en détail la production de coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal. Tout d'abord, un constat de la production chez différents hôtes sera établi avec un point focal sur l'Homme. Puis, les caractéristiques des bactéries produisant du coprostanol à partir de cholestérol et caractérisées à ce jour seront présentées. Ensuite, les voies métaboliques de conversion du cholestérol en coprostanol seront analysées. Et pour terminer, les effets de ce métabolisme sur l'hôte seront abordés.

2.3.3.1 Capacité de production de coprostanol par le microbiote intestinal chez différents mammifères

Tous les animaux possédant un microbiote intestinal dont les bactéries peuvent entrer en contact avec du cholestérol (alimentation, synthèse endogène, etc.) sont susceptibles d'avoir du coprostanol dans leurs selles. Ceci est d'autant plus vrai pour les omnivores qui ont un apport alimentaire en cholestérol plus important que les herbivores. Le coprostanol a été retrouvé dans les selles de différents animaux (Tableau 1). La corrélation avec une activité du microbiote intestinal a été mise en évidence par le constat suivant : les rats axéniques ne présentent pas de transformation des stérols ni de production de coprostanol. Cependant, lorsqu'ils sont replacés dans des conditions dites « normales » (alimentation et air non stériles), une activité coprostanoligène se développe. Cette activité est également observée lorsque les rats sont inoculés avec un microbiote intestinal de rats conventionnels ou lorsqu'ils sont mis en contact avec ces rats (Midtvedt et al. 1987).

Tableau 2 : Animaux produisant du coprostanol recensés dans la littérature

Espèce animale	Production de coprostanol	Taux de production de coprostanol	Références
Rats	Oui	<i>(Coprostanol/Cholestérol)x100</i> 49,5 %	(Eyssen & Parmentier 1974)
Poules pondeuses	Oui/Non	<i>Ratio Coprostanol/Cholestérol</i> De 0,01 à 0,02 ± 0,01	(Li et al. 1996)
Chien	Oui	Petites quantités, mais inductible avec un régime riche en cerveau cru	(Dorée & Gardner 1908)
Chat	Oui	Petites quantités	(Dorée & Gardner 1908)
Cochons	Oui	<i>Coprostanol en mg/g de digesta sec</i> - Iléon = 0,03 ± 0,02 - Côlon = 1,57 ± 0,08	(Fadden et al. 1999)
Babouins	Oui	ND	(Brinkley et al. 1982)
Homme	Oui	<i>Coprostanol = % des stéroïdes fécaux totaux</i> - HP (23 sujets) = 61 ± 9 % - BP (8 sujets) = 8 ± 7 %	(Wilkins & Hackman 1974)

		$(\text{Coprostanol}/(\text{Coprostanol}+\text{Cholestérol}))\times 100$ <ul style="list-style-type: none"> - HP (41 sujets) > 40 % - BP (10 sujets) < 20 % 	(Midtvedt et al. 1990)
		<i>Ratio Coprostanol/Cholestérol</i> <ul style="list-style-type: none"> - HP (5 sujets) > 15 - Intermédiaire (7 sujets) = 0,9-10 - BP (3 sujets) < 0,3 	(Veiga et al. 2005)

HP : Haut-producteur de coprostanol et BP : Bas-producteur de coprostanol ; ND : Non déterminé

Comme le montre le tableau 2, les espèces testées à ce jour présentent toutes une production de coprostanol dans leurs selles. Nous allons maintenant étudier le cas particulier de l'être humain.

2.3.3.2 Le cas particulier de l'Homme : Deux phénotypes en fonction de la capacité du microbiote à produire du coprostanol

La capacité du microbiote intestinal humain à convertir le cholestérol en coprostanol varie d'un individu à l'autre. Les premières études ont montré deux phénotypes dans la population humaine : les bas- et les hauts-producteurs de coprostanol (BP et HP). Wilkins et Hackman (1974) ont étudié le profil de production de coprostanol dans une cohorte de 31 sujets Nord-Américains. Ils ont classé 23 personnes comme haut-producteurs et 8 comme bas-producteurs. Le coprostanol représente en moyenne 61 % des stéroïdes totaux (origines animales, végétales et bactériennes) retrouvés dans les selles des HP alors que ce pourcentage descend à 8 pour les BP (Tableau 2). Ces phénotypes sont globalement reproductibles et stables dans le temps sauf pour un sujet qui devient HP au cours de l'étude (Wilkins & Hackman 1974). L'étude de Midtvedt *et al.* (1990) considère le ratio coprostanol sur la somme du coprostanol et du cholestérol plutôt que sur la somme des stéroïdes totaux pour définir les phénotypes HP et BP. Malgré cette différence, une distribution bimodale est également observée. Le groupe HP est, comme dans l'étude de Wilkins et Hackman, le plus représenté alors que les BP ne constituent que 20 % de la cohorte (Tableau 2).

Ces 51 sujets ont été suivis avant, pendant et après la prise d'antibiotiques. Durant le traitement, les profils HP et BP ne sont pas conservés : certains individus HP avant le traitement deviennent BP durant le traitement et vice versa. La répartition de ces phénotypes au sein des sujets testés est donc modifiée et est fortement dépendante du profil initial de l'individu et de l'antibiotique utilisé. A part deux sujets qui deviennent HP après l'arrêt du traitement, les individus retrouvent le même profil de production de coprostanol qu'avant le traitement aux antibiotiques (Midtvedt *et al.* 1990). Un profil intermédiaire est envisagé par notre laboratoire dans l'étude de Veiga *et al.* (2005). En effet, les phénotypes HP et BP sont bien retrouvés et les BP (trois sujets) constituent également 20 % de la cohorte. La mesure utilisée dans cette étude est le ratio du coprostanol sur le cholestérol dans les selles (Tableau 2). Les BP ne produisent pas de coprostanol alors que les HP (cinq sujets) procèdent à une conversion quasi complète du cholestérol en coprostanol. Un phénotype intermédiaire semble se détacher avec des individus (sept sujets) capables de convertir le cholestérol en coprostanol mais de façon moins importante que les HP.

Sadzikowski *et al.* (1977) font d'abord l'hypothèse que la production de coprostanol est reliée à la quantité de bactéries coprostanoligènes présentes dans le tractus digestif. Cependant,

après avoir constaté un nombre relatif de bactéries coprostanoligènes similaire (par des techniques de dilutions) entre les deux populations BP et HP, ils émettent deux hypothèses pour expliquer ces phénotypes différents : i) les bactéries produisant du coprostanol à partir de cholestérol et appelées bactéries coprostanoligènes ne sont pas les mêmes entre BP et HP et ont donc une efficacité différente ; ii) d'autres bactéries présentes dans le microbiote intestinal peuvent inhiber ce métabolisme. Ils ont remarqué que certains micro-organismes coprostanoligènes isolés à partir de selles BP étaient inhibés par certains membres du microbiote fécal. De plus, ils ont montré que la réduction du cholestérol en coprostanol d'*Eubacterium* ATCC 21408, souche coprostanoligène isolée à partir de fèces de rat et développée plus loin (paragraphe 2.3.2.3) est inhibée à 50 % par des micro-organismes isolés à partir de selles de BP. Ils concluent que la différence entre BP et HP tiendrait au type de bactéries coprostanoligènes et à leur sensibilité plus ou moins marquée à des souches antagonistes (Sadzikowski et al. 1977). Cependant, plus récemment l'hypothèse de départ de Sadzikowski *et al.* (1977) reliant le nombre de bactéries coprostanoligènes à la production de coprostanol a été démontrée par notre laboratoire. Le niveau de bactéries réduisant le cholestérol en coprostanol doit être au moins de 10^6 bactéries/g de fèces pour convertir efficacement le cholestérol dans le tractus digestif humain et les personnes ayant plus de 10^8 bactéries/g de selles peuvent convertir presque entièrement le cholestérol en coprostanol, expliquant la différence entre les individus HP et les individus intermédiaires (Veiga et al. 2005). La technique de TTGE ou gel d'électrophorèse par gradient temporel de température (séparation d'ADN double brin en fonction de leur dynamique de dénaturation, principalement due au contenu en GC des séquences) utilisée dans cette publication a permis la mise en évidence de deux clusters A et B (figure 11A). Le cluster A regroupe les trois individus BP avec trois individus dont le profil de production de coprostanol est considéré comme intermédiaire. Alors que le cluster B regroupe les cinq individus HP avec trois individus au profil intermédiaire. De plus, la moyenne du ratio coprostanol/cholestérol des individus de ces nouveaux clusters A et B est significativement différente avec un ratio égal à $1,03 \pm 1,13$ pour le cluster A et à $13,94 \pm 7,97$ pour le cluster B. Ces résultats témoignent d'une structure de microbiote différente entre ces deux groupes confirmée par une analyse en composante principale(ACP), excepté pour les individus C14 et C27 (figure 11.B). Ceci ne permet cependant pas de corréler l'intensité de la conversion du cholestérol en coprostanol à une ou des espèce(s) bactérienne(s) en particulier.

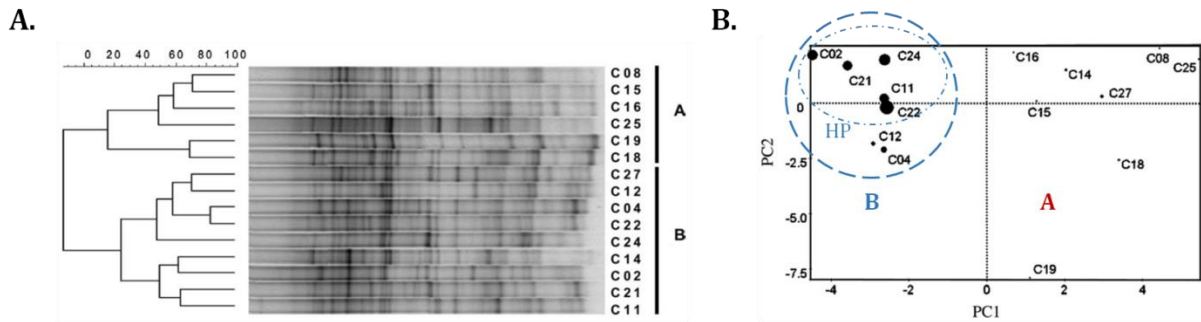


Figure 11 : Mise en évidence de deux groupes (A et B) corrélés à la production de coprostanol grâce aux méthodes de TTGE (A.) et ACP (B.)

Regroupement utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et dendrogramme construit avec la méthode UPGMA (« unweighted pair group clustering method with arithmetic averages ») des profils de TTGE obtenus à partir de 15 échantillons de selles après extraction d'ADN et amplification d'une région spécifique du gène de l'ADNr 16S (A.). Projection de ces données en ACP ; l'axe PC1 est corrélé avec le ratio coprostanol/cholestérol et le diamètre des cercles noirs (•) sont proportionnels au ratio coprostanol/cholestérol (B.) d'après (Veiga et al. 2005).

Comme le tractus digestif des personnes HP présentent plus de bactéries pouvant réduire le cholestérol en coprostanol (Veiga et al. 2005), leurs selles sont utilisées dans le but d'isoler ce type de bactéries.

2.3.3.3 Les bactéries isolées à partir du microbiote intestinal de mammifères

Plusieurs bactéries réduisant le cholestérol en coprostanol ont été isolées à partir de lisier de porcs et à partir de fèces de rats, babouins et humains. Cependant, ces bactéries ont des caractéristiques particulières qui rendent leur manipulation dans les laboratoires difficile. Toutes sont anaérobies strictes, certaines requièrent des substrats spécifiques comme les lipides avec une liaison alkenyl éther (plasmalogène) et sont difficiles à faire croître en milieux solides.

Isolée à partir de fèces de rat, *Eubacterium* ATCC 21 408 est la première souche réduisant le cholestérol en coprostanol à avoir été identifiée. Ce micro-organisme réduit non seulement le cholestérol en coprostanol dans un milieu riche en cerveau de bœuf et additionné de cholestérol (BM), mais aussi d'autres stérols comme les campestérol, β -sistostérol et stigmastérol et des hormones, la pregnénolone et l'androsténolone. *Eubacterium* ATCC 21 408 peut convertir 90 % du cholestérol en coprostanol en moins de 72 h à 37 °C en milieu BM et en condition anaérobie (tableau 2). La concentration optimale en cholestérol pour la croissance est de 1,5-2 mg/mL mais la souche ne forme pas de colonies en milieu solide. Cette bactérie est anaérobie stricte, Gram positive avec une température optimale de croissance située entre 37 et 40 °C (Eyssen et al. 1973). Un autre micro-organisme très proche du premier a été isolé à partir de selles humaines en utilisant une méthode comparable c'est-à-dire par dilutions successives avec en plus l'utilisation d'antibiotiques comme pression de sélection. Cependant, la difficulté à obtenir des colonies en milieu solide n'a pas permis une caractérisation fiable de cette bactérie (Sadzikowski et al. 1977). Brinkley et Mott ont isolé une souche à partir de fèces de babouins en 1979 partageant la plupart des caractéristiques du genre *Eubacterium* et l'ont appelé

Eubacterium 403 (Mott & Brinkley 1979). Cette même équipe a poursuivi ses recherches sur le babouin en 1982 pour isoler neuf nouvelles bactéries : deux à partir des fèces, quatre à partir du côlon ascendant et trois à partir de l'iléon. Elles sont toutes Gram positives et proches de *Eubacterium* ATCC 21 408 dont sept appartenant potentiellement au genre *Eubacterium* et deux bactéries inconnues montrant des similitudes avec *Eubacterium* et *Actinomyces*. Cette étude montre une communauté plus diverse de bactéries réduisant le cholestérol qu'auparavant (Brinkley et al. 1982). *Eubacterium coprostanoligenes* a été isolée en 1994 à partir de lisier de porc (Freier et al. 1994). L'activité productrice de coprostanol de cette souche est mesurée sur sept jours à 35°C, en milieu BCM (composition disponible dans le tableau 3) et en condition anaérobie. Elle atteint 90 % de conversion du cholestérol en coprostanol du 5^{ème} au 7^{ème} jour de culture (tableau 2) (Ren et al. 1996). *Eubacterium coprostanoligenes* est Gram positive, non mobile et non sporulante. Sa croissance ne nécessite ni cholestérol ni plasmalogène et elle peut former des colonies en milieu solide contenant de la lécithine (Freier et al. 1994).

La première bactérie isolée à partir de selles humaines et clairement identifiée est *Bacteroides* sp. D8 (figure 12). C'est aussi la première souche Gram négative identifiée comme étant capable de transformer le cholestérol en coprostanol. Le gène de l'ARN ribosomique 16S de *Bacteroides* sp. D8 montre 5 % de divergence avec celui de *B. vulgatus* et 99,7 % et 99,6 % de similitude avec celui de *B. dorei* 175 et de *B. dorei* 219, respectivement. Le coprostanol apparaît au bout de 3 jours de croissance, durant la phase stationnaire et le cholestérol est entièrement converti au bout de 7 jours en milieu SBM (tableau 3).

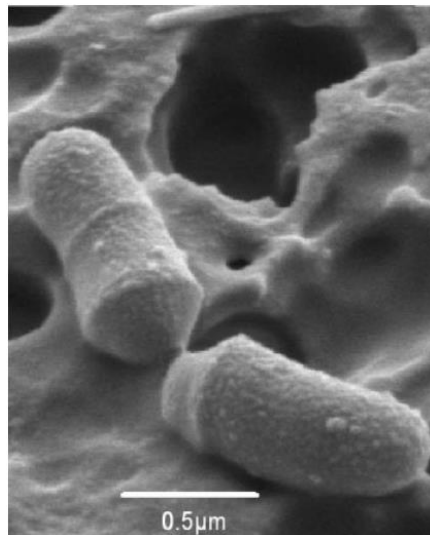


Figure 12 : Micrographie électronique à balayage de la souche *Bacteroides* sp. D8, première bactérie réduisant le cholestérol en coprostanol à avoir été isolée à partir de selles humaines
D'après (Gérard et al. 2007)

Après 24 h de culture en milieu BHI-YH à 37 °C des essais en resting-cells sont effectués sur les cellules de *Bacteroides* sp. D8. Les différents compartiments cellulaires (cellules entières, cellules lysées et surnageant) sont incubés 30 min ou 24 h avec des micelles de

cholestérol/lécithine (concentration finale en cholestérol de 1 mM). Le meilleur taux de conversion est atteint par les cellules entières de *Bacteroides* sp. D8 après 24 h d'incubation et est de 1,5 μmol de cholestérol réduit/mg de protéines bactériennes/h (tableau 3) (Gérard et al. 2007). Cette valeur est supérieure à celles obtenues avec les cellules entières de *Eubacterium coprostanoligenes*. Avec la même concentration de cholestérol, les cellules de *E. coprostanoligenes* réduisent 1.1 μmol de cholestérol/mg de protéine/h après 1 h d'incubation (Li et al. 1995). Dans cette expérience, les bactéries sont récoltées après 48 h de croissance à 37 °C dans un milieu sans cholestérol (tableau 3). Le meilleur taux de conversion est atteint après une incubation d'une heure en présence de 1,25 mM de cholestérol et est de 1,2 μmol de cholestérol réduit/mg de protéine/h (Li et al. 1995) ce qui reste inférieur à la valeur obtenue pour *Bacteroides* sp. D8 (Gérard et al. 2007).

Tableau 3 : Bactéries coprostanoligènes caractérisées

Bactérie coprostanoligène	Origine	Production de coprostanol	Milieu utilisé pour le test	Temps de culture	Références
<i>Eubacterium</i> ATCC 21 408	Fèces de rat	90 %	<p><u>BM (Basal Medium)</u></p> <p>Pour 1 L : 15 g de digestat pancréatique de caséine, 0,5 g de cystéine, 5 g d'extrait de levure, 2,5 g de chlorure de sodium, 0,5 g de thioglycolate de sodium, 0,001 g de résazurine, 0,1 g d'hémine, 2 mg de vitamine K1, 34 g de poudre de cerveau de bœuf lyophilisé (environ 120 mg de cholestérol pour 100 g de poudre)</p>	72 h à 37 °C en condition anaérobie	(Eyssen et al. 1973)
<i>Eubacterium</i> 403	Fèces de babouin	ND	<p><u>SBM (Standard Brain Medium)</u></p> <p>Pour 1 L : 30 g de poudre de cerveau de bœuf lyophilisé, 10 g d'acides casaminés, 10 g d'extrait de levure, 5 g de K₂HPO₄, 0,5 g de sodium thioglycolate et 1 mg de résazurine</p>	7 jours à 37 °C en condition anaérobie	(Brinkley et al. 1982)
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	Lisier de porc	>90 %	<p><u>BCM (Basal Cholesterol Medium)</u></p> <p>Pour 1 L : 10 g de casitone, 10 g d'extrait de levure, 2 g de cholestérol, 1 g de lécithine, 1 g de CaCl₂ déshydraté, 0,5 g de sodium thioglycolate et 1 mg de résazurine</p>	5-7 jours à 35 °C en condition anaérobie	(Ren et al. 1996)
		1.2µmol de cholestérol réduit/mg de	<p><u>Milieu sans cholestérol</u></p> <p>Pour 1 L : 10 g de casitone, 10 g d'extrait de levure, 5 g de lactose, 5 g de sodium pyruvate, 1 g de CaCl₂, 0,5 g de sodium</p>	Resting-cells sur culture de 48 h à 37	(L. Li et al. 1995)

		protéines/h	thioglycolate, 0,1 g de lécithine et 1 mg de résazurine <u>Conditions du resting-cells</u> Incubation 1 h à 37 °C en présence de 1,33 mM de lécithine et 1,25 mM de cholestérol micellaire.	°C en condition anaérobie	
<i>Bacteroides</i> sp. D8	Selles humaines	>90%	<u>SBM (Standard Brain Medium)</u> Pour 1 L : 20 g de poudre de cerveau de veau lyophilisé, 10 g de casitone, 10 g d'extrait de levure, 5 g de K ₂ HPO ₄ , 0,5g de sodium thioglycolate	7 jours à 37 °C en condition anaérobie	(Gérard et al. 2007)
		1,5µmol de cholestérol réduit/ mg de protéines bactériennes/h	<u>BHI-YH (Brain Heart Infusion-Yeast extract-Hemin)</u> Pour 1 L : 10 g d'infusion cœur-cerveau, 10 g d'extrait de levure, 10 ml d'une solution d'hémine à 0,1 %, 0,5 g de L-cystéine, 0,2 g de cholestérol et 1 g de lécithine <u>Conditions du resting-cells</u> Incubation 24 h à 37 °C en présence de micelles de lécithine/cholestérol (6 mM cholestérol et 14 mM de lécithine) pour une concentration finale en cholestérol de 1,00 mM.	Resting-cells sur culture de 24 h à 37 °C en condition anaérobie	

2.3.3.4 Souches probiotiques potentielles

La capacité de production de coprostanol par d'autres souches bactériennes a également été recherchée parmi des souches considérées comme probiotiques. Lye *et al.* (2010) ont testé cinq souches de *Lactobacillus* pour leur capacité à retirer le cholestérol du milieu de culture par incorporation et conversion en coprostanol. Les cultures bactériennes sont faites en milieu Man, Rogosa et Sharp (MRS) additionné de 0,15 % d'hydrochloride de L-cystéine contenant en plus 100 µg/mL de cholestérol. Après 20 h à 37 °C, ils mesurent par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) une production de coprostanol variant de 7,11 µg/mL pour *L. bulgaricus* FTDC 1311 à 24,76 µg/mL pour *L. acidophilus* ATCC 314. Ceci représente respectivement environ 7 et 25 % de conversion du cholestérol initial en coprostanol (Lye *et al.* 2010). La souche de *Bacteroides* sp. D8 dans les essais de resting-cells peut quant à elle convertir 20 % du cholestérol présent initialement en coprostanol après 24 h d'incubation (Gérard *et al.* 2007). Depuis cette étude, ces souches n'ont pas été étudiées plus en détail, notamment sur leur activité potentielle *in vivo* et la production de coprostanol à partir de cholestérol n'a pas été détectée dans d'autres Lactobacilles.

Après avoir fait un tour d'horizon des bactéries convertissant le cholestérol en coprostanol isolées à ce jour, nous allons voir les facteurs influençant cette conversion, que les observations aient été faites *in vitro* ou *in vivo*. Ceci dans le but de mettre l'accent sur la difficulté de cultiver ce type de bactérie et de maintenir leur activité.

2.3.3.5 Facteurs influençant la production de coprostanol

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux facteurs *in vivo* mis en évidence chez l'Homme ou chez l'animal. Ensuite nous verrons les facteurs *in vitro* testés en laboratoire.

2.3.3.5.1 *In vivo*

Les facteurs *in vivo* influençant la croissance des bactéries coprostanoligènes et/ou leur production de coprostanol sont à rapprocher de ceux influençant le microbiote intestinal dans son ensemble et énoncés dans la partie 2.2.1.

2.3.3.5.1.1 Age

Durant les 6 premiers mois et l'apport alimentaire presque exclusivement lacté, le nourrisson ne produit pas de coprostanol. Puis, entre 6 et 15 mois, la capacité de conversion augmente jusqu'à une stabilisation qui intervient avec la diversification du régime alimentaire. Il y a un délai dans l'initiation de la production de coprostanol après le sevrage chez les enfants nourris au sein pendant longtemps. Mais ces enfants sont plus susceptibles de devenir des HP que les autres enfants (Midtvedt & Midtvedt 1993).

2.3.3.5.1.2 Régime alimentaire

Une étude conduite sur dix-huit femmes blanches omnivores, vingt-deux femmes blanches végétariennes et vingt-deux Indiennes végétariennes avant la ménopause a montré que la quantité de coprostanol retrouvée dans les selles est significativement plus élevée chez les omnivores, atteignant en moyenne 20,6 mg/g de poids sec comparé aux groupes végétariens où le coprostanol représente en moyenne 9,3 et 7,4 mg/g de poids secs respectivement chez les végétariennes blanches et Indiennes. Le coprostanol dérivant directement du cholestérol par l'action des bactéries coprostanoligènes, les auteurs ont corrélé cette différence à un différentiel dans les apports en cholestérol. En effet, il représente 199 mg/jour dans le régime alimentaire des femmes blanches omnivores, 104 mg/jour dans celui des femmes blanches végétariennes et seulement 34 mg/jour dans celui des Indiennes végétariennes (Reddy et al. 1998). Cependant, les auteurs n'ont pas mesuré le cholestérol dans les selles ni la quantité de bactéries coprostanoligènes (corrélé à la capacité de conversion du cholestérol en coprostanol, paragraphe 2.3.3.2) rendant difficile les conclusions quant à l'efficacité différentielle ou non des microbiotes intestinaux à réduire le cholestérol en coprostanol chez les trois groupes d'individus testés.

2.3.3.5.1.3 Interactions entre bactéries

Les bactéries coprostanoligènes communiquent et interagissent avec les autres bactéries de leur environnement. Elles doivent faire face à la production de toxines et d'inhibiteurs mais elles peuvent également bénéficier de la production de substrats originaux (vitamines, plasmalogènes, etc.). Les essais de colonisation du tractus digestif du rat par la souche *Eubacterium* 21 408 seule ont échoué. La co-inoculation avec une autre souche (*Clostridium* CI-8) faisant diminuer le potentiel d'oxido-réduction (Eh) est nécessaire à la survie de la souche (Eyssen & Parmentier 1974). Mott et Brinkley émettent l'hypothèse que le plasmalogène, favorisant la croissance de certaines bactéries coprostanoligènes, puisse être apporté par les autres bactéries du microbiote intestinal chez l'humain comme chez l'animal (Mott & Brinkley 1979).

2.3.3.5.1.4 Antibiotiques

Les effets des antibiotiques dépendent du type d'antibiotique et de la production de coprostanol avant traitement (HP ou FP). Chez des rats conventionnels, les antibiotiques à large spectre (de types β -lactamines) abolissent totalement la production de coprostanol qui se rétablit 3 semaines après l'arrêt du traitement (Hashimoto et al. 1996). Chez l'Homme, les antibiotiques ciblant les bactéries Gram positives (bacitracine, clindamycine, érythromycine, métronizadole et vancomycine) diminuent significativement la conversion de cholestérol en coprostanol alors que les autres antibiotiques n'affectent presque pas la production de

coprostanol (Midtvedt et al. 1990). Les auteurs relient cette observation avec le fait que toutes les bactéries coprostanoligènes connues au moment de leur étude (principalement du genre *Eubacterium*) sont Gram positives mais aucune n'a été isolée chez l'Homme. Il est toutefois intéressant de noter que deux personnes de cette étude sont passées de BP à HP après le traitement antibiotique (Midtvedt et al. 1990). Ceci peut s'expliquer par l'existence de bactéries Gram négatives productrices de coprostanol qui ont pu proliférer après la disparition des Gram positives due aux antibiotiques. En effet, *Bacteroides* sp. D8 (figure 12), la seule bactérie isolée à partir de microbiote humain connue à ce jour, est Gram négative (Gérard et al. 2007).

2.3.3.5.1.5 Tube digestif

Le tube digestif représente un long segment d'environ 5m séparé en plusieurs compartiments avec des propriétés différentes particulièrement physico-chimiques (potentiel d'oxydoréduction, temps de transit, pH, etc.) et en termes de charge bactérienne (figure 4).

Chez les mammifères, le cæcum constitue un segment particulier du tractus digestif faisant le lien entre l'intestin grêle et le côlon. Il est particulièrement développé chez les rongeurs mais aussi chez d'autres animaux, notamment les herbivores. Il présente un péristaltisme lent (transit lent), une concentration en oxygène faible pouvant faciliter l'implantation et la croissance de bactéries sensibles à l'oxygène. En effet, le cæcum représente la partie anatomique regroupant le plus de bactéries. C'est également le segment qui permet l'établissement de la production de coprostanol (Eyssen & Parmentier, 1974). Chez les omnivores et notamment les humains, le côlon joue le rôle du cæcum. De même, chez le porc, qui est également un omnivore, la plus forte production de coprostanol se retrouve dans le côlon ($1,57 \pm 0,08$ mg/g de digesta sec) comparé à l'iléon ($0,03 \pm 0,02$ mg/g de digesta sec) (Fadden et al. 1999).

Le potentiel d'oxydoréduction constitue un paramètre important dans l'établissement des bactéries coprostanoligènes dans le tractus digestif des mammifères comme illustré par les essais de Eyssen et Parmentier (1974) sur *Eubacterium* ATCC 21408 et développés dans le paragraphe 2.3.2.5.13.

Dans cette même étude, les auteurs font un lien entre l'activité coprostanoligène de *Eubacterium* ATCC 21408 et la diminution de pH induite par l'administration de lactose. En effet, celui-ci inhibe la production de coprostanol chez des rats co-inoculés avec *Eubacterium* ATCC 21408 et *Clostridium* CI-8 (Eyssen & Parmentier 1974). Eyssen et Parmentier (1974) observent une inhibition de plus de 80 % de la production de coprostanol chez ces rats après cinq jours de régime riche en lactose (40 %). Cette diminution est corrélée à une diminution du pH caecal et à une baisse de la quantité de *Eubacterium* 21 408 passant de 3.10^9 CFU/g de contenu caecal sous régime conventionnel à 5.10^6 CFU/g de contenu caecal en régime riche en lactose. Cependant,

l'effet du lactose est transitoire et le microbiote de ces rats gnotobiotiques finit par trouver un équilibre après trois semaines de ce régime. Le nombre de *Eubacterium* 21 408 se stabilise vers 1.10^9 CFU/g de contenu caecal, le pH aux alentours de 6.6 et la production de coprostanol autour de 75-80 % de la quantité observée chez les animaux non nourris au lactose. Les auteurs émettent l'hypothèse que la variation de pH observée entre le début et le prolongement du régime riche en lactose entraîne une adaptation nécessaire du microbiote présent (Eyssen & Parmentier 1974).

2.3.3.5.2 *In vitro*

Après avoir considéré les facteurs *in vivo*, nous allons nous intéresser aux facteurs *in vitro* pouvant influencer la production de coprostanol par les bactéries convertisseuses. Ces facteurs sont importants à prendre en compte dans une optique de mise en culture des souches et de conservation de leur activité coprostanoligène.

2.3.3.5.2.1 Plasmalogène

Dès 1977, Sadzikowski et al. ont trouvé plus de coprostanol dans les fèces de rats dont le régime alimentaire était supplémenté en extrait de cerveau (Sadzikowski et al. 1977). De plus, plusieurs équipes de recherche ont noté que le maintien des cultures *in vitro* se faisait mieux sur milieux supplémentés en cervelle (Sadzikowski et al. 1977 ; Eyssen et al. 1973). La production de coprostanol par *Eubacterium* 21 408 devient irrégulière après plusieurs transferts successifs de la souche en milieu liquide supplémenté en cholestérol/phosphatidylcholine. L'activité et la bonne croissance de la souche sont retrouvées après ajout de 3 % de cerveau entier et elles peuvent être maintenues sur plus de 300 transferts. L'étude des caractéristiques de *Bacteroides* sp. D8 montre qu'elle perd petit à petit sa capacité à produire du coprostanol lorsqu'elle est cultivée d'abord en milieu standard de cerveau (SBM) puis en milieu basal de cholestérol (BC) ou en milieu infusion cœur-cerveau-extrait de levure-hémimine (BHI-YH). Les auteurs concluent que le milieu SBM doit contenir un constituant spécifique du tissu cérébral qui induit l'activité de production de coprostanol (Gérard et al. 2007). En 1979, Mott et Brinkley isolent à partir de cerveau de bovin la plasményléthanolamine (PLE) comme une molécule essentielle à la croissance de *Eubacterium* 21 408 et 403. Ce composé est un glycérophospholipide très présent dans le cerveau et le cœur des animaux. Seulement deux des neuf bactéries isolées par Brinkley et al. en 1982 peuvent réduire le cholestérol en coprostanol en absence de ce composé (Brinkley et al. 1982). En fait, il semblerait que *Eubacterium* 403 catabolise la liaison alkenyl éther de la PLE durant la formation de coprostanol (Mott & Brinkley 1979). Le rôle précis de ce plasmalogène dans ce métabolisme reste inconnu à ce jour.

2.3.3.5.2.2 Phosphatidylcholine

La nécessité de ce composé pour l'activité réductrice des bactéries coprostanoligènes n'a été démontrée que chez *Eubacterium coprostanoligenes* pour laquelle ce composé est également indispensable à sa croissance (Freier et al. 1994). En revanche, son rôle dans la transformation du cholestérol en coprostanol n'est pas bien compris. Il peut avoir un simple rôle de solubilisant du cholestérol (utilisés dans plusieurs études (Eyssen et al. 1973 ; Brinkley et al. 1982)) le rendant plus facilement accessible aux bactéries en créant des micelles mais il peut avoir, tout comme la PLE, un rôle plus « direct » dans la conversion du cholestérol en coprostanol.

2.3.3.5.2.3 Pyruvate

De même, le rôle du pyruvate dans la production de coprostanol n'est pas clair. Freier *et al.* (1994) proposent un rôle de cofacteur en observant une augmentation de la réduction du cholestérol en présence de pyruvate (Freier et al. 1994).

2.3.3.5.2.4 pH

L'effet du pH sur la production de coprostanol n'a pas été étudié sur beaucoup de souches. *Eubacterium coprostanoligenes* a des pH optimaux de production de coprostanol à 7,0 ; 7,2 et 7,5 correspondant aux pH optimaux de croissance de la souche (Freier et al. 1994). Tous les milieux utilisés dans les études sont tamponnés aux alentours de 7.0 mais l'efficacité de la réduction du cholestérol en coprostanol n'est pas commentée (Eyssen et al. 1973 ; Brinkley et al. 1982 ; Gérard et al. 2007).

Nous avons vu que la conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal dépend de plusieurs facteurs environnementaux. Ceux de l'hôte, l'âge, le régime alimentaire, les caractéristiques du tube digestif mais aussi ceux plus locaux de l'environnement bactérien auquel appartiennent ces bactéries coprostanoligènes. Celui-ci peut influencer les paramètres environnementaux locaux (substrats disponibles, pH, etc.) faisant écho aux observations faites *in vitro*. Nous allons maintenant décrire ce qui est connu mais aussi ce qui l'est moins sur les voies métaboliques impliquées dans cette conversion.

2.3.3.6 Les voies métaboliques de la conversion du cholestérol en coprostanol

Les bactéries coprostanoligènes semblent pouvoir dégrader d'autres substrats que le cholestérol. *Eubacterium* ATCC 21408 est capable de réduire la double liaison 5-6 d'autres stérols de type Δ^5 -3 β -hydroxy en leurs dérivés 5 β saturés (Eyssen *et al.*, 1973). Ces informations ne sont pas disponibles pour les autres bactéries coprostanoligènes.

Deux voies de conversion du cholestérol en coprostanol ont été proposées (figure 13). La première est la réduction stéréospécifique directe de la double liaison 5-6 du noyau stéroïde du cholestérol. La seconde est une transformation indirecte avec en premier lieu une oxydation

conduisant à la formation de 5-cholestén-3-one puis une isomérisation de ce composé en 4-cholestén-3-one (Björkhem & Gustafsson 1971). Dans un troisième temps, une réduction du 4-cholestén-3-one en coprostanone précurseur direct du coprostanol. Rosenfeld et al. ont montré une prépondérance de la voie directe en incubant des selles humaines avec du cholestérol deutéré et marqué au C¹⁴ (Rosenfeld et al. 1954). Mais ces conclusions ont été réévaluées en 1971 par Björkhem et Gustafsson. Ceux-ci ont testé l'abondance relative des deux voies métaboliques et ont trouvé qu'au moins 50 % du coprostanol trouvé dans les selles est formé par la voie indirecte. Ils concluent que les deux voies coexistent dans le microbiote intestinal (Björkhem & Gustafsson 1971). L'étude du métabolisme du cholestérol de *Eubacterium* ATCC 21 408 montre une production de 4-cholestén-3-one et de coprostanone (Eyssen et al. 1973). Ces composés sont également détectés dans les milieux de culture de *E. coprostanoligenes* (Freier et al. 1994) et de *Bacteroides* sp. D8 (Gérard et al. 2007). L'hypothèse du métabolisme indirect chez *E. coprostanoligenes* est soutenue par sa capacité à former du coprostanol à partir de tous les intermédiaires supposés de la voie indirecte (Li 1995; Ren et al. 1996). La caractérisation du métabolisme du cholestérol chez les bactéries isolées jusqu'à présent montre donc une tendance à la voie indirecte mais n'exclut pas l'hypothèse d'une cohabitation entre les deux voies.

Les gènes et les enzymes potentiellement impliquées dans ces deux voies sont toujours inconnus à ce jour. Le chromosome de *Bacteroides* sp. D8 a été séquencé et assemblé (Valentin Loux, MaIAGE, INRA, Jouy-en-Josas). Aucun gène n'a pu être directement relié à la conversion du cholestérol en coprostanol (communication personnelle, Alexandre Bolotine, Ife, Micalis, INRA, Jouy-en-Josas). Ce génome a également été comparé à celui de *Bacteroides dorei* 175 dont l'ARNr 16S partage 99,7 % d'homologie avec *Bacteroides* sp. D8 mais dont la capacité de conversion du cholestérol en coprostanol n'a pas été rapportée (Gérard et al. 2007). Cependant, aucun gène candidat n'est détecté à partir de cette analyse (communication personnelle, Alexandre Bolotine, Ife, Micalis, INRA, Jouy-en-Josas).

Les deux premières étapes de la voie indirecte (oxydation du cholestérol et isomérisation du produit en cholesténone, figure 13) pourraient être catalysées par une seule enzyme : la cholestérol oxydase ou COX (EC 1.1.3.6). Cette enzyme a été décrite dans plusieurs micro-organismes notamment des bactéries du sol (Cheetham et al. 1982 ; Arima et al. 1969 ; Tomioka et al. 1976 ; Fukuyama & Miyake 1979). Cependant, aucun de ces micro-organismes n'est capable de faire la conversion complète du cholestérol en coprostanol. Les cholestérol oxydases peuvent être liées à la membrane (Cheetham et al. 1982 ; Pollegioni et al. 2009), extracellulaires (Xin et al. 2011 ; Volontè et al. 2010 ; Fujishiro et al. 2002) ou les deux (Doukyu et al. 2009 ; Ghasemian et al. 2009). Pour parvenir à l'oxydation du cholestérol dans les conditions naturelles, le cofacteur de l'enzyme est le FAD. Celui-ci peut être lié de manière covalente ou non

à la COX constituant deux familles d'enzymes et deux familles de gènes différentes (Doukyu *et al.* 2009 ; Kumari 2012). Ces deux types d'enzymes n'ont pas d'homologie de séquence significative (Doukyu *et al.* 2009 ; Kumari 2012) mais possèdent les mêmes acides aminés au niveau du site actif (MacLachlan *et al.* 2000). Les gènes des deux différents types de COX sont le point de départ de plusieurs stratégies de recherche d'homologues dans les génomes des souches coprostanoligènes identifiées. Dans les années 1990, l'équipe de Beitz a utilisé l'un de ces gènes identifié chez *Streptomyces* sp. SA-COO pour essayer de détecter la présence d'un homologue dans le génome de *E. coprostanoligenes*. Ce gène, nommé *cho*, code pour une enzyme COX dont le FAD est lié de manière non covalente (Golden *et al.* 2016 ; Pathak *et al.* 2015). Ils ont utilisé la technique d'hybridation par Southern blot entre l'ADN génomique de la bactérie coprostanoligène et une sonde construite à partir du gène *cho* de *Streptomyces* sp. SA-COO. Ils n'ont obtenu aucun signal (Li 1995). La souche *E. coprostanoligenes* présente pourtant un métabolisme signature de la voie indirecte (présence d'intermédiaires, Freier *et al.* 1994). Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat consiste à dire que cette souche coprostanoligène possède effectivement une enzyme COX (expliquant le profil de production de métabolites de la souche) mais que celle-ci lie de manière covalente le FAD contrairement à celle codée par le gène *cho*. Il est également possible que ce soit une COX sans FAD ou une enzyme complètement différente de la COX mais possédant la même activité. Dans ces deux cas, les séquences des gènes codant pour ces enzymes pourraient être relativement éloignées de celle du gène *cho* de *Streptomyces* sp. SA-COO et donc non hybridée par la sonde construite à partir de celui-ci (expliquant la non détection, en Southern blot).

La troisième étape de la voie indirecte, c'est-à-dire la réduction de la double liaison 4-5 du 4-cholestén-3-one en coprostanone (figure 13) pourrait être catalysée par une cholestérol réductase et plus particulièrement une 3-oxo- Δ^4 -steroid 5 β -réductase (EC 1.3.1.3). Björkhem *et al.* (1973) ont isolé à partir du microbiote intestinal de rats, une enzyme capable de faire cette réaction (Björkhem *et al.* 1973). La première 5 β -réductase à avoir été caractérisée est issue du foie de rat et montre une activité extrêmement faible envers le 4-cholestén-3-one contre une activité forte pour la version hydroxylée de la molécule : le 7 α -hydroxy-4-cholestén-3-one. Celle-ci est un intermédiaire de la synthèse des acides biliaires (Okuda & Okuda 1984). Une sonde ADN a été construite à partir de cette 5 β -réductase provenant du foie de rat (Onishi *et al.* 1991) et a permis l'identification d'une enzyme homologue dans le foie humain et dont la séquence est disponible (Charbonneau & The 2001). L'étude de Zanotti *et al.* (2015) a trouvé une enzyme bactérienne possédant une séquence en acides aminés proche (92 % de recouvrement et 34 % d'identité) de cette 5 β -réductase humaine. L'enzyme, codée BBPR_0519 a été détectée comme sur-exprimée dans le transcriptome (ensemble des ARNm) de *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 cultivé avec du cholestérol et comparée à celui de cette même bactérie cultivée sans cholestérol.

De plus, des analyses de génomique comparative sur les séquences de chromosomes bactériens publiquement disponibles (NCBI) soulignent l'existence d'homologues de BBPR_0519 dans tous les génomes des bifidobactéries avec une identité allant de 26 % à 100 % (Zanotti et al. 2015). Le même type d'analyses n'a donné aucun résultat significatif avec le genre *Eubacterium*. En revanche, 5 correspondances ont été trouvées sur le génome de *Bacteroides* sp. D8 avec un pourcentage d'identité allant de 37 à 46 % (tableau 4, communication personnelle, Alexandre Bolotine, Ife, Micalis, INRA, Jouy-en-Josas). Ces résultats nécessitent d'être confirmés par la caractérisation complète des souches ou par l'identification et la purification de ces enzymes.

Tableau 4 : Les 5 séquences de *Bacteroides* sp. D8 possédant le pourcentage d'identité le plus élevé avec la séquence BBPR_0519

Taille (bp)	Identité (%)	Valeur E	Bit score
241	46,06	3e-58	202
248	41,94	2e-53	187
260	40	1e-51	183
159	39,62	1e-32	127
245	37,55	5e-51	181

Ces données ont été obtenues par Alexandre Bolotine (Ife, Micalis, INRA, Jouy-en-Josas), elles sont présentées par pourcentage d'identité décroissant. La valeur E mesure la qualité de l'alignement, plus elle est proche de 0, plus l'alignement est significatif. Le bit score prend en compte les propriétés statistiques du système d'attribution des scores, ils peuvent ainsi être utilisés pour comparer les scores d'alignement obtenus à partir de plusieurs recherches.

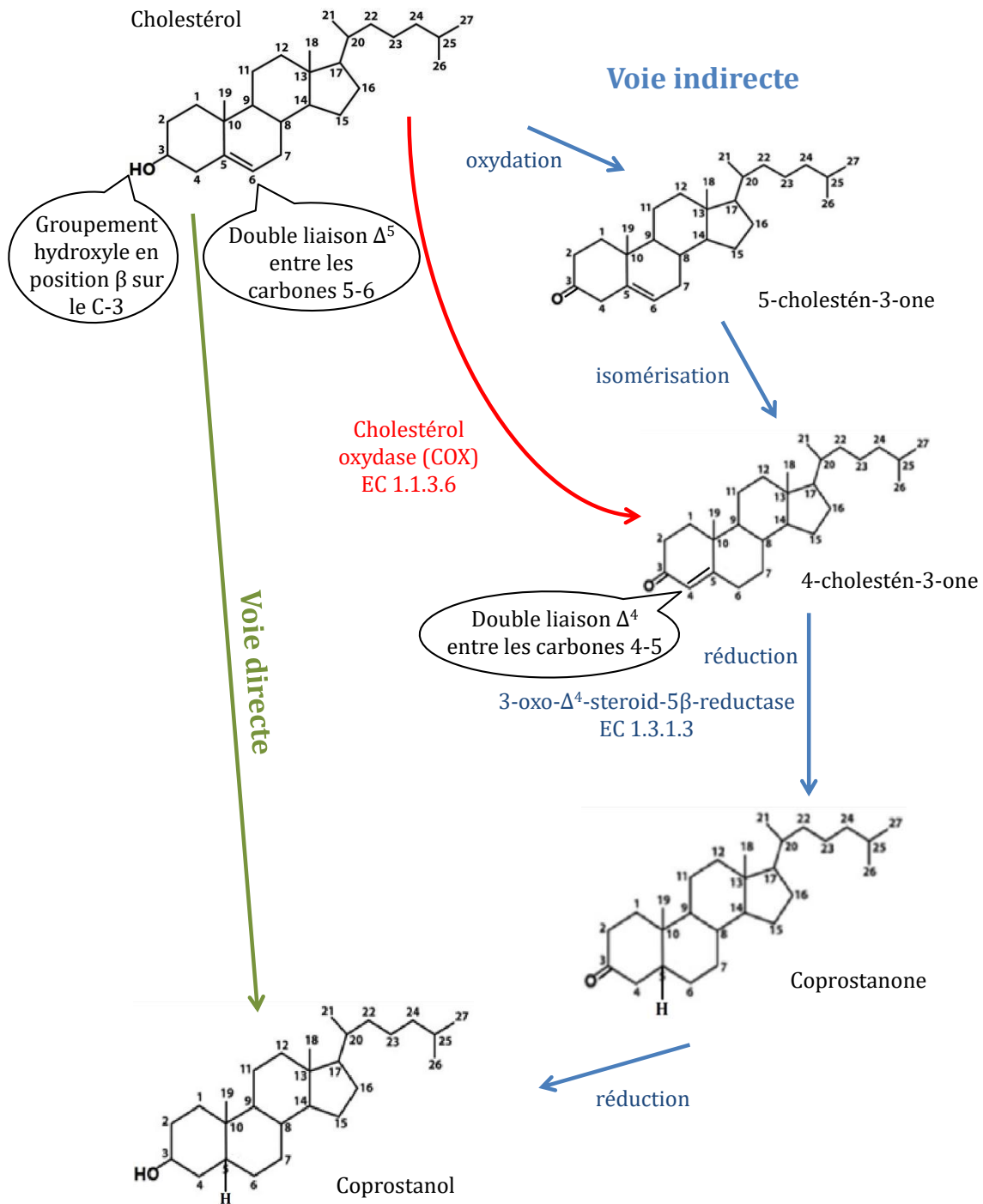


Figure 13 : Présentation des voies directe et indirecte du métabolisme de conversion du cholestérol en coprostanol

Il existe quelques indices pour décrire la ou les voie(s) métabolique(s) de conversion du cholestérol en coprostanol mais à ce jour, aucun gène ou enzyme n'a été directement relié à ce métabolisme. Nous allons maintenant décrire les effets possibles de ce métabolisme sur l'hôte.

2.3.3.7 Les effets potentiels sur l'hôte de la conversion du cholestérol en coprostanol

Les études analysant les effets sur l'hôte de la conversion du cholestérol en coprostanol par le microbiote intestinal sont assez sporadiques. Les effets potentiels recensés sont un effet hypocholestérolémiant, centre de ce projet de thèse ; un rôle potentiel mais non démontré dans le cancer du côlon et un effet œstrogène-mimétique anecdotique chez la moule.

2.3.3.7.1 Effet hypocholestérolémiant

Les premiers constats d'un lien entre la production de coprostanol fécale et le taux de cholestérol sanguin ont été faits chez l'Homme. Dans les années 1980, Sekimoto *et al.* (1983) ont montré une corrélation inverse entre les niveaux de cholestérol sanguins et le ratio coprostanol/cholestérol dans les selles humaines (Sekimoto *et al.* 1983). En transformant le cholestérol en coprostanol, les bactéries coprostanoligènes du microbiote intestinal diminuent la quantité de cholestérol disponible à l'absorption intestinale et/ou à la réabsorption entéro-hépatique. Ce mécanisme pourrait réduire l'entrée du cholestérol dans le réservoir de cholestérol du corps humain et plus particulièrement le cholestérol sanguin expliquant l'observation de Sekimoto *et al.* (1983). De plus, le foie, privé de cet apport, pourrait diriger son pool de cholestérol vers la bile plutôt que vers le sang (Li *et al.* 1995).

Après l'isolement des premières bactéries coprostanoligènes, des essais ont été menés sur différents modèles animaux axéniques ou non. L'étude de Eyssen et Parmentier (1974) a montré que la co-inoculation de *Eubacterium* ATCC 21408 avec *Clostridium* CI-8 chez des rats axéniques permettait la conversion de 70 % du cholestérol en coprostanol. Ce métabolisme n'a pas été associé à une modification du contenu en cholestérol aussi bien dans le foie que dans le sérum (Eyssen & Parmentier, 1974). La souche *Eubacterium coprostanoligenes* a été testée dans trois conditions différentes, chez trois modèles animaux différents. Dans une première étude, 6 lapins blancs Néo-Zélandais sont rendus hypercholestérolémiques par un régime riche en cholestérol (0,1 %) administré du 37^{ème} au 94^{ème} et dernier jour d'expérimentation (figure 14). Après 50 jours d'expérience, ils sont séparés en deux groupes de manière aléatoire. Le groupe test (3 lapins) reçoit alors 4 mL de *E. coprostanoligenes* à 2.10^7 UFC/mL/jr pendant 10 jours. Le groupe contrôle (3 lapins) reçoit la même solution mais bouillie (bactéries détruites par la chaleur). Après 10 jours d'administration bactérienne (de J50 à J60), une différence de cholestérolémie peut être observée entre les deux groupes (figure 14). Du 61^{ème} au dernier jour d'expérimentation (les lapins ne reçoivent plus de bactéries), le cholestérol plasmatique moyen du groupe test est de $183,3 \pm 6,8$ mg/dL alors que celui du groupe contrôle est de $248,8 \pm 11,7$ mg/dL (figure 14). L'effet perdure dans le temps même après l'arrêt de l'administration de la souche. *E. coprostanoligenes* présente donc un effet hypocholestérolémiant dans ces conditions.

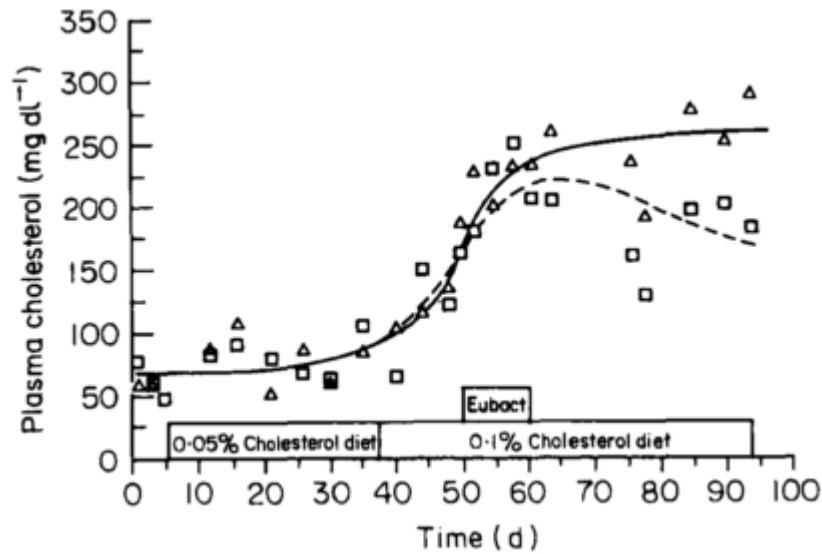


Figure 14 : Concentration du cholestérol plasmatique des groupes de lapins hypercholestérolémiques test (□) et contrôle (Δ)

Les 10 jours où *Eubacterium coprostanoligenes* est donné sont indiqués par « Eubact » sur la figure. Chaque point représente les moyennes des données de trois lapins (L Li et al. 1995).

A la fin de l'expérimentation, le coprostanol est détecté dans le jéjunum et l'iléon, lieu de la réabsorption entéro-hépatique du cholestérol. La détection du coprostanol montre que la bactérie a pu coloniser ces segments du tractus digestif ou tout du moins qu'elle y a été suffisamment longtemps pour pouvoir exprimer son activité coprostanoligène (Li et al. 1995). Dans une seconde étude, 10 poules pondeuses conventionnelles avec une cholestérolémie normale reçoivent 0,5 mL de *E. coprostanoligenes* à environ 2.10^7 UFC/mL/jr pendant 4 semaines. L'implantation de la bactérie et la production de coprostanol sont confirmées mais le taux de cholestérol plasmatique n'est pas affecté. Plusieurs hypothèses peuvent en partie expliquer ce phénomène : i) une différence de métabolisme du cholestérol chez les oiseaux ; ii) une température corporelle plus élevée (42°C) affectant la croissance de *E. coprostanoligenes* et la production de coprostanol et iii) un temps de transit dans le tractus digestif plus court que chez les lapins (Li et al. 1996). Enfin, un effet hypocholestérolémiant transitoire est observé chez la souris axénique. Ces animaux gavés avec *E. coprostanoligenes* tendent à avoir une cholestérolémie sérique plus faible que celle des animaux axéniques contrôles ayant reçu la bactérie tuée (bouillie). Cette différence n'est significative que lorsque l'on compare le point juste avant ($230,5 \pm 7,8$ et $219,4 \pm 7,1$ mg/dL pour les groupes expérimental et contrôle respectivement) et celui juste après gavage ($204,9 \pm 5,3$ et $213,7 \pm 5,9$ mg/dL pour les groupes expérimental et contrôle respectivement). Les auteurs expliquent l'effet transitoire sur la cholestérolémie et sur la production de coprostanol (disparition du coprostanol des selles trois semaines après le premier gavage) par la présence d'une quantité importante d'oxygène dans le tractus des animaux axéniques. Ceci pourrait empêcher l'implantation et la croissance de *E. coprostanoligenes* (Li et al. 1998).

En conclusion, après une étude sur des lapins conventionnels hypercholestérolémiques montrant un effet hypocholestérolémiant de la souche, les tests sur des poules pondeuses conventionnelles n'ont pas confirmé cette observation et les essais sur des souris axéniques n'ont pu être menés à bien faute de colonisation du tractus digestif de la souris.

Plus récemment, un consortium (MicholAther) constitué par mon laboratoire d'accueil et l'UMR-S939 de l'INSERM de la Pitié-Salpêtrière ont évalué la cholestérolémie et la production de coprostanol chez une cohorte de 85 individus. Cette population se distribue en HP (65 individus) et BP (20 individus). Ces individus présentent également une différence significative de la cholestérolémie. En effet, les HP ont en moyenne un taux de cholestérol sanguin 20 % plus faible que celui des individus BP (données non publiées, figure 15A.). Cette étude a été poursuivie par des tests de transfert de microbiote chez la souris. Trois microbiotes de chacun des groupes (HP et BP) ont été sélectionnés selon des critères de reproductibilité (phénotype conservé au cours du temps) et de représentativité (les plus forts producteurs de coprostanol avec une cholestérolémie parmi les plus basses parmi les HP et les plus faibles producteurs de coprostanol avec une cholestérolémie parmi les plus élevées chez les BP) afin d'optimiser la possibilité de voir un effet entre le taux de production de coprostanol et la cholestérolémie. Ces microbiotes ont été transférés chez 10 souris C57BL/6 ApoE KO traitées aux antibiotiques soit 30 souris par phénotype et 60 souris au total. Les souris conservent le même profil de conversion du cholestérol en coprostanol que leurs donateurs respectifs. Plus important, les souris HP (ayant reçu le microbiote de donateurs HP) ont en moyenne un taux de cholestérol 20 % plus faible que les souris BP (ayant reçu le microbiote de donateurs BP) (figure 15B.). Cette étude constitue un indice supplémentaire du lien entre la production de coprostanol retrouvé dans les selles et le taux de cholestérol sanguin même si le transfert d'un microbiote complexe ne permet pas de conclure quant au lien de causalité entre ces deux facteurs. En revanche, il met en évidence l'influence du microbiote intestinal sur la cholestérolémie.

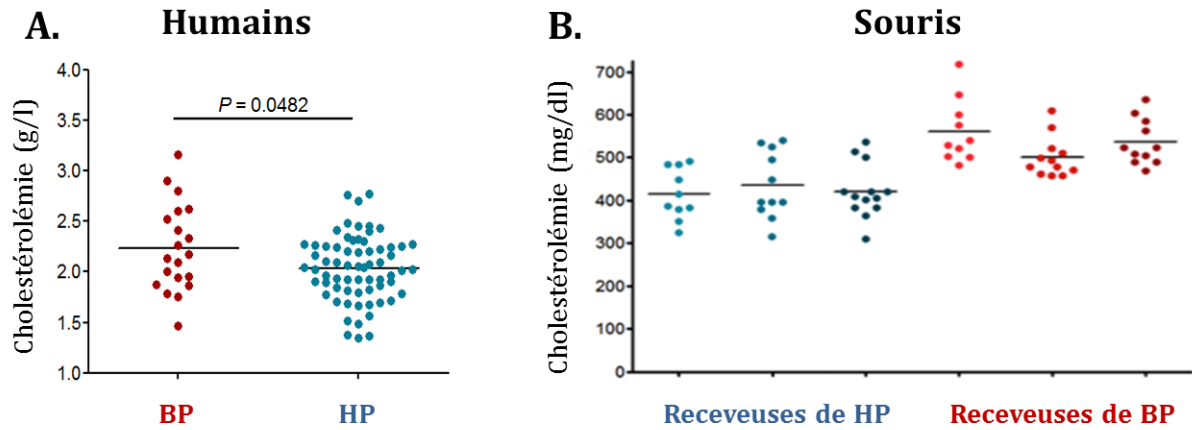


Figure 15 : Cholestérolémie et profil de production de coprostanol d'une cohorte humaine de 85 personnes (A.) et de 60 souris C57BL/6 ApoE KO traitées aux antibiotiques et associées à un microbiote intestinal issu d'individus bas producteurs de coprostanol, en rouge ou d'individus hauts producteurs de coprostanol, en bleu (B.)

BP : Bas producteurs de coprostanol rouge chez les humains et les souris et HP : Hauts producteurs de coprostanol en bleu chez les humains et les souris. Les barres horizontales représentent la moyenne de chaque groupe.

2.3.3.7.2 Rôle potentiel dans le cancer du côlon

Il a été suggéré dans les années 1970 que le coprostanol pouvait avoir des effets pro-carcinogènes et pouvait promouvoir le cancer colorectal (Reddy et al. 1977). En fait, c'est la sécrétion de stérols neutres fécaux qui a été associée de manière plus ou moins forte au développement de cancers-colorectaux. Reddy *et al.* (1977) constatent que les patients atteints de colites ulcéraives présentent plus de risques de développer des cancers colorectaux. Ceux-ci présentent une augmentation de l'excrétion fécale de coprostanol mais aussi d'autres dérivés du cholestérol comparée aux personnes saines (Reddy et al. 1977). Toutefois, Wilkins et Hackman n'ont trouvé aucune corrélation entre la production de coprostanol et la sensibilité au cancer colorectal sur leur cohorte (Wilkins & Hackman 1974). Plus tard, Peuchant *et al.* (1987) ont montré que les stérols neutres fécaux étaient plus élevés chez les personnes ayant un cancer du côlon ($57,3 \pm 2,4$ mmol/kg de fèces) comparés aux personnes saines ($36,9 \pm 3,5$ mmol/kg de fèces). Cependant, les auteurs ne trouvent pas de corrélation directe entre la présence de coprostanol et le développement du cancer du côlon. De plus, ils n'observent pas de coprostanol mais seulement du cholestérol dans les tissus abimés (Peuchant et al. 1987). Aucune de ces études n'a étudié en détail le régime alimentaire des individus étudiés. En effet, ils sont tous en régime mixte de type Western diet (Reddy et al. 1977; Wilkins & Hackman 1974; Peuchant et al. 1987). L'augmentation des stérols neutres fécaux a été corrélée à l'augmentation du cholestérol alimentaire (Reddy et al. 1998) associée à un régime riche en produits animaux (notamment viande rouge et graisses animales) qui pourraient être un facteur de risque dans le développement du cancer colorectal.

Dans une première partie de leur étude, Panda *et al.* (1999) montrent une corrélation positive entre la quantité de coprostanol dans les selles et le nombre de tumeurs au niveau du côlon de rats traités au DMH (1,2-diméthyl hydrazine, promoteur du cancer du côlon). Cependant, après traitement de ces rats à la néomycine pour éliminer les bactéries coprostanoligènes ; ils obtiennent des résultats contrastés : la néomycine a tendance à aggraver ou à diminuer le nombre de tumeurs dans le tube digestif des rats. Ils ne confirment pas l'association coprostanol/nombre de tumeurs (Panda *et al.* 1999).

En résumé, les études montrent que les personnes atteintes de cancers colorectaux tendent à avoir plus de stéroïdes neutres fécaux dans les selles (Reddy *et al.* 1977; Peuchant *et al.* 1987) ce qui peut être corrélé au régime alimentaire (Reddy *et al.* 1998). Cependant, l'implication du coprostanol dans ces phénomènes cancéreux n'est pas claire et aucune relation directe de cause à effet n'a été démontrée à ce jour.

2.3.3.7.3 Effet œstrogène-mimétique

Le coprostanol comme déchet retrouvé dans les effluents d'eaux usées (Sherwin *et al.* 1993) peut s'accumuler dans les tissus mous des organismes marins en aval de ces rejets, notamment dans les tissus mous de la moule (Sherwin *et al.* 1993 ; Gagné *et al.* 2002). Chez la moule *Elliptio complanata*, le coprostanol pourrait avoir un effet œstrogène-mimétique à forte dose (EC50=1mM). Cette effet n'est pas retrouvé sur les cellules cancéreuses humaines (seins) testées (Gagné *et al.* 2001). La même équipe a travaillé sur les effets immuno-toxiques du coprostanol sur le modèle de la moule et ont classé la molécule dans la catégorie des composés à faible risque (Gagné *et al.* 2006).

3. HYPOTHESES ET OBJECTIFS D'ETUDE

La revue bibliographique présentée dans le chapitre précédent souligne la pertinence de l'étude du microbiote intestinal en tant que nouvelle cible pour moduler certains paramètres physiologiques de l'hôte et en particulier la cholestérolémie. Plus précisément, le mécanisme peu étudié de la conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal est une cible intéressante. Après les premiers constats de la réduction du cholestérol en coprostanol dans les selles de différents mammifères, l'isolement de souches bactériennes ayant cette activité a été engagée. Cependant, à ce jour, seule une bactérie isolée à partir de selles humaines est connue. De plus, la ou les voie(s) de conversion du cholestérol en coprostanol ne sont pour l'instant que des hypothèses et les gènes impliqués dans ce métabolisme sont inconnus. Enfin, les individus HP semblent avoir une cholestérolémie plus faible que les individus BP mais pour le moment il n'y a pas de lien de causalité établi entre la production de coprostanol et la cholestérolémie. C'est pourquoi cette étude s'articule autour de trois axes principaux :

1) Quelles bactéries convertissent le cholestérol en coprostanol ?

Les souches possédant cette activité disponibles jusqu'à présent se montrent difficiles à isoler et à cultiver (milieux complexes, peu de biomasse). Dans un premier temps, le but de cette étude est donc d'isoler et d'identifier de nouvelles bactéries convertissant le cholestérol en coprostanol facilement utilisables en laboratoire et pouvant coloniser le tractus gastro-intestinal de la souris. Pour cela, l'isolement se fera à partir de selles d'un donneur HP et différents milieux seront utilisés pour optimiser la production de coprostanol.

2) Quels sont les gènes bactériens impliqués dans la voie de conversion du cholestérol en coprostanol ?

Deux voies de synthèse ont été envisagées pour cette transformation, une voie directe et une voie indirecte (figure 13). Malgré plusieurs approches envisagées par d'autres équipes (Li 1995) et la nôtre (comparaison de génome), aucun résultat satisfaisant n'a pu être mis en évidence. Notre stratégie consiste à construire des banques génomiques à partir de souches productrices de coprostanol puis de les cribler pour la production de coprostanol. Enfin, nous voudrions trouver les gènes voire les enzymes impliqués dans la ou les voie(s).

3) Quel est l'impact de ce métabolisme bactérien sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte ?

Il existe quelques études reliant la production de coprostanol dans les selles et une faible cholestérolémie, cependant, ces études montrent des corrélations mais pas de lien de cause à effet. Dans un troisième temps, cette étude propose d'utiliser des animaux mono-colonisés (monoxéniques) avec des souches bactériennes produisant du coprostanol et sous un régime riche en cholestérol. Ceci afin de montrer un lien direct entre la production bactérienne de coprostanol dans l'intestin et le métabolisme du cholestérol chez l'hôte. Nous espérons ainsi apporter des réponses quant à l'impact de cette activité sur la cholestérolémie de l'hôte.

MATERIELS ET METHODES

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 Isolement et identification de souches réduisant le cholestérol en coprostanol

Compte tenu de la densité de bactéries sensibles à l'oxygène dans les échantillons de selles, le point limitant est souvent le temps d'exposition à ce gaz qui doit être minimisé. Une fois les conditions anaérobies atteintes, la méthode est semblable d'une étude à l'autre (Eyssen et al. 1973; Sadzikowski et al. 1977; Brinkley et al. 1982; Gérard et al. 2007). Des dilutions décimales successives sont réalisées à partir d'échantillons fécaux ; certaines dilutions sont étalées sur boîtes puis après un temps d'incubation permettant l'apparition de colonies, celles-ci sont repiquées en milieu liquide et parfois diluées à nouveau pour obtenir une culture pure, vérifiée par un isolement sur boîte de pétri. Dans le cas de la production de coprostanol, une fois la pureté vérifiée, les cultures liquides sont utilisées pour effectuer une extraction de stérols afin de détecter la production du composé par chromatographie.

4.1.1 Isolement des souches commensales

Un individu masculin en bonne santé avec une cholestérolémie normale (inférieure à 2 g/L) et haut-producteur de coprostanol (ratio coprostanol/cholestérol égal à 98 %) est venu à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Jouy-en-Josas. Ses selles ont été récupérées dans un pot contenant un sachet d'anaérobiose AnaeroGen™. Celui-ci est composé d'acide ascorbique et de charbon activé qui permettent la diminution du taux d'oxygène. Il atteint alors moins de 1 % en 30 min dans une atmosphère confinée. Ces selles fraîches sont ensuite transférées en chambre de Freter (90 % N₂, 5 % H₂, 5 % CO₂) pour limiter au maximum le contact avec l'oxygène (figure 16). Elles sont ensuite pesées et diluées comme suit : 1 g de selles dans 10 mL de milieu liquide LYHBHI (composition disponible dans le tableau 5). Après une faible centrifugation, 1 mL du surnageant contenant les bactéries est prélevé et dilué de manière successive de 10⁻² à 10⁻¹⁰ dans 9 mL de milieu liquide LYHBHI. Les différentes dilutions sont ensuite étalées sur boîte de milieu LYHBHI solide (LYHBHI liquide additionné de 14 g/L d'agar). Les colonies sont ensuite striées individuellement sur des boîtes de LYHBHI fraîches afin d'obtenir un seul type de colonie par boîte (figure 16). Toutes ces manipulations sont réalisées en chambre de Freter (figure 17) et les milieux utilisés (liquides et solides) sont pré-incubés dans cette chambre pour limiter le contenu en oxygène. Ces expériences ont été réalisées par Samira Boudebouze, assistante ingénieure et Moez Rhimi, chargé de recherche dans l'équipe Ife.

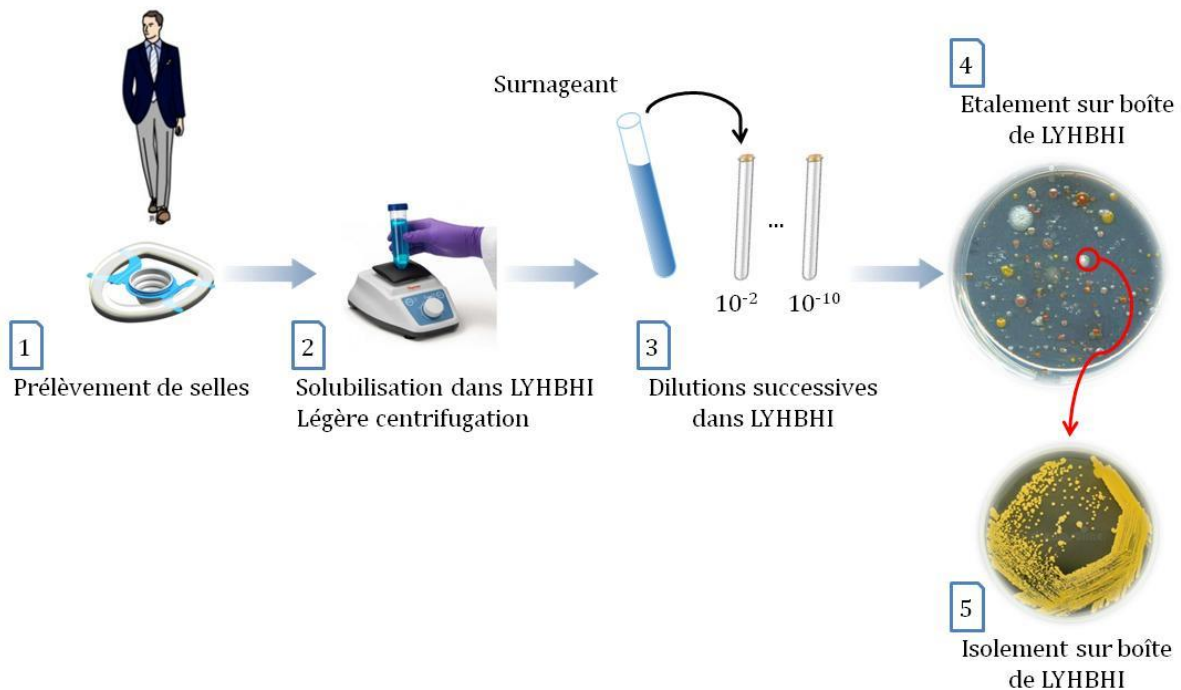


Figure 16 : Isolement de bactéries commensales

4.1.2 Milieux utilisés pour la culture des souches commensales et l'identification de celles produisant du coprostanol

Une fois isolées, les bactéries sont testées pour leur potentiel à produire du coprostanol sur 5 mL de trois milieux liquides dont les compositions sont définies dans le tableau 5.

Tableau 5 : Nom et composition des milieux utilisés pour la croissance des souches commensales nouvellement isolées et pour la mesure de production de coprostanol

Nom du milieu dans la suite du manuscrit	Composition pour 1 L
LYHBHI	Infusion cœur cerveau 37 g, extrait de levure 5 g et hémine 5 mg.
L-DON	Casitone 10 g, extrait de levure 10 g, CaCl ₂ .2H ₂ O 0,5 g, thioglycolate de sodium 0,5 g, résazurine 1 mL, acide pyruvique 1 g.
M17 glucose	Digestion pancréatique de caséine 5 g, peptone de soja 5 g, extrait de bœuf 5 g, extrait de levure 5 g, acide ascorbique 0,5 g, Mg SO ₄ 0,25 g, β-glycérophosphate di-sodique 19 g, glucose 5 g et hémine 5 mg.
M104 +/- vitamine K ₁	Peptone trypticase 5 g, peptone 5 g, extrait de levure 10 g, extrait de bœuf 5 g, glucose 5 g, K ₂ HPO ₄ 2 g, tween 80 1 mL, résazurine 1 mg, cystéine-HCl 7H ₂ O 0,5 g et hémine 5 mg.

Pour la détection de l'activité « production de coprostanol », ces milieux sont additionnés d'un mélange de cholestérol et de phosphatidylcholine préparé comme suit : 0,2 g/L de cholestérol et 1 g/L de phosphatidylcholine dans 50 mL d'eau stérile sont mis sous agitation pendant une nuit à 30°C. Ce mélange est ensuite ajouté à la fraction principale du milieu avant de subir deux cycles d'autoclavage à 120 °C pendant 20 min

Les cultures sont ensuite réalisées en chambre anaérobie présentée dans la figure 17.

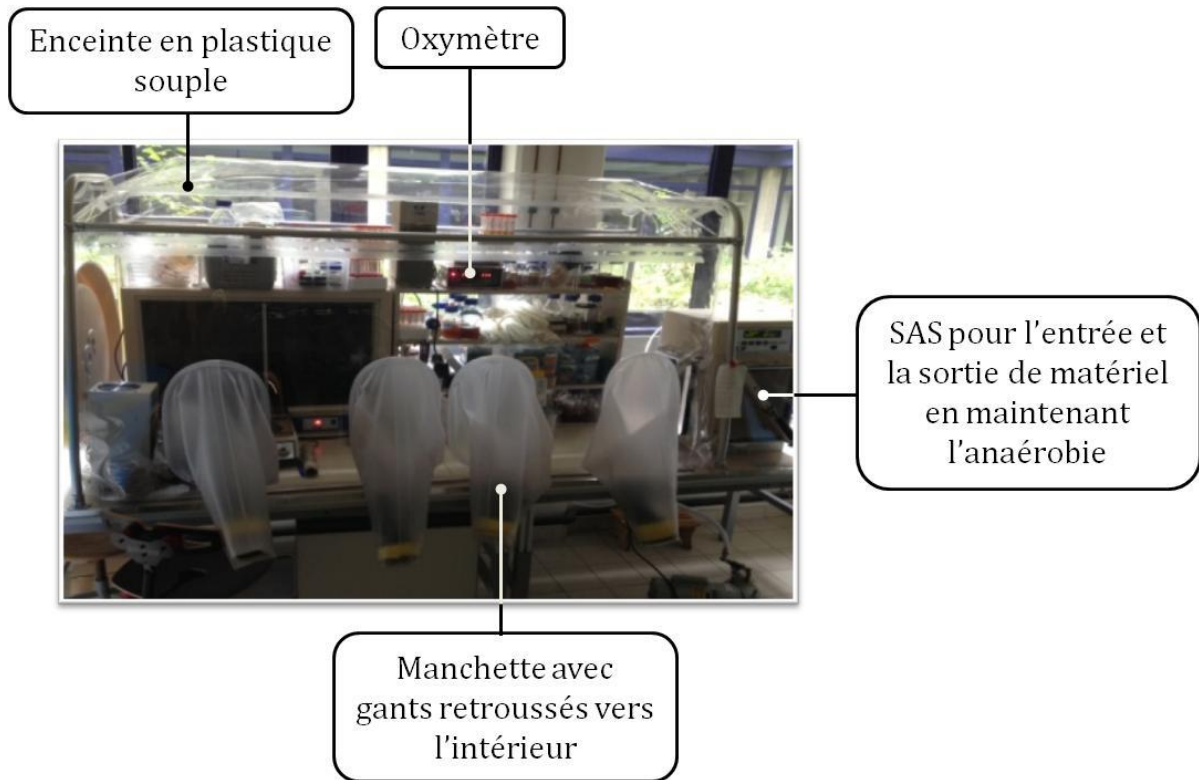


Figure 17 : Principaux composants permettant de maintenir l'anaérobiose dans une chambre anaérobie aussi appelée chambre de Freter

En plus de ces éléments, l'anaérobiose est maintenue grâce au palladium qui transforme l'oxygène en eau qui est ensuite piégée par des grains de silice.

4.1.3 Identification des souches bactériennes produisant du coprostanol

4.1.3.1 Extraction des stérols

L'extraction des stérols est un processus qui suit plusieurs étapes résumées dans le tableau 5. La première est l'extraction des lipides totaux de l'échantillon, la seconde est une étape de saponification pour casser les liaisons esters et libérer les stérols qui sont extraits dans une troisième étape. La méthode utilisée ici est une technique adaptée de Bligh et Dyer (Bligh, E.G. and Dyer 1959). Les échantillons subissent un dernier traitement pour faciliter leur passage en chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée au spectromètre de masse (MS) : une dérivatisation par silylation, permettant une meilleure volatilité des composés.

Tableau 6 : Extraction des stérols

Etapas de l'extraction	Méthodes/Principes/Eléments de protocole
1. Solubilisation et extraction	<p><u>Méthode</u> : Extraction liquide/liquide</p> <p><u>Principe</u> : L'extraction liquide/liquide est la mise en contact d'un mélange binaire avec un troisième liquide non miscible (solvant) et retenu pour extraire préférentiellement un composé du mélange. Après décantation, deux phases sont observées : l'extrait enrichi en soluté et le raffinat appauvri en soluté.</p> <p><u>Protocole</u> : Le mélange binaire est représenté par 500 µL de culture en milieux LYHBHI, L-DON et M17 glucose (tableau 5) +CH/PC additionnés de 10 µL de 5α-cholestane à 100 µg/mL (standard interne). Un blanc est effectué avec 500 µL d'eau stérile. Le solvant est le réactif de Folch composé de méthanol-chloroforme (1:2). Après un mélange par vortex, la décantation est réalisée par une centrifugation. La phase organique située en position inférieure du mélange représente l'extrait enrichi en lipides et en stérols. Il est ensuite séché aux vapeurs d'azote.</p>
2. Saponification	<p><u>Méthodes</u> : Saponification continue à chaud</p> <p><u>Principe</u> : La saponification est une hydrolyse en milieu basique formant un ion carboxylate et un alcool à partir d'un ester.</p> <p><u>Protocole</u> : La réaction se fait à 60 °C pendant 1 h en présence d'une base forte, le KOH dissout dans du méthanol. Celui-ci sert en fait de tensioactif pour favoriser la rencontre du KOH (hydrophile) avec les stérols estérifiés (plutôt hydrophobes). L'ajout d'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) va favoriser la réaction en chélatant les ions divalents présents dans le mélange. Le BHT (hydroxy-toluène butylé), un puissant antioxydant est ajouté à la réaction pour éviter l'oxydation des lipides sous l'effet de la chaleur.</p>

<p>3. Extraction</p>	<p><u>Méthode</u> : Extraction liquide/liquide</p> <p><u>Principe</u> : cf 1^{ère} étape de ce tableau</p> <p><u>Protocole</u> : Le mélange binaire est représenté par le mélange utilisé pour la saponification additionné d'eau stérile. Le solvant utilisé pour l'extraction est l'hexane di-éthyléther (1:1). Comme dans la première étape, un mélange par vortex est suivi d'une centrifugation pour l'étape de décantation. La phase récupérée et séchée à la vapeur d'azote est la phase organique (en partie supérieure du mélange cette fois) enrichie en stérols.</p>
<p>4. Dérivatisation</p>	<p><u>Méthode</u> : Silylation</p> <p><u>Principe</u> : La silylation consiste à remplacer un hydrogène acide sur le composé initial par un groupe silyle et ici un groupe triméthylsilyle (-Si(CH₃)₃). Le composé à modifier est tout d'abord déprotoné avec une base forte. Il va ensuite réagir avec un chlorure de silyle permettant le changement de groupe chimique.</p> <p><u>Protocole</u> : Les échantillons sont tout d'abord dissous dans du cyclohexane. La réaction utilise ensuite deux réactifs de silylation particulièrement adaptés pour réagir sur les stéroïdes : le BSTFA (N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) et le TSMC (chlorure de triméthylsilyle). Le premier, très réactif va agir rapidement sur les composés, le second joue un rôle de catalyseur du premier. Les échantillons sont ensuite séchés à l'azote, repris dans du cyclohexane et conservés à -80 °C avant analyses en GC/MS.</p> <p><u>Avantages</u> : Les dérivés ainsi formés sont en général moins polaires, plus volatiles et plus stables thermiquement. De plus, en spectrométrie de masse, la silylation permet de produire de meilleurs schémas de fragmentation des ions aidant l'identification de composés retrouvés en traces dans les échantillons</p>

4.1.3.2 Dosage des stérols par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (GC/MS)

Historiquement, les études identifiant les souches productrices de coprostanol utilisaient la chromatographie sur couche mince (TLC) (Freier et al. 1994; Eyssen et al. 1973) puis les études plus récentes sont passées à la GC (Gérard et al. 2007).

La chromatographie est une technique de séparation des composés d'un mélange complexe reposant sur les différences d'affinités de ces composés avec deux phases non miscibles : une phase stationnaire (couche de silice pour la TLC et une colonne capillaire pour la GC) et une phase mobile (solvants pour la TLC et gaz pour la GC) (Ambrose & Ambrose 1961).

En GC/MS, le mélange est vaporisé en entrée de la colonne capillaire contenant la phase stationnaire et est transporté par la phase mobile (le gaz). Les différents composés vont se séparer et sortir de la colonne successivement à des temps différents appelés temps de rétention. Un composé avec peu d'affinité pour la colonne sortira avant un composé avec une forte affinité. En sortie, les composés ainsi séparés vont être détectés par un spectromètre de masse. Ils vont être ionisés par le passage au travers d'un champ électronique généré entre une cathode (filament chaud) et une anode. Cette technique s'appelle l'ionisation électronique ou EI. L'interaction entre les composés et les électrons libres ainsi créés conduit à la formation d'ions. Ceux-ci sont ensuite séparés sous l'effet d'un champ magnétique généré par un quadripôle. Cette étape constitue en fait une filtration des ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Les ions sélectionnés atteignent le détecteur qui va d'abord convertir les ions en un signal électrique puis amplifier le signal obtenu pour le traitement informatique et la formation de spectres (Silverstein et al. 2005) (figure 18).

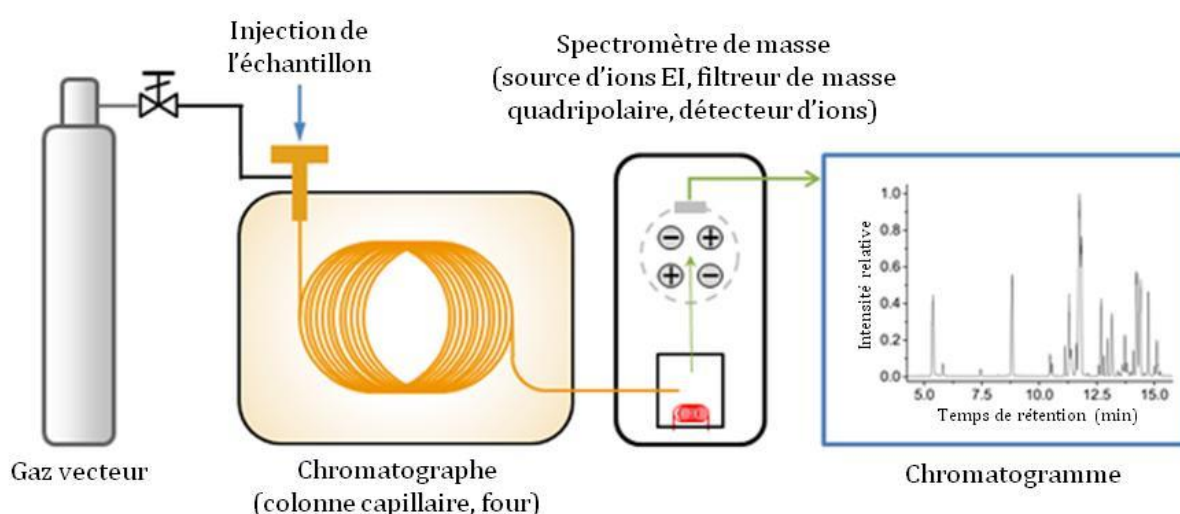


Figure 18 : Représentation schématique de la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse

Les analyses de GC/MS sont réalisées sur la plateforme lipidomique de l'Institut de Cardiométabolisme et Nutrition (ICAN), Paris, 13^{ème} arrondissement avec un appareil Thermo Fischer Scientific (TRACE 1310-ISG LT). Un volume de 0,3 µL d'échantillon est injecté avec un gradient de température de 250°C à 300°C. Le gaz vecteur est l'hélium et son débit dans la colonne est fixé à 1,2 mL/min. Le spectre de masse est fait à partir de 2 ions spécifiques de chaque composé : le premier est quantitatif (le plus sensible), le second est qualitatif. Le ratio de ces deux ions doit toujours être le même (écart de 20 % maximum) afin d'obtenir toujours la même molécule. L'acquisition des données est réalisée grâce au logiciel Xcalibur™ (Thermo Fischer Scientific). Une méthode prédéterminée par la plateforme analyse directement l'aire sous la courbe des pics bien formés sur les composés abondants mais pour les plus petits (comme le coprostanol), il faut le faire manuellement. D'après la plateforme, le seuil de détection du coprostanol est de 5 pg/µL. Ces analyses sont effectuées par Marie Lhomme, ingénieure Recherche & Développement à ICAN.

4.1.3.3 Analyses des données de GC/MS

Dans un premier temps les analyses sont directement menées par la plateforme ICAN qui compare les aires des pics de cholestérol et de coprostanol à celle du standard interne. Ensuite les échantillons sont comparés entre eux pour la production de coprostanol. Dans un second temps, nous analysons les données au sein de l'équipe Ife à l'aide de Microsoft® Office Excel 2007 et du logiciel gratuit RStudio version 3.3.1 pour les statistiques. Les tests statistiques effectués sont des ANOVA suivies quand il y a lieu d'un test de Tukey.

4.1.4 Identification taxonomique des souches commensales nouvellement isolées

4.1.4.1 Extraction d'ADN génomique

Le contenu cellulaire et l'ADN génomique des bactéries coprostanoligènes ou non, nouvellement isolées, a été obtenu selon une méthode de lyse cellulaire mécanique (Cell-D, Constant Systems Ltd.) puis d'une extraction de l'ADN au phénol/chloroforme avant une précipitation à l'éthanol.

Le principe du Cell-D (Constant Systems Ltd.) repose sur l'utilisation de la pression hydraulique pour casser les échantillons biologiques. L'échantillon est placé dans une chambre de cassage, une pression (dont l'intensité est contrôlable) va venir s'exercer sur cette chambre et pousser l'échantillon dans un tube. L'échantillon ainsi broyé va remonter dans une chambre de récupération située au-dessus de la chambre de cassage (figure 19).

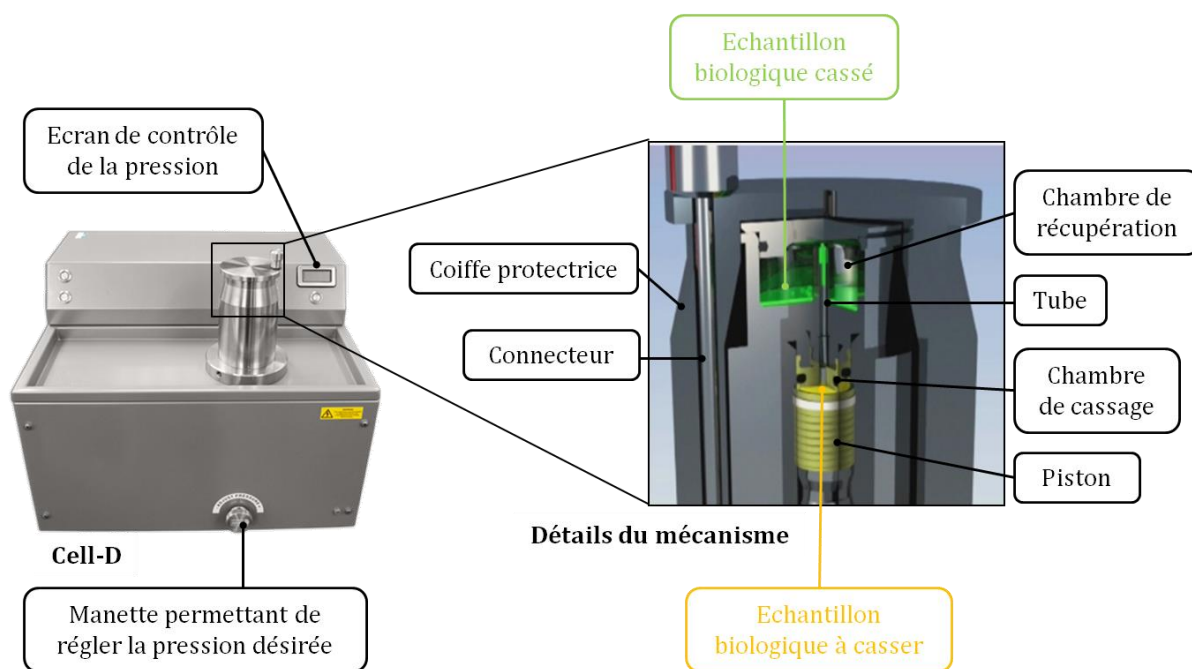


Figure 19 : Représentation du Cell-D et des détails du mécanisme de cassage.

D'après le site <http://www.constantssystem.com/products/oneshot.php>. Le connecteur permet le déclenchement de la montée en pression du piston et la coiffe, qui doit être maintenue par l'expérimentateur est une protection de l'appareil et des utilisateurs compte tenu de la pression exercée.

En fonction de la souche, la mise en culture est faite dans 50 mL de l'un des quatre milieux présentés dans le tableau 5. Après centrifugation, le culot est lavé deux fois avec 2 mL de tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM et KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) et ensuite repris dans 2 mL de tampon TE (10 mM Tris et 1 mM EDTA, pH 7,5). Les échantillons sont ensuite passés dans un broyeur cellulaire (Cell-D, Constant Systems Ltd.) avec deux tirs à 2,7 kilobars. Ils subissent ensuite une première phase d'extraction des ADN et ARN au phénol/chloroforme. Puis, un traitement à la RNase A (concentration finale de 200 µg/mL dans les échantillons) pendant 1 h à 37 °C est appliqué avant un second traitement à la protéinase K (concentration finale de 2 mg/mL dans les échantillons) pendant 2 h à 50 °C. Ensuite, une seconde extraction au phénol/chloroforme est appliquée aux échantillons. Enfin, l'ADN est précipité grâce à l'éthanol absolu et au NaCl 0,5 M pendant une nuit à -20 °C. Le culot contenant l'ADN est récupéré après une centrifugation puis repris dans 100 µL d'eau distillée. Les acides nucléiques absorbent à 260 nm alors que les protéines absorbent à 280 nm. Le NanoDrop (ThermoScientific) mesure le ratio de l'absorbance des échantillons à ces longueurs d'ondes dans le but de mesurer la pureté de l'ADN et sa contamination ou non avec des protéines (avec un ratio de ~ 1,8 l'ADN est considéré comme pur). Il mesure également la contamination par d'autres composés (phénol par exemple, utilisé dans l'extraction d'ADN) en calculant le ratio des absorbances à 260 nm et 230 nm (si celui-ci est aux alentours de 2-2,2, l'échantillon est considéré comme pur). Enfin, le NanoDrop (ThermoScientific) mesure la quantité d'ADN grâce à une version modifiée de la loi de Beer-Lambert en rapportant l'absorbance de l'échantillon à 260

nm à une concentration en ADN. Enfin, une mesure qualitative de la qualité d'ADN des échantillons est réalisée sur gel d'agarose à 0,8 %.

4.1.4.2 Amplification et séquençage de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S

Afin d'identifier l'espèce bactérienne à laquelle appartient l'ADN extrait, nous utilisons le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr). Le degré de diversité des séquences de ces gènes est faible entre les micro-organismes d'une même espèce, mais suffisamment élevé entre les micro-organismes d'espèces différentes (Woese 1987). Ce gène est composé de 8 régions très conservées et 9 régions hypervariables, V1-V9 (Baker et al. 2003) permettant de faire la distinction entre les espèces (Van de Peer et al. 1996). Une étude suggère l'utilisation des régions V1-V3 et V1-V4 pour l'identification de bactéries et des régions V1-V3 pour les *Archaea* (Kim et al. 2011). Les régions V4-V6 semblent elles plus optimales pour la distinction des phyla bactériens (Yang et al. 2016). Pour des raisons de rapidité, nous décidons de séquencer les régions V3-V4 de ce gène pour assigner les bactéries en cours d'étude à des genres voire des espèces.

La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) se fait selon les caractéristiques suivantes : dénaturation à 94 °C pendant 1 min, puis hybridation à 60 °C pendant 1min, amplification à 72 °C pendant 1 min avec un nombre de cycles égal à 30. La séquence des primers utilisés est disponible dans le tableau 7. Il est à noter que des modifications dans ce protocole (notamment température d'hybridation) ont été apportées lorsque cela s'est avéré nécessaire (faible quantité d'ADN, manque de pureté du fragment, etc.). Les molécules d'ADN amplifiées ont ensuite été envoyées à la société eurofins Genomics pour le séquençage.

Tableau 7 : Séquences des primers utilisés pour amplifier la région V3-V4 du gène codant pour l'ARNr 16S

Nom du primer	Séquence 5'-3'
Forward	5'-CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG
Reverse	5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT

4.1.4.3 Création de l'arbre phylogénétique

Les séquences sont reçues et analysées pour leur qualité (taille principalement). Ensuite, l'ADN complémentaire est obtenu à partir de la séquence dérivant de la sonde Reverse, puis les deux séquences (celle-ci et celle obtenue à partir de la sonde Forward) sont alignées pour obtenir la séquence entière des régions V3-V4 de l'ARNr 16s. Cette séquence est comparée aux bases de données NCBI (BLASTn). Dans certains cas, l'espèce est identifiée, dans d'autres seulement le genre et parfois, ni l'un ni l'autre n'ont pu être identifiés.

Ensuite, un arbre phylogénétique est créé à l'aide des outils disponibles sur <http://www.phylogeny.fr> afin de connaître la distance entre les souches productrices et les souches non productrices de coprostanol.

4.2 Les banques génomiques

4.2.1 Construction des banques génomiques

4.2.1.1 Définition d'une banque génomique

Une banque génomique est un ensemble de clones contenant des fragments d'ADN (appelés « inserts ») représentatifs d'un génome. Ces clones sont eux-mêmes contenus dans des hôtes (le plus souvent bactéries et surtout *E. coli* mais les levures peuvent également être utilisées). Une banque génomique se caractérise par la taille de l'insert, le type de vecteur utilisé et le nombre de clones qui la constitue. Elle permet d'avoir une copie « complète » du génome d'un organisme. Les banques génomiques offrent l'opportunité de cribler des fragments d'ADN dans le but de trouver des gènes impliqués dans un phénotype particulier. Elles mettent à disposition des séquences d'ADN pour de futures utilisations, dans d'autres objectifs.

4.2.1.2 Principe de la construction d'une banque génomique

La construction d'une banque génomique repose sur le cassage de l'ADN génomique en fragments. Ceux-ci sont ensuite ligués dans un vecteur. Le produit de cette ligation est transformé dans un hôte permettant ainsi d'obtenir des clones génomiques. Il existe plusieurs types de vecteurs qui se différencient par leur capacité à héberger de l'ADN « étranger » (tableau 8). Le choix du vecteur prend en compte la taille du génome étudié et la question scientifique associée qui déterminent en général la taille des fragments. Ces deux données (taille du génome et taille des fragments) servent à déterminer le nombre de clones nécessaire à un bon recouvrement du génome. C'est-à-dire le nombre de clones suffisant pour avoir au moins une fois toutes les séquences d'ADN du génome cible. Un autre critère de choix du vecteur peut aussi être la facilité d'emploi de ce vecteur couplée à l'hôte utilisé. Les chromosomes artificiels de levures (YAC) par exemple sont des vecteurs réservés aux levures.

Tableau 8 : Taille possible de l'insert en fonction du type de vecteur

Vecteur	Taille maximale de l'insert (kb)
Plasmides	20
Phages λ	25
Fosmides	40
Cosmides	45
Phages P1	100
BAC (chromosome bactérien artificiel)	300
YAC (chromosome artificiel de levure)	200-2000

4.2.1.3 Construction de la banque de *Bacteroides* sp. D8

La banque génomique de *Bacteroides* sp. D8 a été construite par le prestataire privé Libragen® dans la bactérie *E. coli* EPI100 et en utilisant des fosmides comme vecteurs pour l'ADN génomique. En effet, ils sont plus stables que les cosmides pour une taille d'insert similaire (environ 40 kb). Les fosmides ont moins de copies par bactérie favorisant la possibilité de copier des segments génomiques instables ou non clonables (éléments répétés, bases modifiées, etc.) dans d'autres vecteurs. Ceci augmente également la probabilité d'avoir une représentation complète du génome (Kim et al. 1992). La banque génomique de *Bacteroides* sp. D8 contient 768 clones

4.2.1.4 Construction de la banque de *Bacteroides* sp. BV

La bactérie *Bacteroides* sp. BV a été identifiée à partir de la campagne d'isolement décrite en paragraphe 3.1.1 comme souche productrice de coprostanol.

La banque génomique de *Bacteroides* sp. BV contient 2024 clones. J'ai participé à la construction de cette banque réalisée principalement par Aicha Kriaa, étudiante en Master 2 puis en thèse dans l'équipe Ife en 2014. Pour ce faire, le protocole du kit fourni par Epicentre, CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector, a été suivi. Les étapes sont résumées sur la figure 20.

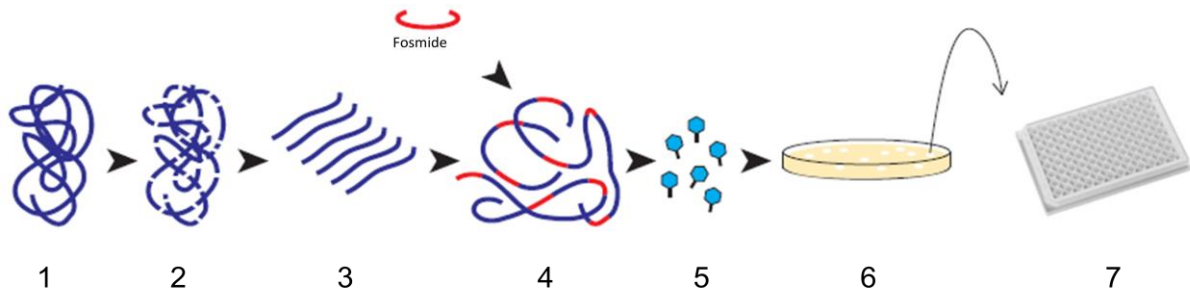


Figure 20 : Etapes de la construction de banques génomiques fosmidiques d'après le protocole epicentre CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector.
 1 : Extraction d'ADN génomique, 2 : Fragmentation mécanique de l'ADN, 3 : Sélection de la taille des fragments (environ 40kb), 4 : Ligation dans les fosmides, 5 : Empaquetage dans les phages λ et transformation chez *E. coli* EPI300, 6 : Etalement sur milieu sélectif LB + chloramphénicol 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 7 : Repiquage des colonies dans milieu neuf sur plaque 96 puits pour conservation à -80°C

La particularité de cette banque est que le nombre de copies du fosmide par bactérie est inductible.

4.2.2 Vérification de la robustesse des banques génomiques

La qualité d'une banque génomique se mesure par sa redondance (les fragments d'ADN contenus dans les inserts doivent être différents les uns des autres) et le recouvrement (la capacité de la banque à représenter le génome entier de l'organisme cible). Celui-ci se calcule de la manière suivante :

$$a = N \cdot \frac{L}{G}$$

Où N est le nombre de clones de la banque génomique, L la taille de l'insert et G la taille du génome de l'organisme cible. La probabilité P d'avoir un recouvrement satisfaisant ($P=0.99$) suit une loi de Poisson :

$$P = 1 - e^{-a} \Leftrightarrow N = -\frac{G \cdot \ln(1 - P)}{L}$$

Une probabilité P de 99 % signifie qu'il y a 99 % de chance que la banque contienne suffisamment de clones pour avoir toutes les séquences d'ADN de l'organisme cible dans la banque génomique.

4.2.2.1 Rapport d'analyse de la banque génomique de *Bacteroides* sp. D8

La société Libragen® nous a fourni un rapport qualité sur la banque de *Bacteroides* sp. D8 dont le génome fait environ 6 Mb. Celui-ci garanti la taille de 40 kb des inserts et la non redondance de la banque.

4.2.2.2 Analyse de la qualité des banques génomiques

La qualité des banques de *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV (génomés de 6 Mb environ) a été vérifiée sur 5 clones pris au hasard pour la D8 (conformément au rapport fourni par Libragen®) soit 0,65 % de la banque et 20 clones également pris au hasard pour la BV soit 0,99 % de la banque. La première étape est l'extraction de fosmides sur des cultures fraîches de bactéries. Cette étape est faite à partir de 10 mL de LB, chloramphénicol 12,5 µg/mL additionné de 20 µL de solution d'induction (seulement pour la banque BV dont le nombre de copies du fosmide est inductible) en suivant le protocole du kit FosmidMAX™ DNA Purification fourni par Epicentre. Le principe du kit repose sur la lyse chimique (alcaline) des bactéries, puis la précipitation des acides nucléiques grâce à l'isopropanol. L'ARN est ensuite digéré grâce à une RNase en solution dans un mélange fourni par le kit. Enfin, les impuretés sont éliminées et les fosmides sont précipités à l'aide d'éthanol. La seconde étape est la vérification de la quantité et de la qualité des fosmides par analyse au NanoDrop (ThermoFischer) et par migration sur gel d'agarose à 0,8%. Les fosmides sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction *HindIII* (1 site de restriction dans le fosmide pCC2FOS™).

4.3 Criblage fonctionnel des banques génomiques

4.3.1 Mise au point du criblage : Choix du milieu

Le choix du milieu pour le criblage est primordial, il doit permettre une biodisponibilité du cholestérol suffisante pour la production de coprostanol et celle-ci doit être détectable en GC/MS. La stratégie adoptée est double : tout d'abord tester des milieux standards pour la croissance de *E. coli* (Luria-Bertani et TB, tableau 9), organisme hôte des banques génomiques. Mais aussi tester le milieu utilisé pour l'isolement des bactéries commensales (LYHBHI) qui semble adapté à la production de coprostanol.

4.3.1.1 Détection du cholestérol dans les milieux frais

Notre but était de trouver un moyen simple et rapide de doser le cholestérol dans nos milieux pour deux raisons 1) connaître la quantité exacte de cholestérol disponible pour la réaction de conversion en coprostanol et potentiellement pouvoir calculer des rendements de production et 2) mettre en évidence une relation de corrélation entre consommation de cholestérol et production de coprostanol pour pouvoir remplacer la méthode de GC/MS qui est coûteuse et demande beaucoup de temps.

4.3.1.1.1 Milieux testés

Nous avons testé plusieurs protocoles d'ajout de cholestérol dans le milieu LB (Luria-Bertani) pour la croissance de la souche *E. coli*

Tableau 9 : Composition et protocole de réalisation des milieux supplémentés en cholestérol

Noms	Ajout à 1 L de LB	Protocole
LB.1	Cholestérol 0,2 g/L, phosphatidylcholine 1 g/L	Les composants sont ajoutés dans 50 mL d'eau stérile et mis sous agitation pendant une nuit à 30 °C. Ce mélange est ensuite ajouté à la fraction principale de milieu LB avant de subir deux cycles d'autoclavage à 120 °C pendant 20 min.
LB.2	Cholestérol 0,2 g/L, α -cyclodextrine 0,1 g/L	Le cholestérol est dissous dans 50 mL d'eau stérile sous agitation pendant une nuit à 30 °C. La cyclodextrine est ajoutée le lendemain et le mélange est additionné au milieu LB avant de subir deux cycles d'autoclavage à 120 °C pendant 20 min.
LB.3	Sérum de Veau 10 %	100 mL de sérum bovin (environ 0,31 g/L de cholestérol) est ajouté à 900 mL de LB et filtrer la préparation.
LB.4	Cholestérol 0,2 g/L, phosphatidylcholine 1 g/L sous forme de liposomes	Les composants sont dissous selon le même protocole que pour le milieu LB.1 mais dans 50 mL de LB et non dans l'eau distillée. Après les cycles d'autoclavage, la solution subit 10 cycles de congélation/décongélation : 10 min dans l'azote liquide/10 min dans un bain-marie à 65 °C et vortex entre chaque cycle. Ajouter à la fraction principale de milieu LB.

4.3.1.1.2 Tests réalisés

Nous avons utilisé le kit Amplex®Red fourni par Invitrogen. Ce kit peut détecter des concentrations en cholestérol allant de 80 ng/mL jusqu'à 2 mg/mL. Le principe est basé sur la détection de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) libéré lors de la conversion du cholestérol en cholesténone. Cette molécule va ensuite réagir avec un fluorophore, le 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine pour donner la résorufine qui possède une longueur d'onde d'excitation à 571 nm et une longueur d'onde d'émission à 585 nm (figure 21).

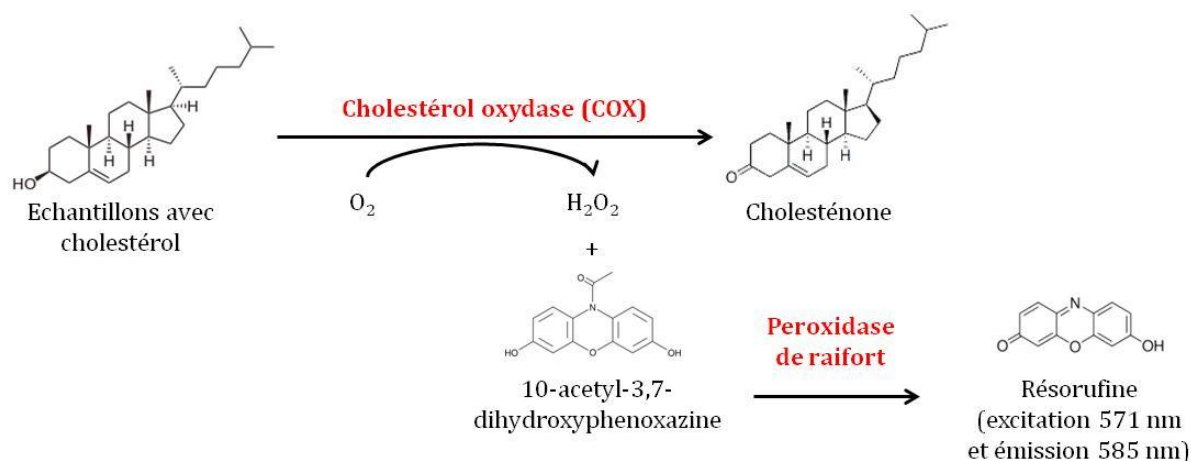


Figure 21 : Principe de détection du cholestérol par le kit Amplex®Red

Les enzymes indiquées en rouge ainsi que le réactif 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine sont fournis par le kit. La réaction est stoechiométrique ce qui permet de calculer la concentration en cholestérol à partir de la quantité de résorufine.

Le protocole est réalisé selon les recommandations du fournisseur. Dans un premier temps, des gammes étalons sont préparées par dilutions successives pour le cholestérol (entre 0 et 20 μ M), le peroxyde d'hydrogène (entre 0 et 20 μ M) et la résorufine (entre 0 et 20 μ M). Les échantillons sont dilués 150X dans du tampon de réaction (1X) pour atteindre une concentration entrant dans la courbe étalon (environ 200 μ g/mL dans les milieux). 50 μ L des échantillons et des standards pour le cholestérol et le peroxyde d'hydrogène sont disposés dans des puits séparés sur une microplaque. 50 μ L de la solution de réaction du kit sont ajoutés à chaque puits en semi-obscurité (le réactif est sensible à la lumière). Cette solution contient 300 μ M de réactif Amplex®Red, 2 U/mL de peroxydase de raifort, 2 U/mL d'oxydase de cholestérol et 0,2 U/mL d'estérase de cholestérol. La plaque est incubée à 37 °C durant 45 min. Pour la résorufine, 100 μ L de chaque dilution sont directement déposés dans des puits vides. La fluorescence est mesurée avec le Synergy 2 BioTek® aux longueurs d'ondes correspondantes à la résorufine (excitation 571 nm et émission à 585 nm). Pour chaque point, l'appareil corrige la valeur par le bruit de fond obtenu dans le puits avec tous les réactifs mais sans cholestérol.

4.3.1.2 Choix d'un témoin pour la biodisponibilité du cholestérol

Après ces expériences, la biodisponibilité du cholestérol est apparue comme un facteur déterminant de l'étude. Un témoin positif pour ce critère a donc été recherché. Nous avons sélectionné dans la littérature une souche de *E. coli* BL21 portant un plasmide pET24b(+) codant pour une cholestérol oxydase (COX). Cette enzyme issue de la souche *Brevibacterium sterolicum*, est connue pour transformer le cholestérol en cholesténone (figures 13 et 21). La souche de *E. coli* contenant le plasmide a été fournie par l'équipe italienne (Département des sciences moléculaires et des biotechnologies, Université de l'Insubrie, Varèse, Italie) qui a cloné le gène (Volontè et al. 2010). La particularité de cette souche est d'avoir une production d'enzyme optimale dans le milieu dit « TB », un milieu LB légèrement modifié dont la composition se trouve dans la première ligne du tableau 10. Après réception de la souche sous forme de boîte de pétri LB + kanamycine (30 µg/mL), une dizaine de colonies sont repiquées en milieu liquide TB + kanamycine (30 µg/mL). Trois sont choisies au hasard pour subir une extraction de plasmide et un séquençage (eurofins Genomics) afin de vérifier la séquence du gène. Puis ces cultures sont mises en collection et conservées à -80 °C pour des utilisations ultérieures.

4.3.1.3 Suivi de croissance des souches de *E. coli*

Sur la base de nos résultats et pour des considérations techniques, la méthode retenue pour l'apport du cholestérol dans le milieu est une version modifiée de celle expliquée en première ligne du tableau 9. L'eau stérile est en effet remplacée par le milieu souhaité (TB ou LYHBHI, tableau 10) stérile.

Avant de commencer le criblage, nous avons voulu vérifier quelques hypothèses : 1) Une pré-culture n'est pas nécessaire à l'obtention d'une biomasse suffisante ; 2) La présence d'un fosmide n'influence pas la croissance de ces souches ; 3) La présence du mélange CH/PC et 4) Le mode de stérilisation du milieu influence(nt) potentiellement la croissance de ces bactéries.

4.3.1.3.1 Suivi de l'absorbance à 600 nm sur la souche *E. coli* EPI300

Ici nous voulons voir si une pré-culture influence ou non la production de biomasse. Des souches de *E. coli* EPI300 sans fosmide sont striées sur LB puis inoculées dans 5 mL des six milieux présentés dans le tableau 10. L'absorbance est ensuite mesurée toutes les heures pendant 20 h. Pour les mesures avec pré-culture, le protocole est le même sauf que les milieux sont inoculés à partir de cultures liquides fraîches de 15-16 h (une nuit à 37 °C sous agitation). L'absorbance à 600 nm initiale est d'environ 0,1. Les cultures sont faites en triplicats pour chaque milieu.

Tableau 10 : Milieux utilisés pour le suivi de croissance et les tests préliminaires en GC/MS

Nom	Composition pour 1 L	Type de stérilisation
TB	Tryptone 12 g, extrait de levure 24 g, glycérol (100 %) 8 mL, KH ₂ PO ₄ 16 mM et K ₂ HPO ₄ 51 mM	Filtration sur filtre 0,22 µm
TB CH/PC	Idem TB + Cholestérol 0,2 g et phosphatidylcholine 1 g	TB filtré sur filtre 0,22 µm Solution mère CH/PC 2 fois à 120°C pendant 20min Rassemblement de ces deux fractions
TB CH/PC*	Idem TB CH/PC	Mélange TB filtré + solution CH/PC et stérilisation 2 fois 120°C pendant 20 min
LYHBHI	<i>Cf</i> ligne 1 tableau 5	Stérilisation standard 120°C, 20 min
LYHBHI CH/PC	Idem LYHBHI + Cholestérol 0,2 g et phosphatidylcholine 1 g	Idem TB CH/PC
LYHBHI CH/PC*	Idem LYHBHI CH/PC*	Idem TB CH/PC*

4.3.1.3.2 Suivi de l'absorbance à 600nm couplée au dénombrement sur boîte

Ici nous voulons voir si la présence d'un fosmide a un impact sur la croissance de la souche. Nous voulons également vérifier si la présence du mélange CH/PC et/ou le mode de stérilisation des milieux influencent la croissance des souches.

Des souches de *E. coli* EPI300 avec ou sans fosmide sont inoculées sans pré-culture dans les six milieux frais énoncés dans le tableau 10. Ces milieux sont supplémentés de

chloramphénicol à 12,5 µg/mL pour la souche avec fosmide. En effet, celui-ci porte un gène de résistance à l'antibiotique permettant la survie de la souche transformée contrairement à la souche non transformée. Un suivi de croissance est effectué toutes les heures pendant 20 h par une mesure de l'absorbance à 600 nm couplée à un dénombrement sur boîtes de TB ou de LYHBHI des dilutions 10^{-1} à 10^{-5} pour les cinq premières heures puis 10^{-5} à 10^{-7} pour les temps de 6 et 7 h et jusqu'à 10^{-9} pour le reste (jusqu'à 20 h).

4.3.1.4 Tests préliminaires en GC/MS

Les hypothèses de travail sont les suivantes : 1) Les souches de *E. coli* utilisées pour la construction des banques ne produisent pas de coprostanol ; 2) Ces souches n'ont pas d'effet connu sur le composé coprostanol (dégradation, transformation, etc.) ; 3) Le cholestérol est biodisponible dans les milieux testés (lequel donne la meilleure biodisponibilité) et 4) La méthode de GC/MS permet bien de détecter le coprostanol.

4.3.1.4.1 Production de coprostanol et détection du cholestérol

Les deux souches, *E. coli* EPI300 avec ou sans fosmide, sont cultivées à partir de stries fraîches, dans les différents milieux testés (tableau 10), une nuit (environ 16 h) à 37 °C avec antibiotique (chloramphénicol 12,5 µg/mL) pour la souche avec fosmide. Puis une extraction de stérols (paragraphe 4.1.3.1 de ce chapitre) et une mesure du cholestérol et du coprostanol (paragraphe 4.1.3.2 de ce chapitre) sont effectuées.

4.3.1.4.2 Transformation du coprostanol

10 mg de coprostanol et 50 mg de phosphatidylcholine sont dissous dans 1 mL de TB filtré et mis sous agitation toute la nuit à 30 °C. La souche *E. coli* EPI300 contenant un fosmide vide est cultivée dans les six milieux testés (tableau 10), une nuit (soit environ 16 h) à 37 °C avec antibiotique (chloramphénicol 12,5 µg/mL) et en présence de coprostanol (concentration finale dans le milieu 50 µg/mL). Les échantillons subissent ensuite une extraction de stérols (paragraphe 4.1.3.1 de ce chapitre) puis une analyse de la composition en cholestérol et coprostanol par GC/MC (paragraphe 4.1.3.2 de ce chapitre).

4.3.1.4.3 Biodisponibilité du cholestérol

La souche de *E. coli* BL21 présentée dans le paragraphe 3.3.1.2 et contenant un plasmide codant pour une cholestérol oxydase est striée en milieu LB additionné de kanamycine (30 µg/mL). Après une nuit à 37 °C, les six milieux à tester (tableau 10) supplémentés en kanamycine (30 µg/mL) sont inoculés, six répétitions par milieu sont réalisées. Après 3 h à 37 °C, les cultures atteignent une absorbance à 600 nm comprise entre 1,5 et 2. A ce moment là, la moitié d'entre elles sont induites avec de l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 0,25 mM en accord avec le protocole de Volonté *et al.* (2010). Les échantillons subissent ensuite une

extraction de stérols (paragraphe 3.1.3.1 de ce chapitre) puis une analyse de la composition en cholestérol et coprostanol par GC/MC (paragraphe 4.1.3.2 de ce chapitre).

4.3.2 Criblage des banques génomiques

4.3.2.1 Culture des clones génomiques

Les clones des banques génomiques de *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV sont striés de manière individuelle à J0 sur milieu sélectif LB complété avec du chloramphénicol 12,5 µg/mL. Ils sont incubés une nuit à 37 °C (ce travail est réalisé par Samira Boudebouze, assistante ingénieure dans l'équipe Ife). Le lendemain, à J1, les colonies obtenues sur boîtes sont utilisées pour inoculer 10 mL de milieu TB CH/PC frais supplémenté en chloramphénicol 12,5 µg/mL, un clone par tube. Ces cultures liquides sont incubées une nuit à 37 °C sous agitation modérée à 150 rpm. De plus, pour le criblage des banques entières, un système de batch a été mis en place. Un batch correspond à une journée d'extraction de stérols. Le milieu TB CH/PC est préparé pour 10 batches soit 10 jours d'extraction.

4.3.2.2 Analyse des stérols

A J2, 1 mL de chaque culture de clone est prélevé pour subir une extraction de stérols selon le protocole énoncé au paragraphe 4.1.3.1 de ce chapitre. Dans ce batch, il y a toujours un blanc (eau stérile) et trois témoins négatifs constitués par le milieu TB CH/PC frais non inoculé. Tous les 10 batches, 3 témoins pour la biodisponibilité du cholestérol sont effectués. Ceux-ci sont constitués de la souche *E. coli* BL21 exprimant le gène COX cultivée dans les mêmes conditions que les clones excepté que le chloramphénicol est remplacé par la kanamycine à 30 µg/mL.

Les échantillons sont ensuite envoyés à la plateforme ICAN pour analyses en GC/MS (paragraphe 4.1.3.2 de ce chapitre).

4.3.2.3 Analyse des données

Les analyses des données de GC/MS ont suivi un pipeline présenté en figure 22 :

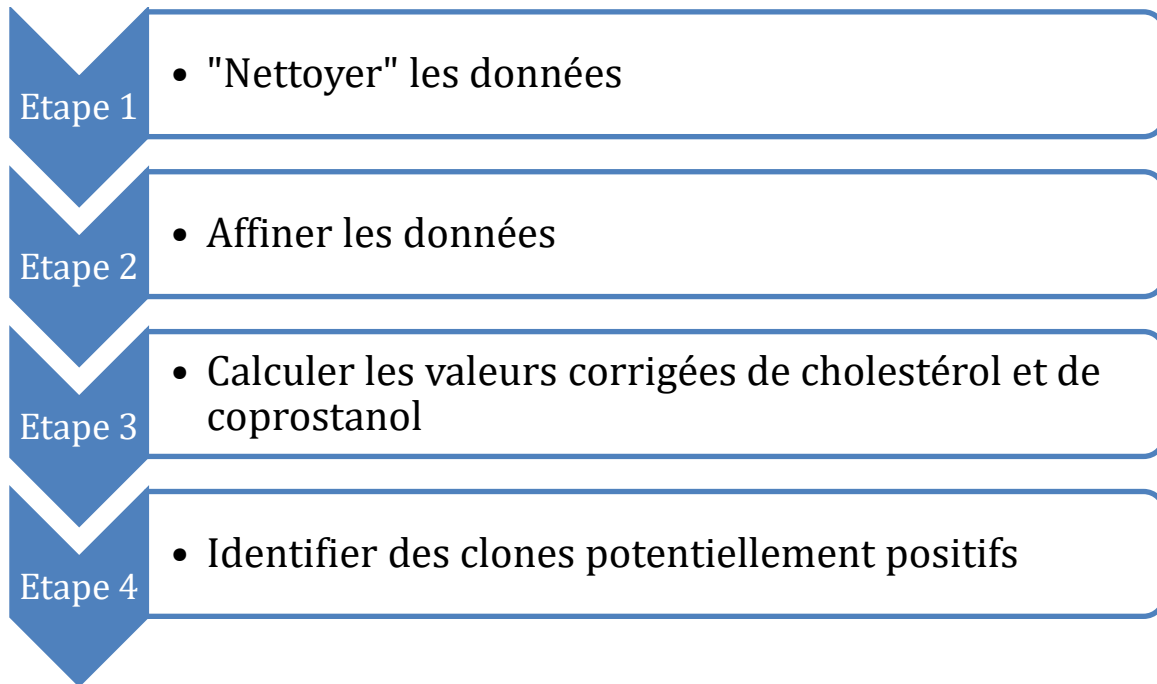


Figure 22 : Pipeline d'analyse des données de GC/MS obtenues sur les banques génomiques

Les analyses sur les deux banques sont faites séparément. Les étapes 2 et 3 sont interchangeable dans le temps.

Tout d'abord les données sont nettoyées : élimination des batchs dont la présence de coprostanol est détectée dans les blancs (eau stérile), élimination des échantillons pour lesquels le standard interne n'est pas détecté (étape 1, figure 22). Ensuite la distribution des échantillons en fonction des valeurs du standard interne est regardée à l'aide du logiciel gratuit RStudio. Les échantillons avec des valeurs aberrantes pour le standard interne sont éliminés (étape 2, figure 22). Puis, des valeurs corrigées des aires du cholestérol (Ch) et du coprostanol (Copro) sont calculées (étape 3, figures 22 et 23).

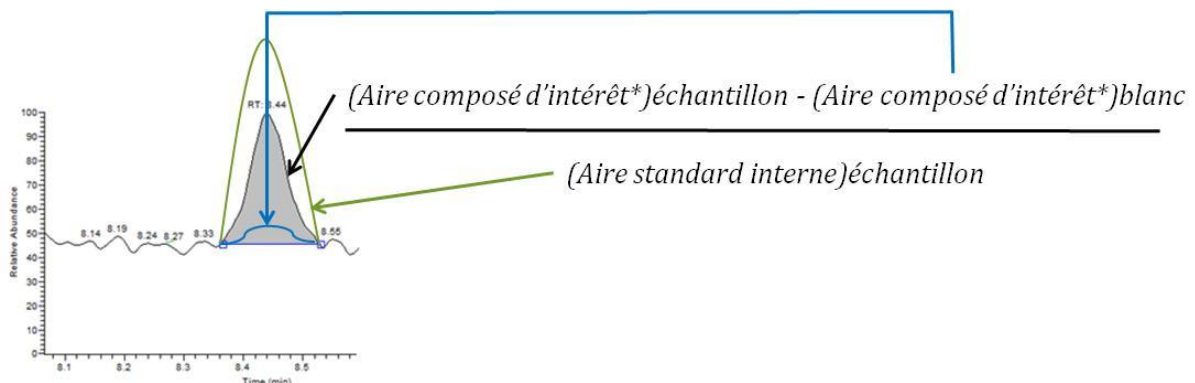


Figure 23 : Schéma de calcul d'une partie des valeurs corrigées

*=le composé d'intérêt est soit le cholestérol, soit le coprostanol. Dans le cas du coprostanol, (Aire coprostanol)blanc = 0. Le terme « échantillon » désigne à la fois les témoins négatifs (milieu TB CH/PC non inoculé), les témoins de la biodisponibilité du cholestérol (*E. coli* BL21 + COX) et les clones des banques génomiques.

La valeur corrigée de cholestérol est calculée comme suit :

$$(1) \frac{(Aire\ cholestérol)témoin - (Aire\ cholestérol)blanc}{(Aire\ standard\ interne)témoin}$$

$$(2) \frac{(Aire\ cholestérol)échantillon - (Aire\ cholestérol)blanc}{(Aire\ standard\ interne)échantillon}$$

$$(3) VCh = (2) - Moyenne(1)$$

Les témoins négatifs sont analysés dans un premier temps en soustrayant la valeur obtenue au temps de rétention du cholestérol du blanc à celle obtenue dans le témoin (milieu frais non inoculé). Cette nouvelle valeur est ensuite standardisée par la valeur du standard interne (5 α -cholestane) dans le témoin (équation (1), figure 23). Nous obtenons ainsi les valeurs de cholestérol pour les témoins négatifs. Cette même opération est effectuée sur les échantillons (équation (2), figure 23). La valeur VCh est ensuite obtenue en soustrayant la moyenne des témoins à la valeur des échantillons (équation (3)). La valeur corrigée de coprostanol (VCopro) est calculée selon le même principe. Il n'y a pas de pic détecté au temps de rétention du coprostanol dans les blancs. En revanche, il y a un pic dans les témoins négatifs, en absence de bactéries et pour chaque batch analysé, formant un bruit de fond dans les analyses. Les dénominateurs des équations (1) et (2) deviennent donc (Aire coprostanol)témoin et (Aire coprostanol)échantillon respectivement (figure 23).

Enfin, les échantillons sont représentés sur deux graphiques prenant pour abscisse la valeur du standard interne et pour ordonnée soit la valeur corrigée de cholestérol soit celle de coprostanol. En fixant une limite de production de coprostanol égale à la valeur obtenue pour les témoins négatifs (bruit de fond), nous avons ainsi pu identifier des clones potentiellement positifs à l'aide du logiciel RStudio (étapes 4, figure 22).

4.4 Etudes *in vivo*

Deux procédures ont été mises en place pour la réalisation de ce projet, rassemblées sous une seule saisine rédigée par Aurélie Bruneau, ingénieure d'étude et Philippe Gérard, directeur de recherche et responsable de l'équipe Amipem. Ce document a été approuvé par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche et porte la référence APAFIS#6089-2016060316479024 v3.

4.4.1 Les animaux utilisés

Tous les animaux utilisés lors de ces expérimentations sont des souris mâles C57BL/6 axéniques provenant du centre de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal (CDTA) d'Orléans (3b rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans) ou de la plateforme Anaxem de notre unité. Leur statut sans germes est maintenu grâce à des chambres confinées en plastique flexible appelés isolateurs (figure 24). Ces enceintes permettent un contrôle de l'air entrant et sortant grâce à un système de filtres (figure 22). Maintenir stérile un isolateur est laborieux et demande une formation spéciale. Toutes les manipulations sur les souris s'effectuent à l'intérieur grâce à des gants fixés sur des manchettes incluses stérilement à l'enceinte en plastique (figure 24). Les contaminations sont surtout dues à des trous dans les gants, les manchettes ou à une connexion non étanche de ces deux éléments entre eux ou à l'enceinte de plastique (Al-Asmakh & Zadjali 2015). Tout objet entrant par la suite doit être stérile. L'aliment, l'eau, la litière et le matériel incluant les cages et autres équipements nécessaires à l'expérimentation (biberons, ciseaux, pinces, etc.) sont stérilisés avant l'entrée en isolateur. Il existe deux moyens de faire pénétrer des objets dans l'enceinte : une tubulure pour les petits objets et une porte sur laquelle un container stérile peut être connecté (figure 24). Les isolateurs sont stérilisés avec une vapeur antibactérienne composée à 18 % d'acide peracétique pendant 2h. Une ventilation à l'air filtré est ensuite mise en place pendant plusieurs heures, une nuit si possible avant le transfert de souris à l'intérieur de l'enceinte.

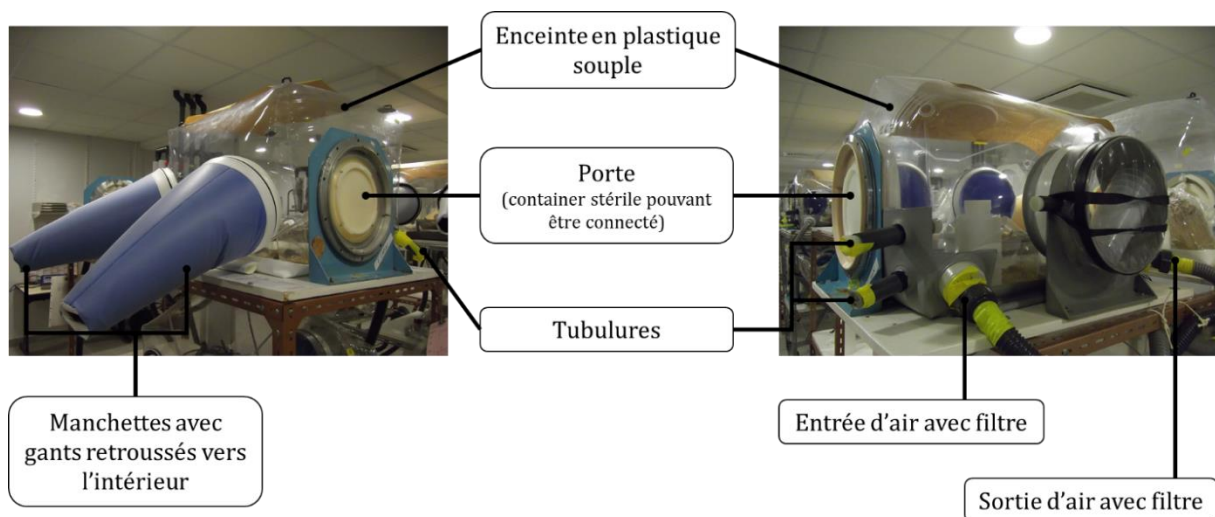


Figure 24: Isolateurs utilisés sur la plateforme Anaxem pour maintenir le statut contrôlé (axénique, monoxénique, gnotobiotique ou SPF) des souris

L'axénie est contrôlée à l'arrivée des souris et tout au long de leur séjour sur la plateforme. Des selles (3-4 crottes) sont prélevées dans chaque cage. Elles sont sorties de l'isolateur et dissoutes en conditions stériles dans 1 mL de milieu LCY (N-Z Amine® A 2 g/L, chlorure de sodium 5 g/L, phosphate de potassium monobasique 1 g/L et extrait de levure 2

g/L). Le tout est inoculé dans un tube contenant 9 mL de LCY frais. A partir de ce nouveau tube, 1 mL est prélevé pour ensemer 9 mL de LB liquide frais ; deux fois 1 mL sont prélevés pour ensemer deux tubes l'un contenant 9 mL de milieu BHI (Infusion cœur-cerveau 37 g/L, agar 15 g/L) et l'autre 9 mL de milieu VF (Foie-viande 38 g/L, agar 8 g/L) en surfusion maintenus à 48 °C. Le contenu de chacun de ces tubes est transféré dans des tubes Raibaud. Tous les milieux sont incubés à 37 °C pendant au moins une nuit et jusqu'à une semaine.

4.4.2 Procédure 1 : Implantation de souches bactériennes produisant du coprostanol dans le tractus gastro-intestinal des souris axéniques

La procédure 1 consiste au suivi de la colonisation du tractus gastro-intestinal de souris axéniques sur deux semaines en régime standard (figure 25). Une semaine après acclimatation, les souris sont gavées avec 200 µL de culture bactérienne fraîche à environ 10⁹ UFC/mL préparée en chambre de Freter (figure 17). Deux dénombrements sont effectués sur les selles après sept et quinze jours, également en chambre de Freter. Une partie des souris reçoivent également un « shoot » de cholestérol par gavage de 200 µL d'une solution à 2 mg/mL trois jours avant la mise à mort. Les selles sont récoltées avant ce *shoot* et juste avant la mise à mort pour le dosage de coprostanol.

4.4.3 Procédure 2 : Investiguer les effets de la production de coprostanol sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte

La procédure 2 consiste au suivi des animaux et en particulier des paramètres liés au métabolisme du cholestérol après un régime riche en cholestérol. Les compositions détaillées des régimes standard (Safe R04-40) et hypercholestérolémique (Ssniff® E15749-34) sont disponibles dans l'annexe II, un résumé se trouve en figure 25 ainsi que dans le tableau 11. Pour cette expérience et sur la base des résultats *in vitro* et *in vivo*, deux souches bactériennes ont été choisies pour la mono-colonisation des souris. La première joue le rôle de témoin négatif pour la production de coprostanol : *Bacteroides dorei* et la seconde a montré la meilleure production de coprostanol *in vivo* : *Parabacteroides distasonis*.

Après réception, les souris sont séparées en trois groupes en équilibrant les âges. Après une semaine d'acclimatation, les 9 souris du premier groupe sont gavées avec 200 µL de culture fraîche de *Bacteroides dorei* à environ 10⁹ UFC/mL. Les 11 souris formant le second groupe sont gavées de la même manière mais avec la souche *Parabacteroides distasonis*. Enfin les 10 souris du dernier groupe sont conventionnalisées avec 200 µL de solution fécale provenant de souris élevées de manière conventionnelle. Après 4 semaines de régime standard R04-40 de Safe-diet

(figure 25 et tableau 11), un régime riche en cholestérol est administré (figure 25 et tableau 11). Ce régime est administré pendant 11 semaines soit un total de 15 semaines pour cette expérience.

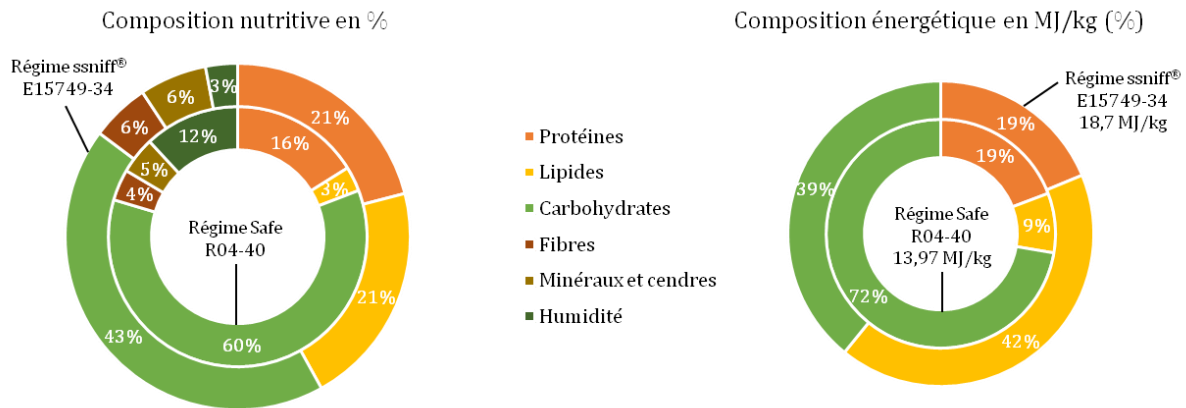


Figure 25 : Compositions nutritive et énergétique (Atwater) des régimes standard (Safe R04-40, intérieur du diagramme) et riche en cholestérol (Ssniff® E15749-34, extérieur du diagramme)

Tableau 11 : Composition en lipides et en cholestérol des deux régimes alimentaires utilisés dans l'expérimentation animale en mg/kg (d'après les fiches techniques des deux fournisseurs)

	Standard (Safe R04-40)	Riche en cholestérol (Ssniff® E15749-34)
Acide myristique C 14:0	-	400
Acide palmitique C 16:0	5 900	45 400
Acide palmitoléique C 16:1	150	800
Acide stéarique C 18:0	600	59 800
Acide oléique C 18:1	4 800	61 400
Acide linoléique C 18:2	15 000	17 200
Acide linoléénique C 18:3	1 200	2 200
Acide arachidique C 20:0	-	1 800
Cholestérol	-	12 350

Durant cette procédure expérimentale, deux prélèvements de sang sont effectués : le premier avant le changement de régime (s0) et le second lors de l'abattage (s11). De plus, durant toute la procédure : 1) l'aliment riche en cholestérol et les animaux sont pesés de manière hebdomadaire grâce à une balance électronique présente dans l'enceinte de l'isolateur et 2) La colonisation du tractus gastro-intestinal des souris mono-colonisées est suivie chaque semaine (de s-3 à s11). Quatre prélèvements de selles sont effectués, un avant le changement de régime

(s0) et trois après (s1, s5 et s9) pour le dosage de coprostanol. Quelques jours avant l'abattage, des prélèvements de selles sont effectués pour doser les acides biliaries (figure 26).

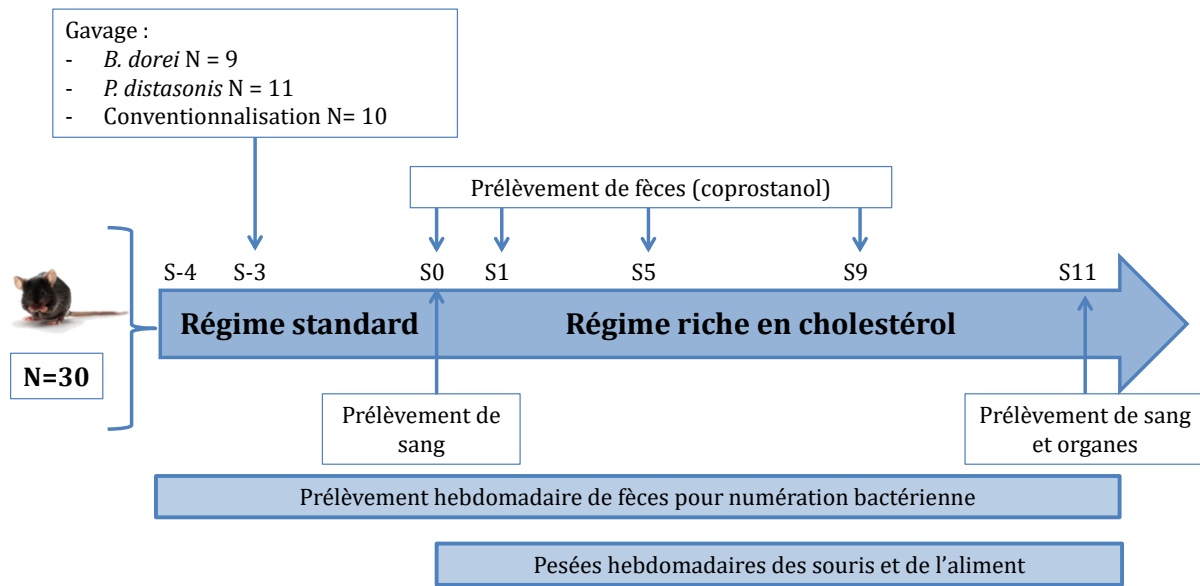


Figure 26 : Diagramme expérimental de la procédure 2

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Pour chaque individu, le foie, le cœur, la rate, le pancréas ainsi que le tissu adipeux épидидymal ont été prélevés et pesés. Le caecum a également été prélevé et pesé vide et plein. La bile est prélevée pour un dosage des acides biliaries. L'iléon et le côlon ont été prélevés et mesurés. Une partie de l'iléon, du foie et du tissu adipeux a été conservé dans 1 mL d'une solution de RNAlater® (Ambio) dans le but d'en extraire l'ARN. Une autre partie des mêmes organes ainsi que l'aorte ont été plongés dans une solution de paraformaldéhyde 4 % en vue des analyses histologiques.

4.4.4 Méthodes utilisées

4.4.4.1 Mesure de l'implantation des souches bactériennes dans le tractus gastro-intestinal de la souris

Les selles des souris monocolonisées sont prélevées dans les isolateurs puis pesées pour déterminer le volume de la dilution -1. Elles sont entrées en chambre de Freter (figure 17) le plus rapidement possible pour limiter le contact avec l'oxygène. Des dilutions successives dans un volume final de 1 mL sont effectuées jusqu'à 10^{-10} . Les trois dernières dilutions sont étalées (100 μ L). Le comptage est effectué après 2 à 3 jours à 37°C en chambre anaérobie. Les milieux utilisés (liquides et solides) sont les milieux LYBHI et M17 glucose (compositions dans le tableau 5 de ce chapitre) en fonction des souches testées.

4.4.4.2 Mesure de la production de coprostanol *in vivo* par les bactéries sélectionnées

Les selles sont pesées (poids humide) puis séchées une nuit à 58 °C. Elles sont ensuite broyées et repesées (poids sec). Le protocole du paragraphe 4.1.3.1 de ce chapitre commence ensuite à la saponification avec une incubation des échantillons pendant 3 h à 60 °C et un mélange régulier toutes les 20 minutes par vortex. Le standard interne est ajouté avant l'incubation (10 µL de 5α-cholestane à 100 µg/mL).

Les échantillons sont ensuite envoyés en analyses GC/MS sur la plateforme ICAN (paragraphe 4.1.3.2 de ce chapitre).

4.4.4.3 Tests particuliers à la procédure 2

4.4.4.3.1 Echantillons sanguins

Un premier prélèvement de sang est effectué avant le changement de régime 4 semaines après la réception des souris et sous un régime standard. Un second prélèvement est fait le jour de l'abattage (figure 26). Le sang est prélevé dans la région sub-mandibulaire et est collecté dans un tube contenant de l'EDTA. Le plasma est récupéré après une centrifugation à 2000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est prélevé et conservé à -80 °C. Les analyses sont ensuite effectuées par la plateforme de biochimie du Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI) de l'hôpital Bichat, Paris. Les paramètres suivants sont dosés : transaminases Alat et Asat, cholestérol total, HDL cholestérol, triglycérides et acides gras non estérifiés.

4.4.4.3.2 Dosage de l'insuline

La mesure de l'insuline plasmatique est effectuée seulement sur les échantillons plasmatiques récoltés le jour de l'abattage. Pour ce faire, nous utilisons un kit ELISA fourni par Merck (Référence EZRMI-13K).

4.4.4.3.3 Dosage des acides biliaires

Le dosage des acides biliaires est effectué sur le contenu de la bile prélevé lors de l'abattage et conservé à - 80 °C ainsi que sur les selles prélevées deux jours avant l'abattage. Ils sont réalisés au sein du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Saint Antoine dans l'unité 1157 de l'INSERM.

4.4.4.3.4 Histologie

Les coupes histologiques ont été effectuées sur le tissu adipeux, le foie, l'iléon et l'aorte. Après fixation au paraformaldéhyde 4 %, les échantillons ont été enrobés dans la paraffine, surfacés pour améliorer la coupe et montés sur lame au sein de la plateforme d'histologie de l'UMR 1313 GABI située sur le site de Jouy-en-Josas avec l'aide d'Alexandre Chapuis, stagiaire de L3 et de Zahra Safari étudiante en thèse de l'équipe Amipem. Les colorations hématoxyline-

éosine-safran (HES) et les numérisations des 120 lames ont été faites par Abdelhak Boukadiri travaillant sur la plateforme. L'hématoxyline colore en bleu-violet les noyaux, l'érythrosine colore en rouge-rosé le cytoplasme et le safran colore les fibres en jaune-orange. Les coupes sont analysées à l'aide du logiciel PanoramicViewer.

Les coupes de tissu adipeux ont été analysées pour la taille et la forme des adipocytes par Alexandre Chapuis, étudiant en L3 dans l'équipe Amipem et moi-même.

Les coupes de foies ont été analysées sur cinq champs par coupe pour trois critères, stéatose, inflammation et gonflement des cellules. La stéatose hépatique est analysée avec un score allant de 0 à 3 mesurant l'accumulation des lipides dans les hépatocytes. Un score de 0 est attribué aux coupes où les lipides représentent moins de 5 % de la cellule et un score de 3 est attribué à celles où l'accumulation des lipides occupe plus de 66 % de la surface cellulaire. L'inflammation du tissu est également mesurée avec un score allant de 0 à 3. Ces notes sont attribuées en fonction du nombre de foyers inflammatoires observés sur un champ. S'il n'y en a pas, le score est de 0, lorsqu'il y en a plus de quatre, le score est de 3. Enfin, un score compris entre 0 et 2 est attribué en fonction du gonflement des cellules. Celui-ci mesure en fait, la désorganisation plus ou moins forte des cellules sous l'effet des deux paramètres précédents (accumulation lipidique et inflammation). Lorsque la cellule a une forme normale pour un hépatocyte, le score est de 0, si la forme change et notamment « gonfle » et si ces gonflements sont répétés au sein du même champ alors le score est de 3 (Tiniakos et al. 2010). Ces analyses ont été effectuées par Zahra Safari, étudiante en thèse, Magali Monnoye, technicienne dans l'équipe Amipem et moi-même.

Les coupes d'aorte ont été analysées pour l'épaisseur et l'aspect des vaisseaux. Dans un premier temps, l'intégrité du vaisseau sanguin a été vérifiée par la reconnaissance des composantes du vaisseau (figure 27) et de l'intégrité de l'intima (pas de thrombus ou de formations anormales dans le vaisseau). Puis l'épaisseur de l'aorte a été évaluée en faisant une moyenne sur 5 points pris au hasard sur une même coupe.

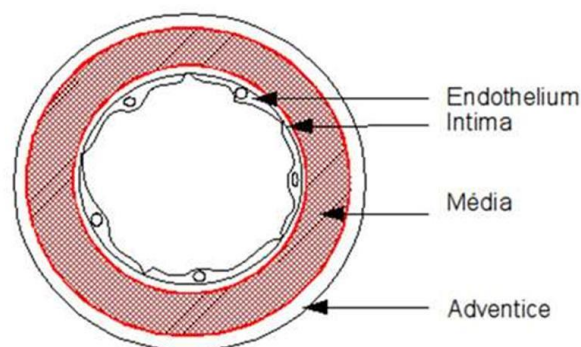


Figure 27 : Coupe schématique d'une artère.

D'après Marie-Céline Jacquier, pour le site futura santé disponible à l'adresse suivante : <http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-atherosclerose-maladie-arteres-997/page/2/>.

Les coupes d'iléon ont été analysées pour la taille et l'épaisseur d'une dizaine de villosités par coupe. De plus, un comptage des cellules à mucus (pas de coloration, sorte de bulles blanches mates au sein du tissu) a également été effectué sur ces coupes. Les capacités sécrétoires des cellules de Paneth ont été évaluées en faisant le rapport entre l'aire occupée par les granulocytes visibles (colorés en rouge cerise) et le nombre de cellules de Paneth auxquels ils appartiennent.

4.4.4.3.5 Etude de l'expression de gènes par RT qPCR

Tous les échantillons (foie, tissu adipeux épидидymal et iléon) subissent le même traitement. Après avoir été prélevés et conservés dans 1 mL de RNAlater® (Ambio) à température ambiante pendant 24 h puis à -80 °C, ils sont broyés à l'aide d'un potter dans un tampon de lyse du kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN). L'extraction de l'ARN total est ensuite effectuée selon les recommandations du fournisseur. Magali Monnoye, technicienne de l'équipe Amipem a ensuite mesuré la concentration et la qualité des ARNs grâce aux puces « RNA 6000 Nano LabChip » et au Bioanalyseur 2100 Agilent (Agilent Technologies) disponible sur la plateforme @Bridge de l'UMR 1313 GABI située sur le site de Jouy-en-Josas.

La rétro-transcription est ensuite effectuée sur 10 µg d'ARN avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). Les premiers essais en qRT-PCR avec ces ADNc dilués au 1/5^{ème} donnaient des Cq (cycle de quantification) élevés pour certains gènes (supérieurs à 35), les échantillons ont donc été amplifiés à l'aide du kit TaqMan PreAmp Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Les ADNc ainsi pré-amplifiés sont ensuite dilués au 1/6^{ème}. Les réactions de PCR sont effectuées en utilisant la technique des sondes TaqMan en suivant le protocole de TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific) et sur plaque 96 puits MicroAmp (Applied Biosystems™). Les réactions de PCR sont réalisées en duplicata sur un StepOnePlus™ (Thermo Fischer Scientific). Une sonde TaqMan est une séquence d'ADN simple brin spécifique d'une région de l'ADN. Elle possède un fluorochrome rapporteur sur son extrémité 5' et un désactivateur de fluorescence sur son extrémité 3'. Le principe de la méthode repose sur les propriétés de la Taq polymérase. Quand celle-ci va polymériser l'ADN à partir des primers PCR (figure 28), elle va rencontrer sur l'ADN matrice, la sonde TaqMan. Son activité exonucléasique 5'-3' va permettre le clivage de la sonde, libérant le désactivateur et levant l'inhibition de la fluorescence. Le signal résultant est directement proportionnel au nombre de molécules libérées permettant une mesure quantitative de l'accumulation du produit de PCR au cours des différents cycles (Cq). Cette méthode permet une augmentation de la spécificité de la détection. Elle autorise également le multiplexage. Il est en fait possible d'analyser plusieurs gènes dans un même puits grâce au marquage des sondes avec des fluorophores émettant à

différentes longueurs d'onde. Des sondes VIC[®], émission à 554 nm et FAM[™] (6-carboxyfluorescéine), émission à 518 nm ont été utilisées dans ces expériences.

Les analyses sont ensuite effectuées à l'aide du logiciel REST 2009 version 2.0.13 (QIAGEN), disponible gratuitement.

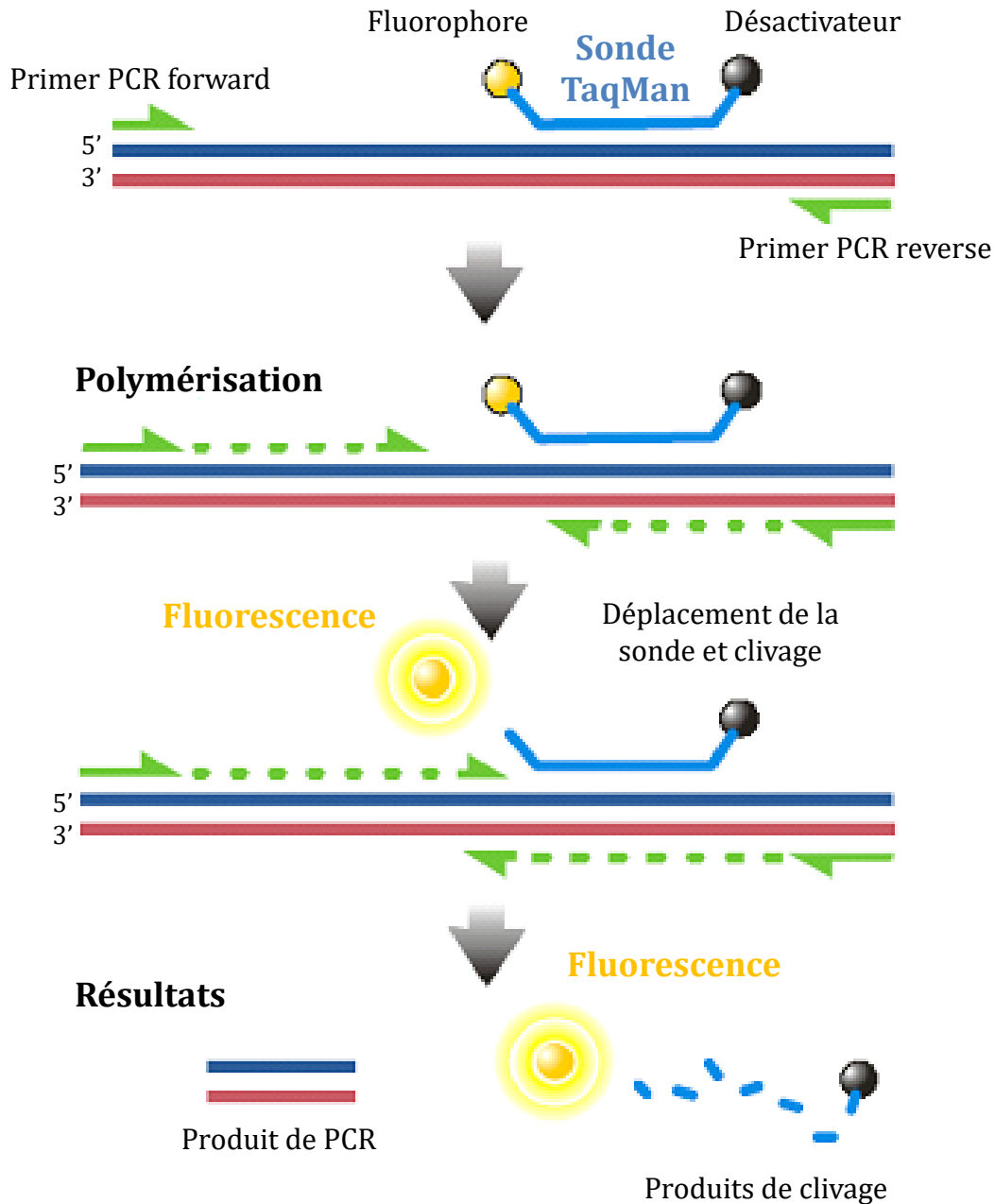


Figure 28 : Principe de la méthode des sondes TaqMan.

La sonde TaqMan consiste en une séquence d'ADNc attachée de manière covalente à un fluorophore en extrémité 5' et un désactivateur en extrémité 3'. Elle vient se fixer spécifiquement en amont de l'amorce d'amplification de PCR. La réaction de polymérisation se fait jusqu'à la sonde où la Taq polymérase va venir cliver la sonde. Ceci va lever l'inhibition du désactivateur sur le fluorophore permettant l'émission d'une fluorescence détectée et enregistrée par le thermocycleur.

Cette technique nous a permis d'analyser l'expression de gènes (entre dix et vingt en fonction des tissus) dans le foie, le tissu adipeux épидидymal et l'iléon (Tableau 12).

Tableau 12 : Liste des gènes quantifiés par PCR en temps réel en fonction du tissu

Gènes	Foie	Tissu adipeux épидидymal	Iléon
<u>Inflammation</u>			
<i>Tumor necrosis factor alpha (TNFα)</i>	√	√	√
<i>Interleukine 1b (IL1β)</i>	√	√	√
<i>Interleukine 6 (IL6)</i>	√	√	√
<i>Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)</i>	√	√	√
<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase sub-unit epsilon (IKKϵ)</i>		√	
<i>Regenerating family member 3 gamma (Reg3γ)</i>			√
<u>Perméabilité intestinale</u>			
<i>Zonula occludens (ZO-1)</i>			√
<i>Occludine</i>			√
<u>Métabolisme du cholestérol et des lipides</u>			
<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HmgcoAr)</i>	√		
<i>Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (Fdft1)</i>	√		
<i>Microsomal triglyceride transfer protein (Mttp)</i>	√		√
<i>Apolipoprotein B (ApoB)</i>	√		√
<i>Apolipoprotein A1 (ApoA1)</i>	√		√
<i>Niemann-Pick C1 like intracellular cholesterol transporter 1 (Npc111)</i>			√
<i>ATP binding cassette subfamily A member 1 (Abca1)</i>	√	√	√
<i>ATP binding cassette subfamily G member 5 (Abcg5)</i>	√		√
<i>ATP binding cassette subfamily G member 8 (Abcg8)</i>	√		√
<i>Low density lipoprotein receptor (LDLr)</i>	√		
<i>Scavenger receptor class B member 1 (Srb1)</i>	√	√	√
<i>Fatty acid synthase (Fas)</i>	√	√	
<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg)</i>	√	√	
<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3 (Nr1h3/Lxr)</i>	√	√	√
<i>Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Sreb1)</i>	√	√	
<u>Métabolisme des acides biliaires</u>			
<i>Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (Cyp7A1)</i>	√		
<i>Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1 (Cyp8B1)</i>	√		
<i>Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1 (Cyp27A1)</i>	√		
<i>Solute carrier family 10 member 2 (Ibat/Slc10a2)</i>			√
<i>ATP binding cassette subfamily B member 11 (Abcb11)</i>	√		
<i>G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1)</i>		√	√
<i>Fibroblast growth factor 15 (Fgf15)</i>			√
<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4 (Nr1h4/Fxr)</i>	√	√	√
<u>Gènes de références</u>			
<i>Actin B (Actb)</i>	√	√	√
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)</i>	√	√	√
Total	25	15	22

4.4.4.4 Analyses des données

A part les données de qPCR, toutes les données sont analysées à l'aide du logiciel gratuit RStudio version 3.4.1. Les tests univariés sont des ANOVA suivies quand il y a lieu d'un test de Tukey. Des analyses multivariées sont également réalisées en utilisant l'analyse en composantes principales (ACP). L'ACP est une méthode de statistique exploratoire permettant une description essentiellement graphique de l'information contenue dans de grands tableaux de données. Elle est utilisée pour mettre en évidence des liaisons (linéaires) entre les variables, des liens entre les variables et les individus et des ressemblances entre les individus. Dans notre étude, les tableaux de données sont centrés (la moyenne de la variable est soustraite à chaque valeur individuelle) et réduits (chaque valeur individuelle est divisée par l'écart-type de la variable) pour s'affranchir des différences d'unités entre les variables lors de l'analyse. Dans un premier temps, une matrice des corrélations entre les variables est générée. Cette matrice est ensuite diagonalisée et ses valeurs propres sont associées à un vecteur propre qui forme un axe. Chaque valeur propre est une partie de la variance totale de départ de nos données. Le pourcentage de variance associé à chaque axe traduit la part de la variance totale expliquée par l'axe. C'est ainsi que les axes de projection sont choisis. Nous examinons toujours le plan 1-2 en premier. La somme des pourcentages de variance doit être égale ou supérieure à 65 % sinon il faut envisager de regarder l'axe 3 pour aider l'interprétation.

Le premier critère à considérer lors d'une ACP est donc le pourcentage de variance expliqué par le plan choisi, puis, nous examinons la qualité de représentation des variables sur le cercle des corrélations des variables. Pour cela, il faut faire la somme des cosinus au carré sur les deux axes choisis pour la représentation : si elle est supérieure à 0,8, la variable est très bien représentée, entre 0,6 et 0,8, la variable est bien représentée et en-dessous de 0,4, la variable est mal représentée. Ces données numériques se reflètent sur le cercle des corrélations par des flèches plus ou moins proche de la bordure du cercle extérieur (figure 29A). Une variable mal représentée n'est pas prise en compte dans l'analyse et doit être envisagée sur un autre plan si nous voulons en tenir compte. La corrélation des variables se voit grâce à la matrice des corrélations mais aussi grâce à l'angle formé entre deux flèches sur le cercle des corrélations : si l'angle est inférieur à 90°, les variables sont corrélées positivement, si l'angle est égal à 90°, les variables ne sont pas corrélées et si l'angle est supérieur à 90°, les variables sont corrélées négativement (figure 29A). Enfin, nous regardons la contribution des variables aux axes du plan choisi pour la représentation. Celles participant le plus aux axes leur donnent un sens pour l'interprétation.

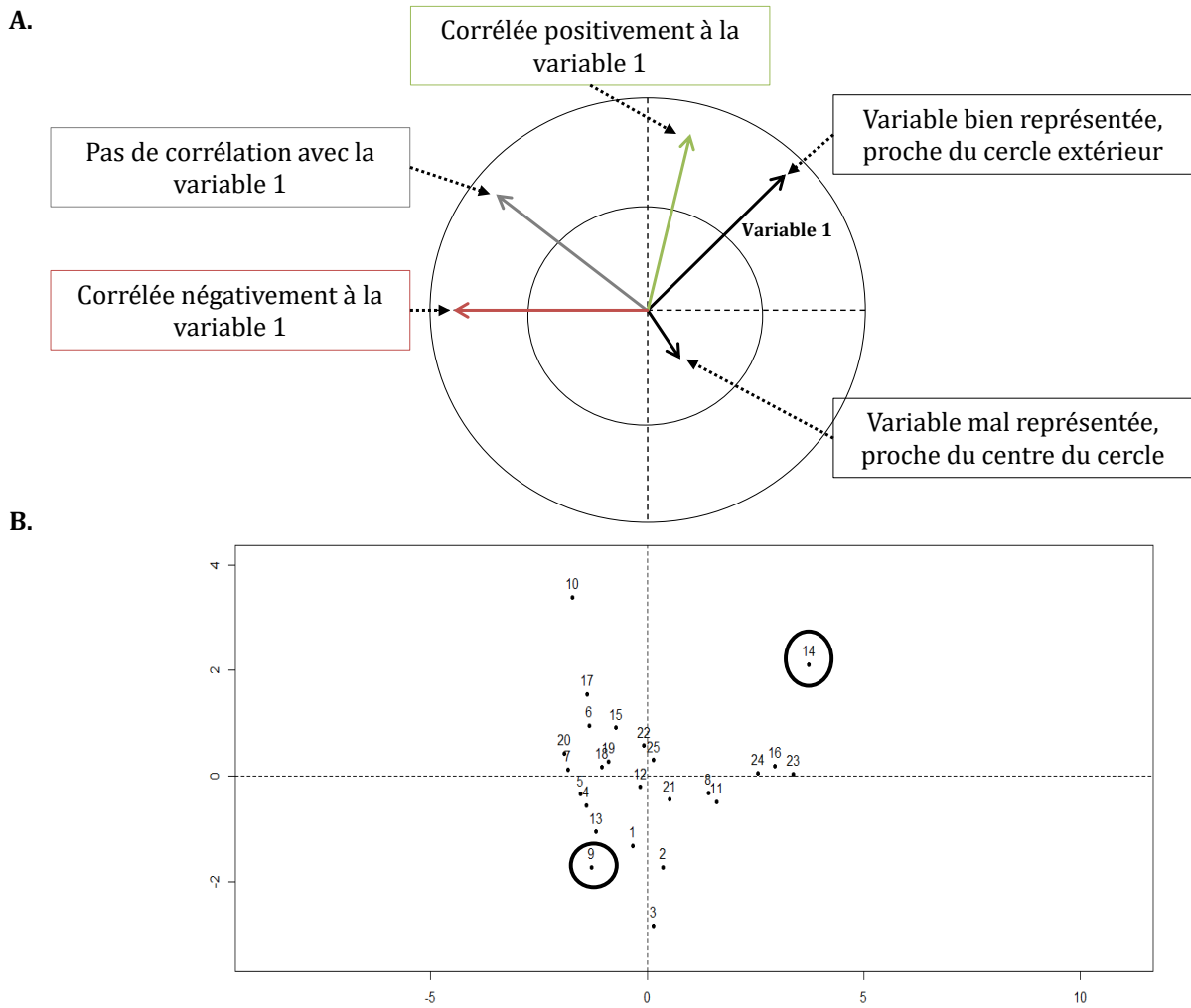


Figure 29 : Principe de la représentation de l'ACP avec un cercle des corrélations des variables (A) et une carte des individus (B) fictifs

En mettant en regard la carte des individus avec le cercle des corrélations des variables, l'individu 14 a une valeur supérieure à la moyenne pour la variable 1 et l'individu 9 a une valeur inférieure à la moyenne pour la variable 1

Ensuite, nous mettons en regard la carte des individus et le cercle des corrélations : à condition que la variable soit bien représentée et corrélée avec un axe, les individus du même côté que la variable possèdent des valeurs supérieures à la moyenne de tous les individus pour cette variable. Inversement, les individus qui sont opposés à cette variable possèdent des valeurs inférieures à la moyenne de tous les individus pour cette variable (figure 29B). Nous évaluons également la qualité de représentation des individus de la même manière que les variables, en regardant la somme des \cos^2 sur les axes choisis pour la représentation et selon les mêmes critères de qualité. Les individus mal représentés ne doivent pas être pris en compte dans l'analyse graphique et il faut alors se référer aux valeurs de départ. Il est également possible de regarder la contribution des individus aux axes pour nous aider à les interpréter.

RESULTATS

5. RESULTATS

Cette partie est construite autour des trois axes énoncés dans le chapitre « Hypothèses et objectifs de l'étude ». Dans un premier temps, la rareté des souches décrites transformant le cholestérol en coprostanol nous a poussés à développer des stratégies pour isoler et sélectionner de nouvelles bactéries commensales ayant cette activité et colonisant le tractus gastro-intestinal de la souris. Nous décrirons les résultats obtenus grâce à ces approches. Dans un second temps, le manque de données sur les gènes et enzymes constituant la voie de conversion du cholestérol en coprostanol chez ces bactéries nous a incités à construire et cribler des banques génomiques. Nous évaluerons les avancées faites dans le déchiffrement de cette voie de synthèse. Enfin et dans un troisième temps, l'ambiguïté des résultats obtenus *in vivo* à propos du rôle du coprostanol sur la cholestérolémie nous a décidés à étudier l'impact de ces bactéries chez des souris mono-colonisées avec des souches produisant ou non du coprostanol. Nous verrons l'impact de cette activité bactérienne sur les paramètres physiologiques de l'hôte, notamment le métabolisme du cholestérol.

5.1 Isolement de nouvelles souches transformant le cholestérol en coprostanol

5.1.1 Objectifs

Compte tenu du peu de souches transformant le cholestérol en coprostanol disponibles, le premier objectif de cette étude était d'isoler de nouvelles bactéries possédant cette activité. En particulier, ces nouvelles souches doivent être relativement faciles à manipuler en laboratoire pour pouvoir les étudier et avoir suffisamment de matériel biologique pour construire une ou des banques génomiques. Elles doivent de plus coloniser le tractus gastro-intestinal (TGI) de la souris afin de pouvoir mettre en place la dernière partie de la stratégie expérimentale consistant à tester le lien de cause à effet entre production de coprostanol et cholestérolémie chez la souris. Les difficultés reposent sur les restrictions de croissance de ces souches puisque celles connues à ce jour croissent sur des milieux complexes, souvent en anaérobiose (voir partie 2.3.3 et en particulier 2.3.3.3 du chapitre « Revue bibliographique »).

5.1.2 Stratégie expérimentale

Le protocole détaillé pour l'isolement des nouvelles souches commensales productrices de coprostanol est disponible dans la partie 4.1 du chapitre matériels et méthodes et résumé sur la figure 30. L'efficacité de cette stratégie repose sur deux hypothèses principales : i) En sélectionnant les selles d'un individu sain haut-producteur de coprostanol, nous optimisons nos chances de trouver des souches coprostanoligènes (puisque la quantité de coprostanol dans les selles est liée à la quantité de bactéries productrices de coprostanol (Veiga et al. 2005)) et ii) Si les souches isolées produisent du coprostanol dans plusieurs milieux de culture supplémentés en cholestérol, elles ont plus de potentiel pour en produire en condition *in vivo*.

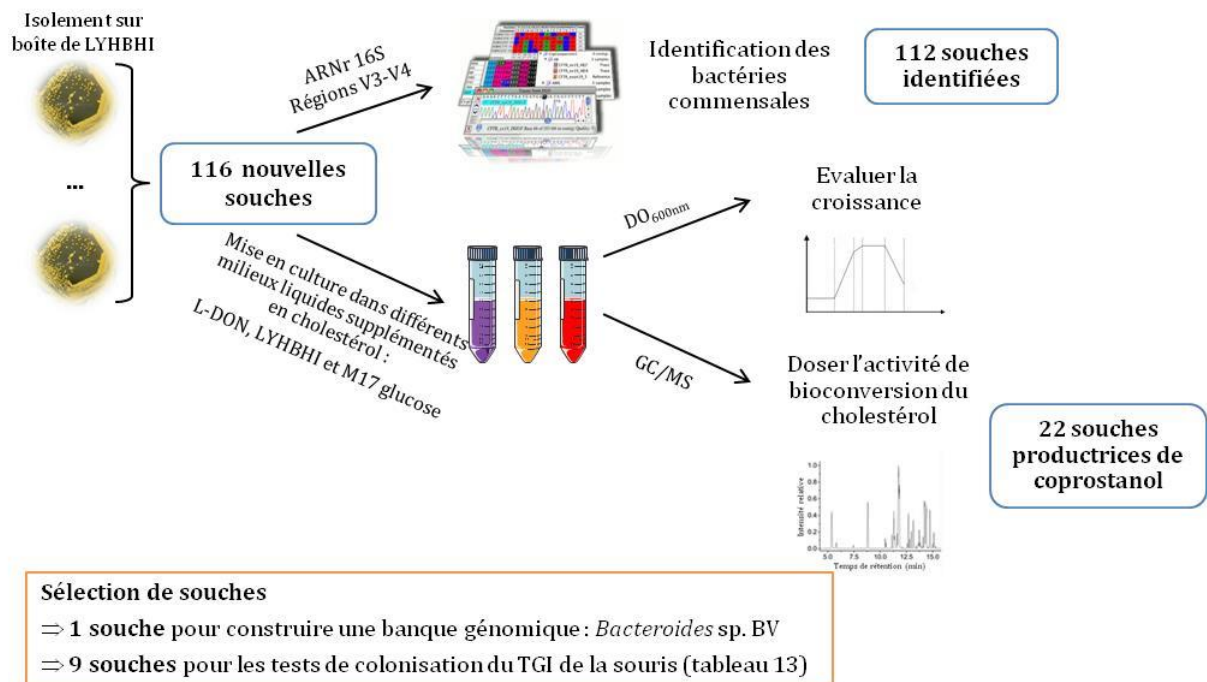


Figure 30 : Stratégies expérimentales pour l'isolement de souches commensales coprostanoligènes

5.1.3 Résultats

La campagne de recherche de nouvelles souches commensales a permis l'isolement de 116 souches. Nous avons pu obtenir suffisamment d'ADN génomique pour le séquençage des régions v3-v4 de l'ARNr 16S pour 112 d'entre elles. Toutes les souches ont été testées pour la production de coprostanol, 22 ont montré une aptitude à produire ce composé dans un ou plusieurs des milieux testés (tableau 13).

Tableau 13 : Caractéristiques *in vitro* des 22 souches productrices de coprostanol

Absorbance à 600 nm (LYHBHI)	Souches	Aire de coprostanol/Aire du standard interne (10 ⁻²)		
		L-DON	M17 glucose	LYHBHI
1,3	<i>Bacteroides caccae</i> AS127	4,90	-	2,10
2,3	<i>Parabacteroides distasonis</i> AS093	0,18	0,56	0,72
2,2	<i>Bacteroides vulgatus</i> AS138	-	-	0,58
2,3	<i>Bacteroides vulgatus</i> AS082	-	-	0,22
2,3	<i>Bacteroides fragilis</i> AS129	-	-	0,22
2,2	<i>Bacteroides ovatus</i> AS140	-	0,15	0,21
2,2	<i>Bacteroides xylanisolvens</i> AS146	0,18	0,15	0,20
3,2	<i>Parabacteroides johnsonii</i> AS122	-	0,11	0,11
2,8	<i>Bacteroides</i> sp. BV	0,09	-	0,40
-	<i>Bacteroides</i> sp. D8	-	-	0,30
1,2	<i>B. vulgatus</i> AS147	19,68	0,13	-
1,5	<i>B. uniformis</i> AS 133	5,39	-	0,31
2	<i>B. vulgatus</i> AS 137	-	-	0,11
3	<i>B. vulgatus</i> AS 139	-	-	0,21
-	<i>Prevotella bivia</i> AS132	3,57	-	0,11
-	<i>B. xylanisolvens</i> AS 141	0,26	-	0,32
1,2	<i>B. xylanisolvens</i> AS143	0,06	0,13	0,19
1	<i>B. uniformis</i> AS116	-	0,33	0,33
1,5	<i>B. caccae</i> AS119	-	0,04	0,34
1,9	<i>B. uniformis</i> AS109	-	-	0,24
2,5	<i>B. xylanisolvens</i> AS 099	0,23	-	-
2,5	<i>B. vulgatus</i> AS 091	0,15	-	0,39
3	<i>B. vulgatus</i> AS115	-	-	0,08

La souche *Bacteroides* sp. D8 est mise à titre indicatif comme témoin pour la production de coprostanol. Les neuf premières souches ont été sélectionnées pour les tests d'implantation *in vivo*. L'absence de production de coprostanol et l'incapacité à mesurer une absorbance sur le milieu LYHBHI sont indiquées par « - ».

Toutes les souches productrices de coprostanol sont des *Bacteroides* et des *Parabacteroides* plus une souche du genre *Prevotella*. Elles appartiennent à un phylum dominant du microbiote intestinal, les *Bacteroidetes*, bactéries Gram négatives.

Parmi ces 22 souches productrices, 3 sont capables de produire du coprostanol sur les trois milieux testés, 11 sur deux des trois milieux et 8 sur un seul milieu. Le milieu LYHBHI est le milieu où le plus de souches peut produire du coprostanol avec 20 souches sur les 22. La souche *Bacteroides* sp. D8, témoin positif de l'expérience ne produit du coprostanol que sur ce milieu. Les capacités de production sur ce milieu varient en fonction des souches avec la souche *B. vulgatus* AS115 la moins productrice (aire de coprostanol/standard interne = 0,08.10⁻²) produisant presque 10 fois moins que la deuxième meilleure productrice, *P. distasonis* AS093 (aire de coprostanol/standard interne = 0,72.10⁻²). Pour illustrer ces propos, la figure 31A

représente les effectifs des souches par tranche de production de coprostanol. Nous pouvons ainsi remarquer que les souches sont également réparties dans les rangs de production de coprostanol allant de 0,11 à 0,20 ; de 0,21 à 0,30 et de 0,31 à 0,40 (effectifs entre 5 et 6) mais que trois souches se distinguent des autres par leur forte production de coprostanol sur le milieu LYHBHI : *B. caccae* AS127, *P. distasonis* AS093 et *B. vulgatus* AS138.

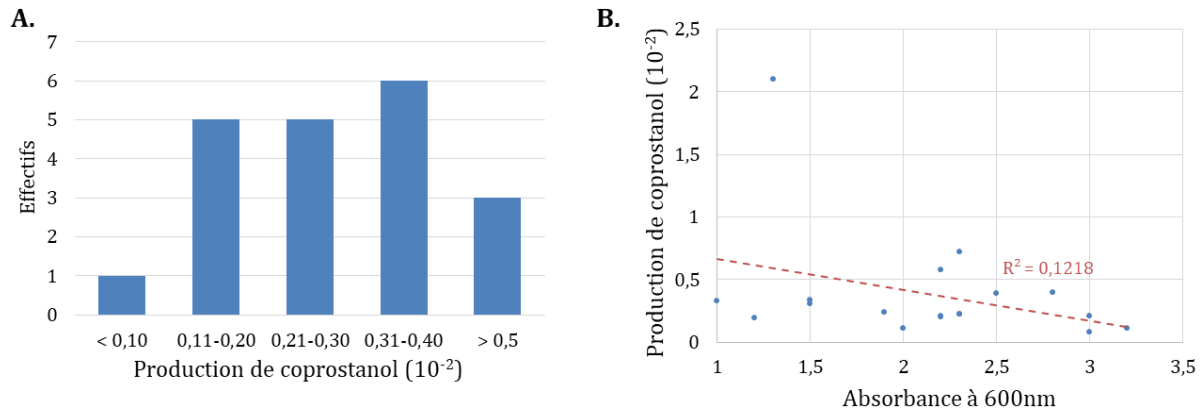


Figure 31 : Effectifs des souches par tranche de production de coprostanol en milieu LYHBHI (A) et Production de coprostanol en milieu LYHBHI des souches en fonction de l'absorbance à 600nm (B)

Pour les 15 souches produisant sur deux ou trois milieux, il est possible de distinguer trois profils : les souches qui ont environ la même valeur de production de coprostanol indépendamment du milieu, celles qui ont des facteurs de 2 à 10 de différence de production et celles qui ont un facteur de différence supérieur à 10. Le premier profil regroupe les souches *P. johnsonii* AS122, *B. uniformis* AS116, *B. ovatus* AS140, *B. xylanisolvens* AS141 et AS146. Le second profil regroupe les souches *B. caccae* AS127 et AS119, *P. distasonis* AS093, *Bacteroides* sp. BV, *B. xylanisolvens* AS143 et *B. vulgatus* AS091. Le troisième profil regroupe les trois souches restantes : *B. vulgatus* AS147, *B. uniformis* AS133 et *P. bivia* AS132 (tableau 13). Enfin, nous pouvons voir que l'absorbance finale lue à 600nm en milieu LYHBHI est différente en fonction des souches (première colonne du tableau 13) et n'est pas corrélée de manière linéaire à la production de coprostanol dans ce milieu (figure 31B).

La souche *Bacteroides* sp. BV (en violet dans le tableau) a été sélectionnée pour sa forte production de coprostanol, sa capacité à le produire sur deux des trois milieux testés mais également sur des critères de facilité de manipulation : biomasse finale relativement importante par rapport aux autres souches et une cinétique de croissance qualitativement plus performante que les autres (atteinte de l'absorbance à 600 nm finale plus rapidement). Elle a été utilisée pour construire une banque génomique dont les résultats du criblage sont décrits dans la partie 5.2 de ce chapitre. Neufs souches ont également été sélectionnées sur ces critères et sur des critères taxonomiques (figure 32) pour les tests d'implantation *in vivo* dont les résultats sont présentés dans le paragraphe 5.3.2.2 de ce chapitre.

La figure 32 représente un arbre phylogénétique des souches testées avec en bleu les souches productrices de coprostanol et en gras les souches sélectionnées pour les tests *in vivo*. Nous pouvons remarquer que parmi ces 22 souches, un tiers environ sont proches de l'espèce *Bacteroides vulgatus*. Nous avons essayé de respecter ce ratio dans la sélection des souches. De plus, lorsque deux souches proches d'une même espèce présentaient de bonnes caractéristiques *in vitro*, deux souches de *Bacteroides caccae* par exemple (tableau 13), nous avons privilégié la diversité en n'en sélectionnant qu'une seule pour permettre à des souches proches d'autres espèces d'être testées comme *Bacteroides fragilis* ou *Parabacteroides johnsonii* par exemple.

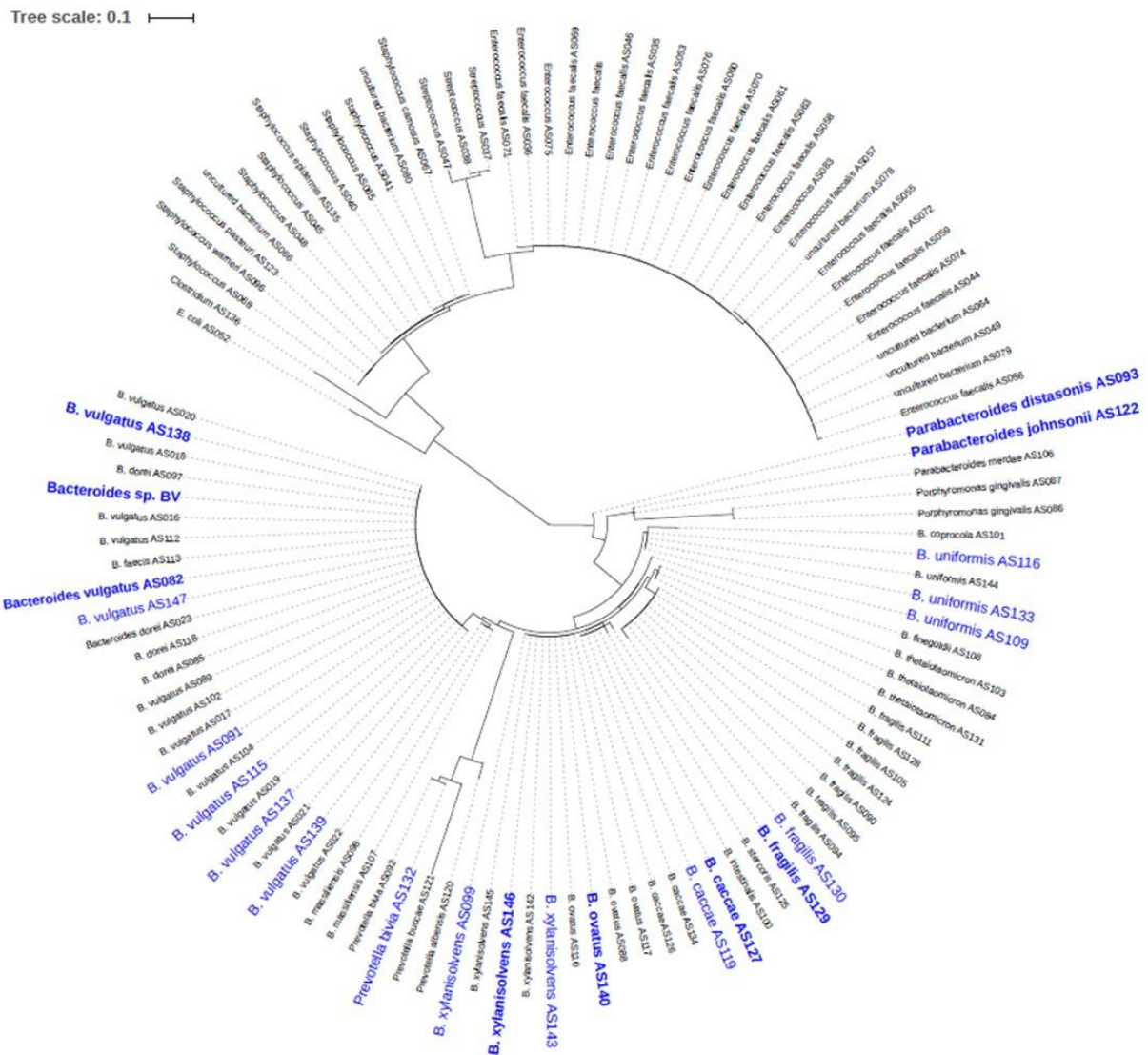


Figure 32 : Arbre phylogénétique circulaire des régions v3-v4 de l'ARNr 16S des 112 souches commensales nouvellement isolées
 En bleu, les souches productrices de coprostanol et en gras les souches sélectionnées pour les tests *in vivo*.

5.1.4 Conclusions et perspectives

Les objectifs de cette étude étaient i) isoler de nouvelles bactéries produisant du coprostanol, ii) sélectionner parmi elles une souche pour la construction d'une banque génomique et iii) en sélectionner plusieurs pour des tests *in vivo* de colonisation du TGI de la souris.

⇒ 22 souches bactériennes ont été identifiées comme productrices de coprostanol

Les nouvelles stratégies d'isolement mises en place nous ont permis d'isoler 116 souches à partir de selles humaines dont 22 productrices de coprostanol. Il est intéressant de noter que ces souches appartiennent toutes exclusivement aux genres *Bacteroides*, *Parabacteroides* et *Prevotella* du phylum des *Bacteroidetes* et sont Gram négatives. Il est donc possible que la production de coprostanol soit une activité bactérienne réservée à ces genres dans les selles du donneur utilisé pour l'isolement. Il est également possible que notre approche favorise sans le vouloir, des bactéries appartenant à ces genres. En effet, ils représentent la moitié des bactéries identifiées (figure 32) les autres appartenant aux genres *Porphyromonas* (également du phylum des *Bacteroidetes*), *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* (bactéries Gram positives appartenant au phylum des *Firmicutes*, également dominant du microbiote humain), une souche de *E. coli* et plusieurs souches non cultivées proches de *Enterococcus faecalis*.

De plus, la production de coprostanol est souche- et milieu-dépendant. Les souches ont donc potentiellement des capacités de production différentes entre elles. Les différences observées entre les milieux peuvent s'expliquer par la présence ou l'absence d'un ou plusieurs composés en fonction des milieux (tableau 5 pour la composition des milieux). La particularité du milieu LYHBHI, milieu sur lequel le plus de souches montrent une activité de production du coprostanol, est de contenir de l'infusion cœur-cerveau. Il est également possible que le cholestérol ne soit pas accessible de la même manière dans tous les milieux. En effet, le mode d'administration est le même dans tous les milieux (micelles formées avec de la phosphatidylcholine) mais les composants des milieux étant différents, ils ne réagissent pas forcément de la même manière avec ces micelles rendant le cholestérol plus ou moins accessible pour sa conversion en coprostanol.

Ensuite, la non corrélation entre production de coprostanol et l'absorbance à 600 nm finale peut s'expliquer par le fait que le nombre de bactéries n'est pas corrélé à la production de coprostanol. Ceci soulignerait la différence de capacité de conversion du cholestérol en coprostanol entre les souches. Néanmoins, il faut signaler qu'il n'est pas évident de corréler le nombre de bactéries à l'absorbance à 600 nm dans ce type de milieux souvent turbides.

Cependant, les expériences ont également mis en évidence des difficultés plus ou moins anticipées : manipulation en chambre de Freter, difficulté d'extraction de l'ADN pour certaines

souches bactériennes. Dans toutes ces circonstances, les problèmes rencontrés ont permis la mise en place de protocoles optimisés.

Les perspectives pour ces nouvelles souches isolées sont une meilleure caractérisation avec un séquençage du gène de l'ARNr 16S entier pour une assignation taxonomique plus précise. Les souches coprostanoligènes pourraient faire l'objet d'une caractérisation plus fine de leur production de coprostanol (temps de latence avant la production, conditions de milieu, essais en resting-cells pour déterminer l'activité de ces souches, etc.). Ces souches et les 94 autres isolées dans cette campagne font d'ores et déjà l'objet d'autres tests au sein de l'équipe Ife pour détecter d'éventuelles activités BSH ou un potentiel anti/pro-inflammatoire.

⇒ La souche *Bacteroides* sp. BV a été sélectionnée pour la construction d'une banque génomique

La souche *Bacteroides* sp. BV a été jugée intéressante sur les critères précités pour la construction d'une banque génomique et son étude ultérieure. Il est à noter qu'à première vue, il semblerait que cette bactérie ait un métabolisme direct de conversion du cholestérol en coprostanol contrairement à *Bacteroides* sp. D8, ce qui rend l'étude des deux banques génomiques complémentaire.

⇒ La souche *Bacteroides* sp. BV ainsi que 8 autres souches ont été sélectionnées pour les tests d'implantation *in vivo*.

Dans le temps imparti de ce projet de thèse, il n'était pas possible de tester les 22 souches chez la souris, les analyses des paramètres *in vitro* et taxonomiques ont permis la sélection de 8 bactéries en plus de *Bacteroides* sp. BV (tableau 13) pour tester leur implantation dans le TGI de la souris dont les résultats sont décrits dans le paragraphe 5.3.3 de ce chapitre. Avant d'effectuer les tests *in vivo*, nous avons voulu nous renseigner sur l'innocuité des souches sélectionnées par leur implication ou non dans différentes maladies liées au microbiote intestinal. Les résultats de cette étude sont résumés sur le tableau 14. Nous avons rapproché les souches *Bacteroides* sp. BV et *Bacteroides* sp. D8 des bactéries les plus proches taxonomiquement parlant c'est-à-dire *Bacteroides vulgatus* et *Bacteroides dorei* pour les informations du tableau. Nous pouvons remarquer que les informations sont souvent contradictoires et varient d'une pathologie à l'autre. Dans ces conditions, il n'y a pas de frein majeur à l'expérimentation *in vivo*.

Tableau 14 : Etude bibliographique sur les espèces sélectionnées pour l'implantation *in vivo*

Souches	Informations en lien avec l'inocuité ou non des espèces	Références
<i>Bacteroides caccae</i>	Enrichie dans le microbiote de patients atteints de la goutte Détection d'une protéine de surface (<i>OmpW</i>) impliquée dans les réactions inflammatoires lors des MICI Brevetée en cocktail avec d'autres espèces dont <i>Bacteroides fragilis</i> et <i>vulgatus</i> comme culture d'exclusion compétitive pour la colonisation du TGI du porc dans le cas d'infection par <i>Salmonella</i> Utilisation brevetée pour la prévention ou le traitement de l'arthrite rhumatoïde et des maladies associées	(Guo et al. 2016) (Wei et al. 2001) WO1999019459 CN104546933
<i>Parabacteroides</i> spp.	Enrichie dans le microbiote de personnes maintenant une rémission suite à une maladie de Crohn comparées aux personnes atteintes de maladie de Crohn récurrente Diminué dans le microbiote de personnes atteintes de NAFLD Enrichi dans le microbiote de personnes saines comparées au microbiote de personnes atteintes de sclérose en plaques	(De Cruz et al. 2015) (Del Chierico et al. 2016) (Chen et al. 2016)
<i>Parabacteroides distasonis</i>	Propriétés anti-inflammatoires <i>in vitro</i> (diminution du TNF α dans les macrophages) et <i>in vivo</i> (diminution de la sévérité des lésions intestinales de souris BALB/c traitées au DSS (Dextran Sodium Sulfate)) de la fraction membranaire Promeut la colite chez des souris BALB/c déficientes en protéines de reconnaissance des peptidoglycanes Négativement corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC) et à l'inflammation systémique Positivement associée à l'obésité	(Kverka et al. 2011) (Dziarski et al. 2016) (Verdam et al. 2013) (C. M. Chiu et al. 2014)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Plus souvent détectée dans le microbiote de personnes saines que dans celui des personnes atteintes de maladie coeliaque Enrichie dans le tissu intestinal de patients atteints de MICI Protection contre la colite induite par <i>E. coli</i> mpk chez des souris IL2 KO co-colonisées avec les deux souches Caractéristique de la muqueuse intestinale de personnes saines comparées à des patients atteints de maladie de Crohn sous régime alimentaire de type méditerranéen Positivement corrélée au développement de la stéatose hépatique chez des souris C57BL6/J conventionnelles, sous régime riche en graisses et en streptozotocine (modèle pour les NASH)	(Sanchez et al. 2010) (Fujita et al. 2002) (Waidmann et al. 2003) (Vidal et al. 2015) (Xie et al. 2016)

	Négativement corrélée au développement de la stéatose hépatique chez la souris Associée à l'insulino-resistance Négativement corrélée à l'IMC et à l'inflammation systémique	(Le Roy et al. 2013) (Pedersen et al. 2016) (Verdam et al. 2013)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Plus abondante dans le microbiote de personnes saines comparées à des personnes atteintes de maladie coeliaque Positivement corrélée à l'IMC et à l'obésité chez des enfants Négativement corrélée à l'IMC et à l'inflammation systémique	(Sanchez et al. 2010) (Ignacio et al. 2016) (Verdam et al. 2013)
<i>Bacteroides ovatus</i>	Plus abondante dans le microbiote de personnes saines comparées à des personnes atteintes de maladie coeliaque Responsable de l'augmentation systémique des anticorps chez les patients atteints de MICI Diminution de la mortalité chez des souris BALB/c et immunodéficientes (SCID) monocolonisées traitées au DSS	(Sanchez et al. 2010) (Saitoh et al. 2002) (Hudcovic et al. 2009)
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	Enrichie dans le microbiote de patients atteints de la goutte Innocuité de la souche pour l'Homme Breveté comme additif alimentaire et/ou probiotique	(Guo et al. 2016) (Ulsemer et al. 2012) US20150118354
<i>Bacteroides dorei</i>	Plus souvent détectée dans le microbiote de personnes atteintes de maladie coeliaque que dans celui de personnes traitées pour cette maladie ou en bonne santé Caractéristique de la muqueuse intestinale de personnes saines comparées à des patients atteints de maladie de Crohn sous régime alimentaire de type méditerranéen Surnageant stimule le récepteur FXR dans les cellules de l'épithélium intestinal (<i>in vitro</i>) et améliore le phénotype d'obésité chez des souris C57BL6/J conventionnelles en régime riches en lipides Utilisation brevetée pour la prévention ou le traitement de l'arthrite rhumatoïde et des maladies associées	(Sanchez et al. 2010) (Vidal et al. 2015) (Xianqin Zhang et al. 2015) CN104546942

Après avoir identifié 22 nouvelles souches productrices de coprostanol, nous avons sélectionné *Bacteroides* sp. BV dans le but de construire une banque génomique. Son criblage couplé à celui de la banque de *Bacteroides* sp. D8 devrait nous renseigner sur les gènes voire les enzymes potentiellement impliqués dans la voie de conversion du cholestérol en coprostanol.

5.2 Criblage fonctionnel des deux banques génomiques de *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV pour la production de coprostanol

5.2.1 Objectif

L'état de l'art sur la(les) voie(s) de conversion du cholestérol en coprostanol présente deux hypothèses, la première est une conversion directe, la seconde une conversion indirecte. Les différentes études essayant de caractériser les gènes de cette/ces voie(s) n'ont pas abouti pour l'instant. L'objectif de cette partie est l'utilisation de banques génomiques construites à partir de souches bactériennes produisant du coprostanol et leur criblage fonctionnel pour détecter ce composé dans le but d'identifier la séquence d'ADN portant les gènes responsables de cette activité. L'une des difficultés de cet objectif repose sur la capacité à obtenir des banques suffisamment robustes pour le criblage (*ie* suffisamment de clones pour avoir une forte probabilité de disposer de tout le génome). De plus, le criblage fonctionnel doit permettre d'identifier des clones positifs pour la production de coprostanol.

5.2.2 Stratégie expérimentale

L'utilisation de banques génomiques pour l'identification de gènes d'intérêt nécessite quatre étapes présentées sur la figure 33. Tout d'abord, deux banques génomiques ont été construites (voir le paragraphe 4.2.1) puis vérifiées pour leur redondance et recouvrement (paragraphe 4.2.2), enfin elles ont été criblées (paragraphe 4.3) dans le but d'obtenir des clones positifs pour la production de coprostanol. L'étape de vérification des banques est importante puisque dans l'hypothèse où la probabilité d'avoir tout le génome de la bactérie contenu dans nos clones est élevée et si nos clones ne sont pas redondants, alors la probabilité d'obtenir au moins un clone producteur de coprostanol est optimisée. Le criblage fonctionnel repose sur le fait que si un clone produit du coprostanol alors c'est qu'il dispose du matériel génétique pour le faire. Dans ce cas, le fragment d'ADN qu'il contient nous intéresse pour identifier les gènes permettant l'activité de conversion du cholestérol en coprostanol.

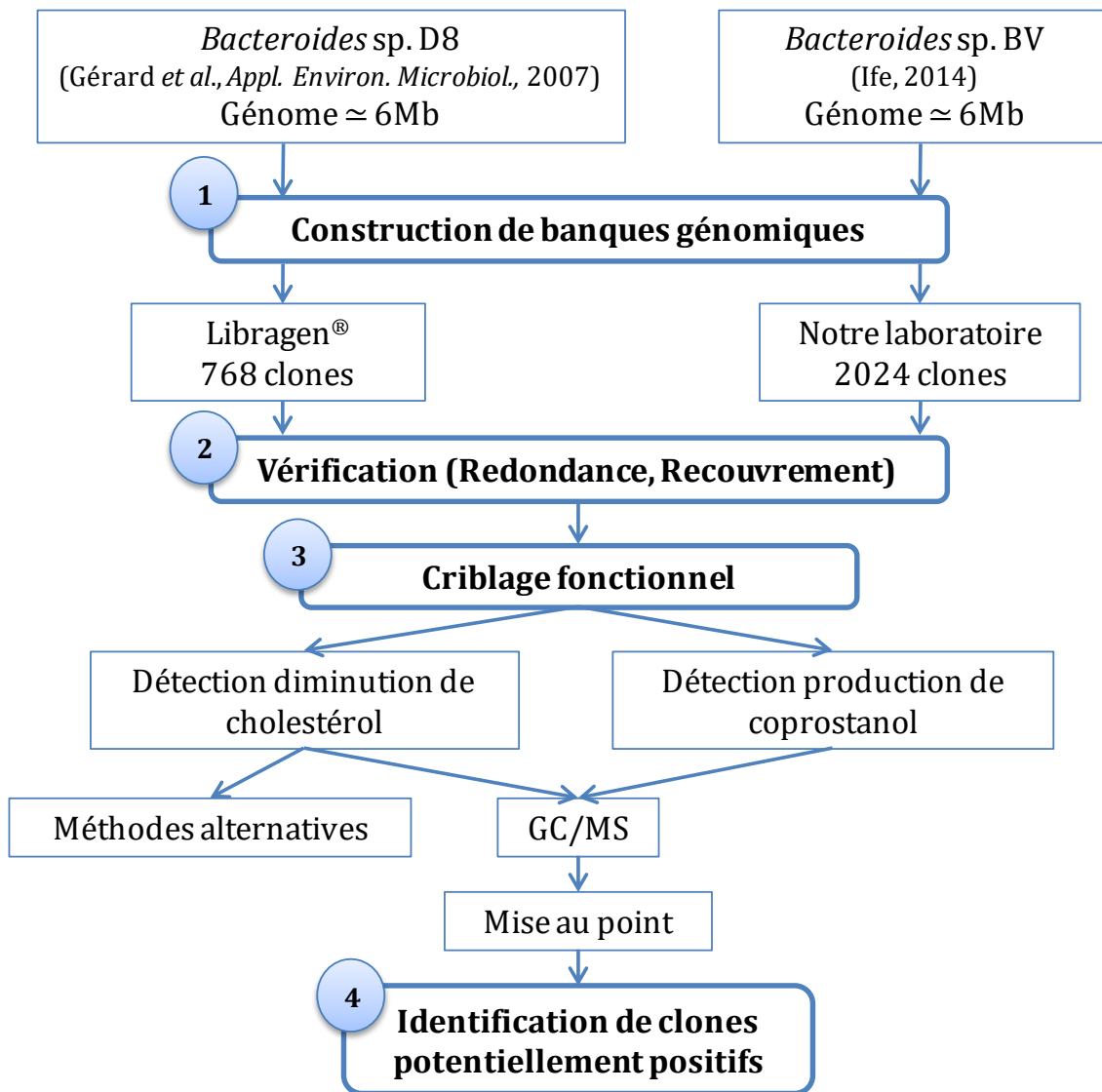


Figure 33 : Stratégie expérimentale mise en place pour l'identification de clones potentiellement positifs pour la production de coprostanol

5.2.3 Les deux banques construites sont suffisamment robustes pour être criblées.

Le rapport de qualité fourni par Libragen® ayant construit la banque de *Bacteroides* sp. D8 assure la diversité et la taille de 40 kb des inserts. Ces informations confirment la non redondance de la banque et permettent de calculer le recouvrement du génome égal à 5,2 (la banque contient environ 5,2 fois le génome de la bactérie cible). Nous obtenons également par le calcul une probabilité de 99 % d'avoir l'intégralité du génome de la bactérie contenu dans les 768 clones fournis.

Nous effectuons un contrôle en prenant 5 clones au hasard pour la banque *Bacteroides* sp. D8 (conformément au rapport fourni par Libragen®) et 20 clones pour la banque de

Bacteroides sp. BV. Après digestion des fosmidés recombinants avec *HindIII* (figure 34), nous évaluons de manière qualitative la taille approximative des inserts et le recouvrement du génome. La taille moyenne des inserts de la banque génomique de *Bacteroides* sp. D8 est de 35 kb environ selon cette méthode, donnant un recouvrement de 4,55 et une probabilité de 99 % avec les 768 clones fournis par Libragen®. Avec une taille moyenne d'insert de 30 kb et 2024 clones pour la banque de *Bacteroides* sp. BV, le recouvrement est égal à 10,12 et la probabilité d'avoir suffisamment de clones pour avoir tous les fragments d'ADN de la bactérie est de 99,99 %.

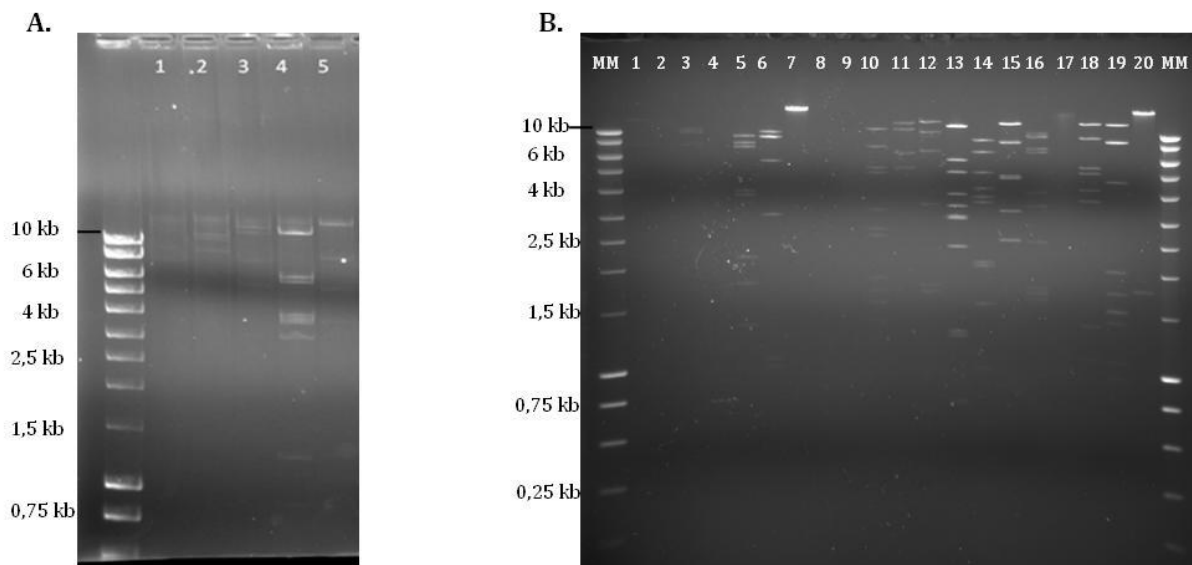


Figure 34 : Gels d'électrophorèse des clones de la banque de *Bacteroides* sp. D8 (A.) et *Bacteroides* sp. BV (B.) digérés par *HindIII*.

Les deux banques ont donc un bon recouvrement et une forte probabilité de contenir l'ensemble des génomes des deux bactéries. De plus, les profils de digestion des clones, visibles sur la figure 34 montrent la non redondance des clones dans les deux banques. En conclusion, ces deux banques sont suffisamment robustes pour être criblées.

5.2.4 Criblage fonctionnel des banques génomique

5.2.4.1 Recherche d'une méthode alternative à la GC/MS

La méthode de GC/MS étant longue et coûteuse, nous avons dans un premier temps cherché une méthode alternative pour un criblage fonctionnel rapide et facile à mettre en place. Dans la littérature, il n'existe pas de tests simples, efficaces et rapides pour détecter la présence de coprostanol particulièrement en petites quantités. Le coprostanol dérivant du cholestérol, nous avons choisi de tester la diminution du cholestérol lors de l'activité bactérienne de conversion en coprostanol. Nous avons tout d'abord testé l'efficacité du kit AmplexRed® pour la détection du cholestérol sur des milieux témoins dont la concentration en cholestérol est connue

(liste disponible dans le tableau 9). Le principe de ce kit ainsi que le protocole détaillé sont disponibles dans le paragraphe 4.3.1.1.2 de la section « matériels et méthodes ». Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15 ainsi que sur la figure 35.

Tableau 15 : Dosage du cholestérol dans les milieux LB et LB.1-4 à l'aide du kit AmplexRed® comparé aux valeurs théoriques attendues

Moyennes obtenues sur trois échantillons \pm l'écart-type

Milieux	Cholestérol détecté (mg/L)	Cholestérol théorique (mg/L)
LB	25,43 \pm 26,34	inconnu
LB.1	50,71 \pm 2,54	200
LB.2	10,91 \pm 5,19	200
LB.3	27,09 \pm 10,52	300
LB.4	40,62 \pm 25,06	200

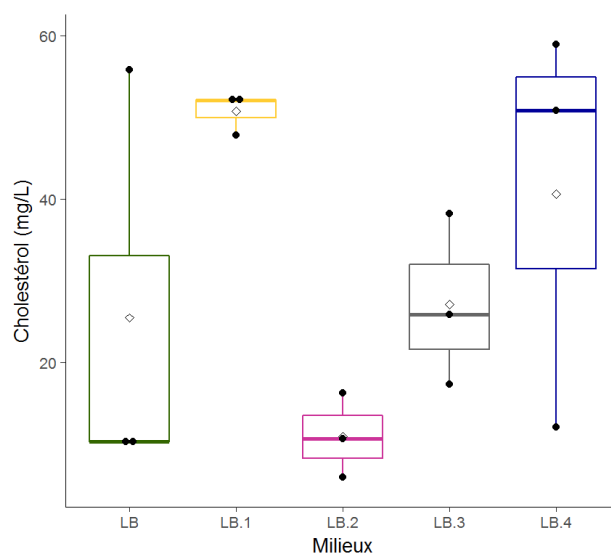


Figure 35 : Diagramme en boîtes de Tukey du cholestérol dosé par le kit en fonction du milieu testé

Chaque point représente une valeur de la série (trois mesures par milieu testé), le losange est situé au niveau de la moyenne de chaque groupe, la valeur précise est disponible dans le tableau 15.

Le tableau 15 présente la valeur moyenne du cholestérol détecté dans chaque milieu témoin. Les valeurs détectées sont entre 4 et 20 fois inférieures aux valeurs théoriques. De plus, les écart-types sont élevés ce qui se traduit graphiquement par une forte étendue (distance entre la valeur la plus basse et la valeur la plus haute), surtout pour les milieux LB, LB.3 et LB.4 (figure 35), les trois milieux avec les écart-types les plus importants. Le milieu dans lequel il y a le plus de cholestérol retrouvé et où les valeurs sont le moins écartées est le milieu LB.1. C'est pourquoi, dans la seconde partie des tests, le protocole de préparation du cholestérol dans ce milieu sera conservé.

Cette méthode ne permet donc pas de retrouver les valeurs théoriques de concentration en cholestérol. De plus, les valeurs détectées pour un même échantillon sont très variables et

donc peu fiables. En conclusion, cette technique ne convient pas à notre étude, nous avons donc opté pour le criblage fonctionnel en GC/MS.

5.2.4.2 Mise au point des conditions de criblage en GC/MS

Ne disposant pas de témoin positif pour la production de coprostanol, nous avons décidé d'utiliser un témoin positif pour la biodisponibilité du cholestérol. La description de ce témoin est faite dans le paragraphe 4.3.1.2 du chapitre « matériels et méthodes ». La mise au point du criblage consiste à déterminer un milieu adapté à la production et la détection du coprostanol. La stratégie est basée sur le choix entre deux types de milieux, le premier est celui utilisé pour l'isolement des souches commensales et sur lequel les deux bactéries utilisées pour construire les banques génomiques peuvent croître : le milieu LYHBHI. Le second milieu est celui utilisé dans la publication de Volontè *et al.* (2010) pour l'optimisation de la production de cholestérol oxydase : le milieu TB. La liste des six milieux testés pour cette mise au point est disponible dans le tableau 10 se trouvant dans la section « matériels et méthodes ».

5.2.4.2.1 Suivi de croissance

Dans cette partie nous allons nous efforcer de répondre aux hypothèses énoncées dans la partie 4.3.1.3 et rappelées ici : 1) Une pré-culture n'est pas nécessaire à l'obtention d'une biomasse suffisante ; 2) La présence d'un fosmide n'influence pas la croissance des souches de *E. coli* utilisées lors de la construction des banques (*E. coli* EPI300) ; 3) La présence du mélange CH/PC et 4) Le mode de stérilisation du milieu influence(nt) potentiellement la croissance de ces bactéries.

Pour répondre à la première hypothèse, un suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600nm est réalisé sur la souche *E. coli* EPI300 dans les six milieux présentés en tableau 10. Les résultats sont présentés en figure 36.

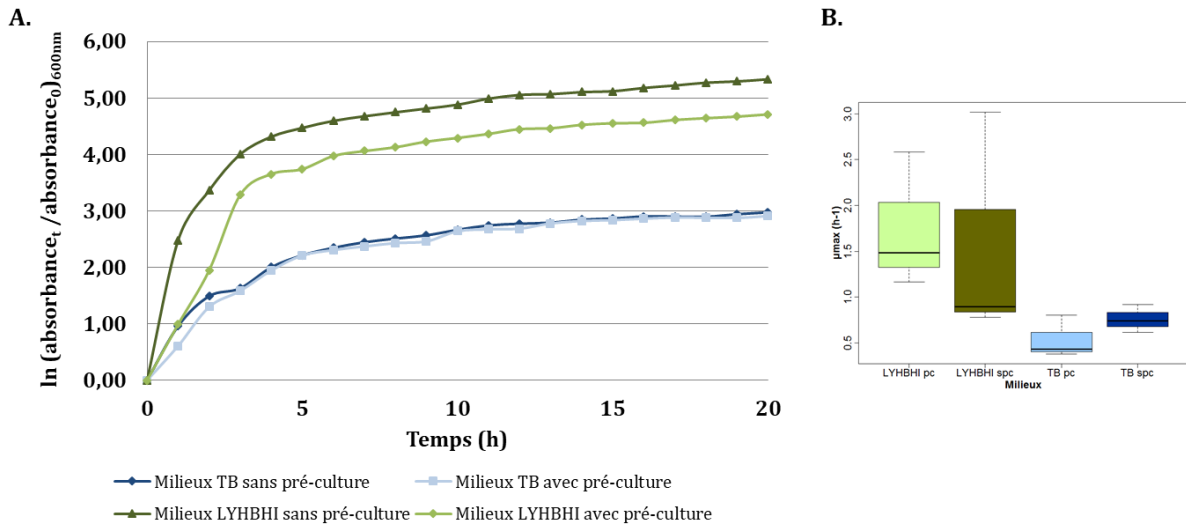


Figure 36 : Courbes de croissance de la souche *E. coli* EPI300 avec et sans pré-culture (A.) et diagramme en boîtes de Tukey des μ_{max} dans ces quatre conditions.

Les courbes représentent la moyenne des absorbance à 600nm sur trois cultures indépendantes dans les six milieux regroupés par type (TB ou LYHBHI), indépendamment du mode d'administration du cholestérol avec et sans pré-culture. Sur la figure B, pc = avec pré-culture et spc = sans pré-culture.

Une ANOVA a été réalisée sur les données du μ_{max} , il n'y pas d'effet de la pré-culture sur les μ_{max} et la figure 36A montre une absorbance finale plus importante sans pré-culture en milieu LYHBHI seulement. En revanche, il y a un effet significatif du milieu sur le μ_{max} , en effet, celui-ci est significativement supérieur en milieu LYHBHI comparé au milieu TB (test de Tukey, $p=0,047$). En conclusion, les résultats ne montrent pas la nécessité d'une pré-culture. Nous choisissons de ne pas en faire pour la suite des essais et pour le criblage final. Ceci constitue un gain de temps lors du criblage des banques génomiques. En revanche, d'après ces données, le milieu LYHBHI permet d'atteindre une biomasse finale plus importante que le milieu TB.

Pour répondre aux autres hypothèses, nous conduisons un suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm couplée à une numération sur la souche *E. coli* EPI300 avec et sans fosmide (*E. coli* EPI300-F4) dans les six milieux précités dans le tableau 10.

Tout d'abord nous vérifions que l'absorbance à 600 nm est corrélée à la numération. La figure 37 montre un nuage des points de l'absorbance à 600 nm en fonction de la numération en s'affranchissant des milieux et du type de souche. La courbe en rouge est la courbe de tendance du nuage de points et la courbe en noire est une régression linéaire de ce nuage de point. Nous pouvons voir que la courbe rouge et la courbe noire sont très proches indiquant une relation quasi linéaire entre l'absorbance à 600 nm et la numération. Cependant, pour les valeurs élevées de l'absorbance à 600 nm, cette association est moins forte (allure de la courbe de tendance).

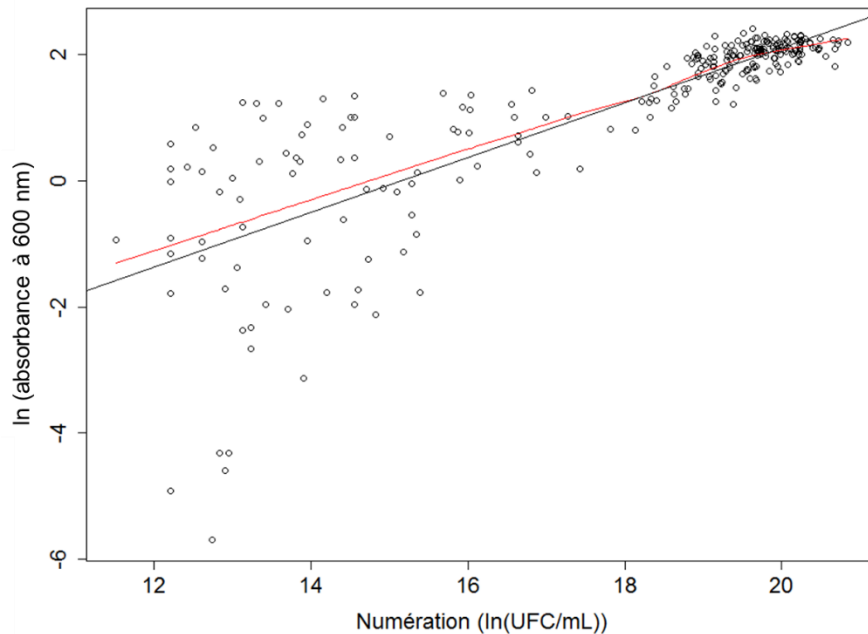


Figure 37 : Nuage de points représentant l'absorbance à 600 nm en fonction de la numération

La courbe en rouge est la courbe de tendance du nuage de point, celle en noire la régression linéaire effectuée sur les données du nuage de points

A la vue de ces résultats, nous décidons de présenter seulement les courbes obtenues pour les numérations ; les résultats des tests statistiques (ANOVA) seront donnés pour les deux conditions (absorbance à 600 nm et numération).

Dans le but de répondre à la seconde hypothèse quant à l'influence de la présence d'un fosmide sur la croissance des souches de *E. coli* EPI300, nous choisissons de représenter les courbes de croissance sur les souches avec et sans fosmide dans les trois différents milieux TB (figure 38A) et dans les trois milieux LYHBHI (figure 38B). La présence d'un fosmide induit un temps de latence plus long dans les milieux TB comparés deux à deux (figure 38A). Les mêmes conclusions peuvent être faites sur les milieux LYHBHI (figure 38B). La biomasse finale (numération à 24h) n'est pas affectée par la présence du fosmide en comparaison des milieux deux à deux sauf pour LYHBHI CH/PC et CH/PC* où la présence du fosmide diminue la biomasse finale (figure 38B). Les μ_{max} calculés à partir de ces courbes expriment seulement une différence (ANOVA, $p=0,043$) en fonction des souches avec un μ_{max} en moyenne supérieur pour la souche avec fosmide comparé à la souche sans fosmide ($1,519 \pm 0,391$ contre $1,340 \pm 0,536$ respectivement).

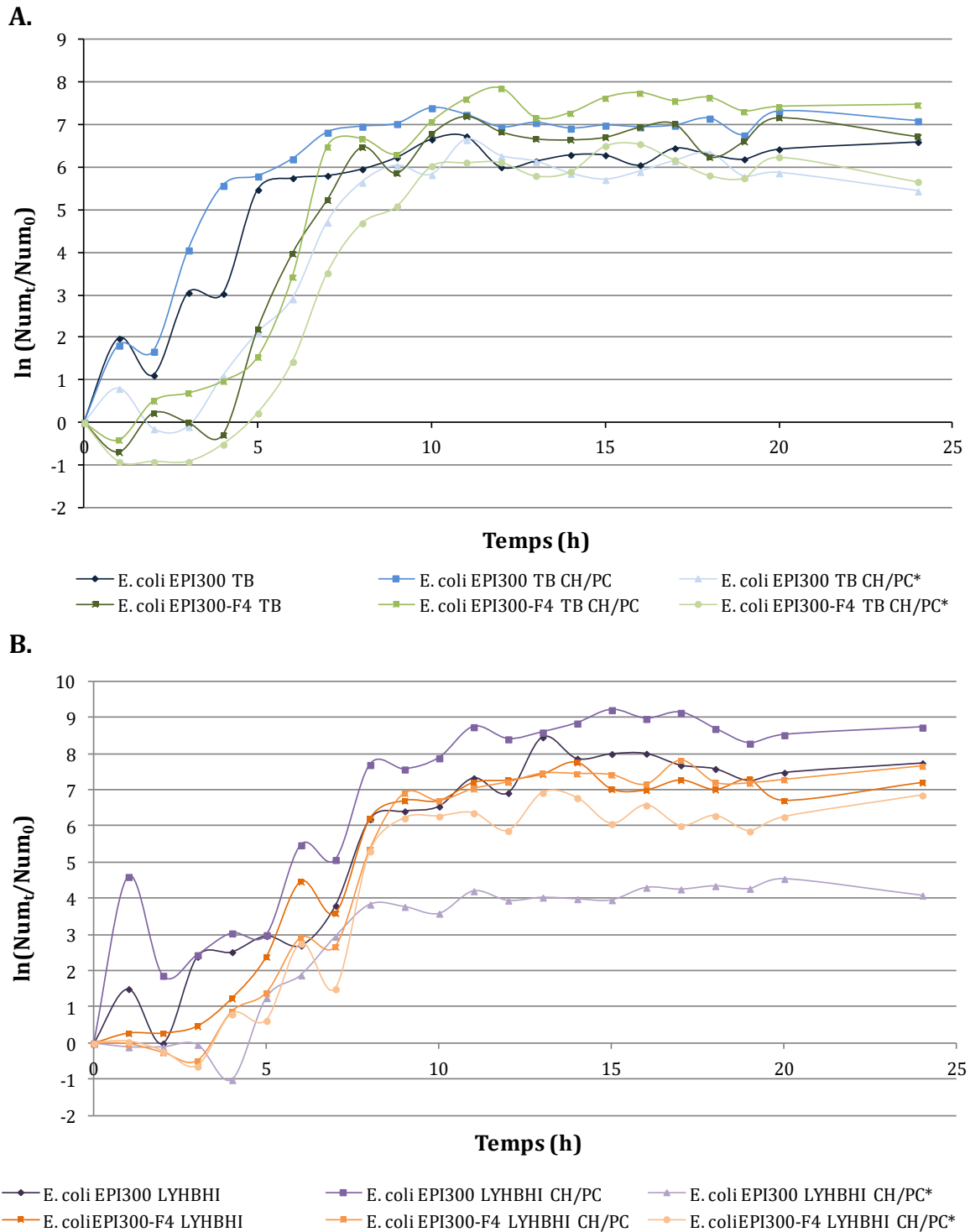


Figure 38 : Courbes de croissance des souches *E. coli* EPI300 et *E. coli* EPI300-F4 sur les six différents milieux TB (A) et LYHBHI (B)

Chaque point est la moyenne de trois mesures indépendantes. La représentation graphique choisie est le logarithme népérien du rapport entre la numération à un instant t et la numération observée au temps 0.

Pour répondre aux deux hypothèses sur la présence du cholestérol, à savoir si le mélange CH/PC et/ou le mode de stérilisation ont un effet sur la croissance des souches, nous choisissons de représenter les courbes de croissance sur les six milieux pour *E. coli* EPI300 (figure 39A) et *E. coli* EPI300-F4 (figure 39B). La souche sans fosmide présente une biomasse en phase

stationnaire plus faible dans les milieux TB que dans les milieux LYHBHI en comparaison deux à deux. En revanche, l'apport du cholestérol sous forme de CH/PC montre une meilleure biomasse finale et tout au long de la phase stationnaire comparé à la forme CH/PC* (figure 39A). Les différences sont moins perceptibles dans le cas de la souche avec fosmide (figure 39B). Les milieux TB ou LYHBHI ainsi que la forme de cholestérol (CH/PC ou CH/PC*) n'affectent pas le μ_{max} de manière significative.

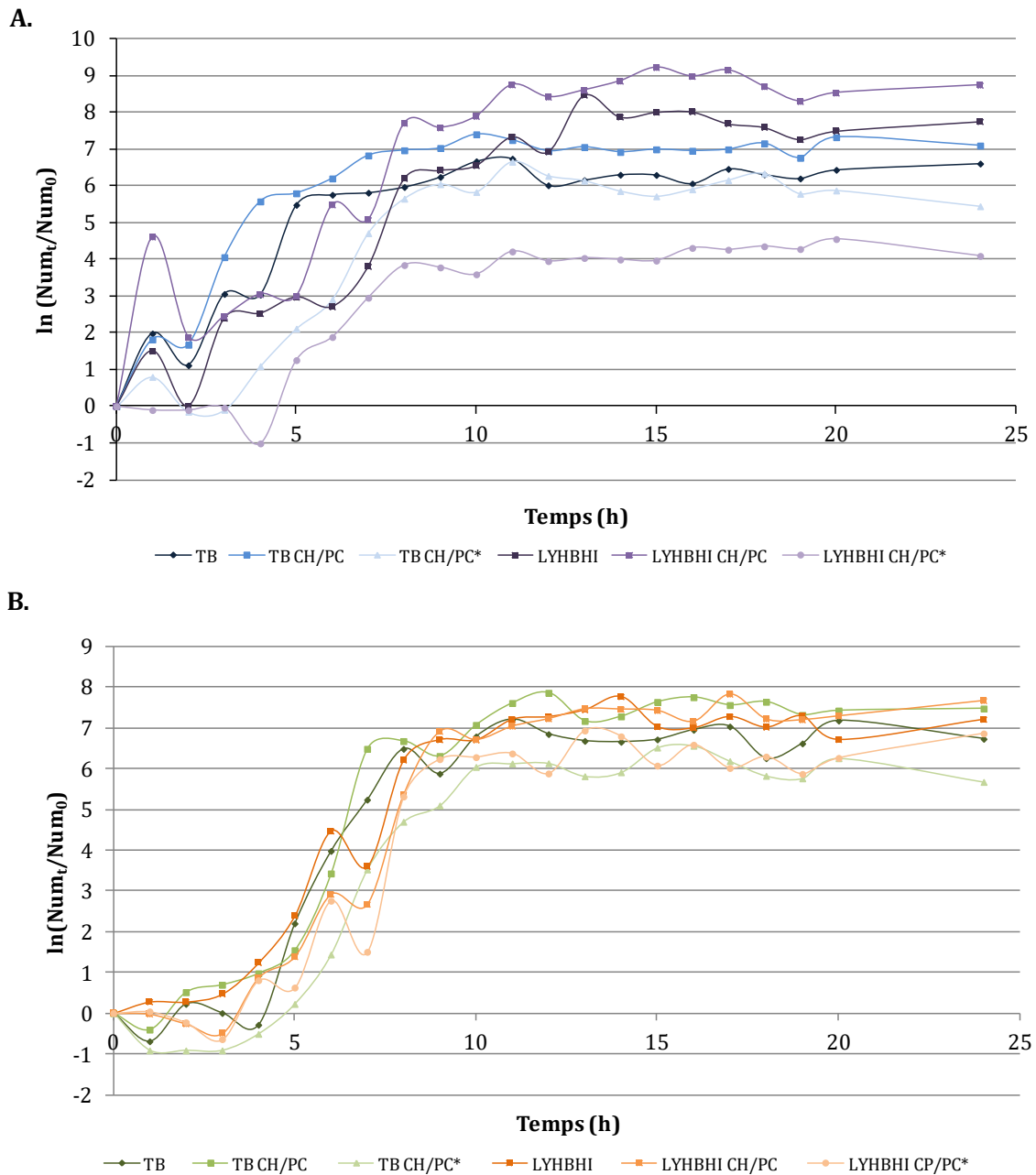


Figure 39: Courbes de croissance des souches *E. coli* EPI300 (A) et *E. coli* EPI300-F4 (B) en fonction des six milieux testés

Chaque point est la moyenne de trois mesures indépendantes. La représentation graphique choisie est le logarithme népérien du rapport entre la numération à un instant t et la numération observée au temps 0.

En conclusion, la présence du fosmide affecte la biomasse finale et la biomasse en phase stationnaire seulement dans les milieux LYHBHI CH/PC et CH/PC* où elle a un effet négatif. Ceci constitue une information importante car la souche *Bacteroides* sp. D8 montre une production de coprostanol en phase stationnaire et non en phase exponentielle (Gérard et al. 2007). Dans ce contexte, la souche sans fosmide semble produire une biomasse supérieure sur le milieu LYHBHI mais ce résultat ne se confirme pas en utilisant la souche avec fosmide rendant les conclusions difficiles. Le mode d'administration du cholestérol sous forme CH/PC semble plus adapté à la production de biomasse que la forme CH/PC* indépendamment du milieu (TB ou LYHBHI) et de la souche testée (avec ou sans fosmide).

Pour conclure sur ces essais, nous faisons le choix de ne pas faire de pré-culture. Pour choisir le milieu de criblage nous effectuons d'autres analyses sur la biodisponibilité du cholestérol dans ces différents milieux.

5.2.4.2.2 Résultats de GC/MS

Dans cette partie nous allons nous essayer de répondre aux hypothèses énoncées dans la partie 4.3.1.4 et rappelées ici : 1) Les souches de *E. coli* utilisées pour la construction des banques ne produisent pas de coprostanol ; 2) Ces souches n'ont pas d'effet connu sur le composé coprostanol (dégradation, transformation, etc.) ; 3) Le cholestérol est biodisponible dans les milieux testés (lequel donne la meilleure biodisponibilité) et 4) La méthode de GC/MS permet bien de détecter le coprostanol dans nos conditions opératoires.

Afin de voir si ces souches produisent du coprostanol, les souches avec et sans fosmide sont mises en culture dans les six milieux du tableau 10 de la partie « matériels et méthodes ». Après extraction des stérols, la production de coprostanol est mesurée par GC/MS. Sur la figure 40A, nous pouvons voir que le coprostanol n'est détecté *a priori* que dans le milieu seul LYHBHI CH/PC* dans un des trois essais (ceci explique l'importante barre d'erreur correspondante à l'écart-type). Il n'est jamais retrouvé dans les échantillons avec la souche *E. coli* EPI300 (sans fosmide) et trois fois avec la souche *E. coli* EPI300-F4 (avec fosmide) dans les milieux TB CH/PC et CH/PC* et LYHBHI CH/PC*. Ces valeurs ne sont pas suffisamment élevées pour conclure que ces souches produisent du coprostanol (ANOVA négative) en revanche elles traduisent un possible bruit de fond de la méthode de détection par GC/MS auquel il faudra prendre garde dans les analyses sur les banques génomiques. En conclusion, la souche utilisée pour construire les banques génomiques, qu'elle contienne un fosmide ou non, ne produit pas de coprostanol.

Pour tester l'effet des souches sur le composé « coprostanol », celles-ci sont mises en culture dans les six milieux précités en présence du coprostanol (protocole détaillé disponible dans le paragraphe 4.3.1.4.2 du chapitre « matériels et méthodes »). Comme ce composé est relativement cher, nous décidons de faire ces expériences seulement sur la souche avec fosmide

sous les hypothèses que si celle-ci est la plus proche de nos constructions pour les banques génomiques et que si elle n'a pas d'effet, il y a une forte probabilité pour que celle sans fosmide n'en ait pas non plus. Les résultats sont présentés sur la figure 40B. En comparant les milieux avec ou sans bactéries, il n'y a pas de différences significatives pour la détection de coprostanol, même dans le milieu TB CH/PC* (ANOVA négative). Il est possible de conclure que les souches n'ont pas d'effet sur le composé coprostanol. De plus, la méthode de GC/MS permet bien la détection de ce composé puisqu'elle n'en détecte pas dans les milieux qui n'en ont pas (figure 40A) mais bien dans les milieux qui en ont (figure 40B). Cependant, cette méthode n'est pas quantitative dans ces conditions puisque malgré une concentration initiale de coprostanol commune (50µg/mL), le ratio coprostanol/standard interne varie entre 1 et 2,5 (figure 40B). Ceci peut être dû à la présence d'un bruit de fond comme suggéré plus haut.

Enfin pour tester la biodisponibilité du cholestérol, nous utilisons comme contrôle positif : la souche *E. coli* BL21 contenant un plasmide codant pour une cholestérol oxydase (COX). Le protocole détaillé de cette expérience est disponible au paragraphe 4.3.1.4.3 de la section « matériels et méthodes ». Nous mettons en culture cette souche dans les six milieux précités avec ou sans induction à l'IPTG (0,25 mM). Les résultats avec induction sur la détection de cholestérol dans les milieux sont présentés sur la figure 39C. Les résultats obtenus sans induction sont similaires mais avec un effet moins significatif et donc non représentés ici. Nous pouvons remarquer que la présence de la souche COX s'accompagne d'une diminution du cholestérol dans les milieux CH/PC et CH/PC*. Cependant, cette diminution n'est significative que dans le milieu TB CH/PC (figure 39C) qui semble donc le mieux adapté pour la biodisponibilité du cholestérol.

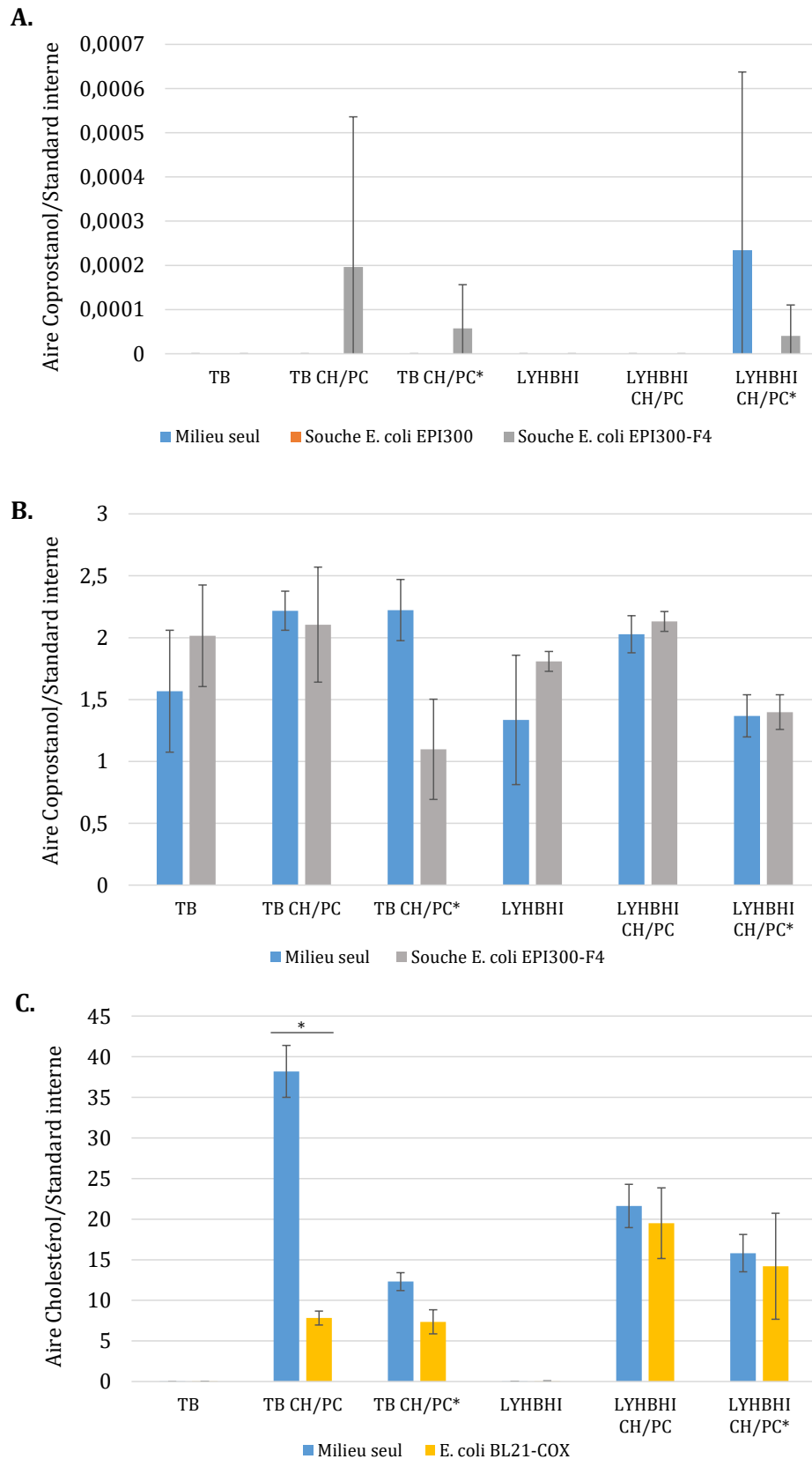


Figure 40 : Histogrammes du ratio des aires de coprostanol (A et B) et de cholestérol (C) par rapport au standard interne en fonction des six milieux testés frais (A, B et C), inoculés avec *E. coli* EPI300 (A), *E. coli* EPI 300-F4 (A et B) ou *E. coli* BL21-COX (C).

Les valeurs ont été mesurées en GC/MS sur des séries de trois échantillons biologiques indépendants. Les barres d'erreur représentent les écart-types. Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA suivi d'un test de Tukey.

5.2.4.2.3 Conclusions

L'ensemble de ces résultats convergent vers un criblage sans pré-culture, dans les conditions utilisés lors de ces essais (une nuit de culture à 37 °C à 150 rpm) en milieu TB CH/PC. Nous choisissons également d'effectuer des témoins négatifs constitués de milieu frais non inoculé pour prendre en compte le bruit de fond de la méthode de GC/MS, observé plusieurs fois dans ces analyses. Les hypothèses principales ainsi que les résultats et conclusions ayant mené à ce choix sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Tableau de synthèse des principales hypothèses et résultats de la mise au point de la procédure de criblage

Mise au point de la procédure de criblage			
⇒ Choix du milieu de culture des clones génomiques			
Hypothèses principales	Expériences réalisées	Résultats principaux	Conclusions
1. Une pré-culture est-elle nécessaire ?	Suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600nm sur les souches <i>E. coli</i> EPI300 et EPI300-F4	<ul style="list-style-type: none"> - Absorbance finale non affectée (milieux TB) ou affectée positivement (milieux LYHBHI) par l'absence de pré-culture - μ_{max} non affecté par la présence d'une pré-culture 	Pas de pré-culture
2. TB ou LYHBHI ?	Suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600nm couplée à la numération sur les souches <i>E. coli</i> EPI300 et EPI300-F4	<ul style="list-style-type: none"> - Effet positif du milieu LYHBHI sur la biomasse en phase stationnaire et final en l'absence de fosmide. - Résultats plus contrastés en présence du fosmide 	LYHBHI
3. CH/PC ou CH/PC* ?		Meilleure biomasse finale en CH/PC qu'en CH/PC* dans les deux types de milieux (TB et LYHBHI) en présence ou en absence de fosmide	CH/PC
4. Dans quel milieu le cholestérol est-il le plus biodisponible ?	Mesure de la diminution du cholestérol en présence de <i>E. coli</i> BL21-COX	Diminution du cholestérol significative uniquement en milieu TB CH/PC	TB CH/PC

5.2.5 Identification de 55 clones potentiellement positifs

Les 768 et 2024 clones des banques génomiques de *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV respectivement ont été criblés individuellement par mise en culture dans 10 mL de milieu TB CH/PC frais. Après une nuit d'incubation, les stérols ont été extraits et analysés en GC/MS. Les protocoles détaillés de l'expérience et de l'analyse des données sont disponibles au paragraphe 4.3.2 de la section « matériels et méthodes ».

La première étape de « nettoyage » des données décrite dans le paragraphe 4.3.2.3 a permis l'élimination de quatre batchs parmi les deux banques génomiques. L'un des batchs de la banque de *Bacteroides* sp. D8 présentait des valeurs de coprostanol aberrantes par rapport au reste des échantillons et a été éliminé après vérification auprès de la plateforme d'analyse de GC/MS. En effet, la colonne de chromatographie avait été changée après ce batch ce qui peut expliquer les différences observées. La présence de coprostanol dans les blancs (extraction à partir d'eau stérile, paragraphe 4.1.3.1 du matériels et méthodes) reflète une éventuelle contamination de l'ensemble du batch et donc son élimination dans la poursuite des analyses. Trois batchs ont ainsi été éliminés, le premier dans la banque de *Bacteroides* sp. D8 et les deux autres dans la banque de *Bacteroides* sp. BV. Après élimination des échantillons ne présentant pas de standard interne, la banque de *Bacteroides* sp. D8 est réduite à 657 échantillons et la banque de *Bacteroides* sp. BV à 1829 échantillons.

La seconde étape permet d'affiner les données en faisant une restriction sur le standard interne. En effet, celui-ci est présent initialement à la même quantité dans tous les échantillons. Sa variabilité devrait donc être faible. Les échantillons avec une valeur très supérieure ou très inférieure à l'ensemble des échantillons sont donc éliminés. Dans un premier temps, nous retirons les valeurs aberrantes identifiées comme les échantillons supérieurs au 3^{ème} quantile additionné de 1,5 fois la distance entre le 1^{er} et le 3^{ème} quantile. Ces valeurs sont représentées par des cercles noirs sur la figure 41A. La figure 41B montre un diagramme en haricot des clones génomiques sans ces valeurs aberrantes. La distribution des valeurs du standard interne pour chaque clone de la banque de *Bacteroides* sp. D8, représentée par les courtes lignes horizontales montre encore un grand nombre de clones entre $6 \cdot 10^6$ et $1,2 \cdot 10^7$ constituant une importante variabilité. Nous décidons donc d'être plus stricts et de retirer les valeurs au-dessus du 3^{ème} quantile pour chaque banque afin de conserver le même circuit d'analyse. Les résultats de la distribution, de la densité et de la médiane de ces nouveaux jeux de données sont représentés en figure 41C.

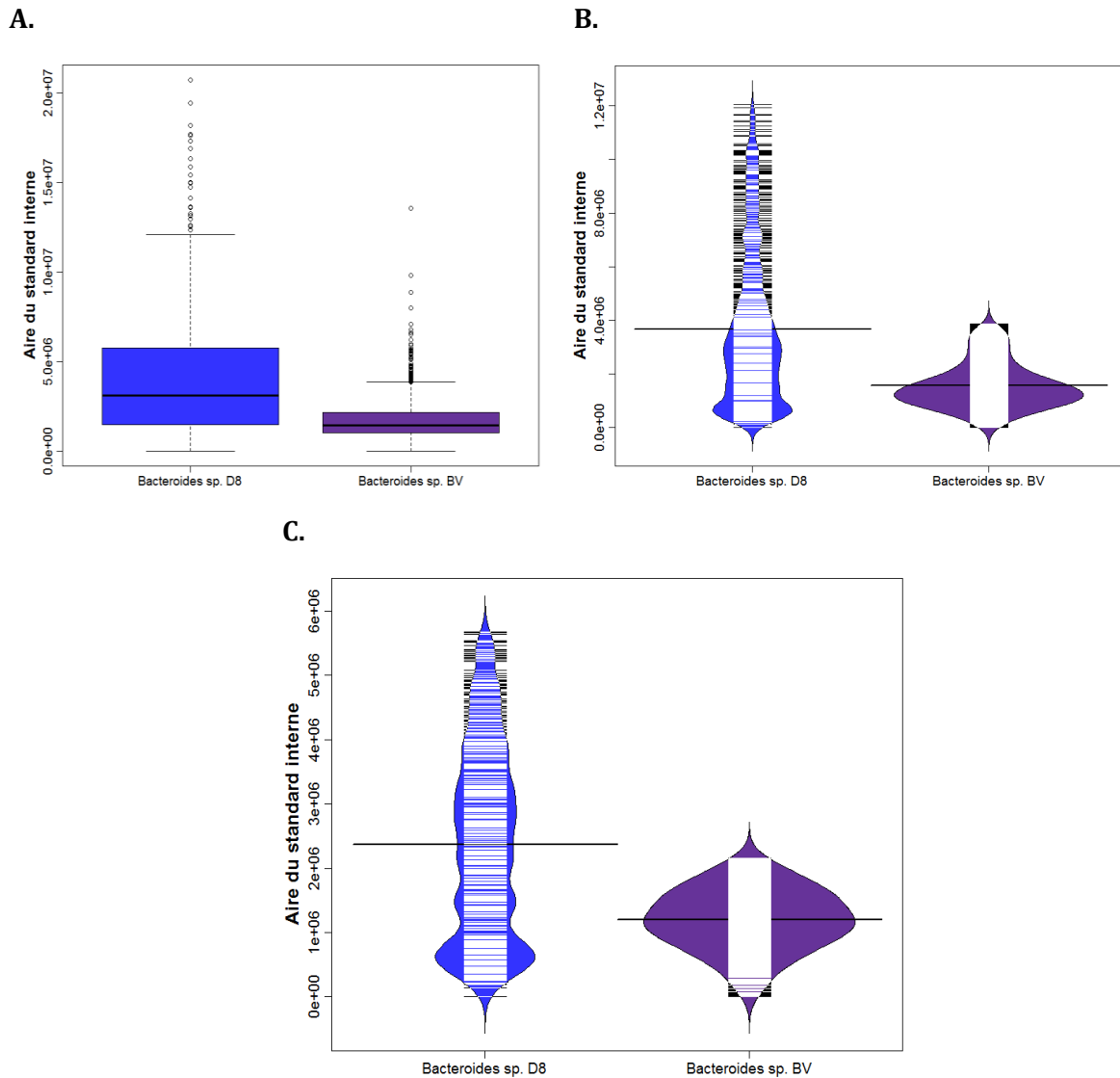


Figure 41 : Diagramme en boîtes de Tukey (A) et diagrammes en haricot (B et C) des valeurs du standard interne pour les clones des banques génomiques de *Bacteroides sp. D8* et *Bacteroides sp. BV* avant (A et B) et après (C) l'affinage des données

Sur les diagrammes en haricot, la courbe de densité est figurée de manière verticale et symétrique. La distribution des valeurs du standard interne pour chaque clone est représentée par une courte ligne (blanche à l'intérieur du diagramme en haricot et noire à l'extérieur) et la médiane est figurée par une épaisse ligne noire horizontale.

Finalement, à la fin de la seconde étape, nous analysons 491 et 1368 clones pour les banques de *Bacteroides sp. D8* et de *Bacteroides sp. BV* respectivement dans le but de trouver des clones potentiellement positifs.

Après avoir calculé les valeurs corrigées de cholestérol et de coprostanol conformément aux formules données dans la partie 4.3.2.3 de la section « matériels et méthodes », les valeurs corrigées de coprostanol sont représentées pour chaque clone en fonction de la valeur du standard interne (figure 42 A et B). Comme expliqué au paragraphe 5.2.4.2.2, la présence d'un pic de coprostanol dans les milieux frais, constituant le bruit de fond de la méthode de GC/MS a été pris en compte par l'utilisation de témoins négatifs et la prise en compte de cette valeur dans les calculs des valeurs corrigées (figure 23). Cependant, pour diminuer la probabilité d'obtenir

de faux-positifs, les clones considérés comme « potentiellement positifs » sont ceux ayant une valeur de coprostanol strictement supérieure au bruit de fond retrouvé dans les milieux frais non-inoculés (témoins négatifs) soit une valeur de coprostanol égale à 0,002 correspondant sur les graphiques 42A et 42B à la ligne horizontale rouge. Ainsi nous pouvons identifier 18 clones potentiellement positifs pour la banque de *Bacteroides* sp. D8 et 37 pour la banque de *Bacteroides* sp. BV.

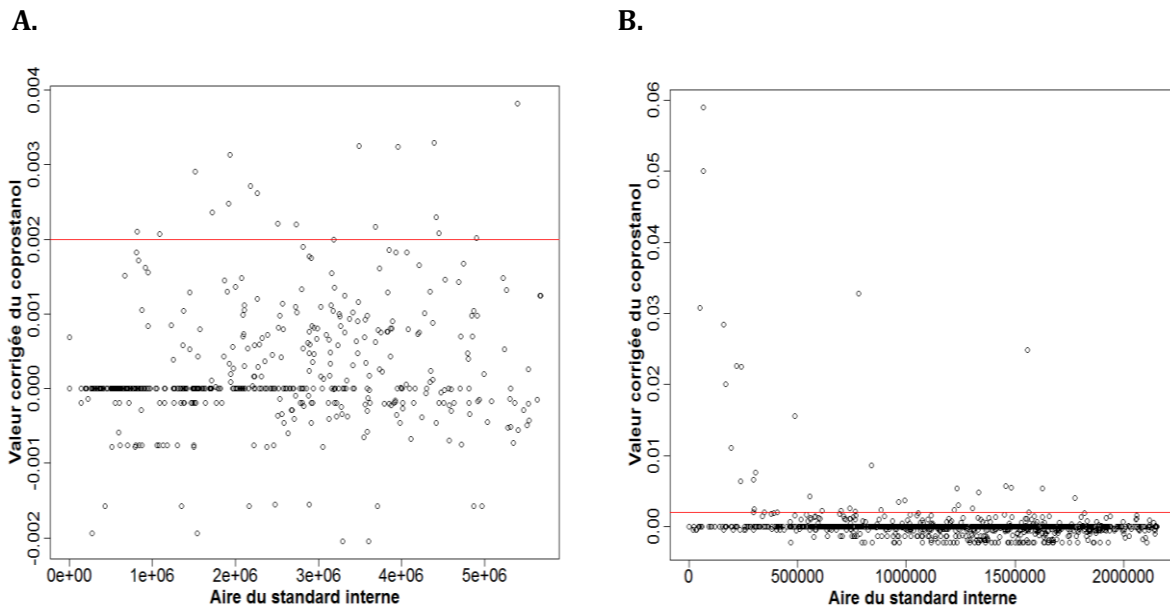


Figure 42 : Valeur corrigée du coprostanol en fonction du standard interne pour les clones génomiques de *Bacteroides* sp. D8 (A) et *Bacteroides* sp. BV (B)

La ligne horizontale rouge est placée à une valeur de 0,002 correspondant au bruit de fond de la méthode de GC/MS dans nos conditions et constituant la limite inférieure d'identification des clones potentiellement positifs.

5.2.6 Conclusions et perspectives

L'objectif de cette étude était d'identifier des clones génomiques positifs pour la production de coprostanol dans le but de trouver les gènes bactériens impliqués dans cette activité.

Le criblage fonctionnel de deux banques génomiques a permis l'identification de 55 clones potentiellement positifs. Néanmoins, il a aussi mis en évidence certaines limites de la méthode d'analyse par GC/MS notamment le temps et le coût associés à cette technique. De plus, les algorithmes de détection et de calculs optimisés par la plateforme ICAN pour la détection des composés en faible quantité comme le coprostanol ont montré leur efficacité par l'identification de clones génomiques potentiellement positifs mais aussi ses limites par la présence quasi systématique d'un bruit de fond dans les échantillons des banques génomiques.

Nous pouvons discuter des choix faits dans le plan d'analyse des clones. Par exemple, la variabilité du standard interne, surtout pour la banque de *Bacteroides* sp. D8 peut être

considérée comme un obstacle à la standardisation des valeurs de coprostanol et de cholestérol. De nouvelles analyses sont en cours en prenant en compte directement les valeurs brutes sans les diviser par le standard interne pour étendre les conclusions. De plus, l'identification des valeurs aberrantes par une représentation en diagramme en boîtes de Tukey est consensuelle mais celle d'utiliser le 3^{ème} quantile pour être plus strict sur la sélection des données est arbitraire et repose avant tout sur l'observation des données et de leur distribution. Nous aurions cependant pu choisir d'autres critères. Sur les figures 43 A et B, nous pouvons voir que à partir des 768 et 2024 clones des banques *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV respectivement, nous ne gardons que 491 et 1368 clones pour chacune des banques. En diminuant le nombre de clones analysés, le recouvrement des génomes diminue également. Celui-ci passe de 4,55 à 2,86 pour la banque *Bacteroides* sp. D8 et de 10,12 à 6,84 pour la banque de *Bacteroides* sp. BV modifiant également la probabilité d'avoir tout le génome dans les clones analysés. Plus précisément, si ce pourcentage reste à 99,99 % dans le cas de *Bacteroides* sp. BV, il descend à 94 % pour la banque de *Bacteroides* sp. D8.

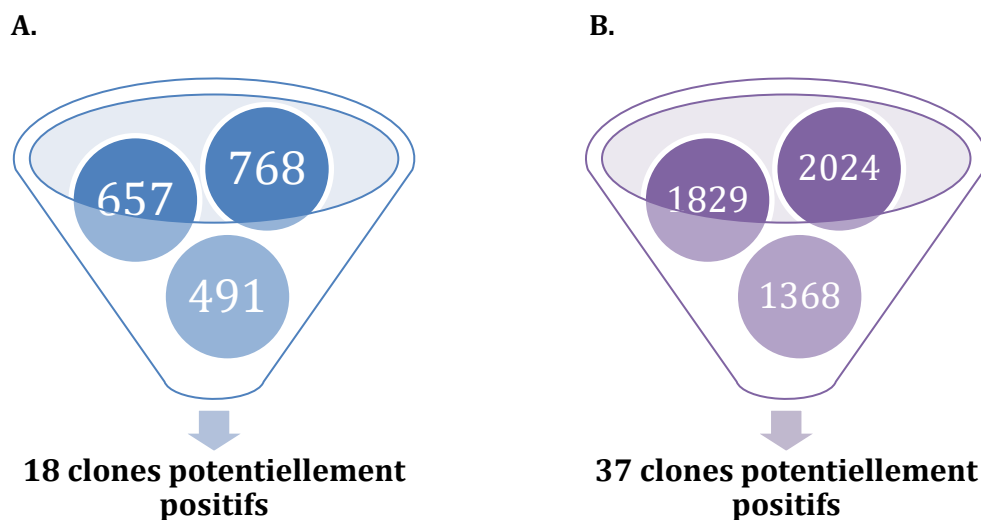


Figure 43 : Résultats en termes de nombres de clones analysés et de clones potentiellement positifs identifiés pour les banques de *Bacteroides* sp. D8 (A) et *Bacteroides* sp. BV (B)

Ce chiffre de 55 clones potentiellement positifs soulève la question des faux-positifs. La présence d'un bruit de fond dans la méthode de détection de GC/MS telle qu'utilisée dans cette expérience rend possible la fausse attribution de la positivité d'un clone. Parmi ces 55 clones, il y a peut-être des « faux-positifs », c'est pourquoi nous utilisons le terme « potentiellement » positifs. Allant en faveur de cet argument, le nombre de clones retrouvés potentiellement positifs, 55, est assez élevé compte tenu de la valeur du recouvrement calculée après les filtres d'analyse et dans l'hypothèse où le ou les gènes impliqués dans l'activité de production de coprostanol seraient en une seule copie dans le génome. Dans ce cas nous aurions dû obtenir au

maximum une dizaine de clones positifs (3 pour la banque de *Bacteroides* sp. D8 et 7 pour la banque de *Bacteroides* sp. BV d'après les recouvrements calculés).

C'est pourquoi les perspectives de cette étude reposent tout d'abord sur une validation de ces clones soit par répétition de l'expérience dans les mêmes conditions ou par l'utilisation de cholestérol deutéré afin de s'assurer que le coprostanol détecté n'est pas un artefact ou dû à une contamination. Les deux stratégies ont été envisagées dans l'équipe Ife et sont actuellement en cours d'étude.

Dans un premier temps, l'isolement de nouvelles bactéries nous a permis la construction d'une banque génomique nous aidant à avancer sur l'identification des gènes de la voie de synthèse bactérienne du coprostanol. Dans un second temps, nous avons sélectionné neuf souches pour les études *in vivo* qui vont nous permettre d'étudier les effets de cette activité sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte.

5.3 Résultats des expérimentations *in vivo*

5.3.1 Objectifs

Les souches bactériennes coprostanoligènes connues ont des difficultés à coloniser le TGI des souris axéniques. Li *et al.* ont montré que *E. coprostanoligenes* n'en était pas capable (Li *et al.* 1998) et les études menées en 2007 sur la souche *Bacteroides* sp. D8 ont été infructueuses (Philippe Gérard, communication personnelle). Le premier objectif est donc de tester la capacité à coloniser le TGI de la souris et à produire du coprostanol *in vivo* des neuf souches sélectionnées dans la partie 5.1 « Isolement de nouvelles souches coprostanoligènes ». De plus, les résultats portant sur le lien entre la production de coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal et la cholestérolémie de l'hôte sont partiels et peu nombreux. Le second objectif des expérimentations *in vivo* est donc l'utilisation de souris axéniques monocolonisées avec les souches bactériennes précédemment sélectionnées qui auront montré des capacités de colonisation du TGI et de production de coprostanol chez la souris axénique. Ceci dans le but d'apporter des informations supplémentaires sur le lien entre production de coprostanol et cholestérolémie de l'hôte. Les difficultés techniques rencontrées sont le travail en isolateur stérile (partie 4.4.1 et figure 24), les transferts stériles de la chambre de Freter où sont cultivées les bactéries coprostanoligènes à ces isolateurs et le maintien de la monoxénie tout au long des expérimentations.

5.3.2 Mesure de l'implantation et de la production de coprostanol chez les souris axéniques

5.3.2.1 Stratégie expérimentale

Le protocole pour l'étude de l'implantation des bactéries dans le TGI des souris axéniques et de leur production de coprostanol *in vivo* aussi appelée procédure 1 de l'expérimentation animale, est détaillé dans la partie 4.4.2 du chapitre matériels et méthodes et résumé sur la figure 43. Les hypothèses de cette expérience sont : i) Les bactéries qui s'implantent doivent être présentes en grande quantité (supérieure à 10^{10} UFC/g de fèces) dans le tractus digestif de la souris sept et quinze jours après le gavage et ii) Nous devrions observer une augmentation de la production de coprostanol *a priori* environ trois jours après le gavage de cholestérol (temps de latence de production chez *Bacteroides* sp. D8 *in vitro* (Gérard et al. 2007)) chez les souris inoculées avec des bactéries coprostanoligènes vérifiant de cette manière leur capacité de production *in vivo*. L'administration d'un gavage de cholestérol a nécessité la mise en place d'un avenant à la saisine initiale. Faute de temps et de disponibilité des souris et des isolateurs, elle n'a été effectuée que sur six des neuf bactéries sélectionnées (tableau 17).

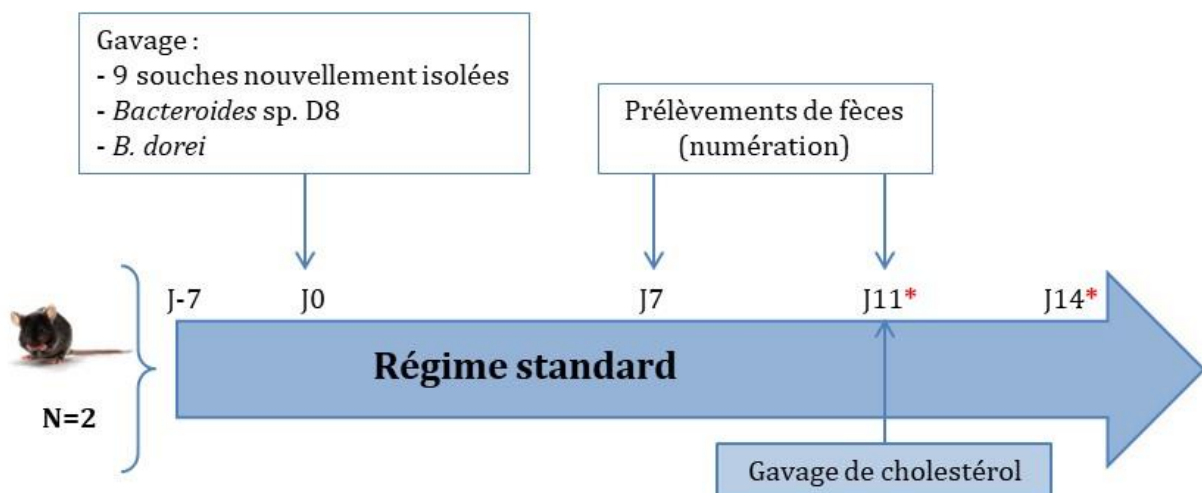


Figure 44 : Stratégie expérimentale pour l'étude de la colonisation du TGI et de la production de coprostanol des souches coprostanoligènes chez les souris axéniques

Mesure du coprostanol dans les selles : *

Tableau 17: Tests réalisés sur les souches bactériennes sélectionnées pour la procédure 1 de l'expérimentation *in vivo*.

√ : testée, X : non testée. *Bacteroides dorei* et *Bacteroides* sp. D8 sont choisies comme témoin négatif et positif respectivement pour la production de coprostanol.

Nom de la souche	Implantation	Coprostanol
<i>Bacteroides ovatus</i> AS140	√	X
<i>Bacteroides fragilis</i> AS129	√	X
<i>Parabacteroides johnsonii</i> AS122	√	X
<i>Bacteroides vulgatus</i> AS082	√	X
<i>Bacteroides caccae</i> AS127	√	X
<i>Bacteroides</i> sp. BV	√	√
<i>Bacteroides vulgatus</i> AS138	√	√
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> AS146	√	√
<i>Parabacteroides distasonis</i> AS093	√	√
<i>Bacteroides dorei</i>	√	√
<i>Bacteroides</i> sp. D8	√	√

5.3.2.2 Résultats : Choix de la souche coprostanoligène à implanter

Au total, 11 souches ont été testées pour l'implantation dans le TGI de la souris axénique (figure 44). Parmi les 9 nouvellement isolées, 3 souches se sont avérées contaminées : *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis* et *Parabacteroides johnsonii*. Ce constat nous a permis d'identifier la source de la contamination et de renforcer notre protocole de contrôle de la pureté des souches de la culture en chambre de Freter jusqu'au gavage des souris dans les isolateurs stériles. Faute de temps et de disponibilité des souris et des isolateurs, nous n'avons pas pu re-tester ces souches qui ne faisaient pas partie des meilleures sélectionnées. Toutes les autres souches testées peuvent coloniser le tractus digestif de la souris ($> 10^{10}$ UFC/g de fèces) (figure 45A). En effet, les souches *P. distasonis*, *B. vulgatus* AS138 et *B. caccae* colonisent en moyenne à hauteur de $1,3 \cdot 10^{10}$; $7,2 \cdot 10^{10}$ et $8,2 \cdot 10^{10}$ UFC/g de fèces respectivement deux semaines après le gavage (J11). Les autres souches, *B. vulgatus* AS082, *B. dorei*, *Bacteroides* sp. BV, *B. xylanisolvens* et *Bacteroides* sp. D8 dépassent même les 10^{11} UFC/g de fèces avec $1,2 \cdot 10^{11}$; $1,8 \cdot 10^{11}$; $2,0 \cdot 10^{11}$; $2,4 \cdot 10^{11}$ et $5,7 \cdot 10^{11}$ UFC/g de fèces respectivement en moyenne. Des profils se dégagent entre les deux souches qui montrent une numération plus importante en J11 qu'en J7 (*B. vulgatus* AS082 et *B. caccae*), la majorité qui montrent une numération plus faible en J11 qu'en J7 (*Bacteroides* sp. BV, *B. vulgatus* AS138, *B. xylanisolvens*, *P. distasonis* et *Bacteroides* sp. D8) et la souche qui a une numération similaire sur les deux dates (*B. dorei*). Toutefois, nous ne pouvons pas conclure sur une cinétique de colonisation du fait du faible nombre de souris

testées (deux par souche). Ces résultats montrent que ces souches ne semblent pas être inhibées par le potentiel d'oxydoréduction du TGI de la souris axénique.

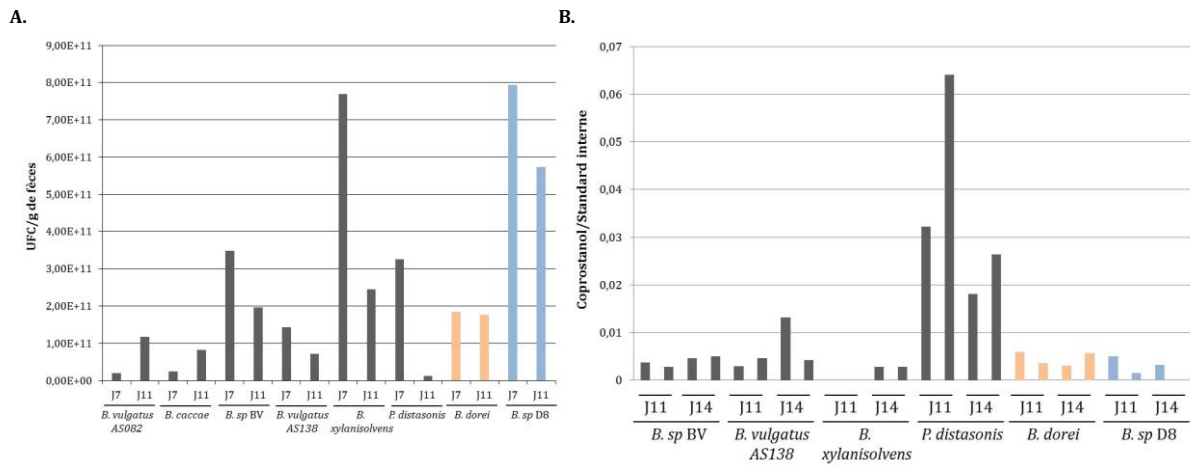


Figure 45 : Implantation des souches (A.) et production de coprostanol (B.) chez les souris mono-colonisées
En orange, le témoin négatif pour la production de coprostanol (*B. dorei*) et en bleu le témoin positif (*Bacteroides* sp. D8). La figure A. représente la moyenne des numérations de trois dilutions de selles prélevées sur deux souris. La figure B. est l'aire sous la courbe du chromatogramme obtenu en GC/MS pour le temps de rétention du coprostanol normalisée à l'aide de celle du standard interne (cholestane) ; les mesures sont faites sur deux souris.

L'interprétation des résultats sur la production de coprostanol nécessite la mise en place de deux hypothèses : la première, en considérant un bruit de fond de la technique de GC/MS détecté lors du criblage des clones et égal à 0,002. Dans ce cas, le coprostanol est détecté seulement dans les selles des souris monocolonisées avec *Parabacteroides distasonis* et *B. vulgatus* AS138. De plus, la première semble pouvoir produire du coprostanol indépendamment de l'induction avec le gavage de cholestérol alors que la production de la seconde est dépendante de ce gavage (figure 45B). La seconde hypothèse est basée sur l'absence du bruit de fond (par définition, il devrait toujours être plus ou moins présent) dans les échantillons en J11 de la bactérie *B. xylanisolvans* (production de coprostanol égale à 0, figure 45B). Dans ce cas, toutes les souches testées produisent du coprostanol *in vivo* avec des efficacités différentes : pas d'induction de la production de coprostanol par le gavage de cholestérol pour les souches *Bacteroides* sp. BV, *P. distasonis*, *B. dorei* et *Bacteroides* sp. D8 ; induction pour les souches *B. xylanisolvans* et *B. vulgatus* AS138. La meilleure souche productrice reste *P. distasonis* sous les deux hypothèses. Toutefois, de la même manière que pour la colonisation du TGI, il est difficile de conclure sur deux souris.

En dehors de la considération de ces deux hypothèses, ces résultats montrent une différence de capacité de production des souches dans le système *in vivo* confirmant cette même assertion faite sur les données *in vitro*. Le TGI de la souris axénique constitue en fait un autre « milieu » dont les caractéristiques sont encore différentes de celles des milieux testés *in vitro*. En effet, la composition physico-chimique est différente (potentiel redox, pH, mobilité intestinale, etc.), la présence et la disponibilité des composés sont également différentes avec

l'accessibilité aux substrats issus de l'alimentation mais aussi du mucus et des cellules de l'épithélium intestinal. Enfin, la biodisponibilité du cholestérol pour sa conversion en coprostanol peut également être impactée par tous ces facteurs.

Les résultats *in vivo* ainsi que les critères *in vitro* énoncés dans le paragraphe 5.1.3 de ce chapitre, nous ont permis de sélectionner la meilleure souche productrice de coprostanol pour la procédure 2 de l'expérimentation animale : *Parabacteroides distasonis*. Nous choisissons également de tester *B. dorei* comme contrôle négatif pour la production de coprostanol.

5.3.3 Effet de la production de coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal sur divers paramètres et notamment la cholestérolémie et le métabolisme du cholestérol

5.3.3.1 Stratégie expérimentale

De la même manière que pour la procédure 1, le protocole détaillé de la procédure 2 est disponible dans le paragraphe 4.4.3 de la partie « matériels et méthodes », figure 26. Après deux semaines d'acclimatation, deux souches bactériennes, l'une produit du coprostanol et l'autre non, sont inoculées à deux groupes de souris axéniques (n=10). Un troisième groupe de souris sont conventionnalisées (n=10). Après deux semaines, durée suffisante pour vérifier que les microbiotes se sont bien implantés, un régime riche en cholestérol est administré pendant 11 semaines. Durant la procédure, plusieurs prélèvements sanguins et de selles sont effectués (figure 26). Les hypothèses de cette étude reposent sur : i) L'utilisation de souris axéniques permet de mettre en évidence un lien de cause à effet entre la bactérie colonisatrice et les observations sur l'hôte, ii) L'utilisation d'un régime riche en cholestérol chez des souris monoxéniques doit induire une hypercholestérolémie, iii) Des souris conventionnalisées sont utilisées comme groupe contrôle et la souche productrice de coprostanol sélectionnée (*P. distasonis*) devrait empêcher l'augmentation de cette cholestérolémie comparativement à la souche ne produisant pas de coprostanol (*B. dorei*), enfin, iv) Si l'hypothèse iii) est vérifiée, d'autres caractéristiques du métabolisme du cholestérol sont probablement modifiées (aspect du foie et du tissu adipeux, expression de certains gènes, etc.)

5.3.3.1.1 Suivi temporel de l'implantation des bactéries

Afin de vérifier la monoxénie et l'implantation correcte de *P. distasonis* et *B. dorei* dans les souris axéniques, une numération bactérienne est effectuée de manière hebdomadaire. La figure 46 montre que les deux souches sont correctement implantées dans le TGI des souris axéniques (> 10¹⁰ UFC/g de fèces). Une baisse significative de la population bactérienne est observée entre

S-1 et S2 passant d'une moyenne de $1,52 \cdot 10^{11}$ et $1,04 \cdot 10^{11}$ UFC/g de fèces en S-1 à $3,55 \cdot 10^{10}$ et $7,12 \cdot 10^9$ UFC/g de fèces en S2 pour les souris colonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement. Cette diminution apparaît deux semaines après le changement de régime alimentaire. Après une période d'adaptation (entre S2 et S5), le niveau de colonisation retrouve les niveaux de départ avec en fin d'expérience une colonisation à hauteur de $9,20 \cdot 10^{10}$ et $6,57 \cdot 10^{10}$ UFC/g de fèces pour les souris colonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement.

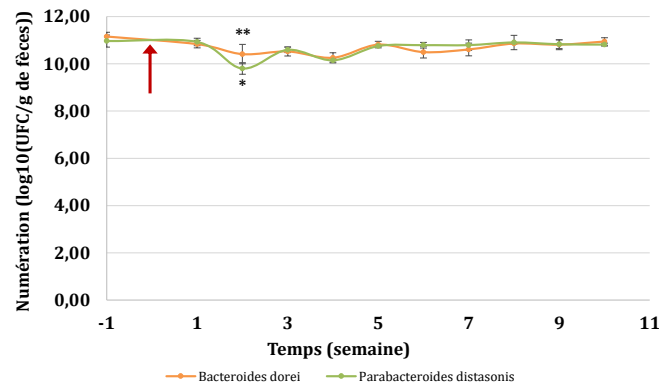


Figure 46 : Suivi de la numération bactérienne sur les selles des souris inoculées avec *B. dorei* et *P. distasonis* au cours du temps

Les points sont la moyenne de la numération effectuée sur trois dilutions sur trois souris. La flèche rouge indique le changement de régime alimentaire. ANOVA et tests de Tukey « * » si $p < 0,05$ et « ** » si $p < 0,01$. Il existe une différence significative entre S-1 et S2 pour les deux groupes de souris avec $p_{B. dorei} = 0,0048$ et $p_{P. distasonis} = 0,031$.

5.3.3.1.2 Détection du cholestérol et du coprostanol dans les selles

Le cholestérol ainsi que le coprostanol ont été dosés par la méthode de GC/MS sur les selles des 30 souris à quatre temps : S0 avant le passage en régime riche en cholestérol, S1, S5 et S9. Il faut tout d'abord noter qu'il n'y a aucune différence significative sur l'aire du standard interne entre les trois groupes de souris (conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*), nous considérerons donc les valeurs de cholestérol et celles de coprostanol comme le ratio des aires de cholestérol et des aires de coprostanol sur l'aire du standard interne. Ce ratio n'a pas d'unité.

5.3.3.1.2.1 Dosage du cholestérol dans les selles

Les analyses sur le cholestérol ne montrent pas de différences significatives entre les trois groupes de souris à chaque point temporel (figure 47A). Le régime riche en cholestérol semble donc avoir le même effet sur la présence de cholestérol dans les selles sur les trois groupes de souris. En revanche, les figures 47 B à D montrent qu'il existe des différences entre les points temporels pour tous les groupes de souris.

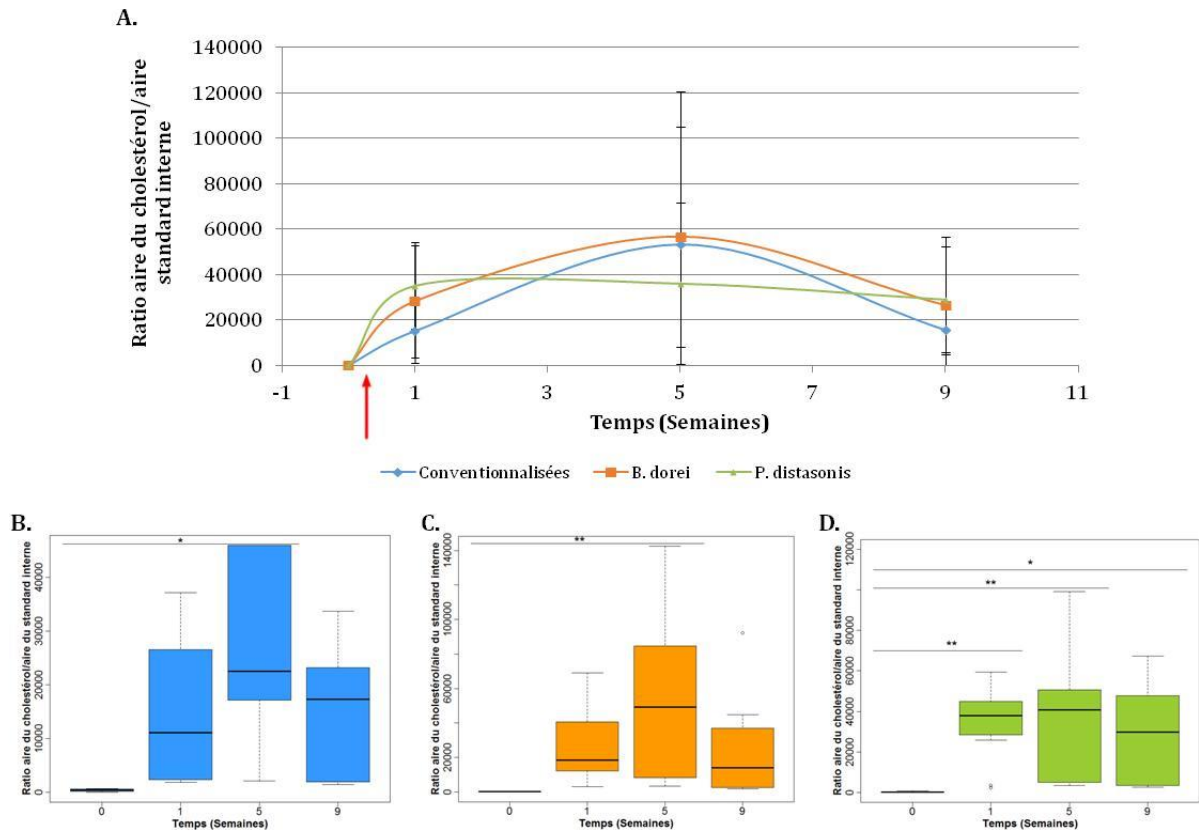


Figure 47 : Cholestérol dans les selles en fonction du temps (A) et diagrammes en boîtes de Tukey du cholestérol retrouvé dans les selles des souris conventionnalisées (B), monocolonisées avec *B. dorei* (C) et *P. distasonis* (D)

Les valeurs sont la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$, $n_{B. dorei} = 9$ et $n_{P. distasonis} = 11$ souris au cours du temps. ANOVA et test de Tukey, « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$.

Le régime riche en cholestérol induit une augmentation de la présence de cholestérol dans les selles entre les semaines 0 et 5 atteignant un ratio moyen de 53 336,38 ; 56 624,97 et 36 122,75 pour le groupe de souris conventionnalisées et pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement ($p_{\text{conv}} = 0,0143$, $p_{B. dorei} = 0,0046$ et $p_{P. distasonis} = 0,0060$ respectivement). L'augmentation du cholestérol dans les selles entre S0 et S5 pour tous les groupes de souris peut être due à l'augmentation de la quantité de cholestérol apportée par le régime alimentaire. Elle peut également faire suite à une augmentation de l'excrétion du cholestérol dans les selles ou à une diminution de l'absorption.

Les selles des souris monocolonisées par *P. distasonis* présentent de plus une augmentation significative du cholestérol entre S0 et les autres semaines ($p_{S0/S1} = 0,0047$ et $p_{S0/S9} = 0,0302$) indiquant une plus grande stabilité dans la présence de cholestérol dans les selles que pour les autres souris. Ces résultats pourraient indiquer que la souche ne consomme pas le cholestérol.

5.3.3.1.2.2 Dosage du coprostanol dans les selles

La figure 48 montre le dosage de coprostanol dans les selles en fonction du temps. En S0, avant le changement de régime alimentaire, les souris conventionnalisées sont le seul groupe à produire du coprostanol de manière significative par rapport aux deux groupes de souris monocolonisées ($p_{B. dorei/conv} = 0,0321$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,0389$). Par la suite, le groupe monocolonisé avec *P. distasonis* produit plus de coprostanol que les deux autres groupes de manière significative en S1 ($p_{P. distasonis/conv} = 1,48.10^{-3}$ et $p_{P. distasonis/B. dorei} = 0,0302$). Il n'y a pas de différence significative sur les autres points temporels.

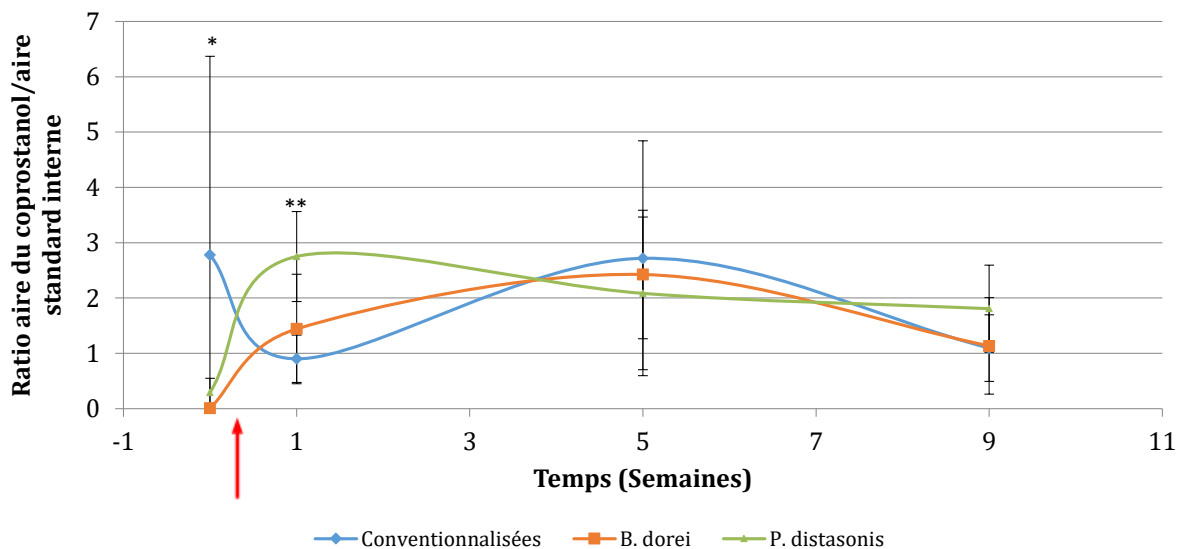


Figure 48 : Coprostanol dans les selles en fonction du temps

Les valeurs sont la moyenne de $n_{conventionnalisées} = 10$, $n_{B. dorei} = 9$ et $n_{P. distasonis} = 11$ souris au cours du temps. La flèche rouge indique le changement de régime alimentaire. ANOVA et test de Tukey, « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$.

De plus les tests univariés entre les différents points temporels sur les groupes de souris montrent qu'il n'y a aucune différence significative sur la production de coprostanol dans le groupe de souris conventionnalisées. Chez les souris monocolonisées, nous observons une augmentation de la production de coprostanol dans les selles entre S0 et tous les autres points temporels pour les deux groupes (figure 49). Ces résultats signifient que le régime alimentaire riche en cholestérol induit la production de coprostanol chez les monocolonisées mais que les conventionnalisées y sont insensibles. En revanche, les profils de production sont différents pour les deux groupes de souris. Après une augmentation du coprostanol en S1 et S5 ($p_{S0/S1} = 0,0124$, $p_{S0/S5} = 2,4.10^{-5}$ et $p_{S1/S5} = \text{non significatif}$), celle-ci diminue de manière significative entre S5 et S9 ($p_{S5/S9} = 0,0219$) mais reste supérieure à S0 ($p_{S0/S9} = 0,0652$) chez les souris monocolonisées avec *B. dorei* (figure 49A). Pour les souris inoculées avec *P. distasonis*, la production de coprostanol augmente dans les selles entre S0 et tous les points temporels ($p_{S0/S1} = 3,42.10^{-5}$, $p_{S0/S5} = 1,91.10^{-5}$ et $p_{S0/S9} = 4,14.10^{-3}$) mais la tendance est plutôt à la baisse entre S1 et S5 et entre S5 et S9 même si cette diminution n'est jamais significative (figure 49B). La

production du coprostanol dans les selles des souris inoculées avec *P. distasonis* semble plus stable au cours du temps que celle des souris inoculées avec *B. dorei*. Ces données montrent donc que contrairement notre hypothèse de départ, la souche *B. dorei* produit du coprostanol *in vivo* sous l'influence d'un régime riche en cholestérol.

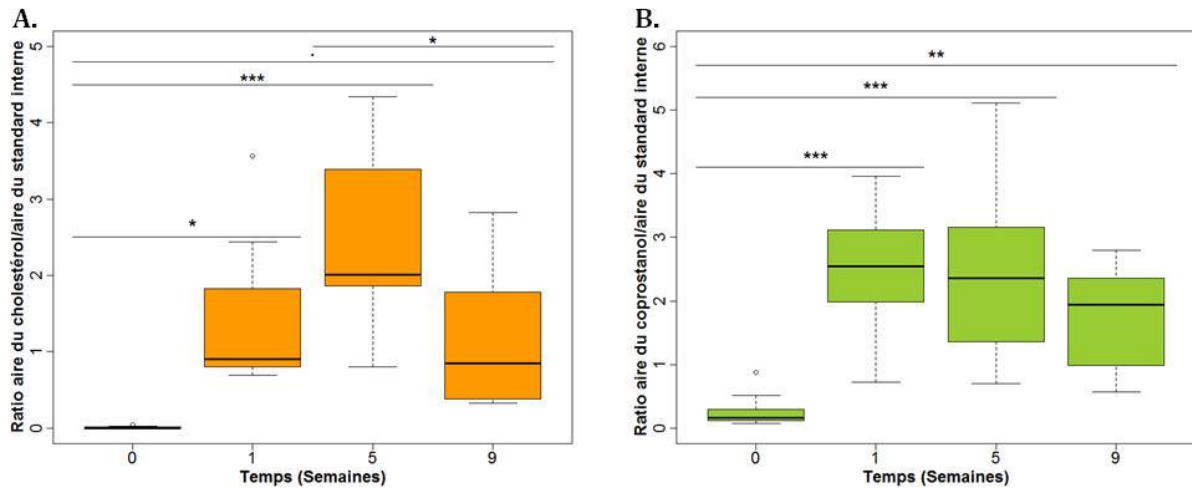


Figure 49 : Diagrammes en boîtes de Tukey de la production de coprostanol dans les selles des souris monocolonisées avec *B. dorei* (A) et *P. distasonis* (B).

Les valeurs sont la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$, $n_{B. dorei} = 9$ et $n_{P. distasonis} = 11$ souris au cours du temps. ANOVA et test de Tukey, « . » si $p < 0,1$, « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$.

De manière générale, la présence de coprostanol dans les selles est synonyme de deux choses : il y a du cholestérol disponible au niveau intestinal pour sa conversion en coprostanol et des bactéries coprostanoligènes sont présentes pour effectuer cette transformation. La présence de coprostanol en S0 dans les selles des souris conventionnalisées indique qu'il y a du cholestérol dans l'intestin en régime standard pour générer cette activité et que des bactéries coprostanoligènes composent le microbiote de base des souris C57BL/6J. De plus la stabilité de cette production au cours du temps indique que le régime riche en cholestérol n'a pas d'influence sur la présence de coprostanol dans les selles chez les souris conventionnalisées.

La faible production de coprostanol en S0 chez les souris monocolonisées peut indiquer une quantité de cholestérol insuffisante pour la production de coprostanol par les souches inoculées. Ou bien que les conditions physico-chimiques du TGI en monocolonisation avec nos souches diminuent la biodisponibilité du cholestérol. Il est également possible qu'en l'absence d'autres bactéries, des composés essentiels à la production de coprostanol ne soient pas disponibles (co-facteurs). Cette dernière hypothèse est cependant mise à mal par l'augmentation de la quantité de coprostanol dans les selles entre S0 et les autres semaines. De plus, ceci indique soit une augmentation du substrat disponible (le cholestérol) soit une meilleure efficacité des bactéries présentes soit une augmentation de leur nombre. Pour vérifier cette dernière hypothèse nous effectuons une analyse multivariée sous forme d'ACP avec les données sur les selles et celles sur les numérations.

5.3.3.1.2.3 Conclusions

Pour aller plus loin, nous avons donc essayé de corrélérer la production de coprostanol au nombre de bactéries présentes dans les selles sous l'hypothèse que le nombre de bactéries coprostanoligènes est corrélé à la production de coprostanol (Veiga et al. 2005). Pour cela, nous effectuons une analyse en composantes principales (ACP) sur le cholestérol, le coprostanol, le standard interne retrouvés dans les selles et les numérations sur les deux groupes de souris monocolonisées. Nous avons remplacé les données manquantes sur les numérations par la moyenne des points à une date donnée ou par les numérations des dates précédentes pour celles où aucune différence significative n'a été montrée (entre S-1 et S1 et entre S5 et S10, voir figure 46).

Le plan 1-2 explique 86,77 % de la variance totale (62,56 % sur l'axe 1 et 24,22 sur l'axe 2). Le cercle des corrélations présenté sur la figure 50A ainsi que le calcul de la somme des \cos^2 sur les axes 1 et 2 montrent que toutes les variables sont très bien représentées. Le cholestérol (Ch) et le coprostanol (Copro) sont corrélés positivement entre eux mais négativement au standard interne (ISTD) et au dénombrement contrairement à notre hypothèse de base. Le cholestérol et le coprostanol contribuent majoritairement à l'axe 1 (35,00 % et 35,18 % respectivement) et le standard interne et le dénombrement majoritairement à l'axe 2 (45,88 % et 53,14 % respectivement).

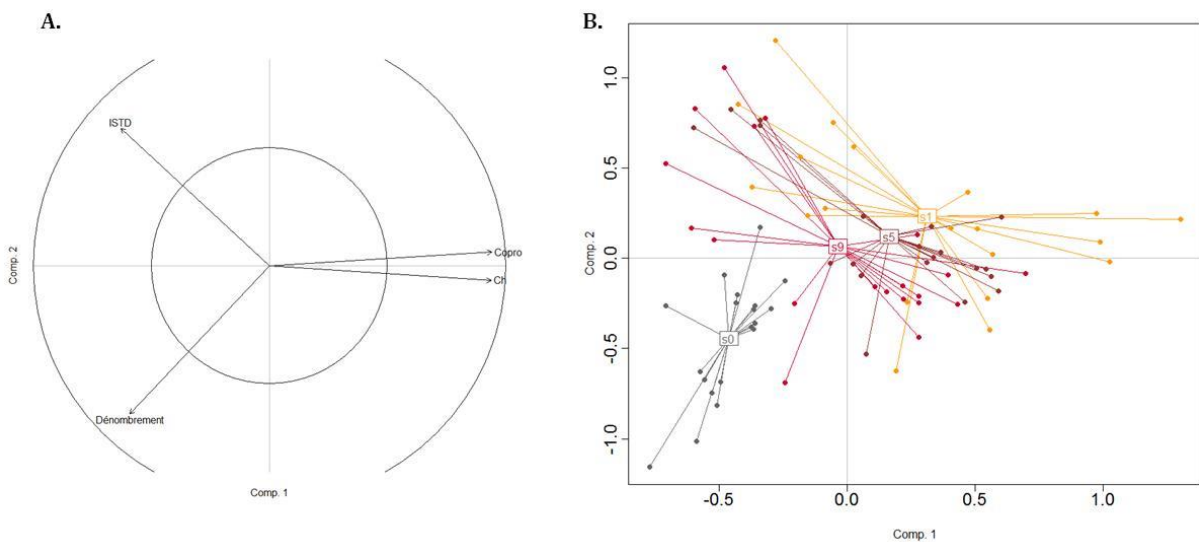


Figure 50 : Cercle des corrélations (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur les données retrouvées dans les selles (cholestérol, coprostanol et numération)

Toutes les souris monocolonisées avec *P. distasonis* sont bien représentées en revanche, quatre souris inoculées avec *B. dorei* sont mal représentées en S5 et une en S9. Il est intéressant de constater que des groupes se forment en fonction du temps avec un déplacement du centre d'inertie de la gauche vers la droite entre S0 et S1 (figure 50B) montrant à la fois une diminution

de la numération (figure 46) et une augmentation du cholestérol et du coprostanol (figures 47 B et C et 49 A et B) dans les selles. Puis le centre d'inertie se déplace à nouveau entre S5 et S1 et entre S9 et S5 pour se rapprocher de la position initiale qui aurait peut-être été atteinte si nous avions suivi l'expérimentation sur une plus longue période. Le regroupement par point temporel et par statut bactérien qui est présenté dans l'annexe III n'apporte pas beaucoup plus d'informations si ce n'est une séparation en S0 entre les deux groupes de souris avec les souris inoculées avec *P. distasonis* un peu plus proches du centre de la carte des individus. Ceci peut s'expliquer par une plus faible numération en S-1 (utilisée pour les données de l'ACP en S0 comme aucune différence significative n'a été montrée entre S-1 et S1) que les souris inoculées avec *B. dorei* ($1,04 \cdot 10^{11}$ et $1,52 \cdot 10^{11}$ UFC/g de fèces respectivement) et par un plus fort contenu en coprostanol en S0 (figures 46 et 48) même si ces différences ne sont pas significatives en tests univariés.

En conclusion, la figure 46 ainsi que cette analyse montrent que l'hypothèse d'une augmentation du nombre de bactéries entre S0 et les autres semaines de l'expérience n'est pas valide pour expliquer l'augmentation du coprostanol retrouvé dans les selles. En revanche, celle d'une augmentation du substrat disponible dans l'intestin peut en partie être vérifiée. Cependant, le dosage sur les selles n'est qu'un reflet du cholestérol réellement disponible au niveau intestinal pour la transformation en coprostanol. Enfin, nous n'avons pas de données sur l'efficacité de la production de coprostanol par les souches *in vivo*.

5.3.3.1.3 Gain de poids et poids des organes

5.3.3.1.3.1 Gain de poids

Les trois groupes de souris ont un gain de poids similaire au cours du temps (figure 51A). Les souris monocolonisées avec *Bacteroides dorei* ont une tendance à être plus lourdes que les autres mais ceci n'est pas confirmé statistiquement, la probabilité est toujours supérieure à 0,07 après une ANOVA et un test de Tukey. De même, à la fin de l'expérimentation soit 11 semaines après un régime riche en cholestérol, le poids ainsi que le gain de poids des trois groupes sont similaires (figure 51 B et C). Les souris conventionnalisées atteignent un poids moyen de $30,46 \pm 3,08$ g et les souris monocolonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* un poids moyen de $33,03 \pm 2,20$ g et de $31,20 \pm 2,88$ g respectivement. Les gains de poids moyens sont de $6,15 \pm 3,81$ g, $7,47 \pm 3,35$ g et $5,48 \pm 2,62$ g pour les groupes de souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement. En revanche, les souris monocolonisées avec *P. distasonis* montrent une consommation alimentaire moyenne sur les 11 semaines de régime riche en cholestérol significativement plus faible que les deux autres groupes $p_{P. distasonis/conv} = 3,75 \cdot 10^{-3}$ et $p_{P. distasonis/B. dorei} = 3,03 \cdot 10^{-4}$ (figure 51D). Ce résultat n'est pas lié à une diminution du poids corporel ni à une différence d'efficacité alimentaire (diagramme non présenté ici). Il pourrait

s'expliquer par la production de composé(s) ayant un effet satiétogène direct sur le système cérébral du contrôle de l'appétit ou indirect en activant la production de molécules ayant ces effets.

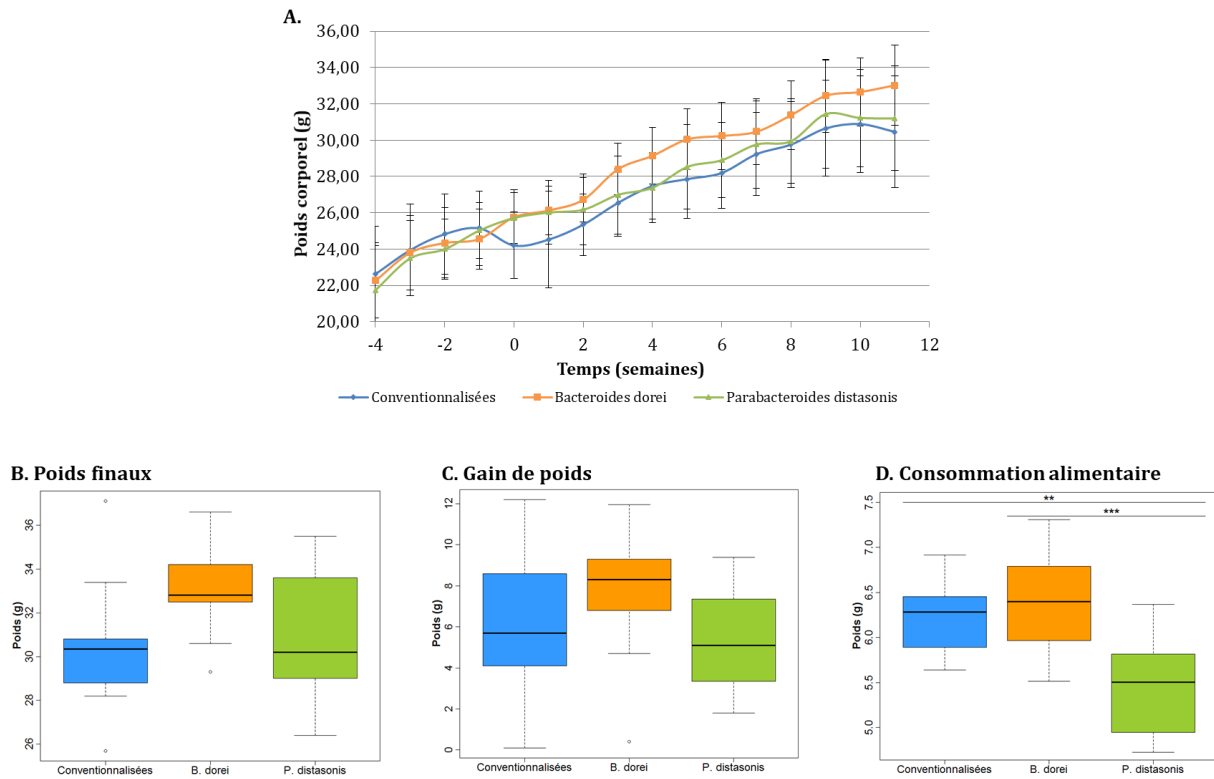


Figure 51 : Suivi du poids corporel au cours du temps (A), poids finaux (B) gain de poids (C) et consommation alimentaire (D)

A. Chaque points est la moyenne des poids de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$, $n_{\text{B. dorei}} = 9$ et $n_{\text{P. distasonis}} = 11$ souris au cours du temps **B.** De même pour la dernière semaine d'expérimentation (S11) **C.** Le gain de poids mesuré comme étant la différence entre le poids final des souris et celui avant le régime alimentaire riche en cholestérol (S0) et **D.** La consommation alimentaire moyenne sur les 11 semaines de régime riche en cholestérol ; ANOVA et test de Tukey, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$, $p_{\text{P. distasonis/conv}} = 3,75 \cdot 10^{-3}$ et $p_{\text{P. distasonis/B. dorei}} = 3,03 \cdot 10^{-4}$.

Pour la suite des analyses, la stratégie était de rassembler toutes les variables de poids corporel et des organes ainsi que les paramètres plasmatiques pour construire un modèle par analyse en composantes principales (ACP) expliquant un maximum de la variance observée entre toutes les données sur les 30 souris. Cependant, ce modèle une fois réalisé n'explique que 44 % de la variance observées pour les meilleurs axes (1-2) et certaines variables sont très mal représentées. Nous décidons donc de séparer analyses des poids et analyses des paramètres plasmatiques.

5.3.3.1.3.2 Poids des organes

Le foie, le cœur, la rate, le pancréas, le tissu adipeux épidydimal, le caecum total, vide et son contenu sont pesés et le côlon et l'intestin grêle sont mesurés lors de l'abattage. Les données exprimées ici sont le poids des organes ramenés au poids corporel des souris excepté pour

l'intestin grêle et le côlon où ce n'est pas le poids qui est pris en compte mais la longueur. L'ACP réalisée sur l'ensemble de ces organes explique 65,30 % (40,90 % pour l'axe 1 + 24,41 % pour l'axe 2) de la variance totale du modèle sur les dimensions 1 et 2 (figure 52).

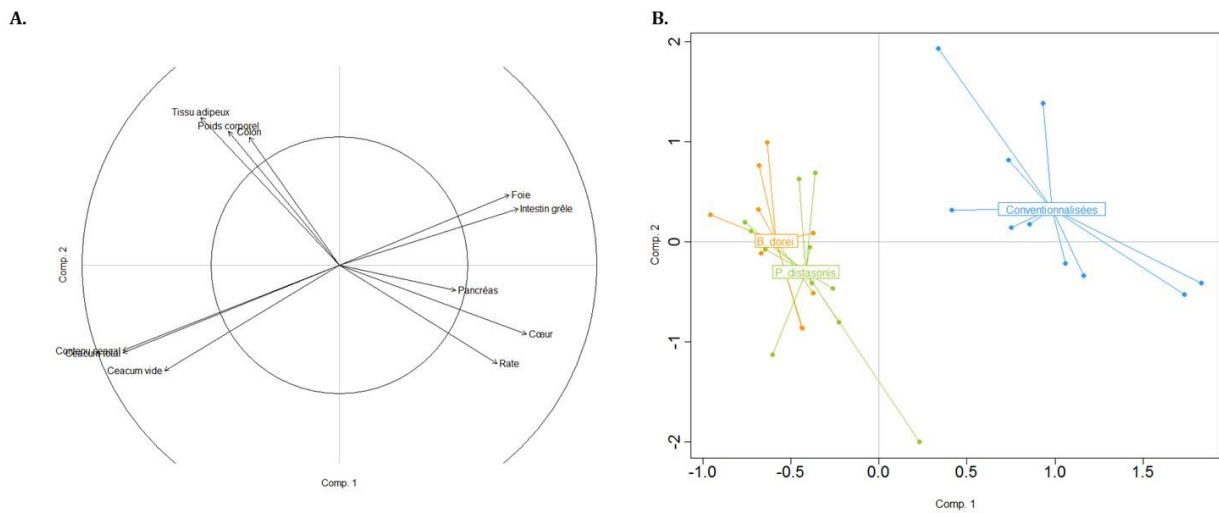


Figure 52 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur le poids des organes

La figure 52A représente le cercle des corrélations des variables. La majorité des variables sont bien représentées sauf le pancréas qui n'est pas très bien représenté (somme des \cos^2 égale à 0,21). Le poids corporel est corrélé positivement à la longueur du côlon et au poids du tissu adipeux mais négativement avec les poids du cœur et de la rate. C'est-à-dire que les individus ayant un poids élevé ont un cœur et une rate légers. De même le poids du foie et la longueur de l'intestin grêle sont corrélés positivement l'un à l'autre mais négativement avec l'ensemble des mesures réalisées sur le caecum (figure 52A.). Ceci est cohérent avec la contribution des variables aux axes avec les données du caecum (total, vide, contenu) et du cœur ainsi que la longueur de l'intestin grêle contribuant majoritairement à l'axe 1 (caecum total 15,78 %, vide 10,28 % et contenu 15,77 %, cœur 11,70 % et intestin grêle 10,70 %), alors que le poids corporel, le poids du tissu adipeux, et la longueur du côlon contribuent majoritairement à l'axe 2 (poids corporel 16,99 %, tissu adipeux 20,68 %, côlon 15,51 %). Ceci signifie que sur la carte des individus, ceux à droite de l'axe 2 ont un cœur plus lourd et un intestin grêle plus long que la moyenne des individus mais des données sur le caecum inférieures à la moyenne. Ceux, au-dessus de l'axe 1, ont un poids corporel et de tissu adipeux et une longueur de côlon supérieurs à la moyenne des individus.

Lorsque l'on regarde la carte des individus plus précisément (figure 52B), seul un individu appartenant au groupe de souris conventionnalisées est mal représenté par cette analyse, un seul également pour le groupe de souris monocolonisés avec *B. dorei* et trois pour le groupe monocolonisés avec *P. distasonis*. Cette représentation permet de dissocier deux

groupes : les souris conventionnalisées à droite de l'axe 2 ayant les caractéristiques énoncées plus haut (cœur plus lourd, intestin grêle plus long mais valeurs du caecum plus faibles), et les souris monoxéniques à gauche. Il est plus difficile de situer les deux groupes en fonction de l'axe 1 bien que les souris conventionnalisées semblent au-dessus.

Pour étendre les conclusions, nous réalisons des tests univariés sur ces données sous forme d'une ANOVA couplée à un test de Tukey. Les résultats sont présentés sur la figure 53 avec les poids du cœur, foie, pancréas et caecum total représentés par les figures 53 A, B, C et D respectivement et la longueur de l'intestin grêle sur la figure 53E.

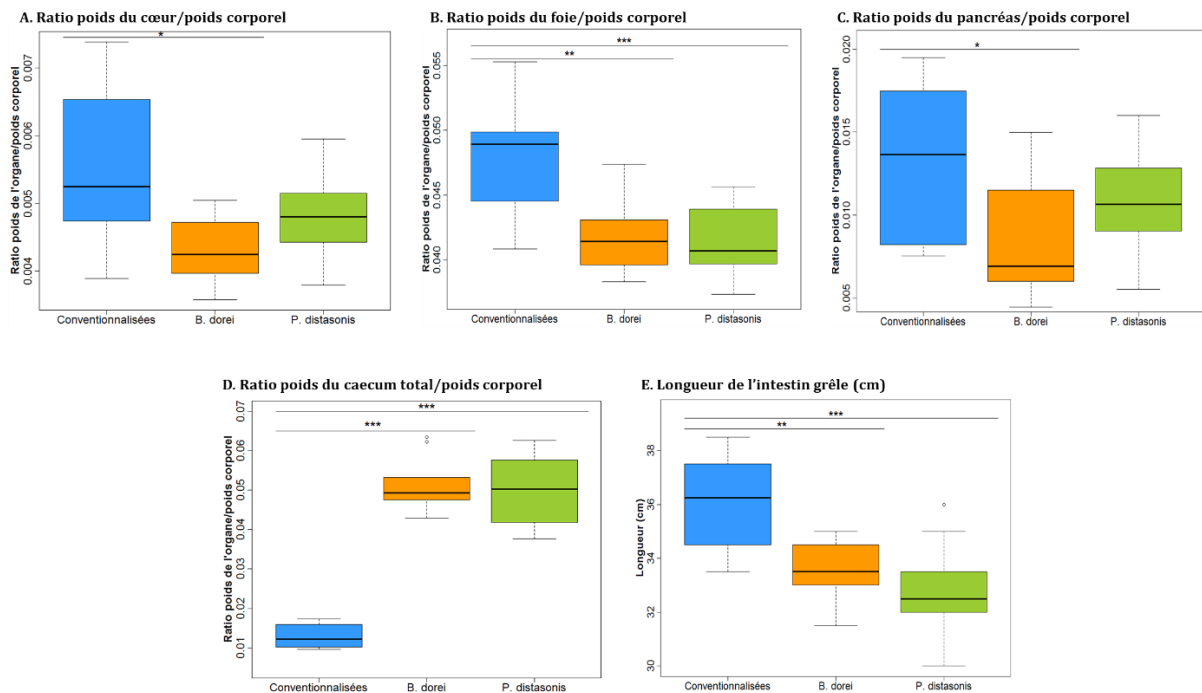


Figure 53 : Diagrammes en boîtes de Tukey du ratio poids des organes/poids corporel pour le cœur (A), le foie (B), le pancréas (C) et le caecum total (D) ainsi que de la longueur de l'intestin grêle (E).

Chaque points est la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$, $n_{B. dorei} = 9$ et $n_{P. distasonis} = 11$ souris. ANOVA et test de Tukey : « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$.

Ces analyses confirment une dichotomie entre les souris conventionnalisées et monocolonisées illustrée par l'ACP et par les poids du foie (53B) et du caecum total (53D) ainsi que par la longueur de l'intestin grêle (53E). En effet, tous ces paramètres sont significativement différents entre les souris conventionnalisées et celles monocolonisées que ce soit avec *B. dorei* ou *P. distasonis*. Plus précisément, les souris conventionnalisées ont un foie rapporté au poids corporel plus lourd que les monocolonisées ($p_{B. dorei/conv} = 1,89.10^{-3}$ et $p_{P. distasonis/conv} = 9,82.10^{-4}$), un intestin grêle plus long ($p_{B. dorei/conv} = 5,97.10^{-3}$ et $p_{P. distasonis/conv} = 2,05.10^{-4}$) mais un caecum total plus léger ($p_{B. dorei/conv} = 0$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0$). Les résultats sur le caecum total, vide et le contenu caecal sont similaires c'est pourquoi nous choisissons une seule de ces trois représentations. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus pour l'ACP. En effet, le groupe conventionnalisé est à droite de l'axe 2 ce qui correspond à un intestin grêle plus long et un

caecum total plus léger, validés par l'ANOVA et le test de Tukey. Ils apportent une information supplémentaire sur le foie. Les tests univariés distinguent également le groupe monocolonisé avec *B. dorei* des deux autres sur deux critères : le poids du cœur et le poids du pancréas rapportés au poids corporel, sont tous deux significativement plus légers ($p_{B. dorei/conv} = 0,0143$ et $p_{B. dorei/conv} = 0,0411$) que le groupe de souris conventionnalisées (figure 52 A et C). La corrélation négative entre le poids corporel et le poids du cœur (figure 52A) est cohérente avec le fait que le groupe de souris le plus lourd (monocolonisés avec *B. dorei*, figures 51 A et B) est aussi celui qui a les organes ramenés au poids corporel les plus légers (cœur, foie et pancréas) à l'exception du caecum et de l'intestin grêle. La différence non significative de poids corporel peut s'expliquer partiellement par le poids du caecum (figure 53D) mais aussi et ce qui n'a pas été mesuré dans cette étude, par le poids des muscles et/ou des os étant donné que nos résultats ne montrent pas de différence significative sur le tissu adipeux.

En résumé, dans un premier temps, ces données distinguent surtout les souris conventionnalisées des deux groupes monocolonisés indépendamment de la souche bactérienne colonisatrice. Dans un second temps, les tests univariés distinguent les souris monocolonisées avec *B. dorei* des souris conventionnalisées.

5.3.3.2 Comparaison des paramètres plasmatiques

De la même manière que pour le poids des organes, nous réalisons une ACP sur les paramètres plasmatiques aux temps S0 et S11 accompagnés du coprostanol et du cholestérol mesurés dans les selles en S0 et S9. Les valeurs associées à la semaine 9 sont indiquées sous le label semaine 11 dans l'ACP pour permettre l'identification de certaines tendances présentées dans la suite de ce paragraphe. Le cercle des corrélations des variables ainsi que la carte des individus en fonction du statut bactérien des souris et en fonction du temps de prélèvement sont disponibles sur les figures 54 A et B. Ce modèle explique 65,76 % de la variance totale sur le plan 1-2 (49,68 % sur l'axe 1 + 16,08 % sur l'axe 2).

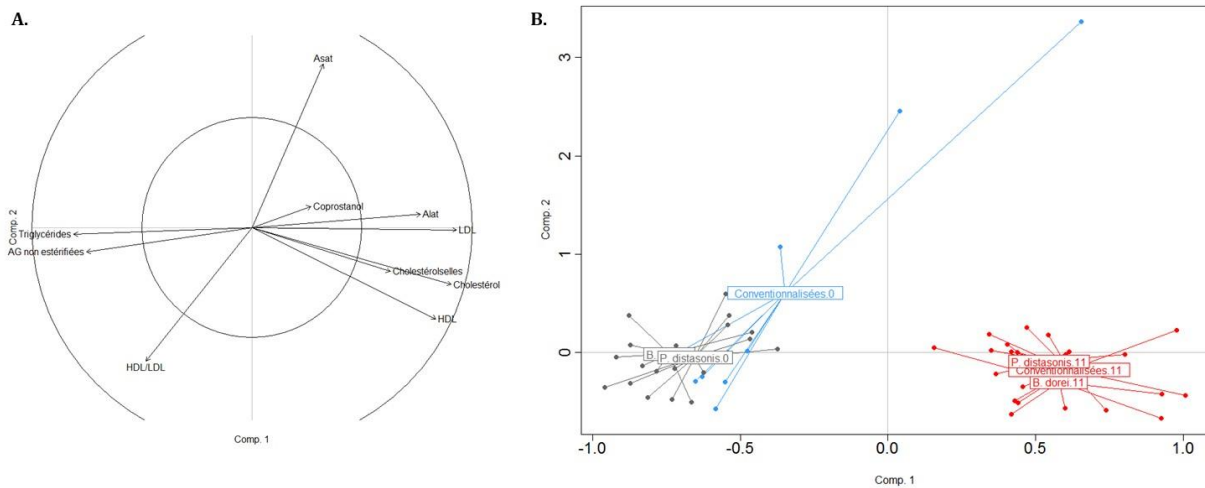


Figure 54 : Cercle des corrélations (A) et carte des individus colorés en fonction du statut bactérien du TGI des souris et du temps de prélèvement (B) sur les axes 1-2 de l'ACP prenant en compte les paramètres plasmatiques ainsi que le cholestérol et le coprostanol retrouvés dans les selles

Le cercle des corrélations ainsi que le calcul de la somme des \cos^2 montrent que presque toutes les variables sont bien représentées. Cependant, le coprostanol est très mal représenté dans ce plan (somme des $\cos^2 = 0,09$) et le cholestérol dans les selles (Cholestérolselles) pas très bien représenté (somme des $\cos^2 = 0,44$). Nous ne commenterons donc pas ces deux variables dans ce paragraphe. Les variables HDL, LDL, cholestérol et Alat sont corrélés positivement entre elles mais négativement aux variables acides gras (AG) non estérifiés et triglycérides (TG) (figure 54A). Les variables contribuant le plus à la dimension 1 sont les variables cholestérol et LDL et dans une moindre mesure AG non estérifiés, triglycérides et Alat (17,55 %, 18,90 %, 12,61 %, 14,24 % et 12,62 % respectivement) alors que les variables contribuant le plus à la dimension 2 sont les variables Asat et HDL/LDL (Asat 43,47 % et HDL/LDL 27,75 %). La variable HDL contribue de manière égale aux deux axes (14,68 % pour l'axe 1 et 17,22 % pour l'axe 2). Ceci signifie que les individus au-dessus de l'axe 1 ont une concentration en Asat supérieure et en HDL/LDL inférieure à la moyenne. De même ceux situés à droite de l'axe 2 ont une concentration en LDL, HDL et cholestérol supérieures et en Alat, AG non estérifiés et en triglycérides inférieures à la moyenne.

Tous les individus sont bien représentés sauf trois dans le groupe conventionnalisé à S0 et un dans le groupe de souris colonisées avec *B. dorei* un à S11. La figure 54B montre une dichotomie entre les souris monocolonisées (en gris sur le graphique) et les souris conventionnalisées (en bleu) en S0. Ceci signifie que ces dernières ont des moyennes plasmatiques en Asat en S0 plus élevées que les souris monocolonisées mais des valeurs en AG non estérifiés et en triglycérides globalement inférieures. Cette analyse montre également une séparation en fonction du temps de part et d'autre de l'axe 2 indiquant des différences sur les variables entre S0 et S11 et témoignant de l'effet du régime riche en cholestérol. Notamment

avec des concentrations en triglycérides et en AG non estérifiés plus élevées et des concentrations en Alat, cholestérol, HDL et LDL plus faibles en S0 qu'en S11 pour les trois groupes de souris, indépendamment de leur statut bactérien.

Pour mettre en évidence ces différences de manière statistique, cette ACP est couplée avec des analyses univariées effectuées entre les trois groupes de souris en S0, figures 55 A à C et en S11, figures 55 D à F. Ces résultats confirment les tendances observées sur l'ACP et montrent des différences en fonction du statut bactérien des souris pour chaque temps S0 et S11.

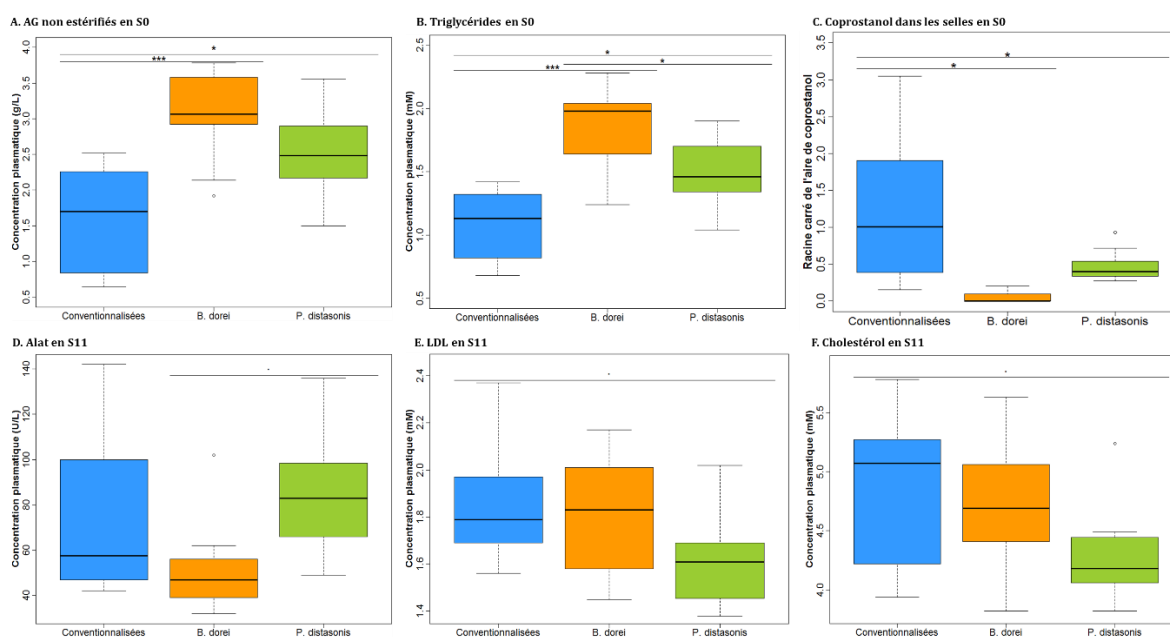


Figure 55 : Diagrammes en boîtes de Tukey de la concentration plasmatique en S0 d'AG non estérifiés (A) et de triglycérides (B) ainsi que du coprostanol retrouvé dans les selles (C) et de la concentration plasmatique en S11 en Alat (D), LDL (E) et cholestérol (F).

Chaque point est la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$, $n_{B. dorei} = 9$ et $n_{P. distasonis} = 11$ souris en S0 et idem mais $n_{P. distasonis} = 8$ en S11. ANOVA et test de Tukey : « . » si $p < 0,1$, « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$. C. L'utilisation de la racine carrée pour le coprostanol améliore la qualité du graphique.

Avec des concentrations plasmatiques en S0 (avant le changement de régime alimentaire) en AG non estérifiés de $3,06 \pm 0,66$ g/L et $2,48 \pm 0,62$ g/L pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement et de $1,58 \pm 0,70$ g/L pour les souris conventionnalisées, il y a une différence significative entre monocolonisation et conventionalisation ($p_{B. dorei/conv} = 1,14 \cdot 10^{-4}$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,011$). De même, en S0, les concentrations plasmatiques en triglycérides sont significativement différentes entre les trois groupes, selon le même ordre de grandeur que pour les AG non estérifiés : $1,86 \pm 0,32$ mM et $1,48 \pm 0,29$ mM pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement et $1,08 \pm 0,27$ mM pour les conventionnalisées, de plus, $p_{B. dorei/conv} = 8,5 \cdot 10^{-6}$, $p_{P. distasonis/conv} = 0,010$ et $p_{B. dorei/P. distasonis} = 0,012$ (figures 55 A et B). Les différences observées sur ces deux paramètres entre souris

monocolonisées et souris conventionnalisées peuvent être dues à une moindre absorption de ces molécules au niveau intestinal, une moindre synthèse ou une plus forte excrétion dans les selles. Elle n'est pas due à un différentiel dans les apports en acide gras du régime alimentaire puisque toutes les souris sont soumises au même régime standard en S0. Les triglycérides sont synthétisés à partir des acides gras pour permettre leur stockage, notamment au niveau des cellules adipeuses. Le sang permet de faire circuler ces molécules vers les tissus utilisateurs. Les AG non estérifiés sont quant à eux le reflet de la dégradation de ces triglycérides au niveau tissulaire. Leur concentration plasmatique plus faible chez les conventionnalisées peut donc aussi s'expliquer par une moindre utilisation des triglycérides dans les tissus. Dans ce cas, ces résultats pourraient s'accompagner d'une plus forte concentration tissulaire en triglycérides et notamment dans le tissu adipeux et dans le foie, ce que ne montrent pas nos résultats histologiques. Ils pourraient également souligner une moindre activité physique et métabolique.

Le coprostanol retrouvé dans les selles est significativement plus élevé en S0 pour les souris conventionnalisées comparées aux deux autres groupes ($p_{B. dorei/conv} = 0,017$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,025$) suggérant une production de coprostanol par les bactéries commensales chez la souris et une possible implication dans les différences observées plus haut (figure 55C).

En S11, les contrastes sont moins importants mais certaines différences sont visibles (figures 55 D, E et F). Les souris monocolonisées par *P. distasonis* présentent des concentrations plasmatiques en LDL et en cholestérol total inférieures aux souris conventionnalisées. Elles ont une concentration plasmatique en LDL de $1,62 \pm 0,21$ mM contre $1,87 \pm 0,25$ mM pour les souris conventionnalisées ($p_{P. distasonis/conv} = 0,092$) et en cholestérol total de $4,31 \pm 0,44$ mM contre $4,87 \pm 0,62$ mM pour les souris conventionnalisées ($p_{P. distasonis/conv} = 0,089$). Cette différence sur la cholestérolémie peut s'expliquer par une synthèse de cholestérol moins importante au niveau du foie. Cette hypothèse est soutenue par la différence observée sur les LDL, transporteur du cholestérol synthétisé dans le foie vers les autres organes. Cependant, elle peut également s'expliquer par un moindre apport en cholestérol au niveau intestinal ou une moindre absorption. Cependant, il se peut également que le cholestérol ait été transformé plus efficacement en coprostanol (notre hypothèse de travail) ou en une autre molécule le rendant moins disponible à l'absorption. Enfin, il est également possible que les souris colonisées avec *P. distasonis* excrètent plus efficacement le cholestérol dans les selles que les souris conventionnalisées.

De plus, la concentration plasmatique moyenne en Alat est supérieure pour les souris monocolonisées par *P. distasonis* comparées aux souris monocolonisées par *B. dorei* ($85 \pm 27,19$ U/L contre $51,78 \pm 21,36$ U/L, $p_{B. dorei/P. distasonis} = 0,061$). Ce résultat suggère qu'il y aurait moins de lésions hépatiques dans le foie des dernières comparées à celui des premières.

Il faut également noter que l'insuline plasmatique a été mesurée en S11 mais il n'y a aucune différence entre les trois groupes de souris.

Pour aller plus loin, nous avons voulu tester l'implication du coprostanol retrouvé dans les selles sur ces séparations aux temps S0 et S11 en prenant les axes 1-3 de l'ACP précédente. En effet, ce plan explique 61,90 % de la variance (49,68 % pour l'axe 1 et 12,22 % pour l'axe 3) ce qui est moins bon que le plan 1-2 mais reste intéressant, d'autant plus que le coprostanol contribue à 55,58 % à l'axe 3. Le cercle des corrélations montrent que les individus en-dessous de l'axe 1 ont une forte concentration plasmatique par rapport à la moyenne en AG non estérifiés et en triglycérides mais une faible concentration en cholestérol et en coprostanol dans les selles.

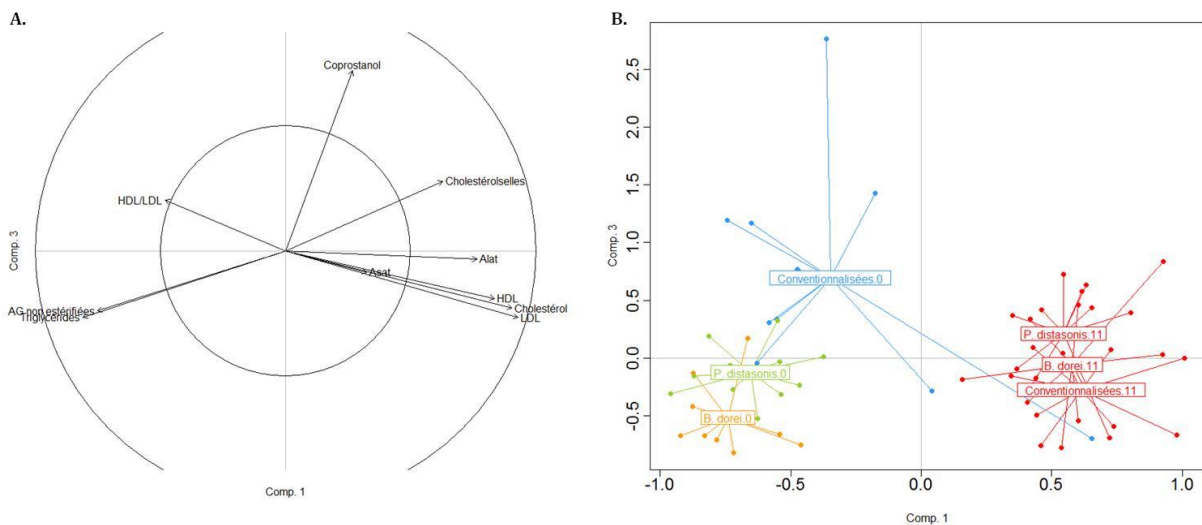


Figure 56 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) pour les axes 1-3 de l'ACP faite sur les paramètres plasmatiques ainsi que le cholestérol et le coprostanol retrouvés dans les selles

Dans le plan 1-3 toutes les variables sont bien représentées sauf Asat et le rapport HDL/LDL (figure 56A). De manière intéressante, le coprostanol est corrélé au cholestérol dans les selles. Ceci est cohérent avec le fait que le premier est le résultat d'une transformation du second, leurs quantités sont donc forcément liées. En revanche le fait que la corrélation soit positive est étonnante car si la production de coprostanol est forte, celle de son substrat, le cholestérol devrait être faible et donc la corrélation plutôt négative. Le résultat inverse peut donc montrer une potentielle inhibition de la transformation du cholestérol en coprostanol par excès de substrat. Il peut également indiquer que la transformation en coprostanol ne compense pas l'apport en cholestérol venu de l'alimentation et/ou de la synthèse dans le foie. De plus, le coprostanol ne présente pas de corrélation positive ou négative avec le cholestérol plasmatique ni avec les LDL, les HDL et le rapport HDL/LDL. Ceci est en contradiction avec notre hypothèse de travail et rejette cette hypothèse pour expliquer la plus faible cholestérolémie des souris monocolonisées avec *P. distasonis* comparées aux souris conventionnalisées. Le coprostanol dans les selles est en revanche corrélé négativement aux triglycérides et aux AG non estérifiés *ie*

une forte concentration de coprostanol dans les selles semble corrélée à une faible concentration plasmatique en AG non estérifiés et en triglycérides. Compte tenu du fait que ces molécules ne sont pas des précurseurs du coprostanol, le lien avec celui-ci reste flou. Ils pourraient avoir un rôle de co-facteur ou participer à la biodisponibilité du cholestérol. Le cholestérol dans les selles, mieux représenté sur ce plan que sur le plan 1-2 ($\cos^2 = 0,59$), est corrélé de manière positive au coprostanol mais aussi au cholestérol plasmatique, HDL et LDL. Les autres corrélations sont semblables au plan 1-2 (figure 54A.)

Sur les dimensions 1-3 tous les individus sont bien représentés sauf deux individus en S0 du groupe conventionnalisé et un individu en S11 pour chaque groupe. La figure 56B montre des regroupements en fonction du statut bactérien du TGI et du temps de prélèvement cohérents avec les résultats obtenus sur le plan 1-2. Les souris peuvent être divisées en fonction de leur statut bactérien en S0 confirmant les observations faites avec les ANOVA et les tests de Tukey. La disposition des groupes correspond de l'extérieur de la carte vers l'intérieur à des concentrations décroissantes en AG non estérifiés et en triglycérides et croissantes en cholestérol et en coprostanol dans les selles en S0 cohérentes avec le cercle des corrélations et les tests univariés. En revanche, cette ACP ne montre pas de distinctions claires pour le temps S11 confirmant la moindre significativité des différences observées en ANOVA.

En résumé, les tests univariés et l'analyse multivariée de ces résultats montrent une dichotomie entre souris conventionnalisées et souris monocolonisées en S0 (figures 54B et 55 A à C). Cette séparation ne se retrouve pas en S11, indiquant un effet du régime plus important que celui du statut bactérien en régime riche en cholestérol. En revanche, une différence sur les LDL et le cholestérol plasmatique existe en S11 entre souris colonisées avec *P. distasonis* et souris conventionnalisées (figures 55 E et F).

Les deux cartes des individus (plan 1-2, figure 54B et plan 1-3, figure 56B) montrent une séparation des souris en fonction du temps de prélèvement et synonyme de l'effet du régime alimentaire (S0 : régime standard, S11 : régime riche en cholestérol). Pour vérifier ces observations, nous réalisons dans un second temps des tests univariés présentés en figures 57 A et B. Elles confirment la séparation des groupes en fonction du temps sur beaucoup de paramètres plasmatiques et pour tous les statuts bactériens des TGI des souris. Pour illustrer les effets du régime alimentaire, nous choisissons de considérer le groupe de souris conventionnalisées comme un groupe contrôle. Les différences avec les autres conditions quand il y en a, seront soulignées et les figures correspondantes sont disponibles en annexe IV.

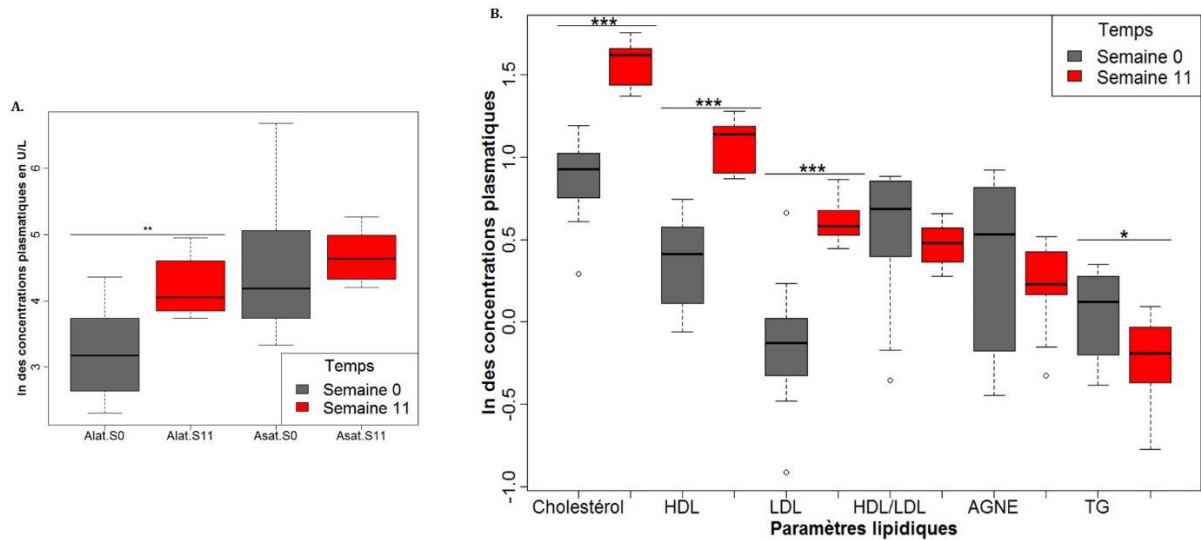


Figure 57 : Diagrammes en boîtes de Tukey des paramètres plasmatiques, transaminases (A) et lipidiques (B) entre S0 et S11 des souris conventionnalisées

Les données sont mises sous forme logarithmique pour s'affranchir des différences d'unités. Chaque boîte est la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$ souris. ANOVA et test de Tukey : « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$. B. AGNE : AG non estérifiés et TG : triglycérides.

Ces analyses montrent qu'en moyenne, la concentration en cholestérol et en coprostanol dans les selles ne varient pas entre S0 et S9 (figure 47). Le régime riche en cholestérol n'induit pas la production de coprostanol chez ces souris mais une augmentation de l'excrétion de cholestérol. Les paramètres plasmatiques varient avec une augmentation des transaminases AlAt ($p_{\text{Alat}} = 5,9 \cdot 10^{-3}$) pouvant indiquer des lésions dans le foie induites par le régime riche en cholestérol qui est également riche en graisses. Ce régime alimentaire induit également une augmentation du cholestérol, des HDL et des LDL ($p_{\text{Cholestérol}} = 3,52 \cdot 10^{-8}$, $p_{\text{HDL}} = 1,61 \cdot 10^{-7}$, $p_{\text{LDL}} = 1,24 \cdot 10^{-5}$) cohérente avec la forte teneur en cholestérol du régime. De plus, les triglycérides sont diminués entre S0 et S11 ($p_{\text{TG}} = 2,41 \cdot 10^{-2}$). Ceci signifie qu'il y a moins de triglycérides circulant en S11 qu'en S0. Ceci peut s'expliquer par une moindre absorption des acides gras au niveau intestinal ou un plus grand stockage dans les tissus.

Ces résultats sont similaires pour les deux groupes de souris monocolonisées (Annexe IV) qui présentent tout de même en plus une augmentation des transaminases Asat suggérant de plus fortes lésions dans le foie de ces souris, et du coprostanol dans les selles entre S0 et S11. Ce résultat suggère que le cholestérol contenu dans le régime alimentaire induit la production de coprostanol chez les souris monocolonisées. De plus, ces souris montrent une diminution des AG non estérifiés entre S0 et S11 pouvant indiquer un plus grand stockage des triglycérides dans les tissus.

De plus, les souris monocolonisées avec *P. distasonis* ont une augmentation du cholestérol dans les selles (figure 47) et une diminution significative du rapport HDL/LDL (Annexe IV). Ce dernier résultat accompagné du fait que les concentrations plasmatiques en LDL et en HDL

augmentent entre S0 et S11 indique que le régime riche en cholestérol induit une augmentation plus importante des LDL comparativement à celle des HDL chez ces souris.

Ces résultats montrent que le régime alimentaire a un effet similaire sur les paramètres plasmatiques des trois groupes de souris. Et notamment, il augmente effectivement la cholestérolémie passant de $2,56 \pm 0,30$ mM à $4,31 \pm 0,43$ mM entre S0 et S11 pour les souris monocolonisées avec *P. distasonis*, de $2,67 \pm 0,43$ mM à $4,75 \pm 0,52$ mM pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* et de $2,44 \pm 0,57$ à $4,87 \pm 0,62$ pour les souris conventionnalisées, mimant une hypercholestérolémie chez la souris. De plus, le cholestérol alimentaire induit une production de coprostanol, une augmentation des transaminases Asat et une diminution des AG non estérifiés mais seulement chez les souris monocolonisées.

5.3.3.3 Dosage des acides biliaires

Nous avons dans un premier temps analysé l'ensemble des données récoltées sur le dosage des acides biliaires (bile et selles) à la fin de l'expérimentation (S11) par la réalisation d'une ACP. Le pourcentage de variance expliquée étant plus faible (69,04 % sur l'axe 1-2) et l'information récoltée moins intéressante que l'analyse séparée, nous avons réalisé deux analyses : la première sur la bile et la seconde sur les selles.

La figure 58 représente un schéma de la synthèse des AB afin de mieux comprendre ces analyses. Cette représentation figure seulement les AB retrouvés dans notre étude mais il en existe d'autres. De plus, le cycle entéro-hépatique n'est pas représenté.

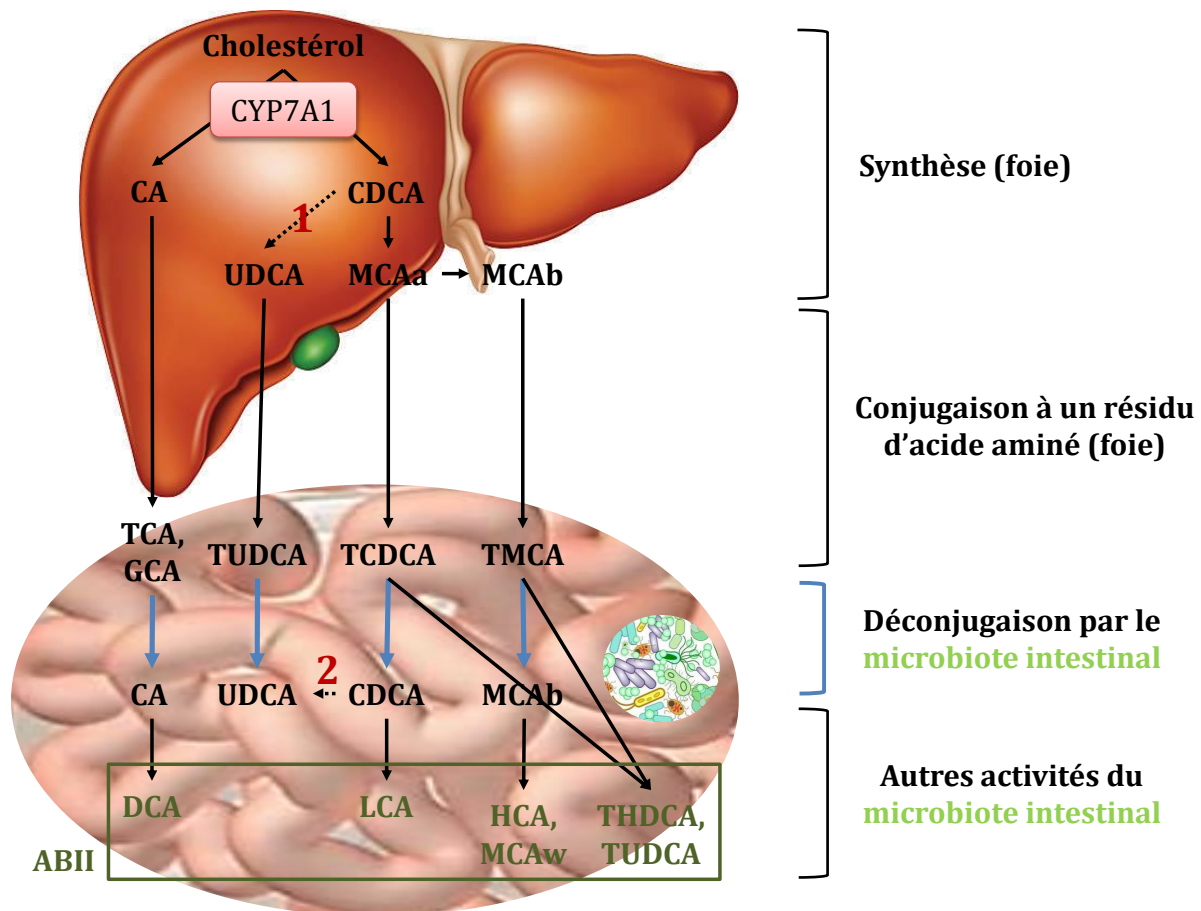


Figure 58 : Schéma résumant les voies de synthèse des principaux AB détectés dans notre étude

D'après (Qi et al. 2015). Le cholestérol est converti en CA (acide cholique) et en CDCA (acide chénodésoxycholique). L'enzyme CYP7A1, initiatrice de cette transformation, est une enzyme limitante. Chez la souris, le CDCA est converti en MCAa (acide muricholique α) et MCAb (acide muricholique β) et la majorité des ABs sont conjugués à la taurine avant d'être sécrétés dans la bile. Dans l'intestin, sous l'action du microbiote intestinal, les ABs sont déconjugués et subissent ensuite d'autres modifications comme la 7-déhydroxylation transformant le CA en DCA (acide désoxycholique) et le CDCA en LCA (acide lithocholique). Le MCAb est transformé en HCA (acide hyocholique) et MCAw (acide muricholique ω); TCDCA (acide taurochénodésoxycholique) et TMCA (acide taumuricholique) deviennent THDCA (acide taurohyodésoxycholique) et TUDCA (acide tauroursodésoxycholique). Une partie des ABs est réabsorbée par le cycle entéro-hépatique (ne figurant pas sur ce schéma) et peuvent être à nouveau conjugués comme le DCA en TDCA (acide taurodésoxycholique) (voie ne figurant pas sur le schéma). Une autre partie de ces ABs est sécrétée dans les selles. Le statut de l'UDCA (acide ursodésoxycholique) est discuté, une première étude le considère comme un acide biliaire primaire (ABI) synthétisé chez la souris (1 sur le schéma) mais pas chez l'Homme (Sayin et al. 2013). Une seconde étude le considère comme un acide biliaire secondaire (ABII) en tant que dérivé du CDCA sous l'action de bactéries (2 sur le schéma) (Qi et al. 2015).

5.3.3.3.1 Dosage des acides biliaires dans la bile

Tout d'abord, les AB ont été dosés dans la bile des trois groupes de souris, 4 échantillons (1 pour le groupe de souris monocolonisées avec *B. dorei*, 1 pour le groupe conventionnalisées et 2 pour le groupe de souris monocolonisées avec *P. distasonis*) n'ont pas pu être analysés faute d'un volume suffisant. Les données sont représentées sous forme d'ACP et mettent en évidence une dichotomie entre les souris conventionnalisées et les souris monocolonisées (figure 59B). L'ACP réalisée sur les données centrées et réduites explique 85,48 % (53,25 % pour l'axe 1 et 32,23 % pour l'axe 2) de la variance totale sur les dimensions 1 et 2.

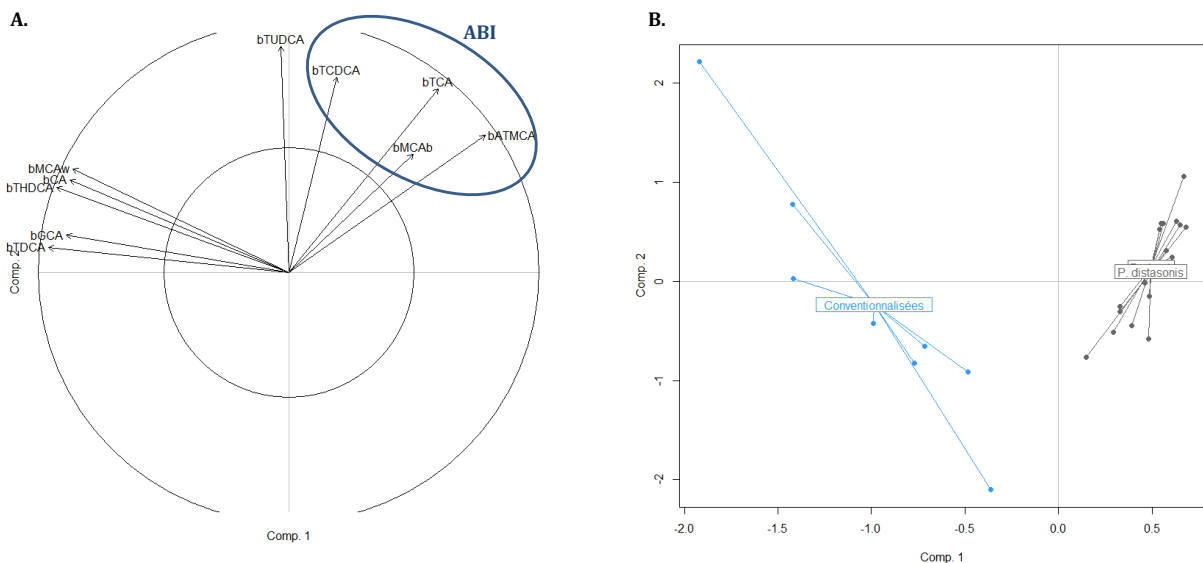


Figure 59 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur le dosage des ABs dans la bile (b) en semaine 11

Acides biliaires primaires (ABI) : acide glycocholique (GCA), acide cholique (CA), acide taurochénodésoxycholique (TCDCA), acide taurocholique (TCA), acide β -muricholique (MCAb), acide α -taurouricholique (ATMCA) ; acides biliaires secondaires (ABII) : acide taurodésoxycholique (TDCA), acide taurohyodésoxycholique (THDCA), acide ω -muricholique (MCAw) et acide ursodérivé : acide tauroursodésoxycholique (TUDCA)

Toutes les variables sont bien représentées comme le montre le cercle des corrélations présenté en figure 59A. La majorité des acides biliaires primaires (ABI) sont corrélés positivement entre eux et se retrouvent groupés en haut à droite du cercle alors que les acides biliaires secondaires, également corrélés positivement entre eux sont groupés à gauche du cercle. Ceci est cohérent avec le fait que les ABI TCDCA, ATMCA, TCA et dans une moindre mesure MCAb contribuent majoritairement à l'axe 2 (27,80 % ; 20,69 % ; 10,18 % ; 18,33 % et 7,57 % respectivement) alors que THDCA, TDCA, MCAw mais aussi ATMCA, GCA et CA contribuent majoritairement à l'axe 1 (16,11 % ; 17,27 % ; 13,98 % ; 11,51 % ; 14,80 % et 14,36 % et respectivement).

Sur la carte des individus, ceux-ci sont tous bien représentés sauf un appartenant au groupe de souris monocolonisées avec *P. distasonis*. Lorsque l'on met en regard le cercle des corrélations et la carte des individus, nous pouvons observer une dichotomie entre souris

conventionnalisées et souris monocolonisées. Celles-ci, à droite de la carte des individus ont des niveaux supérieurs à la moyenne en ABI (TCDCA, TCA, MCAb et ATMCA) d'après le cercle des corrélations. Les conventionnalisées situées à gauche ont des niveaux supérieurs à la moyenne en ABII et en GCA et CA.

Ces données sont cohérentes avec les tests univariés présentés en figure 60 sur les groupes d'AB et ceux réalisés sur les AB individuellement, présentés en figures 61A et B. Les deux groupes de souris monocolonisées étant parfaitement assimilables pour les tests sur les ABs individuels, nous choisissons de ne présenter ici que la comparaison entre les conventionnalisées et les monocolonisées avec *B. dorei*. Le graphe correspondant aux données des souris monocolonisées avec *P. distasonis* est disponible en annexe V. Les valeurs sont représentées sous la forme de leur racine carrée pour améliorer la qualité de représentation.

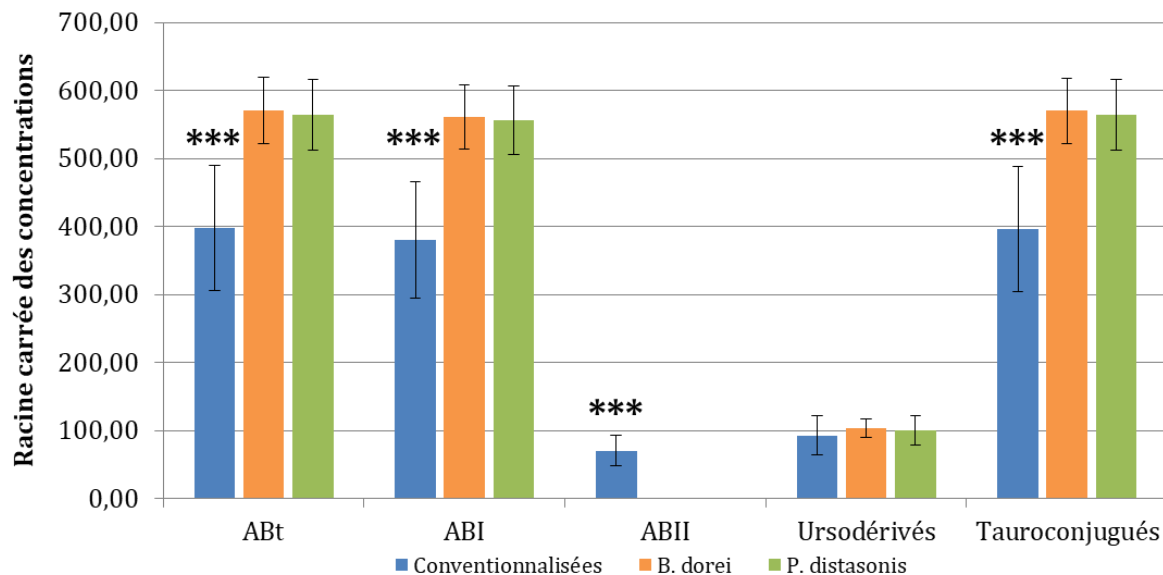


Figure 60 : Histogrammes de la racine carrée des concentrations en acides biliaires totaux (ABt), primaires (ABI), secondaires (ABII) et ursodérivés (UDCA) dans la bile des souris conventionnalisées et monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*

Avec ABt, la somme de tous les acides biliaires : GCA, CA, TCDCA, TCA, MCAb, ATMCA, TDCA, THDCA, MCAw et TUDCA ; ABI la somme des acides biliaires GCA, CA, TCDCA, TCA, MCAb et ATMCA ; ABII : TDCA, THDCA et MCAw et Ursodérivés égaux à la concentration en TUDCA. Les valeurs sont la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$; $n_{B. dorei} = 8$ et $n_{P. distasonis} = 9$ et l'écart-type est représenté. ANOVA et test de Tukey entre les trois conditions, « *** » si $p < 0,001$.

La figure 60 montre en effet que les souris monocolonisées ont significativement plus d'ABI avec en moyenne $316\,781,6 \pm 52\,374,7 \mu\text{M}$ ($p_{B. dorei} = 1,05 \cdot 10^{-5}$) et $311\,018,3 \pm 54\,568,8 \mu\text{M}$ ($p_{P. distasonis} = 1,13 \cdot 10^{-5}$) pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* et *P. distasonis* respectivement contre une moyenne de $151\,059,3 \pm 61\,399,2 \mu\text{M}$ pour les souris conventionnalisées. De plus, ces dernières ont significativement plus d'ABII dans leur bile puisqu'aucun n'est détecté dans la bile des souris monocolonisées (figures 60 et 61B). De plus, dans la bile, les souris conventionnalisées ont moins d'acides biliaires totaux avec une moyenne

de $165\,769,1 \pm 69\,041,8 \mu\text{M}$ contre $327\,532,3 \pm 54\,986,6 \mu\text{M}$ et $321\,542,2 \pm 57\,085,7 \mu\text{M}$ pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* ($p = 4,28 \cdot 10^{-5}$) et avec *P. distasonis* ($p = 4,73 \cdot 10^{-5}$) respectivement. Les acides biliaires urso-dérivés (UDCA) ne présentent pas de différences. La présence d'une plus grande quantité d'AB totaux et d'ABI en particulier, dans la bile des animaux monocolonisés peut être la signature d'une plus grande synthèse de ces composés ou d'une meilleure réabsorption par la voie entéro-hépatique. L'absence d'ABII dans les selles des souris monocolonisées est cohérente avec une moindre activité sur les AB que celle d'un microbiote complexe. Ceci concorde avec nos résultats sur les souris conventionnalisées montrant une plus grande variété des ABII dans la bile (figure 61A). Le fait de retrouver des ABII dans la bile est la signature du cycle entéro-hépatique qui réabsorbe les ABs au niveau iléal indépendamment de leur origine (hôte ou microbiote). Les analyses sur les données des AB rapportés aux AB totaux donnent globalement les mêmes résultats sauf pour le pourcentage de TUDCA qui est alors significativement supérieur chez les souris conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées ($p_{B. dorei/conv} = 4,89 \cdot 10^{-4}$ et $p_{P. distasonis/conv} = 3,33 \cdot 10^{-4}$). Ceci est cohérent avec l'ACP. De plus, nous remarquons des différences significatives dans la conjugaison des acides biliaires aux dérivées d'acides aminés. Malgré une concentration significativement différente (figure 60) des tauroconjugués entre conventionnalisées et monocolonisées ($p = 0$), ces acides biliaires dominant dans la bile des trois groupes et représentent plus de 99 % des AB totaux (99,33 % ; 99,83 % et 99,81 % respectivement pour les souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* et monocolonisées avec *P. distasonis*). Cependant, la bile des souris conventionnalisées contient également du GCA, un AB glycoconjugué ce qui n'est pas le cas des souris monocolonisées, indépendamment de la souche utilisée (figure 61B). Ces résultats suggèrent que la synthèse d'acides biliaires glycoconjugués ne peut se faire qu'en présence d'un microbiote complexe. Celle-ci s'effectue dans le foie des souris. De plus, aucun AB glycoconjugué n'est retrouvé dans les selles (figures 63 A à C). Ceci suggère une réabsorption par la voie hépatobiliaire ou une déconjugaison par les bactéries du microbiote intestinal.

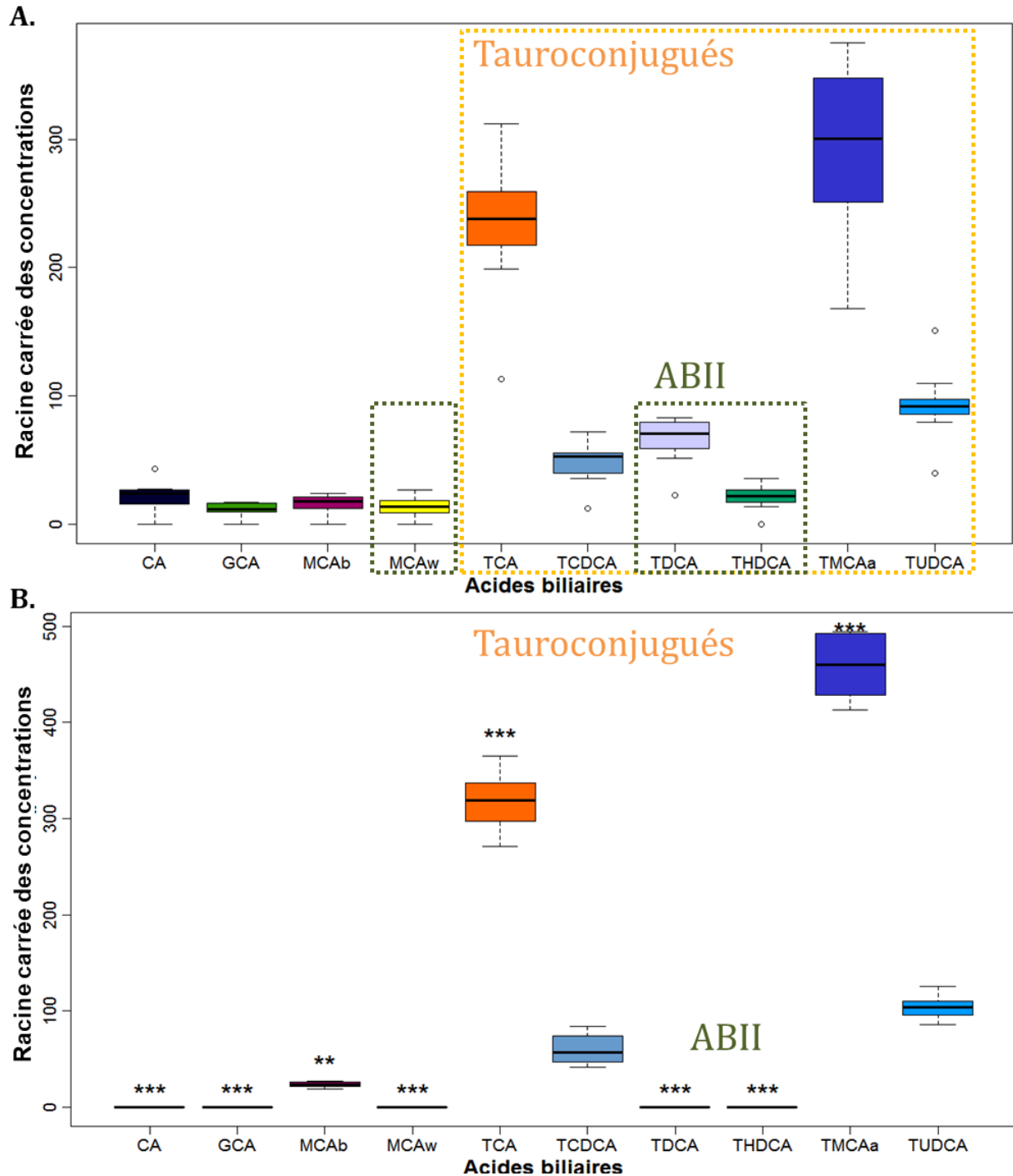


Figure 61 : Diagrammes en boîte de Tukey de la racine carrée des concentrations en acides biliaires retrouvés dans la bile des souris conventionnalisées (A) et monocolonisées avec *B. dorei* (B).

Les valeurs sont la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$ et $n_{B. dorei} = 8$. ANOVA et test de Tukey entre les trois conditions. Seulement la comparaison conventionnalisées/monocolonisées avec *B. dorei* est signifiée sur le graphe des souris monocolonisées avec *B. dorei* (B) « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$.

La figure 61B montre des différences significatives sur tous les acides biliaires sauf TCDCA et TUDCA, acides tauroconjugués dont le second est en fait un énantiomère du premier. Comme indiqué sur l'ACP et les tests sur les AB groupés, les acides biliaires primaires TCA, MCAb et TMCAa sont significativement présents en plus grande quantité dans la bile des animaux monocolonisés comparés aux animaux conventionnalisés avec en moyenne $101\,988,4 \pm$

20 871,5 μM ; $547,9 \pm 140,3 \mu\text{M}$ et $210 491,9 \pm 29 430,7 \mu\text{M}$ respectivement pour les trois AB pour le groupe monocolonisé avec *B. dorei* et $57 855,4 \pm 24 352,4 \mu\text{M}$; $310,4 \pm 180,5 \mu\text{M}$ et $89 531,3 \pm 33 765,3 \mu\text{M}$ respectivement, pour le groupe conventionnalisé ($p_{\text{TCA}} = 1,17.10^{-3}$; $p_{\text{MCAb}} = 2,96.10^{-2}$ et $p_{\text{TMCAa}} = 1,2.10^{-6}$). Nous pouvons noter que malgré ces différences, les deux ABs majeurs sont les mêmes pour les trois groupes de souris : TCA et TMCAa. Ces deux ABs semblent donc être la voie de synthèse majoritaire chez les souris.

En conclusion, le contenu de la bile en acides biliaires sépare les souris en deux groupes correspondant aux souris conventionnalisées et aux souris monocolonisées indépendamment de la souche bactérienne. Le premier groupe se caractérise par une plus faible concentration en acides biliaires totaux mais une plus forte concentration en ABII et la présence d'AB plus diversifiés (figure 61A), reflet d'un microbiote plus complexe ayant des activités variées. Le second groupe se caractérise par une forte concentration en AB totaux et particulièrement en ABI et aucun ABII n'est détecté.

5.3.3.3.2 Dosage des acides biliaires dans les selles

L'ACP réalisée sur les données des acides biliaires dans les selles explique 75,29 % de la variance avec 55,80 % porté par l'axe 1 et 19,49 % porté par l'axe 2. Le cercle des corrélations présenté en figure 62A montre que toutes les variables sont bien représentées sauf l'acide ursodésoxycholique (UDCA) avec une somme des \cos^2 sur les deux axes égale à 0,10 et une flèche proche du centre du cercle. Trois groupes se détachent sur cette représentation. Le premier à gauche composé de tous les AB tauroconjugués retrouvés dans les selles. Ce groupe s'oppose (corrélation négative) au second situé à droite du cercle et composé majoritairement d'ABII. Enfin, un troisième groupe situé en bas du cercle, plutôt corrélé de manière neutre avec les deux autres, rassemble les ABs UCDA, CDCA, MCAb et CA. Ces observations s'expliquent par le fait que les variables TUDCA, TCDCA, ATMCA, TCA, LCA, DCA, MCAw et TMCA_3S contribuent majoritairement à l'axe 1 avec 9,69 % ; 9,35 % ; 10,14 % ; 11,85 % ; 9,73 % ; 10,78 % ; 10,18 % et 10,65 % respectivement. Alors que les variables UDCA, CDCA, CA et MCAb contribuent majoritairement à l'axe 2 avec 24,29 % ; 22,22 % ; 23,65 % et 15,69 % respectivement.

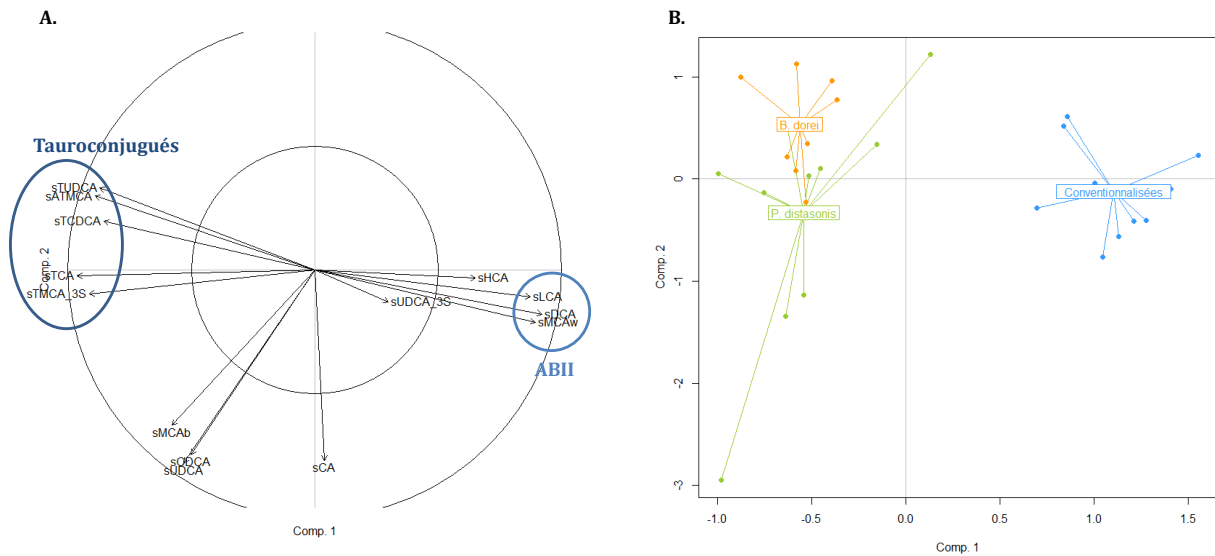


Figure 62 : Cercle des corrélations des variables (A) et carte des individus (B) dans le plan 1-2 de l'ACP effectuée sur le dosage des ABs dans les selles (s)

Acides biliaires primaires (ABI) : acide β -muricholique (MCAb), acide taumuricholique-3S (TMCA_3S), acide taurocholique (TCA), acide taurochénodésoxycholique (TCDCA), acide α -taumuricholique (ATMCA), acide chénodésoxycholique (CDCA) et acide cholique (CA) ; acides biliaires secondaires (ABII) ; acide hyocholique (HCA), acide lithocholique (LCA), acide désoxycholique (DCA), acide ω -muricholique (MCAw) et acides ursodérivés : acide tauroursodésoxycholique (TUDCA), acide ursodésoxycholique (UDCA) et acide ursodésoxycholique-3S (UDCA_3S)

Sur la carte des individus, tous sont bien représentés sauf un appartenant au groupe monocolonisées avec *P. distasonis*. La figure 62B montre à nouveau cette dichotomie entre monocolonisées d'un côté et conventionnalisées de l'autre. De plus, cette représentation montre une légère séparation entre les souris monocolonisées avec *B. dorei* de celles monocolonisées avec *P. distasonis*. En mettant en regard la carte des individus (figure 62B) et le cercle des corrélations (figure 62A), nous pouvons observer que le groupe de souris conventionnalisées, à droite de la carte a des valeurs supérieures à la moyenne pour les ABII (HCA, LCA, DCA et MCAw) cohérent avec ce qui a été observé précédemment dans la bile. Ce groupe possède également des valeurs inférieures à la moyenne pour les AB tauroconjugés, cohérent avec une activité supérieure sur les ABs du microbiote complexe et notamment dans leur déconjugaison. Les observations inverses peuvent être faites pour les deux groupes de souris monocolonisées, situés à gauche de la carte des individus. De plus, le groupe de souris monocolonisées avec *P. distasonis* se sépare légèrement vers le bas de celui monocolonisé avec *B. dorei*. Il semblerait donc, d'après le cercle des corrélations que le premier groupe ait des valeurs supérieures à la moyenne pour les acides biliaires UCDA, CDCA, MCAb et CA. Ce qui est confirmé par les tests univariés présentés en figure 64.

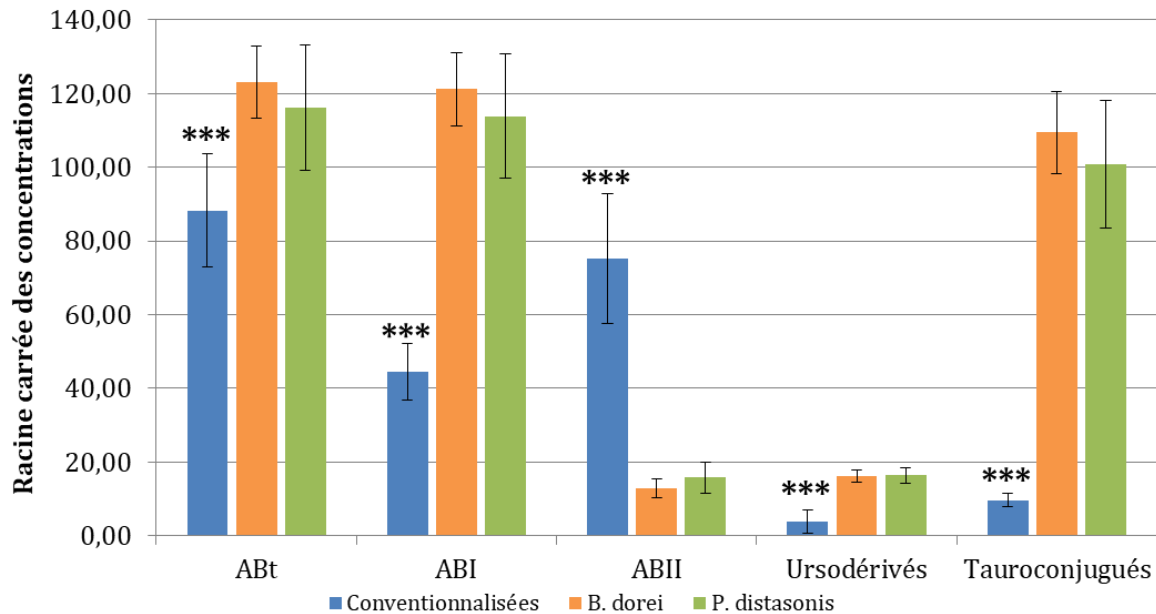


Figure 63 : Histogrammes de la racine carrée des concentrations en acides biliaries totaux (ABt), primaires (ABI), secondaires (ABII), ursodérivés (UDCA) et tauroconjugués dans les selles des souris conventionnalisées et monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*

Avec ABt, la somme de tous les acides biliaries : MCAb, TMCA_3S, TCA, TCDCA, ATMCA, CA, CDCA, HCA, LCA, DCA, MCAw, TUDCA, UDCA et UDCA_3S ; ABI, la somme des acides biliaries : CA, CDCA, TMCA_3S, TCDCA, TCA, MCAb et ATMCA ; ABII, la somme des acides biliaries : LCA, DCA, HCA, et MCAw ; UDCA, la somme des acides biliaries ursodérivés : TUDCA, UDCA et UDCA_3S et les tauroconjugués, la somme des acides biliaries : TCA, TCDCA, TMCA_3S, ATMCA et TUDCA. ANOVA et test de Tukey entre les trois conditions, « *** » si $p < 0,001$.

Ces observations sont cohérentes avec les tests univariés réalisés sur les groupes d'AB et présentés en figure 63 et ceux réalisés sur les ABs individuellement, présentés en figures 64 A à C.

D'une manière générale et comme observé dans la bile, il y a plus d'AB totaux dans les selles des souris monocolonisées avec *B. dorei* ($p = 1,51 \cdot 10^{-4}$) ou *P. distasonis* ($p = 1,26 \cdot 10^{-3}$) avec des moyennes de $15\,206,9 \pm 2\,546,9 \mu\text{M}$ et de $13\,743,7 \pm 3\,797,1 \mu\text{M}$ respectivement, que dans celles des souris conventionnalisées dont la moyenne est de $8\,001,1 \pm 2\,491,4 \mu\text{M}$. Ces dernières ont également moins d'ABI avec en moyenne $2\,043,2 \pm 690,6 \mu\text{M}$ représentant seulement 27,97 % des AB totaux, contre $14\,770,9 \pm 2\,523,8 \mu\text{M}$ et $13\,205,2 \pm 3\,684,7 \mu\text{M}$ pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* ($p = 0$ pour les deux) respectivement et représentant dans ce cas 97,10 % et 96,04 % respectivement des AB totaux (figure 63). Conformément aux observations de l'ACP, les ABII sont significativement plus présents dans les selles des souris conventionnalisées avec en moyenne $5\,934,5 \pm 2\,375,8 \mu\text{M}$ représentant 71,76 % des AB totaux contre $171,7 \pm 70,7 \mu\text{M}$ et $265,4 \pm 131,9 \mu\text{M}$ représentant moins de 2 % des AB totaux pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* respectivement ($p = 0$ pour les deux). De manière cohérente avec ces résultats sur les ABI et les ABII, leur ratio est significativement plus faible chez les conventionnalisées avec un ratio égal à $0,44 \pm 0,3$ en moyenne contre $100,3 \pm 46,4$ et $61,5 \pm 30,6$ pour les souris colonisées avec *B. dorei* ou *P.*

distasonis respectivement ($p_{B. dorei/conv} = 0$ et $p_{P. distasonis/conv} = 3,75.10^{-4}$). La tendance observée dans la bile pour les AB ursodérivés (UDCA) est significative sur les selles. Les UDCA sont significativement plus élevés chez les monocolonisées avec $264,4 \pm 51,0 \mu\text{M}$ et $273,0 \pm 68,6 \mu\text{M}$ pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* respectivement que chez les conventionnalisées $23,4 \mu\text{M} \pm 22,7$ ($p = 0$ pour les deux). Comme dans la bile et comme présenté sur l'ACP, les souris monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* ont plus d'AB tauroconjugués ($p = 0$ pour les deux) dans leurs selles que les souris conventionnalisées avec respectivement $12\,091,8 \pm 2\,637,4 \mu\text{M}$; $10\,424,2 \pm 3\,519,2 \mu\text{M}$ et $97,15 \pm 37,3 \mu\text{M}$ représentant 79,15 % ; 75,50 % et 1,45% des AB totaux. La présence de plus d'acides biliaires dans les selles des monocolonisées peut s'expliquer par une moindre absorption par la voie entéro-hépatique mais aussi par une moindre modification des ABs par le microbiote intestinal. Cette dernière assertion est cohérente avec une plus forte concentration en tauroconjugués chez les monocolonisées et avec une plus forte variété et quantité d'ABII chez les conventionnalisées.

La présence d'ABII dans les selles des monocolonisées alors qu'ils sont absents dans la bile et une concentration significativement supérieure aux conventionnalisées en UDCA alors qu'il n'y a pas de différence dans la bile, sont le signe de l'activité de nos souches. Elles sont à interpréter en analysant la présence de chaque acide biliaire individuellement. Ces résultats sont présentés sur les figures 64 A à C. Les valeurs sont représentées sous la forme de leur racine carrée pour améliorer la qualité de représentation.

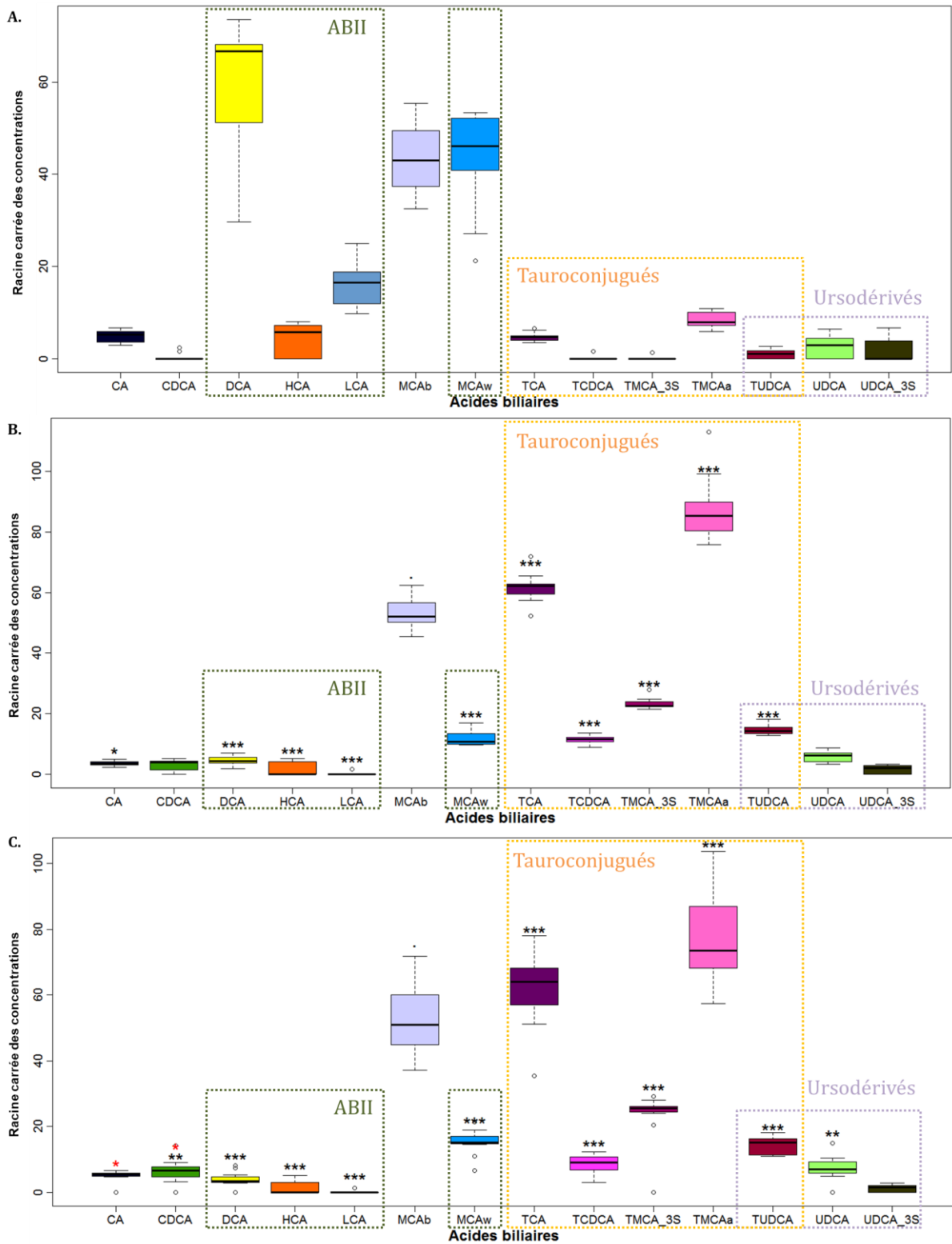


Figure 64 : Diagrammes en boîte de Tukey de la racine carrée des concentrations en acides biliaires retrouvés dans la selles des souris conventionnalisées (A), monocolonisées avec *B. dorei* (B) et avec *P. distasonis* (C). Les valeurs sont la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$ et $n_{B. dorei} = 9$ et $n_{P. distasonis} = 11$. ANOVA et test de Tukey entre les trois conditions « . » si $p < 0,1$; « * » si $p < 0,5$; « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$. Les différences avec le statut conventionnalisé sont marquées par des indices noirs (B et C) alors que les différences entre les deux groupes monocolonisés sont indiquées par des indices rouges, seulement sur la figure C.

Conformément aux résultats précédents, les ABII sont prépondérants chez les souris conventionnalisées alors que ce sont les ABI avec une part importante de tauroconjugés qui sont majoritaires chez les monocolonisées. Ainsi les deux acides biliaires majoritaires des souris conventionnalisées sont DCA et MCAw, produits de la dégradation du TCA et du TMCAa et/ou MCAb respectivement (figure 60). Les concentrations de ces AB sont significativement supérieures chez les conventionnalisées avec en moyenne $3\,684,8 \pm 1\,526,3$ nmol/g pour DCA et $1\,974,3 \pm 822,9$ nmol/g pour MCAw contre $22,9 \pm 13,4$ nmol/g pour DCA et $148,6 \pm 66,4$ nmol/g pour MCAw et $20,8 \pm 21,2$ nmol/g pour DCA et $244,5 \pm 112,9$ nmol/g pour MCAw chez les souris monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* respectivement. Ces résultats sont cohérents avec les données sur la bile qui donnaient les AB TCA et TMCAa majoritaires. Ils sont également cohérents avec la moindre concentration, significative, en TCA, TMCAa ($p = 0$ pour les deux ABs indépendamment du statut bactérien) et MCAb ($p_{B. dorei/conv} = 7,70 \cdot 10^{-2}$ et $p_{P. distasonis/conv} = 5,31 \cdot 10^{-2}$) dans les selles des souris conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées. De plus, ces données coïncident avec la représentation donnée sur l'ACP (figures 62 A et B) et avec une plus forte activité du microbiote des conventionnalisées comparées aux monocolonisées. Les AB TCA, TMCAa et MCAb sont présents à hauteur de $23,4 \pm 10,0$ μM ; $71,6 \pm 28,6$ μM et $1\,890,8 \pm 689,5$ μM respectivement pour chaque AB dans les selles des souris conventionnalisées. Alors que ces mêmes AB sont retrouvés à hauteurs de $3\,828,0 \pm 670,7$ μM ; $7\,907,6 \pm 2\,175,8$ μM et $2\,871,1 \pm 644,6$ μM respectivement pour chaque AB chez les souris monocolonisées avec *B. dorei* et de $3\,888,2 \pm 1\,291,0$ μM ; $6\,252,9 \pm 2\,337,7$ μM et $2\,896,2 \pm 1\,272,1$ μM respectivement pour chaque AB chez les souris monocolonisées avec *P. distasonis*. Ces trois AB sont les AB majoritaires dans les selles des souris monocolonisées ce qui est cohérent avec les données sur la bile.

En ce qui concerne les ABII chez les souris monocolonisées, il faut considérer la présence de HCA et de LCA avec précaution dans la mesure où ces composés ne sont en fait retrouvés que dans les selles d'une et de trois souris colonisées avec *B. dorei* et d'une et de quatre souris colonisées avec *P. distasonis*. Cependant, la présence chez celles-ci d'ABII est le signe de la capacité des souches à effectuer des modifications sur les ABs. Notamment, comme expliqué plus haut, la présence de MCAw, dérivé de MCAb et TMCAa (figure 60) montre que ces bactéries sont capables de déconjuguer TMCAa et/ou de modifier MCAb mais dans une moindre mesure que le microbiote complexe présent chez les souris conventionnalisées.

De plus, les tests univariés présentés en figures 64 A à C montrent des différences significatives des AB tauroconjugés ($p = 0$ indépendamment du statut monocolonisé comparé au statut conventionnalisé). En particulier les ABs TCDCA et TMCA_3S ne sont pas retrouvés dans les selles des individus conventionnalisés, à part un pour chaque AB. En fait, le TMCA_3S est un AB signature des souris axéniques, son absence est le reflet d'une dé-sulfatation des ABs

possible seulement en présence de bactéries désulfatrices, cohérente dans le cas d'un microbiote complexe. Cela signifie que nos bactéries n'ont pas cette capacité de désulfatation. En revanche, il n'y a pas de glycoconjugués dans les selles des trois groupes et les mêmes quantités et proportions d'AB sulfoconjugués (somme de TMCA_3S et UDCA_3S). Globalement, ceci signifie que les selles des conventionnalisées contiennent plus d'AB déconjugués que celles des souris monocolonisées. La déconjugaison rend les ABs plus hydrophobes et donc moins réabsorbés par la voie entéro-hépatique. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes sur l'indice d'hydrophobicité calculé sur l'ensemble des ABs.

La différence significative observée sur les ursodérivés (UDCA figure 63) se confirme lorsque l'on sépare les trois ABs composant cette famille : TUDCA, UDCA et UDCA_3S (figure 64). Le TUDCA est présent à hauteur de $1,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$; $224,0 \pm 62,9 \mu\text{M}$ et $201,6 \pm 73,5 \mu\text{M}$ dans les selles des souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* respectivement. Cette différence entre conventionnalisées et monocolonisées n'existe pas dans la bile. Ceci montre une plus forte modification de cet AB dans les selles des premières comparativement aux secondes. Et confirme une plus faible capacité de déconjugaison des monocolonisées comparativement aux conventionnalisées. Cependant, la présence d'UDCA, significativement plus forte ($p = 9,37 \cdot 10^{-3}$) avec en moyenne $68,7 \pm 61,1 \mu\text{M}$ chez les souris monocolonisées avec *P. distasonis* contre $12,7 \pm 14,6 \mu\text{M}$ chez les conventionnalisées interrogées. Soit cette souche est capable d'effectuer plus de déconjugaisons de TUDCA que le microbiote complexe dans le cas où l'UDCA est produit selon la voie 1 de la figure 58. Dans le cas de la voie 2, ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que cette souche transforme le TCDCA en CDCA puis en UDCA (figure 58). Dans les deux cas, il se peut également que *P. distasonis* transforme moins l'UDCA en une autre molécule que les souris conventionnalisées.

L'absence de CDCA et de TCDCA chez les conventionnalisées (figure 64A) alors que le TCDCA est au même niveau dans la bile que celui des souris monocolonisées (figure 61) peut s'expliquer par la production de LCA par le microbiote complexe (figure 58), absent des selles des souris monocolonisées. Ceci peut signifier que les bactéries testées ne peuvent pas produire ce composé à partir du CDCA. La plus forte concentration en CDCA des souris monocolonisées avec *P. distasonis* comparativement aux souris monocolonisées avec *B. dorei* avec en moyenne $53,3 \pm 53,9 \mu\text{M}$ contre $12,1 \pm 10,0 \mu\text{M}$ respectivement ne s'explique pas par une différence dans la production de LCA (figures 64 B et C). Le CDCA dérivant du TCDCA, il est possible que la souche *P. distasonis* déconjugue plus de ce composé que la souche *B. dorei*. Effectivement, il y a moins de TCDCA dans les selles des souris colonisées avec la première souche que dans les selles de celles colonisées avec la seconde. Cependant, cette différence n'est pas significative (figures 64 B et C).

Enfin, la présence de plus de CA dans les selles des souris conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées avec *B. dorei* avec en moyenne $24,9 \pm 12,1 \mu\text{M}$ et $12,7 \pm 5,8 \mu\text{M}$ respectivement, peut être le signe d'une plus forte activité de déconjugaison, cohérente avec les observations faites jusqu'à présent. Ce composé est également significativement plus présent dans les selles des souris monocolonisées avec *P. distasonis* avec en moyenne $28,3 \pm 11,3 \mu\text{M}$ comparées aux souris conventionnalisées. Ceci peut s'expliquer par une différence dans la déconjugaison de l'AB TCA ou plus probablement par une différence dans la transformation du CA en DCA, les souris conventionnalisées ayant beaucoup plus de ce composé dans les selles que les souris monocolonisées (figure 64A).

De plus, le ratio ABI/ABII est significativement supérieur ($p = 2,76 \cdot 10^{-2}$) chez les souris colonisées avec *B. dorei* comparées aux souris colonisées avec *P. distasonis* atteignant $100,3 \pm 46,4$ pour les premières et $61,5 \pm 30,6$ pour les secondes. Ceci est cohérent avec une somme des ABI supérieure chez les premières comparées aux secondes et une somme des ABII supérieure chez les secondes comparées aux premières même si à chaque fois, ces différences ne sont pas significatives. Ces résultats tendent à montrer une différence entre les deux souches testées avec potentiellement *B. dorei* induisant une plus forte production d'ABI chez l'hôte et/ou ayant moins d'activité de modification des AB que *P. distasonis*.

Ces résultats sur les selles trouvent une cohérence avec ceux obtenus dans la bile au regard de la voie de synthèse des AB (figure 58). Ils montrent une fois encore des différences entre souris conventionnalisées et monocolonisées, dans les mêmes tendances que celles observées dans la bile à savoir plus d'ABII en quantité et en diversité chez les premières et plus d'ABI et de tauroconjugués chez les secondes. Toutefois, la présence d'ABII chez les souris monocolonisées est la signature d'une activité de nos bactéries testées sur les AB. De plus, les données sur les selles montrent quelques différences entre *B. dorei* et *P. distasonis* dans leur métabolisme des CA, CDCA et UDCA.

5.3.3.4 Comparaison des paramètres histologiques

Les analyses sur les coupes histologiques du tissu adipeux et de l'aorte n'ont montré aucune différence significative entre les trois groupes de souris selon les paramètres analysés et détaillés dans la section 4.4.4.3.4 du chapitre « matériels et méthodes ». Cela signifie que le statut bactérien n'influence pas l'aspect de ces tissus. Bien qu'il n'y ait pas non plus de différence significative entre les groupes de souris sur le foie, celui-ci présente les marques d'une stéatose hépatique. Celle-ci se caractérise par la présence d'inclusions de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes qui sont présentes de la même manière dans les foies des trois groupes (figure 65). Le régime alimentaire donné à partir de S0 induit donc un stockage des lipides modéré et la formation d'une légère stéatose avec un score moyen de 1 ; 1,3 et 1,2 pour les souris

conventionnalisées et monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis* respectivement. A titre d'exemple, une coupe de foie d'une souris de chaque groupe est montrée dans la figure 65. La première lame correspond à la seule souris du groupe conventionnalisé pour laquelle le score pour la stéatose atteint 0.

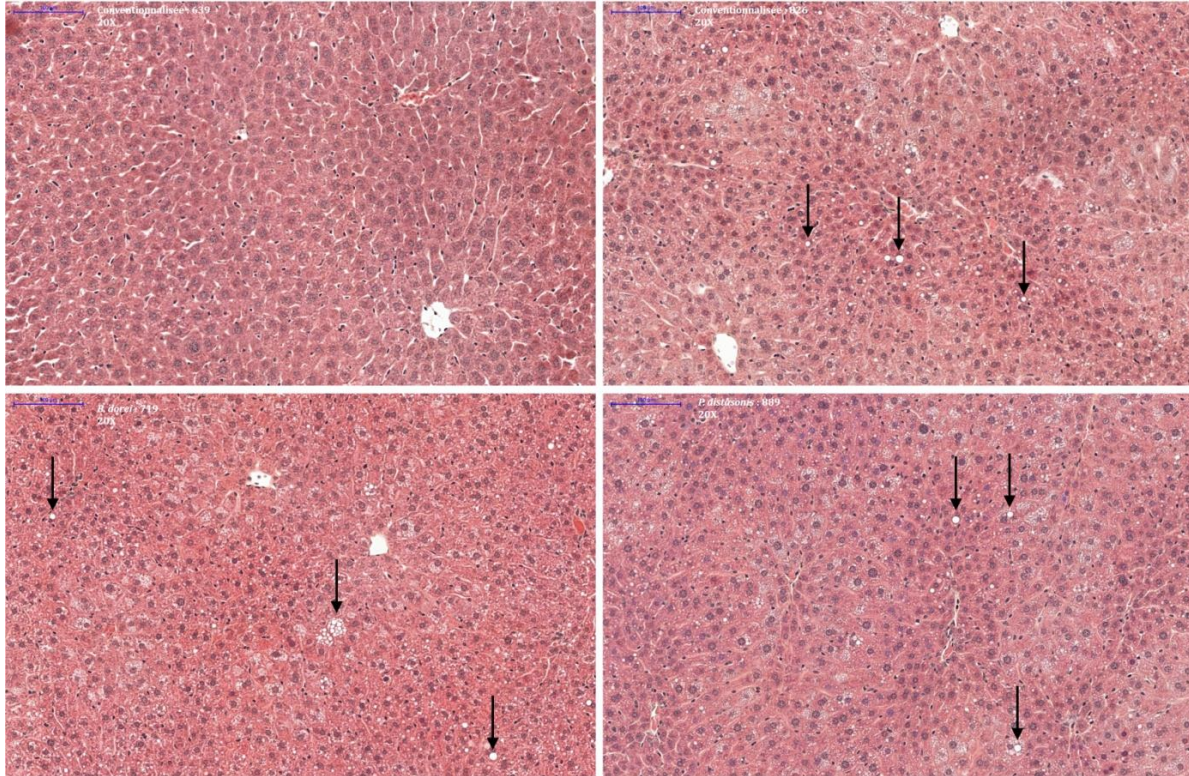


Figure 65 : Coupes histologiques du foie.

Exemples représentant une souris conventionnalisée sans stéatose, une conventionnalisée, une monocolonisée avec *B. dorei* et une autre avec *P. distasonis* présentant toutes une légère stéatose. Les flèches indiquent les inclusions lipidiques. Grossissement 20X.

Les analyses sur les coupes d'iléon n'ont montré aucune différence sur la taille et l'épaisseur des villosités, ni sur le nombre de cellules à mucus. En revanche, l'évaluation des capacités sécrétoires des cellules de Paneth montre une différence entre les souris conventionnalisées et les souris monocolonisées d'une manière générale mais aussi entre les souris colonisées avec *B. dorei* et celles colonisées avec *P. distasonis* (figure 66). L'aire des granulocytes rapportée au nombre de cellules de Paneth visibles est plus importante chez les souris conventionnalisées ($56,29 \pm 17,4 \mu\text{m}^2$) que chez les souris monocolonisées avec *P. distasonis* ($45,89 \pm 13,46$) ou avec *B. dorei* ($37,67 \pm 10,58$). Ces différences sont significatives (figure 67) avec $p_{B. dorei/conv} = 1,9.10^{-6}$, $p_{P. distasonis/conv} = 5,9.10^{-3}$ et $p_{B. dorei/P. distasonis} = 0,037$. Les cellules de Paneth situées au fond des cryptes sécrètent des peptides antimicrobiens dans le but de protéger la muqueuse contre des bactéries pathogènes. Ces résultats suggèrent donc que les souris conventionnalisées ont plus de potentiel pour sécréter ce type de molécules que les souris monocolonisées. Et parmi celles-ci, la souche *P. distasonis* semble induire un plus fort potentiel sécrétoire que la souche *B. dorei* (figure 67).

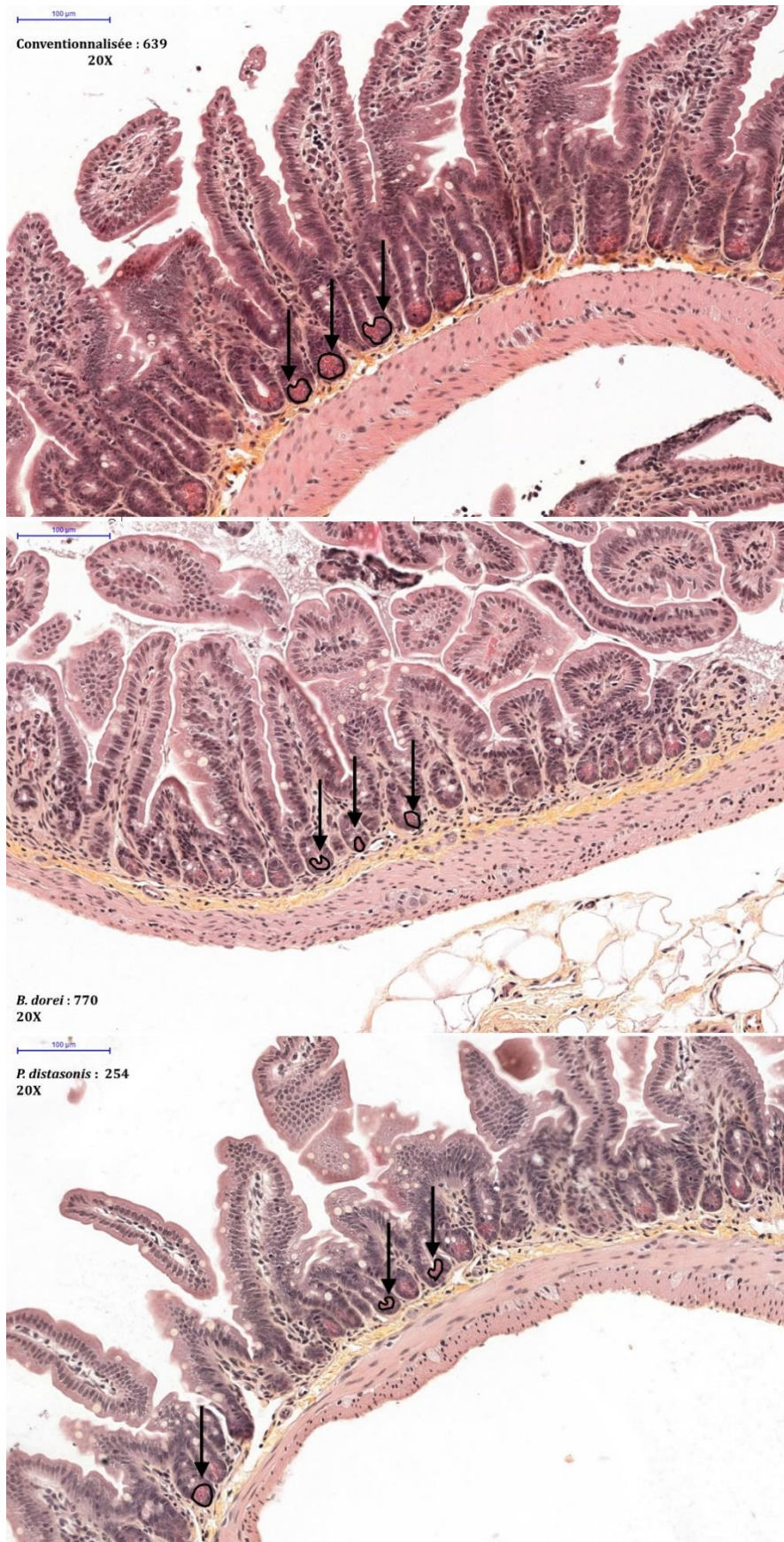


Figure 66 : Coupes histologiques d'iléon.

Exemples représentatifs des coupes d'iléon des souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* (*B. dorei*) ou *P. distasonis* (*P. distasonis*). Les cercles noirs indiquent l'aire totale des granulocytes. Grossissement 20X.

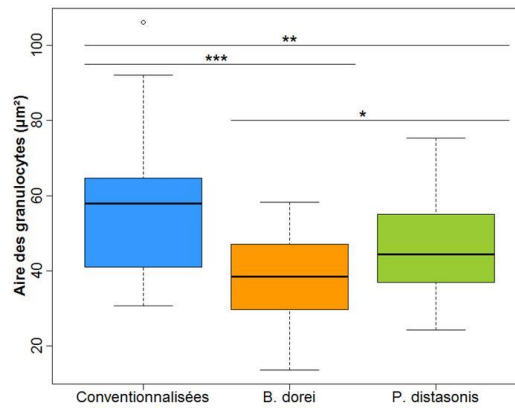


Figure 67 : Diagramme en boîtes de Tukey de l'aire des granulocytes dans les cellules de Paneth pour les trois groupes de souris

Les mesures sont une moyenne des aires des granulocytes rapportées au nombre de cellules de Paneth visibles au grossissement 20X sur 3 à 8 mesures/souris en fonction de la qualité de la coupe. ANOVA et test de Tukey : « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$.

5.3.3.5 Comparaison de l'expression des gènes

Il est à noter que parmi la liste des gènes étudiés disponible dans le tableau 12, celui codant pour l'interleukine 6 a été éliminé des analyses en raison de données non exploitables.

5.3.3.5.1 Expression de gènes dans le tissu adipeux

Nous avons analysé l'expression de quinze gènes dans le tissu adipeux, impliqués dans l'inflammation (TNF α , IL1 β , IL6, MCP-1 et IKK ϵ), le métabolisme des lipides (Abca1, Srb1, Fas, Pparg, Lxr et Srebf1) et des acides biliaries (Gpbar1 et Fxr). L'analyse de l'expression de ces gènes sur le tissu adipeux n'a montré aucune différence significative entre les trois groupes de souris. Le statut bactérien n'a donc pas d'effet sur l'expression de ces gènes dans le tissu adipeux dans nos conditions expérimentales.

5.3.3.5.2 Expression de gènes dans le foie

Nous réalisons une ACP sur l'ensemble des gènes étudiés dans le foie. Les deux premiers axes de l'ACP cumulent 56,62 % de la variabilité totale et les trois groupes de souris sont indissociables sur la carte des individus (figure 68) même si le groupe conventionnalisé semble se détacher un peu des deux autres.

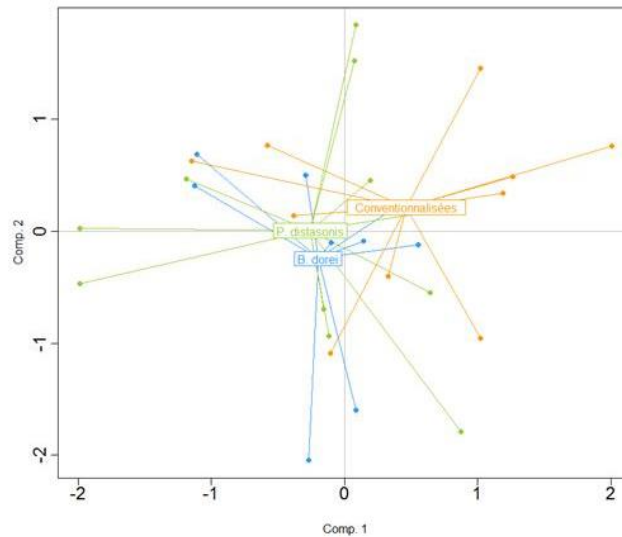


Figure 68 : Analyse en composantes principales de l'expression des gènes hépatiques des souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*

Nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation (TNF α , IL1 β , IL6 et MCP-1), dans le métabolisme du cholestérol et des lipides (HmcoAr, Fdft1, Mttp, ApoB, ApoA1, Abca1, Abcg5, Abcg8, LDLr, Srb1, Fas, Pparg, Lxr, Srebf1) et dans le métabolisme des acides biliaires (Cyp7a1, Cyp8b1, Cyp27a1, Abcb11 et Fxr). Les gènes impliqués dans l'inflammation ne montrent aucune différence significative dans leur niveau d'expression entre les trois groupes de souris. Le statut bactérien n'influence donc pas la réponse inflammatoire au niveau du foie. Les seuls gènes ressortant comme différents sont présentés sur la figure 69.

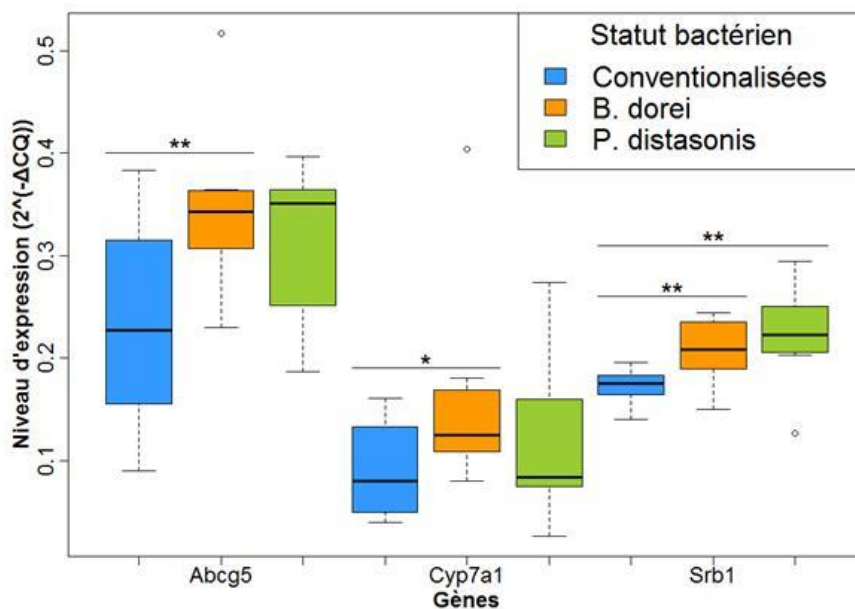


Figure 69 : Gènes hépatiques dont l'expression est significativement différente entre deux ou plusieurs groupes de souris

Abcg5, ATP binding cassette subfamily G member 8 ; Cyp7a1, Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1; Srb1, Scavenger receptor class B member 1. ANOVA et test de Tukey : « * » si $p < 0,05$, et « ** » si $p < 0,01$.

Le gène *Srb1* est surexprimé chez les deux groupes de souris monocolonisées comparées aux souris conventionnalisées ($p_{B. dorei/conv} = 0,008$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,005$). Ce gène code pour le récepteur aux HDL. Ces lipoprotéines sont impliquées dans le transport réverse du cholestérol des organes vers le foie pour être ensuite éliminé par la voie hépatobiliaire dans les selles (voir le paragraphe 2.1.2.5). Il semblerait donc que les souris monocolonisées éliminent plus le cholestérol que les conventionnalisées ce qui est cohérent avec une cholestérolémie plus faible chez les souris monocolonisées avec *P. distasonis* mais ne se traduit pas au niveau plasmatique chez les souris monocolonisées avec *B. dorei*. De plus, les gènes *Abcg5* et *Cyp7a1* apparaissent comme surexprimés chez les souris monocolonisées avec *B. dorei* comparées aux souris conventionnalisées ($p_{Abcg5} = 0,010$ et $p_{Cyp7a1} = 0,015$). Le premier code pour un transporteur de cholestérol localisé au niveau canaliculaire qui dirige le cholestérol hépatique dans la vésicule biliaire pour ensuite être éliminé au niveau hépatobiliaire. Le second code pour la première enzyme limitante du catabolisme du cholestérol dans la formation des acides biliaires (figure 70). Ensemble, ces résultats indiquent une élimination plus importante du cholestérol chez ces souris que chez les conventionnalisées. Enfin, aucune différence n'est observée entre les deux groupes de souris monoxéniques.

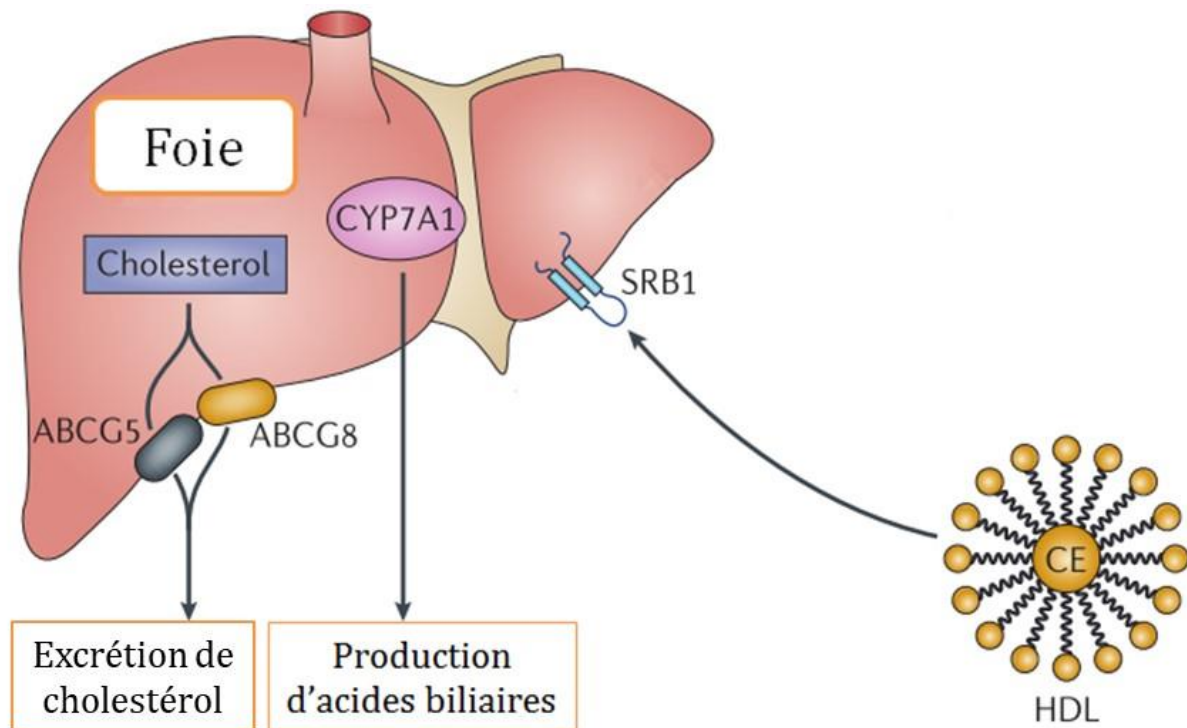


Figure 70 : Protéines et mécanismes associés aux gènes différentiellement exprimés dans le foie
Adapté de (Hong & Tontonoz 2014)

5.3.3.5.3 Expression de gènes dans l'iléon

L'ACP est réalisée sur l'ensemble des gènes étudiés dans l'iléon. Les deux premiers axes de l'ACP cumulent 53,23 % de la variabilité totale. La carte des individus représentée sur la figure 71 ne montre pas de distinction claire entre les deux groupes de souris monocolonisées mais met de côté les souris conventionnalisées.

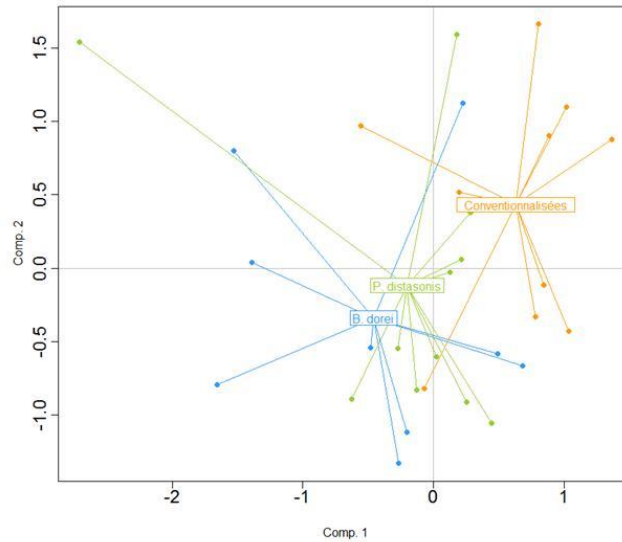


Figure 71: Analyse en composantes principales de l'expression des gènes de l'iléon des souris conventionnalisées, monocolonisées avec *B. dorei* ou *P. distasonis*

Nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation (TNF α , IL1 β , IL6, MCP-1 et Reg3g), dans la perméabilité intestinale (ZO-1 et Occludines), dans le métabolisme du cholestérol et des lipides (Mttp, ApoB, ApoA1, Npc1l1, Abca1, Abcg5, Abcg8, Srb1 et Lxr) et dans le métabolisme des acides biliaires (Ibat, Gpbar1, Fgf15 et Fxr). Les gènes impliqués dans ce dernier ne montrent aucune différence significative dans leur expression entre les trois groupes de souris. Le statut bactérien n'influence donc pas ce métabolisme au niveau de l'iléon. Les seuls gènes ressortant comme différents sont présentés sur la figure 72.

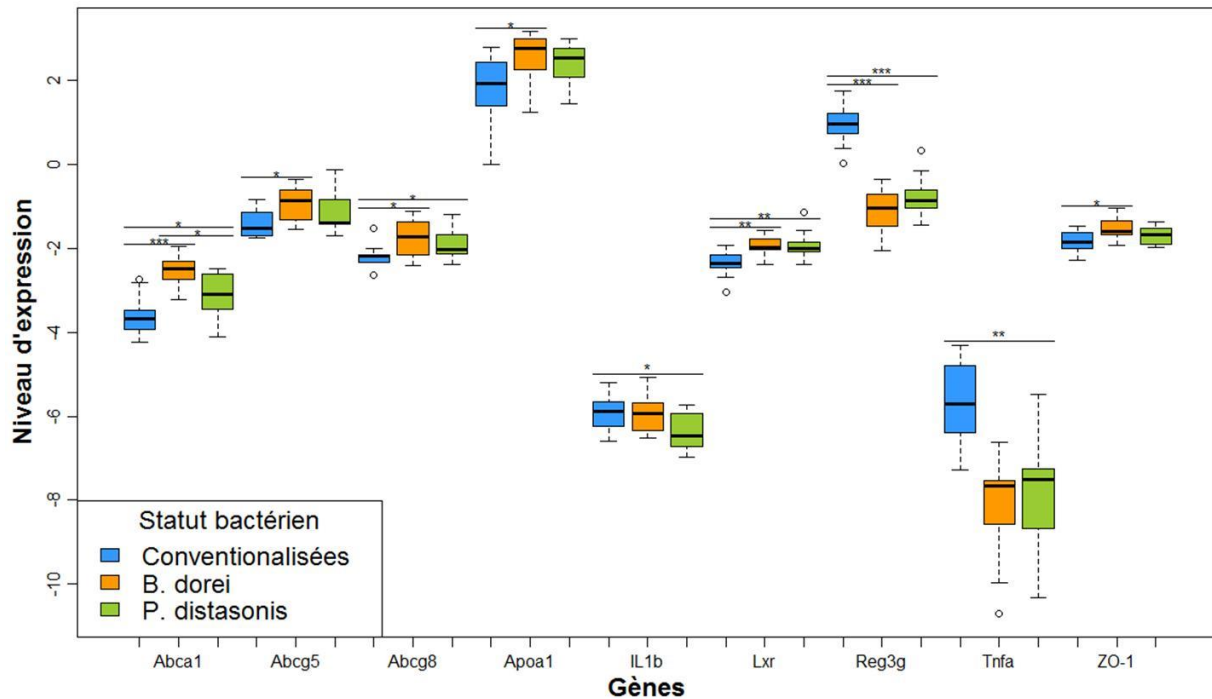


Figure 72 : Gènes de l'iléon dont l'expression est significativement différente entre deux ou plusieurs groupes de souris

Abca1/g5/g8, ATP binding cassette subfamilies A/G members 1, 5 and 8 respectively ; Apoa1, Apolipoprotein A1 ; IL1b, Inteleukine 1b ; Lxr, Nucler receptor subfamily 1 group H member 3 ; Reg3g, Regenerating family member 3 gamma ; Tnfa, Tumor necrosis factor alpha ; ZO-1, zona occludens.

Parmi les gènes étudiés, le gène Reg3g est surexprimé dans l'iléon des souris conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées ($p = 0$ pour conventionnalisées/*B. dorei* et conventionnalisées/*P. distasonis*). Reg3g est un peptide antimicrobien dirigé contre les bactéries Gram positives et sécrété par les cellules de Paneth. Les deux bactéries testées sont Gram négatives, il est donc cohérent que ce gène soit sous-exprimé chez les souris monocolonisées avec ces souches. Chez les deux groupes de souris monocolonisées, nous observons également une surexpression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des lipides : Abca1, Abcg8 et Lxr ($p_{B. dorei/conv} = 0,001$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,038$ pour Abca1, $p_{B. dorei/conv} = 0,033$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,045$ pour Abcg8 et $p_{B. dorei/conv} = 0,003$ et $p_{P. distasonis/conv} = 0,004$ pour Lxr). Le premier code pour une protéine impliquée dans le transport reverse du cholestérol des organes vers le foie *via* la formation de HDL et en collaboration avec l'apolipoprotéine A1 codée par le gène Apoa1. Le second, Abcg8, code pour un transporteur du cholestérol limitant sont absorption au niveau iléal et induisant sa sécrétion par le mécanisme du TICE (paragraphe 2.1.2.6 de l'introduction, figure 73). Enfin, le troisième, Lxr code pour un facteur de transcription jouant un rôle pivot dans l'homéostasie des lipides. Sa surexpression au niveau iléale est cohérente avec la surexpression des deux premier car ils sont régulés par ce facteur de transcription. Ensemble ces résultats sur le métabolisme des lipides indiquent que les souris monocolonisées excrètent plus activement le cholestérol de leur organisme par le TICE et par le transport réverse de cholestérol et la formation de HDL que les souris conventionnalisées.

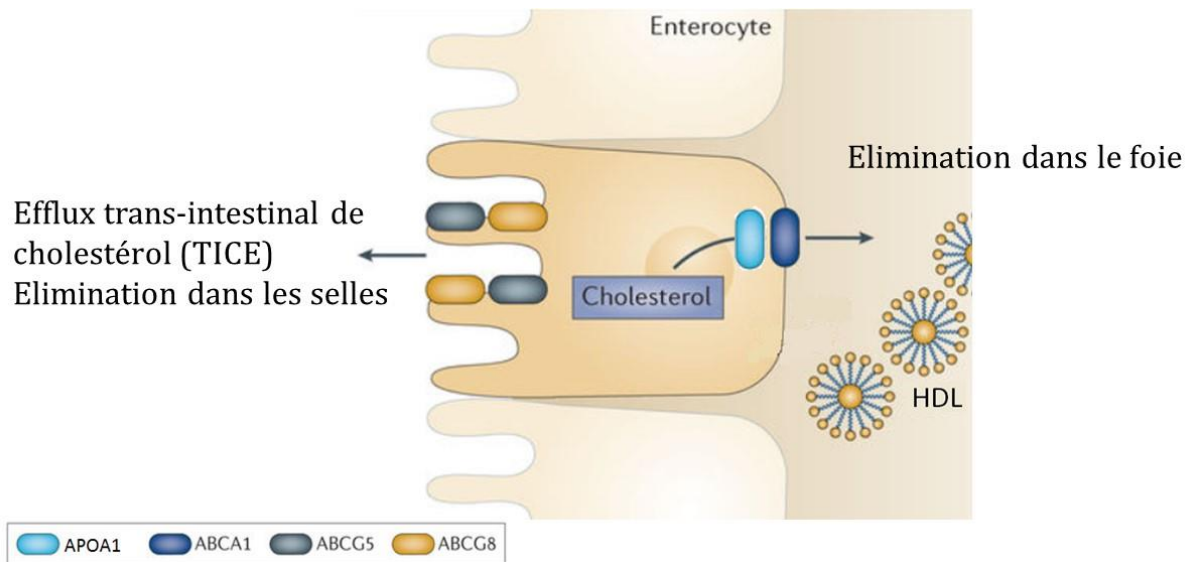


Figure 73 : Protéines et mécanismes associés aux gènes surexprimés dans l'iléon
Adapté de (Hong & Tontonoz 2014)

Les gènes *Abcg5*, *Apoa1* et *ZO-1* sont surexprimés chez les souris colonisées avec *B. dorei* comparativement aux souris conventionnalisées ($p_{Abcg5} = 0,021$, $p_{Apoa1} = 0,049$ et $p_{ZO-1} = 0,028$). Le premier est souvent en association avec le gène *Abcg8* et joue un rôle dans le mécanisme du TICE, le second, comme expliqué plus haut, participe à la formation des HDL et donc au transport reverse du cholestérol (figure 73). Ces résultats montrent que les souris colonisées avec *B. dorei* éliminent plus efficacement le cholestérol de leur organisme que les souris conventionnalisées. Enfin, le gène *ZO-1* code pour une protéine des jonctions serrées formant la zona occludens. Ceci suggère que cette bactérie pourrait avoir un effet de renforcement de la barrière intestinale.

Les gènes *IL1 β* et *Tnfa* sont surexprimés ($p_{IL1\beta} = 0,031$ et $p_{Tnfa} = 0,001$) chez les conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées avec *P. distasonis* (figure 72). Le premier code pour une cytokine produite par les macrophages activés et est un médiateur de la réponse inflammatoire. Le second code également pour une cytokine régulant les cellules immunitaires (recrutement et activation des macrophages et lymphocytes notamment). Le *TNF α* est relargué en réponse aux LPS et autres composés bactériens et à l'*IL1*. Ces résultats suggèrent donc une réponse inflammatoire plus accrue chez les souris conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées avec *P. distasonis*.

Enfin la seule différence significative entre les deux groupes monocolonisés se voit sur l'expression du gène *Abca1*, surexprimé chez les souris colonisées avec *B. dorei* en comparaison des souris colonisées avec *P. distasonis* ($p = 0,023$). Ceci suggère une meilleure efficacité du transport reverse de cholestérol chez les premières comparées aux secondes.

Globalement ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus sur le foie et indiquent une élimination du cholestérol plus importante chez les souris monocolonisées que chez les

conventionnalisées. Les mécanismes impliqués ici sont le transport reverse de cholestérol *via* les HDL et le TICE. De plus, ces mécanismes semblent en particulier renforcés chez les souris monocolonisées avec *B. dorei* comparées aux conventionnelles.

5.3.4 Conclusions et perspectives

Les principaux objectifs de cette étude étaient i) isoler de nouvelles bactéries coprostanoligènes, ii) trouver les gènes impliqués dans la voie de conversion bactérienne du cholestérol en coprostanol et iii) analyser l'impact de cette activité sur la cholestérolémie de l'hôte.

Les principaux résultats, conclusions et perspectives sont disponibles sur la figure 74. Nous avons isolé 22 nouvelles souches coprostanoligènes à partir desquelles nous avons pu en choisir une, *Bacteroides* sp. BV pour construire une banque génomique. Son criblage fonctionnel, couplé à celui de la banque construite à partir de *Bacteroides* sp. D8 nous a permis d'identifier 55 clones potentiellement positifs pour la production de coprostanol sur lesquels d'autres analyses sont en cours. En plus de ces deux souches, 8 ont été sélectionnées pour tester leur implantation *in vivo* dans le TGI de la souris axéniques et leur production de coprostanol. Les résultats obtenus au cours de cette première expérimentation animale nous ont permis de sélectionner la meilleure souche productrice de coprostanol *in vivo* : *P. distasonis*. Nous avons couplé l'analyse de sa réponse *in vivo* à un régime riche en cholestérol avec celles de souris conventionnalisées et de souris monocolonisées avec *B. dorei*, espèce bactérienne n'étant pas rapportée comme productrice de coprostanol. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 74 avec un effet du régime riche en cholestérol (bloc IV, figure 74), des différences entre les souris conventionnalisées et monocolonisées (bloc VI, figure 74) et des effets souche-dépendants (blocs VI et VII, figure 74).

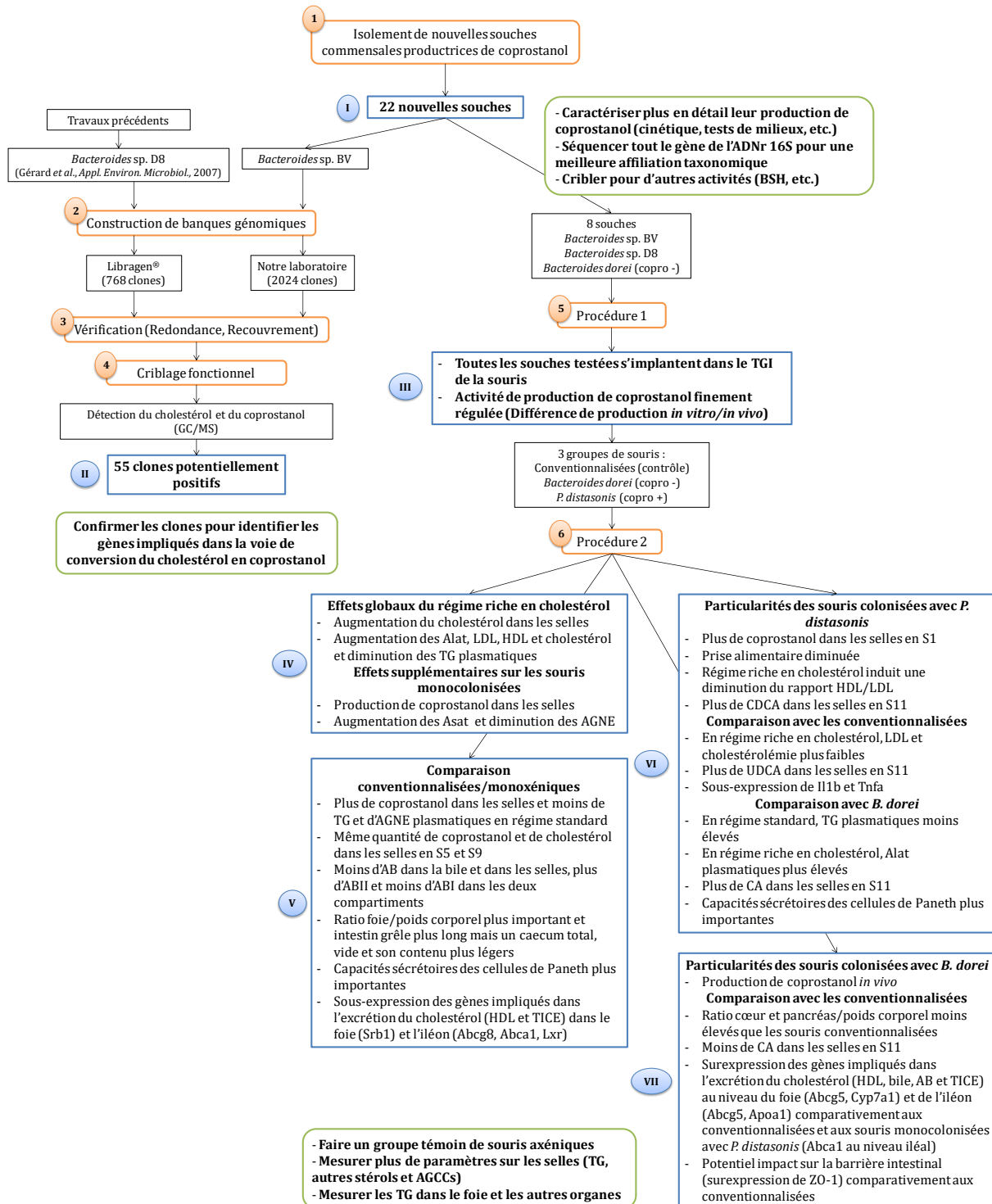


Figure 74 : Schéma bilan des expériences, des principaux résultats et perspectives du travail de thèse

Les encadrés orange, numérotés de 1 à 6 représentent les principales expérimentations auxquelles j'ai participé. Les encadrés bleu, numérotés de I à VII figurent les principaux résultats de cette étude et les encadrés verts énoncent les principales perspectives envisagées.

**DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

6. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les MCV sont un fléau du 21^{ème} siècle et la principale cause de mortalité dans le monde. Elles sont liées au développement de l'athérosclérose dont l'un des principaux facteurs de risque est une cholestérolémie élevée. Plusieurs traitements ont déjà montré leur efficacité à diminuer le cholestérol mais également leurs limites avec des effets secondaires importants et des patients qui ne répondent pas au traitement.

L'étude du microbiote intestinal, déjà impliqué dans diverses pathologies, constitue une alternative intéressante pour l'étude de ces maladies et la recherche d'un moyen efficace pour diminuer la cholestérolémie. Dans ce contexte, des études ont montré une corrélation négative entre la forte production de coprostanol, dérivé du cholestérol peu absorbé, et la cholestérolémie.

Ce travail de thèse s'intéresse à cette activité de production de coprostanol. Il avait trois objectifs principaux : i) Isoler de nouvelles souches coprostanoligènes en vue de les étudier, ii) Identifier les gènes de la voie bactérienne de conversion du cholestérol en coprostanol et iii) Etudier l'impact de cette activité et de ces bactéries sur le métabolisme du cholestérol chez des souris originellement axéniques.

Notre stratégie d'isolement a permis l'identification de 22 nouvelles souches coprostanoligènes

Alors que jusqu'à présent, une seule bactérie avait été isolée à partir de selles humaines : *Bacteroides* sp. D8 (Gérard et al. 2007) ; nous avons pu en isoler 22 nouvelles. Deux hypothèses peuvent expliquer cette efficacité, la première est la performance de notre stratégie d'isolement, la seconde repose sur des différences entre la sensibilité des différentes méthodes utilisées pour détecter le coprostanol entre les précédentes études et celle-ci.

Les études précédentes identifiant des bactéries coprostanoligènes ont utilisé le même type de schéma expérimental que le nôtre en partant de selles (humaines ou non), puis en faisant des dilutions successives à partir de ces échantillons avant une mesure de l'activité coprostanoligène et des tentatives d'isolement bactérien. Les dilutions effectuées dans ces études ont été faites dans des milieux simples. Sadzikowski *et al.* (1977) diluent les selles humaines dans une solution saline avant d'inoculer un milieu plus complexe, contenant de la cervelle de porc pour la mesure de la production de coprostanol (Sadzikowski et al. 1977). De même, dans l'étude de Gérard *et al.* (2007), le milieu LCY (composition disponible au paragraphe

4.4.1) est utilisé pour les dilutions à partir des selles et les essais de production de coprostanol sont effectués en milieu SBM (composition disponible dans le tableau 3) contenant de la poudre de cerveau de veau (Gérard et al. 2007). Notre stratégie d'isolement a pour différence l'utilisation du milieu LYHBHI contenant une infusion cœur-cerveau pour les dilutions à partir des selles (paragraphe 4.1.1 et figure 16). En effet, les données récoltées dans la littérature montrent l'importance de ce composé pour la production de coprostanol même si les mécanismes ne sont pas connus (Sadzikowski et al. 1977; Eyssen et al. 1973; Mott & Brinkley 1979). Cette différence dans le protocole pourrait expliquer une part de la réussite dans nos isollements. En effet, lorsque Brinkley *et al.* (1982) ont utilisé le même genre de stratégie en utilisant le milieu SBM pour leurs dilutions à partir du contenu intestinal et des selles de babouins, ils ont pu isoler 9 nouvelles souches produisant du coprostanol (Brinkley et al. 1982). De plus, il faut noter que notre stratégie utilise les selles d'un individu sain HP comme matériel de base pour l'isolement, tout comme l'étude de Gérard *et al.* (2007) (Gérard et al. 2007). La quantité de coprostanol dans les selles ayant été reliée au nombre de bactéries coprostanoligènes (Veiga et al. 2005), nous optimisons ainsi la probabilité d'isoler ce type de bactéries.

Même si cette différence de protocole peut en partie expliquer les différences de résultats ; il faut également noter que toutes ces études ont plus de 10 ans, parfois même plus de 40 ans. Entre temps, les techniques et les appareils utilisés pour la mesure du coprostanol ont évolué. La littérature montre deux techniques principales pour la détection de ce composé : la chromatographie en couche mince (Freier et al. 1994; Eyssen et al. 1973) et la chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme (Brinkley et al. 1982; Sadzikowski et al. 1977; Gérard et al. 2007). Ces études ne précisent pas le seuil de détection des méthodes utilisées, dans notre cas, nous utilisons la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse permettant la détection du coprostanol au-dessus de 5 pg/μL.

Nos résultats montrent une conservation de l'activité coprostanoligène au sein du phyla *Bacteroidetes*, bactéries Gram négatives et en particulier des genres *Bacteroides* et *Parabacteroides* dans notre échantillon fécal. Il se peut que ce résultat soit spécifique de l'individu choisi. Il est aussi possible que cette activité soit spécifique de ces genres bactériens ou bien que notre technique d'isolement sélectionne de manière non intentionnée ces bactéries.

La première hypothèse implique une répartition de cette activité au sein du microbiote intestinal différente en termes de genres voire de phyla en fonction des individus. En fait, certaines activités métaboliques sont largement partagées au sein du microbiote et ne sont pas spécifiques d'un genre ou d'une espèce (voir le paragraphe 2.2.1.3 de ce manuscrit).

Toutefois, un argument allant contre cette première hypothèse et soutenant la seconde, est que la seule bactérie coprostanoligène isolée à ce jour à partir de selles humaines appartient au genre *Bacteroides* (Gérard et al. 2007). Cependant et en faveur de la troisième, les autres bactéries coprostanoligènes isolées à partir de selles de mammifères : *Eubacterium* 403 (Mott & Brinkley 1979), *Eubacterium* ATCC 21 408 (Eyssen et al. 1973) et *E. coprostanoligenes* (Freier et al. 1994) appartiennent au phylum des *Firmicutes*, bactéries Gram positives. De la même manière, les neuf bactéries isolées par Brinkley *et al.* (1982), n'ont pas été clairement identifiées mais sont toutes Gram positives et proche de *Eubacterium* ATCC 21 408 (Brinkley et al. 1982). Ces résultats peuvent donc mettre en évidence une spécificité du microbiote intestinal humain par rapport aux microbiotes intestinaux des autres mammifères. Ou bien, ce sont nos techniques d'isolement qui ont sélectionné ces bactéries en particulier. Pour soutenir cette dernière assertion, il faut noter que plus de la moitié des bactéries isolées par notre approche sont des *Bacteroidetes*. Bien que ce phylum soit dominant dans le microbiote intestinal humain, il représente en général moins de la moitié de celui-ci, entre 9 et 42 % (Rajilić-Stojanović et al. 2007).

Dans un dernier temps, les résultats *in vitro* et *in vivo* de production de coprostanol par nos souches montrent des différences dans leur capacité de production malgré leur proximité phylogénétique.

D'un côté, malgré des absorbances à 600 nm différentes pouvant faire penser à un lien entre biomasse bactérienne et production de coprostanol, nous n'avons pas observé de corrélation linéaire (positive ou négative) entre ces deux paramètres. Néanmoins, les milieux utilisés sont souvent turbides et peuvent perturber la lecture de l'absorbance à 600 nm. Il faudrait donc coupler ces mesures à une numération pour pouvoir conclure sur ce lien dans les conditions *in vitro*. En revanche, nous avons montré qu'il n'existait pas pour les souches *B. dorei* et *P. distasonis* dans le contexte de la monocolonisation du TGI de souris axéniques.

D'un autre côté, les différences observées pourraient être dues à des différences de composition et de biodisponibilité du cholestérol de nos trois milieux. En effet, nous savons que la composition des milieux joue un rôle sur la production du coprostanol et que cet effet est souche-dépendant. Les études *in vitro* réalisées sur les premières souches isolées montrent un effet de différents composés sur la production de coprostanol et notamment de l'extrait de cerveau (Sadzikowski et al. 1977; Eyssen et al. 1973; Gérard et al. 2007; Brinkley et al. 1982). Le plasmalogène, très présent dans le cœur et dans le cerveau des animaux est le composé suspecté mais son rôle précis dans l'activité de production de coprostanol reste inconnu à ce jour (voir paragraphe 2.3.3.5.2.1 de ce manuscrit). Or dans nos milieux tests, seul le LYHBHI contient une infusion cœur-cerveau ce qui peut expliquer pourquoi c'est sur ce milieu que la plupart des

souches (mais pas toutes) produisent du coprostanol et les différences observées entre les milieux. Le pH et la phosphatidylcholine sont également suspectés de jouer un rôle dans la production de coprostanol (Freier et al. 1994). Cependant, tous nos milieux sont tamponnés aux alentours du pH neutre, pH optimal de production de coprostanol de la souche *E. coprostanoligenes* (Freier et al. 1994). La phosphatidylcholine est utilisée dans la plupart des études sur les bactéries coprostanoligènes (Eyssen et al. 1973; Brinkley et al. 1982; L. Li et al. 1995; Ren et al. 1996; Gérard et al. 2007) dont la nôtre, pour solubiliser le cholestérol. En fait, ce phospholipide, en présence d'eau va venir former une bicouche lipidique dans laquelle le cholestérol va pouvoir s'insérer (Poznansky & Weglicki 2010). Ces structures sont appelées liposomes (Bangham et al. 1965). Notre protocole vise l'optimisation de la formation de liposomes homogènes par une agitation du mélange milieu/liposomes à 30 °C sur une nuit. Cependant, nous n'avons pas vérifié la taille et l'organisation de ces structures. Or, il arrive souvent que les liposomes n'aient pas la même taille mais surtout que des bicouches enferment d'autres bicouches de plus petites tailles. Dans ce cas, ces liposomes multi-lamellaires sont constitués en bicouches lipidiques concentriques et séparées les unes des autres par une couche aqueuse (Lorin et al. 2004). Ces événements influencent la biodisponibilité du cholestérol. En effet, une partie du cholestérol sera présente dans la couche la plus à l'intérieur de ces gros liposomes et sera donc inaccessible aux bactéries pour sa conversion en coprostanol. De plus, nous ne connaissons pas l'influence des différents composés des milieux utilisés pour les tests de production de coprostanol sur la forme de ces liposomes et donc leur influence sur la biodisponibilité du cholestérol. Il pourrait donc être intéressant dans le futur de mesurer le diamètre de ces particules dans nos milieux pour voir si elles sont uniformément distribuées autour d'une taille. Il existe plusieurs techniques pour réaliser cette mesure mais la plus utilisée semble être la technique de diffusion dynamique de la lumière (Hupfeld et al. 2006).

Ces critères de composition et de disponibilité du cholestérol sont cohérents avec les résultats *in vivo* obtenus. En effet, les conditions *in vivo* peuvent en fait être considérées comme un 4^{ème} milieu dont les paramètres sont encore moins contrôlés. La prise en compte ou non du bruit de fond de la méthode de GC/MS amène deux hypothèses énoncées dans le paragraphe 5.3.4. Mais dans les deux cas, les résultats montrent des différences de potentiel entre les souches : production ou non de coprostanol et induction ou non par le gavage de cholestérol. Plusieurs facteurs peuvent influencer la production de coprostanol *in vivo* (paragraphe 2.3.3.5.1) et notamment les conditions du tube digestif et le régime alimentaire. Le TGI des souris axéniques présente des caractéristiques différentes de celui des souris conventionnelles. Il a notamment une augmentation du potentiel d'oxydo-réduction au niveau de l'intestin grêle (Al-Asmakh & Zadjali 2015; Wostmann 1981), paramètre qui a été mis en cause dans l'échec de l'implantation de la souche *E. coprostanoligenes* dans le TGI de souris axéniques (Li et al. 1998).

Malgré cela, toutes les souches testées dans notre étude ont pu s'implanter dans le TGI des souris axéniques. En ce qui concerne le régime alimentaire, même si les conclusions de Reddy *et al.* (1998) ne sont pas complètes quant à l'efficacité à réduire le cholestérol en coprostanol des microbiotes intestinaux de femmes végétariennes ou non leur étude semble montrer un lien entre cholestérol alimentaire et coprostanol dans les selles (Reddy *et al.* 1998). Dans ce sens, nos résultats sur la procédure 2 de l'expérimentation animale montrent une induction de la production de coprostanol chez les souris monocolonisées suite à un passage en régime alimentaire riche en cholestérol.

Enfin, les différences observées entre les souches peuvent s'expliquer par une différence dans les voies de synthèses du coprostanol. Il est possible que les voies directe et indirecte n'aient pas le même rendement même si cela n'est pas discuté dans la littérature. En effet, hormis la souche *Eubacterium* 403 (Brinkley *et al.* 1982), les souches isolées et étudiées jusqu'à présent (*Eubacterium* ATCC 21 408, *E. coprostanoligenes* et *Bacteroides* sp. D8) présentent une voie de conversion indirecte (Eyssen *et al.* 1973; Gérard *et al.* 2007; Ren *et al.* 1996) rendant impossible les comparaisons de rendement entre les voies indirecte et directe et questionnant sur l'existence de cette deuxième voie. Il est en effet possible que l'absence d'intermédiaires soit le résultat d'une conversion rapide du cholestérol en coprostanol et non de l'existence d'une voie directe. Il est de plus possible que l'une des souches voire plusieurs possèdent une autre voie de synthèse du coprostanol non connue à ce jour et possédant un rendement différent des deux premières. Il serait intéressant dans ce contexte de mesurer la production ou non d'intermédiaires en GC/MS pour nous renseigner sur la/les voie(s) utilisée(s) par ces souches.

Dans ce contexte global de mesure de la capacité des souches à produire du coprostanol, nous pourrions réaliser des analyses plus fines en termes de cinétique pour mesurer la production du coprostanol en fonction de la phase de croissance de la bactérie. Il serait également intéressant de faire des tests sur des composants du milieu dans le but d'identifier un ou des composé(s) intéressant(s) pour la production de coprostanol. Au regard du nombre des différents composés proposés comme ayant un rôle dans cette activité, il pourrait être intéressant de réaliser un plan d'expérience afin de minimiser le nombre d'expérimentations et d'optimiser les résultats obtenus.

De manière surprenante, nos résultats montrent une production de coprostanol par la bactérie *B. dorei* en condition *in vivo* alors qu'elle n'en avait pas montré *in vitro* (Gérard *et al.* 2007). Ce résultat soulève plusieurs hypothèses : dans un premier temps et comme expliqué plus haut, dix ans séparent notre étude de celle de Gérard *et al.* (2007). Il est possible que depuis, les techniques de GC aient progressé. De plus, la méthode de détection par spectrométrie de masse est peut-être plus sensible que celle par ionisation de flamme. Il faut également noter

que les essais *in vitro* de production de coprostanol par *B. dorei* dans l'étude de Gérard *et al.* (2007) ont été faits sur les milieux SBM, BC et BHI-YH supplémenté en cholestérol (Gérard *et al.* 2007). Pour confirmer ou infirmer cette différence *in vitro/ in vivo*, il faudrait donc réaliser des tests de production de coprostanol par cette souche sur nos milieux LYHBHI, L-DON et M17 glucose supplémentés en cholestérol. La production de coprostanol *in vivo* par *B. dorei* apporte de plus un nouvel éclairage sur les résultats négatifs obtenus après la comparaison du génome de cette bactérie avec celui de *Bacteroides* sp. D8 (communication personnelle, Alexandre Bolotine, Ife, Micalis, INRA, Jouy-en-Josas ; paragraphe 2.3.3.6 de la partie « revue bibliographique »). Cette comparaison a été faite pour identifier et étudier les gènes responsables de l'activité coprostanoligène chez *Bacteroides* sp. D8. Elle repose sur l'hypothèse selon laquelle les gènes identifiés comme différents entre les deux souches expliqueraient leur différence de phénotype *in vitro* malgré leur proximité phylogénétique (99,7 % d'homologie pour le gène de l'ARNr 16S). Finalement les deux souches produisent du coprostanol expliquant la difficulté à trouver des gènes codant pour des protéines ayant un lien avec le métabolisme du cholestérol différent entre les deux souches.

Nous avons identifié 55 clones potentiellement positifs par le criblage fonctionnel de deux banques génomiques

Les voies de synthèse du coprostanol étant inconnues, nous avons choisi de construire des banques génomiques à partir de souches coprostanoligènes. La première, *Bacteroides* sp. D8 possède une voie de synthèse indirecte alors que les premiers résultats sur *Bacteroides* sp. BV indiqueraient une voie de synthèse directe (pas de détection d'intermédiaires en GC/MS).

Dans le cas de la voie indirecte, l'identification de clones positifs repose sur l'hypothèse de l'organisation des 3 ou 4 gènes impliqués en opérons ou sur un fragment de moins de 35 kb. En effet, dans le cas contraire, la voie de synthèse ne serait pas complète et il serait donc impossible de détecter le coprostanol. Selon l'hypothèse de la présence d'une ou deux copies (souvent une copie par génome chez les bactéries) de ces gènes sur le génome de nos bactéries, le nombre de clones positifs seraient de 3 à 8 pour la banque de *Bacteroides* sp. D8 et de 7 à 14 pour la banque de *Bacteroides* sp. BV. Or, au total nous avons identifié 55 clones potentiellement positifs, 18 sur 491 pour la banque de *Bacteroides* sp. D8 et 37 sur 1368 pour la banque de *Bacteroides* sp. BV. Comme énoncé dans la partie 5.2.6 des résultats, ces chiffres posent la question de la présence de faux positifs.

Pour soutenir cette assertion, il faut tout d'abord noter que l'hypothèse de l'organisation en opéron ou sur un fragment de moins de 40 kb possède une faible probabilité d'apparition compte tenu du fait que *Sterolibacterium denitrificans* et *Rhodococcus* sp. RHA1, micro-

organismes capables de dégrader le cholestérol en condition anaérobie possèdent des gènes du catabolisme du cholestérol et notamment des COX qui ne sont pas organisés en clusters de gènes cataboliques (Van der Geize et al. 2007; Chiang et al. 2008). Dans ce cas, il serait intéressant de regarder les chromatogrammes des clones déjà criblés pour rechercher les intermédiaires de la voie et notamment le 4-cholestan-3-one, produit de la dégradation du cholestérol par l'action de la COX. Il pourrait également être intéressant de refaire des essais en GC/MS en ciblant plus particulièrement la détection de ces composés. Nous pourrions également faire des pools de clones afin d'augmenter la probabilité d'avoir tous les gènes responsables de l'activité dans au moins un essai.

Pour expliquer la présence de faux positifs, il faut tout d'abord noter que la limite à laquelle nous avons considéré les clones comme potentiellement positifs est arbitraire et pourrait être revue à la hausse. Ensuite, l'algorithme développé par la plateforme ICAN pour la détection des composés en faible quantité comme le coprostanol, peut également être à l'origine de la présence de ce bruit de fond dans tous les échantillons et expliquant le nombre élevé de clones détectés comme potentiellement positifs. La présence d'un composé ayant le même temps de rétention que le coprostanol dans le milieu utilisé pour le criblage n'est pas à exclure et constitue une seconde hypothèse expliquant le bruit de fond observé. En effet, ce milieu a été optimisé pour la biodisponibilité du cholestérol avec pour témoin une souche *E. coli* BL21 porteuse du gène COX mais il n'a pas été optimisé pour la production de coprostanol (pas de témoin positif disponible) ni pour la détection de ce composé. Peut-être qu'un milieu encore moins complexe aurait généré un bruit de fond plus bas facilitant l'identification claire des clones positifs. Il serait possible d'utiliser un milieu moins complexe pour essayer de minimiser ce bruit de fond mais il faudrait d'abord s'assurer de la biodisponibilité du cholestérol et de la possibilité de production de coprostanol dans ce milieu, avec les souches à l'origine des banques par exemple. La mise en place de pools de clones pourrait potentialiser la production de coprostanol pour essayer de dépasser nettement le bruit de fond et mieux identifier les clones positifs.

La suite repose sur l'identification du ou des gènes impliqués dans l'activité de conversion du cholestérol en coprostanol. Pour cela, les fosmidés des clones confirmés positifs pour le coprostanol ou pour le 4-cholestan-3-one, pourront être extraits et analysés. Ils pourront ensuite être séquencés et assemblés dans le but d'identifier les gènes qu'ils portent et plus particulièrement ceux impliqués dans l'activité de production du coprostanol. Compte tenu du fait que nous disposons du génome de *Bacteroides* sp. D8, la comparaison de ces séquences avec le génome de la bactérie pourrait être informative quant à l'identification de certains gènes. Une autre stratégie repose sur la possibilité d'effectuer des mutations aléatoires dans le fosmide et de cribler ces nouveaux clones pour la production de coprostanol afin d'étudier la séquence de

ceux qui ont perdu cette activité. Une fois le ou les gènes identifiés, il serait intéressant de vérifier le produit d'expression et de purifier la ou les enzymes.

Toutes les souches testées s'implantent dans le TGI de la souris axénique

Ce résultat est important puisque à ce jour, les deux bactéries coprostanoligènes isolées, *E. coprostanoligenes* et *Eubacterium* 21 408 n'ont pas montré d'aptitude à coloniser le TGI de souris axéniques pour la première et de rats axéniques pour la seconde (Li et al. 1998; Eyssen & Parmentier 1974).

Nos résultats peuvent en partie s'expliquer par la différence dans le protocole utilisé. Alors que Li *et al.* (1998) administrent oralement à leurs souris 500 µL d'une solution à 2.10⁷ UFC/mL tous les jours pendant une semaine (Li et al. 1998) ; nous gavons nos souris une seule fois avec 200 µL d'une solution bactérienne à 10⁹ UFC/mL. Ce protocole a déjà été utilisé auparavant pour l'implantation de *B. thetaiotaomicron*, avec une dose moindre d'environ 10⁷ UFC/mL et montrant de bon résultats de colonisation, atteignant 10¹⁰ UFC/g de contenu fécal après un seul gavage et maintenu pendant 30 jours (Wrzosek et al. 2013).

Les détails sur la concentration en bactéries inoculées chez les rats axéniques de l'étude de Eyssen et Parmentier (1974) ne sont pas disponibles. Cependant, la souche *Eubacterium* 21 408 étant anaérobie stricte, les auteurs sont forcés de faire diminuer le potentiel d'oxydoréduction du TGI des rats axéniques avec une co-inoculation de la souche avec *Clostridium* CI-8 (Eyssen & Parmentier 1974). Les conditions particulières de stress oxydatif du TGI des animaux axéniques est l'une des hypothèses avancées par Li *et al.* (1998) pour expliquer la non colonisation du TGI de la souris axénique par *E. coprostanoligenes* (Li et al. 1998) alors qu'elle colonise le TGI de lapins hypercholestérolémiques et de poules conventionnelles avec une cholestérolémie normale (L Li et al. 1995; Li et al. 1996). En colonisant le TGI de souris axéniques, nos résultats semblent indiquer que nos souches coprostanoligènes sont moins sensibles à l'O₂ que celles testées jusqu'à ce jour. Pour répondre précisément à cette question, nous pourrions effectuer des expériences de survie *in vitro* sur ces souches en présence d'un gradient d'O₂.

Le régime riche en cholestérol et en graisse induit une augmentation de la cholestérolémie et une diminution de la triglycéridémie

Nous comparons les paramètres mesurés entre S0 et S11 sur les souris conventionnalisées pour étudier l'impact du régime riche en cholestérol et en graisse utilisé dans notre étude. Les principales différences entre le régime standard (Safe R04-40) et le régime

riche en cholestérol et en graisse (Ssniff® E15749-34) sont leurs teneurs pour ces deux composés. Alors que la quantité précise de cholestérol n'est pas connue pour le premier, le second contient 12,35 g/kg de cholestérol. Ce régime est également constitué de sept fois plus d'acides gras, précurseurs des triglycérides que le régime standard (le régime standard se compose au total de 27,05 g/kg d'acides gras contre 189 g/kg pour le régime riche en cholestérol). L'apport énergétique se fait de plus sous forme différente, avec pour les deux régimes, 19 % de l'énergie apportée sous forme de protéines mais 72 % et 39 % sous forme de carbohydrates et 9% et 42 % sous forme de lipides pour le régime standard et le régime riche en cholestérol respectivement (figure 25).

Nos résultats montrent que ce régime augmente l'excrétion de cholestérol dans les selles, la cholestérolémie (LDL et HDL inclus) et diminue la triglycéridémie.

Une forte excrétion de cholestérol dans les selles a été observée dans l'étude de Choi *et al.* (2017) sur des souris conventionnelles soumises à un régime riche en graisses (40 % de l'énergie sous forme de lipides et contenant 1 % de cholestérol) pendant 16 semaines. De manière similaire mais avec un autre régime (60 % de l'énergie sous forme de lipides et contenant 0,03 % de cholestérol), l'étude de Rabot *et al.* (2010) montrent une augmentation de l'excrétion de cholestérol dans les selles chez des souris conventionnelles après 11 semaines de ce régime comparées au régime standard (Rabot *et al.* 2010). L'augmentation de cholestérol observée dans ces études et dans la notre s'explique probablement par le plus fort apport en cholestérol alimentaire de ces régimes.

L'augmentation de la cholestérolémie, des HDL et des LDL est cohérente avec plusieurs études utilisant des régimes riches en graisses similaires au nôtre (au moins 40 % de l'énergie totale du régime). En effet ces études montrent une augmentation de la cholestérolémie de 1,5 (Nie *et al.* 2017; Gangadaran & Cheema 2017) à 2 (Yang *et al.* 2017) fois plus sous ce genre de régime comparé à un régime standard chez des souris C57BL/6J conventionnelles. Ces résultats s'accompagnent d'une augmentation des LDL (Zheng *et al.* 2008; Nie *et al.* 2017). En revanche, les données sur les HDL varient d'une étude à l'autre avec dans une première un triplement des HDL (Zheng *et al.* 2008) et dans une seconde une diminution de la moitié (Nie *et al.* 2017) entre régime riche en graisse et régime contrôle. Presque toutes ces études montrent de plus une augmentation des triglycérides entre régime standard et régime riche en graisse même si celle-ci n'est pas toujours significative (Nie *et al.* 2017; Gangadaran & Cheema 2017; Yang *et al.* 2017). Seule, l'étude de Zheng *et al.* (2008) trouve une diminution (non significative) des TG. Les études utilisant exactement le même régime que le nôtre (Ssniff® E15749-34) sont souvent effectuées sur des souris C57BL/6J conventionnelles KO pour le récepteur au LDL ou pour l'ApoE. Dans ces cas, la cholestérolémie est toujours augmentée entre ce régime et le régime standard qui lui,

varie d'une étude à l'autre (Custodis et al. 2008; Chiba et al. 2008; Alikhani et al. 2014; Lichtman et al. 1999). Deux études rapportent les effets de ce régime riche en graisse sur des souris sauvages conventionnelles. La première indique une augmentation de la cholestérolémie couplée à une diminution des TG et des AG non estérifiés après 14 semaines de ce régime (Lohmann et al. 2009) alors que la seconde montre une augmentation de la cholestérolémie couplée à une augmentation des TG après 12 semaines de ce régime (Cui et al. 2015).

La diminution des TG observée dans notre étude pourrait s'expliquer par une plus forte sécrétion de ces composés dans les selles. Cependant, Choi *et al.* (2017) observent une faible quantité de TG (inférieure à 0,03 mM/g de fèces en moyenne) dans les selles de souris conventionnelles soumises à un régime riche en graisse (40 % de l'énergie sous forme de lipides et contenant 1 % de cholestérol) pendant 16 semaines (Choi et al. 2017). De plus, l'étude de Rabot *et al.* (2010) ne montre aucune différence significative dans le contenu en triglycérides fécaux entre des souris conventionnelles nourries avec un régime standard ou avec un régime riche en lipides (60 % de l'énergie sous forme de lipides et contenant 0,03 % de cholestérol) (Rabot et al. 2010). Pour vérifier cette hypothèse dans notre cas, nous pourrions refaire l'expérience en dosant ces composés dans les selles. Les triglycérides peuvent également être stockés dans le foie ou dans d'autres organes (paramètres non mesurés). Une observation allant dans ce sens est la présence d'une stéatose hépatique légère marquée par l'inclusion de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, signe d'une accumulation lipidique modérée dans le foie. De plus, nous observons une augmentation des transaminases Alat entre S0 et S11, signe de dommages hépatiques. Ces observations sont en cohérence avec les données retrouvées dans la littérature. En effet, un régime alimentaire dont l'énergie est apportée à 45 % sous forme de lipides, induit une stéatose hépatique plus ou moins sévère chez des souris conventionnelles C57BL6/J accompagnée d'une du cholestérol et de l'activité Alat dans le foie (Zheng et al. 2008).

Il faut également noter que les prélèvements sanguins en S0 et en S11 ont été effectués à des périodes différentes de la journée. En effet, le prélèvement en S0 a été fait le matin, en période d'absorption intestinale compte tenu de l'activité nocturne des rongeurs. Alors que le prélèvement en S11 a été effectué l'après-midi, après 4h de jeûne. En effet, le temps de jeûne a un impact sur les paramètres hépatique et plasmatique. Le jeûne de courte durée (entre 2 et 4 h) induit une augmentation de la cholestérolémie mais pas de modification dans les HDL (Champy et al. 2004). Le jeûne de longue (entre 48 et 72 h), moyenne (entre 4 et 16 h) ou courte (entre 0 et 6 h) durée induit une augmentation des triglycérides hépatiques (Hashimoto et al. 2000; Heijboer et al. 2005; Lin et al. 2005). Au contraire, il a tendance à induire une diminution des triglycérides plasmatiques entre 0, 48 et 72 h dans l'étude de Hashimoto *et al.* (2000) et entre 2 et 4 h passant de $1,09 \pm 0,02$ à $0,90 \pm 0,02$ mmol/L dans l'étude de Champy *et al.* (2004) (Hashimoto et al. 2000; Champy et al. 2004). Dans cette dernière étude, l'activité Alat est

diminuée entre 2 et 4 h mais pas de manière significative (Champy et al. 2004). Ceci pourrait en parti expliquer la diminution des triglycérides entre S0 et S11 mais ces études ne comparent pas les effets entre 0 et 4 h (nos conditions) et des essais supplémentaires sur l'impact de la durée du jeûne dans nos conditions expérimentales seraient nécessaires pour le démontrer.

En résumé, les observations faites sur la cholestérolémie sont cohérentes avec les données de la littérature exceptée pour les HDL dont la tendance à augmenter ou à diminuer n'est pas claire en fonction des études. En revanche, la diminution des triglycérides est plus complexe à expliquer. Les différences observées entre les études précitées et entre ces études et la nôtre peuvent d'une part s'expliquer par le fait que nous effectuons nos prélèvements entre deux points temporels sur le même groupe de souris alors que ces études comparent souvent deux groupes de souris, l'un soumis à un régime standard, l'autre soumis à un régime riche en graisses et en cholestérol (plus ou moins proche du nôtre). D'autre part, les différences observées peuvent également en partie s'expliquer par le point de comparaison choisi. En effet, en fonction du régime standard utilisé comme contrôle, les différences observées peuvent varier. Pour étudier l'effet précis de ce régime nous pourrions donc effectuer un groupe de souris témoin avec un régime standard pendant 11 semaines pour comparer les paramètres plasmatiques, histologiques et les dosages sur les selles avec nos données récoltées en régime riche en graisses et en cholestérol.

Les souris monocolonisées se distinguent des souris conventionnalisées

Après 11 semaines de régime riche en cholestérol, le poids, le gain de poids et l'efficacité alimentaire sont similaires entre les souris monocolonisées et conventionnalisées. La tentative de monocolonisation par *E. coprostanoligenes* chez des souris axéniques s'est avérée infructueuse (Li et al. 1998) compliquant la possibilité de faire des rapprochements. Cependant, Eyssen et Parmentier (1974) réussissent à inoculer la souche *Eubacterium* 21 408 à des rats axéniques en co-inoculation avec *Clostridium* CI-8. Ceux-ci ont un poids similaire aux rats monocolonisés avec *Clostridium* CI-8 et aux rats conventionnels (Eyssen & Parmentier 1974). De plus ces auteurs ne trouvent pas de différence significative sur le poids du foie (Eyssen & Parmentier 1974), alors que nos résultats indiquent une tendance du ratio poids foie/poids total à être plus faible chez les monocolonisées comparées aux conventionnalisées. Au vue de la difficulté à trouver ce type d'information dans la littérature sur la comparaison souris monocolonisées avec une souche de *Bacteroides* et conventionnalisées, nous recherchons des informations dans la comparaison de souris axéniques et conventionnelles. Rabot *et al.* (2010), trouvent un foie et un pancréas plus légers chez les axéniques comparées aux conventionnelles et un caecum plus lourd après 11 semaines de régime riche en graisses (60 % de l'énergie sous

forme de lipides et contenant 0,03 % de cholestérol) (Rabot et al. 2010). Malgré nos conditions expérimentales différentes, nos résultats montrent un ratio poids pancréas/poids total plus faible chez les monocolonisées comparativement aux conventionnalisées et un ratio poids caecum/poids total (idem pour caecum vide et contenu caecal) plus élevé chez ces dernières comparativement aux premières. Ces résultats peuvent faire penser que nos souris monocolonisées ont un phénotype sur les poids des organes après un régime riche en graisse plus proche des souris axéniques que des souris conventionnelles. Cependant, dans l'étude de Rabot *et al.* (2010) ces différences de poids sur les organes sont associées à une différence de poids total avec des souris axéniques plus légères que les souris conventionnelles (Rabot et al. 2010). Ce n'est pas le cas de notre étude qui ne montre de plus, aucune différence sur le tissu adipeux, ni en terme de poids ni en termes de taille et de forme des adipocytes entre les trois groupes de souris. Ceci peut signifier que dans notre cas, le poids du caecum suffit à compenser la légèreté du pancréas et du foie, ou bien que d'autres organes comme les muscles ou les os (non mesurés dans notre étude), rapportés comme étant plus lourds chez les souris axéniques (Sjögren et al. 2012), le soient aussi dans nos conditions de monocolonisation.

Les profils de production de coprostanol entre conventionnalisées et monocolonisées sont différents. En effet, les premières présentent une production basale en régime standard indiquant la capacité du microbiote commensal à produire du coprostanol et donc la présence de bactéries coprostanoligènes dans le microbiote « standard » des souris C57BL/6J. Ces résultats non rapportés dans la littérature pour les souris, l'ont été pour les rats (Eyssen & Parmentier 1974) et d'autres mammifères (tableau 2). La production de coprostanol par les souris monocolonisées est induite par le régime riche en cholestérol ce qui n'est pas le cas des souris conventionnalisées. Les rats axéniques co-colonisés avec *Eubacterium* 21 408 et *Clostridium* CI-8 ont une augmentation de la production de coprostanol dans les selles comparativement aux rats conventionnels, l'apport en cholestérol du régime n'est pas spécifié (Eyssen & Parmentier 1974). Même si *E. coprostanolignes* ne parvient pas à coloniser le tractus de souris axéniques dans les conditions de Li *et al.* (1998), les auteurs observent une augmentation de coprostanol dans les selles pendant la semaine de gavage des souris avec la souche. Cependant, ces souris sont nourries avec un régime sans cholestérol (Li et al. 1998). D'après ces résultats, *E. coprostanoligenes* se contente du cholestérol synthétisé par la souris et relargué par la voie hépatobiliaire et/ou du cholestérol des cellules épithéliales (membranes) pour produire du coprostanol dans ces conditions. Cependant, nos souches sont sensibles à la présence de cholestérol alimentaire et le niveau de production de coprostanol n'est pas liée à la quantité de bactéries présentes. Il est possible que *B. dorei* et *P. distasonis* mettent en place cette activité si et seulement si la quantité de cholestérol dans l'environnement atteint une certaine concentration.

Bien que la quantité de cholestérol dans les selles soit corrélée à celle du coprostanol, la nature positive de cette corrélation est surprenante, le premier étant l'unique substrat connu du second. En fait, la consommation du cholestérol pour effectuer cette transformation ne fait pas diminuer le cholestérol dans les selles. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux rapportés par Eyssen et Parmentier (1974) sur les rats co-colonisés avec *Eubacterium* 21 408 et *Clostridium* CI-8. En effet, bien que la production de coprostanol chez ces rats soit supérieure à celles des rats conventionnels, la quantité de stérols totaux retrouvés dans les selles est inférieure. Cette activité ne semble donc pas suffisante pour impacter de manière significative le contenu en stérols des selles.

Finalement, après 11 semaines de régime riche en cholestérol et en lipides, les quantités de cholestérol et de coprostanol dans les selles sont similaires pour les trois groupes de souris. De plus, dans les trois cas, le coprostanol n'est pas corrélé (corrélation neutre) avec la cholestérolémie contrairement à notre hypothèse d'étude et aux observations de Sekimoto *et al.* (1983) (Sekimoto *et al.* 1983). La production de coprostanol n'a donc pas d'effet sur la cholestérolémie dans nos conditions expérimentales. Eyssen et Parmentier (1974) observent une cholestérolémie supérieure sur leurs rats gnotobiotiques co-inoculés avec *Eubacterium* 21 408 et *Clostridium* CI-8 comparativement aux conventionnels alors qu'ils sécrètent plus de coprostanol. En fait, la cholestérolémie de ces rats gnotobiotiques est similaire aux rats axéniques et aux rats monocolonisés avec *Clostridium* CI-8, les deux groupes ne produisant pas de coprostanol (Eyssen & Parmentier 1974). Li *et al.* (1998) montre une diminution de la cholestérolémie transitoire entre la fin et le début de l'inoculation de *E. coprostanoligenes* sur des souris axéniques mono-inoculées (Li *et al.* 1998).

De plus, le cholestérol dans les selles est corrélé positivement à la cholestérolémie. Ce résultat est étonnant au regard du profil d'expression des gènes dans le foie et dans l'iléon. En effet, ces organes surexpriment des gènes impliqués dans le TICE (Abcg8, Lxr dans l'iléon) et dans le transport réverse du cholestérol via la formation de HDL (Srb1 dans le foie et Abca1 et Lxr dans l'iléon) des organes vers le foie puis vers les selles chez les souris monocolonisées comparativement aux souris conventionnalisées (figures 69, 70 et 72, 73). Or, il n'y a pas de différence dans la quantité de cholestérol excrété ni dans la teneur en HDL plasmatique. Cette excrétion supérieure supposée mais non retrouvée dans les selles pourrait s'expliquer par une compensation dans l'absorption. Si les monocolonisées absorbent et excrètent plus de cholestérol, le bilan final serait le même que les conventionnalisées qui absorberaient et excrèteraient moins de cholestérol. Cependant, nous ne mesurons pas de différence dans l'expression du gène *Npc111*, transporteur du cholestérol au niveau intestinal entre les trois groupes de souris. Les différences dans les profils d'expression n'ont donc pas d'effet phénotypique sur les paramètres mesurés par notre étude.

Les souris monocolonisées et conventionnalisées présentent des différences dans leurs niveaux plasmatiques en TG et en AGNE en S0. En S0, en régime standard, les souris monocolonisées ont des taux de TG plasmatiques significativement supérieurs à ceux des souris conventionnalisées. Au regard de la difficulté de trouver des comparaisons sur les paramètres lipidiques plasmatiques entre souris monocolonisées et conventionnalisées dans la littérature, nous pouvons trouver des informations, incomplètes, dans les comparaisons entre souris axéniques et conventionnelles. Bäckhed *et al.* (2007) montrent des taux plasmatiques de triglycérides et d'AG non esterifiés supérieurs chez les souris axéniques comparées aux souris conventionnelles en régime pauvre en graisse (proche de notre régime standard), leurs résultats n'étant que des tendances et n'étant pas significatifs ($p=0,19$ pour les triglycérides et $p=0,6$ pour les AG non esterifiés) (Bäckhed *et al.* 2007). Les différences observées pourraient s'expliquer par une plus forte sécrétion fécale de TG et AGNE (paramètres non mesurés). En effet, un régime riche en graisse induit une augmentation de l'excrétion des AG non esterifiés dans les selles chez les souris conventionnelles comparativement à un régime standard (Rabot *et al.* 2010). Il est également possible que les conventionnelles stockent les TG dans les tissus comparativement aux monocolonisées, cependant nous n'avons pas observé de différences histologiques dans le foie et le tissu adipeux. Cependant, pour vérifier cette hypothèse de manière plus précise, nous pourrions effectuer des dosages de TG, AGNE et cholestérol dans ces tissus. Enfin, l'ACP montre une corrélation négative entre la quantité de coprostanol dans les selles et les niveaux plasmatiques de TG et AGNE. Cependant, les concentrations de ces trois composés sont les mêmes en S11 pour les trois groupes de souris. De plus, TG et AGNE n'ont pas été rapportés dans la littérature comme substrat ou co-facteur de la production de coprostanol. La détection de cette corrélation montre les limites des analyses en ACP et la nécessité de revenir aux données brutes pour une meilleure compréhension des résultats et tendances observées. En effet, cette corrélation apparaît car en S0 les souris conventionnalisées ont significativement plus de coprostanol dans les selles et moins de TG et AGNE dans le plasma ce qui tire les axes de l'ACP et explique cette corrélation qui ne trouve pas d'explication biologique.

Nous observons des différences dans les concentrations et la composition en acides biliaires de la bile et des selles entre souris conventionnalisées et monocolonisées.

La bile des animaux conventionnalisés présente moins d'AB totaux que celle des animaux conventionnalisées. Dans les deux cas, les ABI dominant mais la présence d'ABII est détectée dans la bile des souris conventionnalisées contrairement aux souris monocolonisées (figures 60 et 61). L'étude de Sayin *et al.* (2013) sur des souris C57BL/6J en régime standard montre des teneurs supérieures en AB totaux dans la bile des souris axéniques comparées aux conventionnelles. De plus, les tendances observées dans notre étude sont également retrouvées avec une dominance des AB tauroconjugués et en particulier TCA et TMCA chez les deux types

de souris (Sayin et al. 2013). La présence d'ABII n'est reportée que dans la bile des animaux conventionnels comparés aux axéniques (Sayin et al. 2013), suggérant d'après nos résultats, que nos souches ne produisent pas ou peu d'ABII ou que ceux-ci ne sont pas réabsorbés par la voie hépatobiliaire, ce qui est confirmé par le dosage dans les selles.

En effet, bien que les selles des souris monocolonisées soient dominées par les ABI, nous observons des traces d'AB déconjugés : MCAb, CA, CDCA et UDCA et d'AB transformés comme DCA et MCAw (figures 64 B et C) non présents initialement dans la bile (figure 61B). Ces résultats suggèrent que *B. dorei* et *P. distasonis* sont capables de déconjuguer certains AB et en particulier TMCA, TUDCA, TCDCA et TCA. Ce résultat est important car bien que les BSH, enzymes responsables de la déconjugaison (voir paragraphe 2.3.2.1 de ce manuscrit), soient largement représentées au sein du microbiote intestinal et présentes en particulier chez les *Bacteroidetes* (Jones et al. 2008), la monocolonisation de souris C3H/HeN axéniques par *B. thetaiotaomicron* ne montre pas un tel profil d'AB dans les selles (Hoffmann et al. 2016). De plus cette étude ne montre aucune déconjugaison ni transformation des AB dans les selles des souris monocolonisées avec les bactéries *E. coli*, *Ruminococcus gnavus* et *R. intestinalis* (Hoffmann et al. 2016). Nos résultats suggèrent également que *B. dorei* et *P. distasonis* sont capables de transformer CA en DCA (7 α -déhydroxylation) et MCAb en MCAw (6 β -épimérisation). La première réaction est quantitativement la plus présente chez l'humain (Hamilton et al. 2007) et importante chez la souris puisque le DCA est l'AB majoritaire dans les selles de nos souris conventionnalisées, ce qui est aussi le cas des souris conventionnelles de l'étude de Sayin *et al.* (2013) (Sayin et al. 2013). De manière intéressante, cette réaction n'a été décrite jusqu'à présent que dans les genres *Clostridium* et *Eubacterium*, appartenant au phylum des *Firmicutes* (Ridlon et al. 2006; Ridlon et al. 2014). La seconde réaction transformant MCAb en MCAw est une 6 β -épimérisation (Eyssen et al. 1983). Le MCAw est le second AB majoritaire dans les selles de nos souris conventionnalisées et une fois de plus en accord avec les résultats obtenus par l'étude de Sayin *et al.* (2013) (Sayin et al. 2013). Cette activité est en fait le résultat d'une oxydation du groupement 6 β -OH du MCAb puis de l'épimérisation du groupe 6-oxo formé en 6 α -OH formant le MCAw. Ces réactions ont pour l'instant été décrites indépendamment chez des micro-organismes différents *in vitro* et *in vivo* chez des rats gnotobiotiques. La première réaction chez une souche de *E. lentum* et la seconde chez deux souches de *Fusobacterium* sp. (Eyssen et al. 1983). Ce genre de réactions peuvent également s'effectuer sur les carbones 3, 7 et 12 des AB (voir paragraphe 2.3.2.2 de ce manuscrit), réaction portée par plusieurs genres et notamment les *Bacteroidetes* (Lepercq et al., 2004a ; Lepercq et al., 2004b). Compte tenue de la faible teneur en CA, CDCA et DCA et des données de la littérature, il est également possible que leur présence dans les selles des souris monocolonisées soit un artéfact. En revanche, la présence de MCAw est avérée et pose la question de la capacité des souches à réaliser l'ensemble des réactions

nécessaires : déconjugaison (MCAB présent dans la bile mais possibilité de déconjuguer TMCA), oxydation et épimérisation alors que l'expérience de Eyssen *et al.* (1983) nécessite au moins deux souches (Eyssen *et al.* 1983).

Enfin, les souris monocolonisées ont plus d'AB totaux que les souris conventionnalisées alors que l'étude de Sayin *et al.* (2013) montre la configuration inverse, pour des souris axéniques comparées à des souris conventionnelles (Sayin *et al.* 2013). Cependant, l'étude de Hoffman montre que les souris C3H/HeN axéniques monocolonisées avec *E. coli* ont également plus d'AB totaux comparativement aux conventionnelles. Or, ce n'est le cas pour aucune autre souche testée dans cette étude (*B. thetaiotaomicron*, *Ruminococcus gnavus* et *R. intestinalis*) (Hoffmann *et al.* 2016). Ces résultats ainsi que les nôtres montrent les différences de phénotypes autour des acides biliaires en fonction des souches considérées et suggèrent une plus forte synthèse des ABI ou une moindre efficacité de la voie hépatobiliaire.

Nous observons de plus une surexpression de Reg3g dans l'intestin accompagnée d'une augmentation des granulocytes des cellules de Paneths significativement supérieure chez les souris conventionnalisées comparées aux souris monocolonisées (figures 67 et 72). Une plus faible expression de Reg3g au niveau iléal est observée de manière similaire chez des souris monocolonisées avec *B. thetaiotaomicron* comparativement à des souris conventionnelles (Cash *et al.* 2006). L'induction d'une sous-expression de Reg3g chez la souris pourrait donc être une propriété partagée par les genres *Bacteroides* et *Parabacteroides*, par les Gram négatives ou par toutes les bactéries en condition de monocolonisation. Cependant, cette même étude montre également une diminution du niveau d'expression de Reg3g chez des souris monocolonisées avec *Listeria innocua*, bactérie Gram positive, comparativement à des conventionnelles (Cash *et al.* 2006). En fait, Reg3g est un peptide antimicrobien dirigé contre les bactéries Gram positives. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas de contrôle axénique ni de contrôle avec des souris monocolonisées avec une bactérie Gram positive, ce qui serait à faire si nous refaisions l'expérience.

Les souches *B. dorei* et *P. distasonis* ont des effets différents

Avant de discuter des résultats obtenus dans notre étude, il faut noter que *Parabacteroides distasonis* est en fait un reclassement de la souche *Bacteroides distasonis* datant de 2006 (Sakamoto & Benno 2006). Avant cela, elle appartenait au genre *Bacteroides*. *P. distasonis* et *B. dorei* sont donc phénotypiquement très proches mais les *Parabacteroides* se rapprochent phylogénétiquement (ARNr 16S) de *Tannerella forsythensis*, une autre souche à l'origine classée dans le genre *Bacteroides* et reclassée en 2002. La principale différence entre les genres *Parabacteroides* et *Bacteroides* se trouve dans la composition en ménaquinones (vitamines K₂). Le premier genre est dominé par les ménaquinones MK-9 et MK-10 alors que le

second est dominé par les ménaquinones MK-10 et MK-11 (Sakamoto & Benno 2006). *P. distasonis* et *B. dorei* sont donc deux souches très proches taxonomiquement parlant mais dans notre étude, elles ont des effets différents *in vivo*.

A commencer par la production de notre composé d'intérêt, le coprostanol. Les souris monocolonisées avec *P. distasonis* produisent significativement plus de coprostanol que les souris monocolonisées avec *B. dorei* (et que les souris conventionnalisées) après une semaine de régime riche en cholestérol et en lipides. Ces résultats suggèrent une meilleure efficacité de la voie de conversion du cholestérol en coprostanol chez la première souche comparativement à la seconde et pose la question du métabolisme utilisé (direct, indirect ou autre). *B. dorei* étant très proche de *Bacteroides* sp. D8 (similitude du gène de l'ARNr 16S > 99,5 %) (Gérard et al. 2007) et puisque nous n'observons pas de différences concluantes entre les génomes de ces deux espèces, nous pouvons supposer que *B. dorei* utilise une voie de conversion indirecte comme démontré pour *Bacteroides* sp. D8 (Gérard et al. 2007). Il est plus délicat de faire le même type d'hypothèses pour *P. distasonis*. Cependant, indépendamment de la voie utilisée, elle semble plus efficace que celle de *B. dorei* au début de l'introduction du régime riche en cholestérol. A la fin de l'expérimentation il n'y a pas de différence entre les deux souches. La voie utilisée par *P. distasonis* serait donc plus réactive à la présence d'une forte concentration en cholestérol que celle utilisée par *B. dorei*.

Les souris colonisées avec *P. distasonis* ont également une prise alimentaire diminuée comparativement aux souris colonisées avec *B. dorei* (et comparativement aux conventionnalisées). Ce paramètre n'est pourtant pas corrélé avec une diminution de poids ni une augmentation de l'efficacité alimentaire. Nous avons amené plusieurs hypothèses pour expliquer cette diminution de prise alimentaire : activité locomotrice différente ou production de composés ayant un effet satiétogène. Nous n'avons pas mesuré la première dans notre expérience, cependant, une première étude montre une VO_2 synonyme de la dépense énergétique, augmentée chez les souris conventionnelles et conventionnalisées par rapport aux souris axéniques en régime standard (Bäckhed et al. 2004). En régime riche en graisse pourtant, une seconde étude réalisée par la même équipe montre le résultat inverse avec une diminution de l'activité locomotrice chez des souris conventionnalisées comparées à des souris axéniques (Bäckhed et al. 2007). De plus, en 2011, Neufeld *et al.* ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les souris axéniques et les souris SPF dans la locomotion (Neufeld et al. 2011). Ces divers résultats ne permettent donc pas de conclure sur notre hypothèse, d'autant plus qu'ils sont obtenus en comparant souris conventionnalisées ou conventionnelles et souris axéniques et non avec des souris monocolonisées. La différence de la prise alimentaire peut également être due à une différence dans la production de composés directement satiétogène et/ou induisant la production d'hormones satiétogènes par l'hôte. L'accumulation de données sur la possibilité

des bactéries à produire ce type de composés a amené les scientifiques à repenser la manière dont était contrôlé l'appétit chez les animaux et en particulier l'Homme. Une liste de ces composés et leurs effets sur l'hôte sont résumés dans l'étude de Fetissov (2017) (Fetissov 2017). Celle-ci intègre les composés bactériens, différents en fonction de la phase de croissance des bactéries (phase exponentielle ou stationnaire) dans le schéma global du contrôle de l'appétit. Ces composés vont venir agir sur la production des hormones de l'hôte (en particulier GLP1 et PYY) ou agir directement sur les centres nerveux impliqués dans la régulation de l'appétit comme ClpB (Caseinolytic peptidase B) (Fetissov 2017). En particulier, la diminution de la prise alimentaire a été reliée à une forte production d'AGCC dans les selles (Lin et al. 2012; Frost et al. 2014). Cependant, celle-ci est habituellement accompagnée d'une baisse de poids alors que le poids moyen des souris monocolonisées avec *P. distasonis* ($31,20 \pm 2,88$ g) se situe entre les souris monocolonisées avec *B. dorei* et les souris conventionnalisées ($33,03 \pm 2,20$ et $30,46 \pm 3,08$ g respectivement), figure 51B. Il aurait fallu doser les AGCCs dans les selles pour pouvoir affirmer ou infirmer cette hypothèse. Il est difficile d'attribuer cette fonction au coprostanol puisque sa quantité ne diffère pas entre les trois groupes de souris dans les dernières semaines de l'expérimentation.

Le métabolisme lipidique et en particulier le métabolisme du cholestérol semble différent entre les deux groupes de souris monocolonisées en régime standard. Les TG plasmatiques sont moins élevés pour les souris colonisées avec *P. distasonis* comparativement aux souris colonisées avec *B. dorei*. Les hypothèses énoncées dans la section précédente pour expliquer les différences entre les souris conventionnalisées et monocolonisées peuvent être reprises ici. Ce résultat souligne que toutes les bactéries n'ont pas les mêmes effets sur l'hôte.

Les souris monocolonisées avec *P. distasonis* présentent une cholestérolémie et un taux de LDL réduit par rapport aux souris conventionnalisées alors que les souris colonisées avec *B. dorei* ont un phénotype intermédiaire sur ces deux paramètres. Cette propriété n'a pas été rapportée pour la souche *P. distasonis*. En revanche, chez l'Homme, cette souche a été associée positivement (Verdam et al. 2013; Haro, Montes-Borrego, et al. 2016; Haro, Garcia-Carpintero, et al. 2016) ou négativement (C. M. Chiu et al. 2014; Kuang et al. 2017) à des paramètres liés à l'obésité et au syndrome métabolique. Ces études établissent des associations entre abondance de la souche et maladies mais ne spéculent pas quant aux mécanismes sous-tendants. La différence de la cholestérolémie observée dans notre étude pourrait s'expliquer par une moindre synthèse dans le foie, corroborée par la diminution des LDL mais nous n'avons pas noté de différence dans l'expression des gènes impliqués dans ces mécanismes (HmgcoAr, ApoB ou Mttp). Le cholestérol pourrait également être éliminé plus efficacement dans la bile mais contrairement aux souris colonisées avec *B. dorei*, nous n'observons pas de surexpression du gène *Abcg5* dans le foie, toutefois nous n'avons pas dosé le cholestérol dans la bile. De plus, la

quantité de cholestérol fécal est la même pour tous les groupes. Compte tenu de ces résultats et de ceux présentés dans la section précédente concernant le TICE et le transport reverse de cholestérol, la différence de cholestérolémie ne s'explique pas par une plus forte excrétion du cholestérol.

Ceci est d'autant plus cohérent que les souris colonisées avec *B. dorei* bien que surexprimant plus de gènes impliqués dans ces mécanismes que les souris colonisées avec *P. distasonis*, ne présentent pas de différence sur leur cholestérolémie avec les souris conventionnalisées.

Il est intéressant de noter ici que la seule différence significative dans l'expression des gènes entre les deux groupes de souris monocolonisées, se retrouve sur l'expression du gène *Abca1* dans l'iléon. Il est surexprimé chez les souris colonisées avec *B. dorei* comparativement à celles colonisées avec *P. distasonis*. Ce gène code pour une protéine impliquée dans le transport reverse du cholestérol des organes vers le foie *via* la formation de HDL et en collaboration avec l'apolipoprotéine A1 codée par le gène *Apoa1*. Celui-ci est également surexprimé chez les souris colonisées avec *B. dorei* comparativement aux conventionnalisées mais pas aux souris colonisées avec *P. distasonis*. L'expression d'*Abca1* est régulée par le récepteur *Lxr* (Chawla et al. 2001; Joseph et al. 2002; Ogata et al. 2009) dont le gène est également surexprimé chez nos souris monocolonisées comparativement aux souris conventionnalisées. *Abca1* est surtout exprimé dans les macrophages et est impliqué dans le développement de l'athérosclérose par son action sur le cholestérol mais aussi par son rôle dans l'apoptose et l'inflammation (Soumian et al. 2005; Yvan-charvet et al. 2011). Son rôle au niveau intestinal est plus discuté (Oram 2002). En plus de participer à la formation des HDL, il pourrait également avoir un rôle dans l'absorption du cholestérol. En effet, des souris C57BL6 conventionnelles KO pour ce gène présentent une augmentation de 62 % de l'absorption du cholestérol (McNeish et al. 2000). Ces études tâtonnent à expliciter le rôle de cette protéine mais sa surexpression chez les souris colonisées avec *B. dorei* ne s'accompagne pas d'une modification de la cholestérolémie dans nos conditions.

La différence de cholestérolémie entre les souris colonisées avec *P. distasonis* et les souris conventionnalisées pourrait aussi s'expliquer par une plus forte excrétion sous forme d'AB cohérente avec la présence de plus d'AB totaux dans la bile. Cependant, nous n'observons pas de surexpression du gène *Cyp7a1* dans le foie, contrairement aux souris monocolonisées avec *B. dorei*. Ces dernières présentent pourtant les mêmes concentrations en AB totaux que les souris colonisées avec *P. distasonis* et une cholestérolémie intermédiaire entre souris conventionnalisées et colonisées avec *P. distasonis*.

La différence d'effet sur la cholestérolémie entre les souches *B. dorei* et *P. distasonis* pourrait se trouver dans le ratio ABI/ABII dans les selles des souris colonisées avec ces souches.

Il est supérieur chez les souris colonisées avec *B. dorei* comparativement aux souris colonisées avec *P. distasonis*. Ceci montre une différence sur les capacités de transformation des AB par les souches cohérente avec un profil d'ABII et déconjugués légèrement différent entre les deux souches. En effet, les selles des souris colonisées avec *P. distasonis* présentent plus d'UDCA et de CDCA que les souris conventionnalisées (ce n'est pas le cas de souris monocolonisées avec *B. dorei*) et plus de CA et de CDCA que les souris monocolonisées avec *B. dorei*. Il semblerait donc que *P. distasonis* ait plus de BSH ou des BSH différentes de celles de *B. dorei* permettant une déconjugaison plus efficace des AB TCA et TCDCA. Cependant, ce mécanisme ne peut expliquer la différence de cholestérolémie puisque les conventionnalisées ont plus d'ABII dont les AB déconjugués que les monocolonisées.

En revanche, des analyses préliminaires couplant les données des AB sur les selles et les paramètres plasmatiques tendent à mettre en évidence une corrélation négative entre la cholestérolémie et la concentration d'UDCA dans les selles (données non présentées ici, en cours d'analyse). En fait, cet AB est déjà utilisé pour le traitement de plusieurs maladies chez l'Homme et en particulier dans les calculs biliaires et les maladies cholestatiques du foie (Ikegami & Matsuzaki 2008). De plus, l'étude de Poupon *et al.* (1993) montre que chez certains de ces patients, l'administration d'UDCA réduit la cholestérolémie, le taux de LDL mais ne fait pas varier les taux de HDL (Poupon *et al.* 1993). Il se pourrait donc que les effets observés sur la cholestérolémie soient dus à cet AB.

Il se peut également que la diminution significative de la prise alimentaire explique tout simplement cette différence. Ceci peut induire une moindre concentration en cholestérol dans la lumière intestinale et donc réduire la quantité de cholestérol absorbée sans pour autant modifier le taux d'expression du gène codant pour le transporteur du cholestérol au niveau intestinal (*Npc1l1*). Pourtant la quantité de cholestérol dans les selles ne reflétant pas exactement la quantité de cholestérol au niveau de la lumière intestinale, est la même entre les trois groupes de souris.

De manière intéressante, une étude datant de 2015 montre que le surnageant de *B. dorei* est capable d'induire l'activité du récepteur FXR *in vitro* sur une lignée de cellules reportrices construite par les auteurs (Xianqin Zhang *et al.* 2015). Le récepteur FXR est impliqué dans la régulation intracellulaire des niveaux d'AB dans le foie et l'intestin (Thomas *et al.* 2010) et a notamment pour gènes cibles *Cyp7a1* et plusieurs transporteurs des AB. Les essais *in vitro* indiquent une stimulation de l'activité FXR mais pas une trans-activation de tous ses gènes cibles (Xianqin Zhang *et al.* 2015). Zhang *et al.* (2015) testent également cette activité *in vivo* sur des souris C57BL/6J conventionnelles gavées quotidiennement avec le surnageant de *B. dorei* et soumises à un régime riche en graisse pendant 10 semaines. Ils obtiennent alors des souris plus

légères que les conventionnelles sous le même régime et un foie plus léger (Xianqin Zhang et al. 2015). Nos résultats montrent quant à eux un ratio poids foie/poids corporel plus léger pour les souris colonisées avec *B. dorei* comparativement aux conventionnalisées. Nous retrouvons également des ratios pancréas/poids corporel et cœur/poids corporel diminués alors que le groupe de souris colonisées avec *B. dorei* est le groupe le plus lourd (non significatif) posant la question de l'origine de ces différences. Comme expliqué dans la section précédente, il est possible que le poids d'autres organes et notamment le caecum, les muscles ou les os compensent ces différences. La cholestérolémie et la triglycéridémie des souris de l'étude de Zhang *et al.* (2015) ne sont pas modifiées par le traitement au surnageant de *B. dorei*, en revanche, ils remarquent une diminution des transaminases Alat et Asat (Xianqin Zhang et al. 2015). Nos résultats, bien qu'obtenus avec des traitements différents (souris axéniques et bactéries entières) montrent une diminution des transaminases Alat comparativement aux deux autres groupes de souris ; cette diminution est significative seulement en comparaison avec le groupe de souris colonisées avec *P. distasonis*. Ils montrent également une surexpression de Cyp7a1 dans le foie mais pas de différence dans l'expression de Fxr et du transporteur iléal Ibat alors que l'étude de Zhang *et al.* (2015) montre une surexpression des trois significative seulement pour Fxr et Ibat (Xianqin Zhang et al. 2015). Les mêmes tests réalisés avec des bactéries vivantes (le protocole ne détaille ni la quantité ni le temps ni le mode d'administration de la bactérie) ne montrent aucune différence sur le poids total, le poids des organes et les paramètres plasmatiques. Le gène Fxr est surexprimé au niveau iléal mais ses gènes cibles ne le sont pas ni au niveau iléal ni au niveau hépatique (Xianqin Zhang et al. 2015).

Les souris monocolonisées avec *P. distasonis* sous-expriment les gènes Tnfa et IL1b, marqueurs de l'inflammation comparativement aux souris conventionnalisées (figure 72). Les souris monocolonisées ne sont pas des souris axéniques, toutefois, Chiu *et al.* (2014) n'observent pas de différence significative sur l'expression du gène Tnfa dans le côlon entre des souris C57BL/6JNarl axéniques et celles monocolonisées avec une souche de *Bacteroides fragilis* (C. C. Chiu et al. 2014). De plus, Rabot *et al.* (2010) trouvent des niveaux de TNF α et IL-1 β plasmatiques inférieurs (significatif seulement pour TNF α) chez des souris axéniques comparées à des souris conventionnelles soumises à un régime riche en graisse (Rabot et al. 2010). Nous n'avons pas mesuré la concentration de ces cytokines pro-inflammatoires dans le plasma de nos souris mais l'ensemble de ces résultats tendent à montrer que les souris monocolonisées avec *P. distasonis* ont un phénotype plus proche des axéniques que celles monocolonisées avec *B. dorei* ou bien que la première souche exprime des effets plus protecteurs vis-à-vis de l'inflammation comparativement à la seconde. Pour soutenir cette hypothèse, plusieurs études reconnaissent des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* chez cette souche. *In vitro*, tout d'abord, sa fraction membranaire diminue la production de TNF α dans les macrophages (Kverka et al.

2011). Cependant, l'étude de Lakhdari *et al.* (2011) montre qu'elle pourrait induire la voie NF- κ B dans des cellules reproductrices Caco-2 mais pas dans les cellules HT-29, cette induction restant très inférieure à celle obtenue avec IL-1 β et TNF α (Lakhdari *et al.* 2011). *In vivo*, sa fraction membranaire diminue la sévérité des lésions intestinales de souris BALB/c traitées au DSS (Kverka *et al.* 2011). De plus, elle serait impliquée dans « l'éducation » du système immunitaire murin en incitant la différenciation des cellules T régulatrices au niveau du côlon (Lathrop *et al.* 2011). Elle montre également une stimulation des cellules T régulatrices chez la souris et des lymphocytes T anti-inflammatoires produisant IL-10 chez l'humain (Cekanaviciute *et al.* 2017). *P. distasonis* est sous-représentée dans les tissus inflammés provenant de biopsies de patients atteints de MICI (Zitomersky *et al.* 2013). Il semblerait donc que *P. distasonis* ait des propriétés anti-inflammatoires. Cependant, les mécanismes associés ne sont pas encore connus. Nos résultats montrent une surproduction de l'AB UDCA dans les selles de souris monocolonisées avec cette souche. Or cet AB est reporté comme ayant un effet protecteur sur la colite induite au DSS chez des souris C57BL/6J en régime standard (Van den Bossche *et al.* 2017). Chez l'Homme, le traitement longue durée (plusieurs années) à l'UDCA a été associé à une diminution du taux de réapparition des adénomes colorectaux chez des patients avec un passé de cholangite biliaire primitive (maladie chronique inflammatoire induisant la destruction du canal biliaire et le relargage des produits destinés à la bile directement dans le foie) (Serfaty *et al.* 2003) et une diminution de la prévalence de néoplasies au niveau du côlon chez des patients atteints de colite ulcéreuse (Tung *et al.* 2001) et de cholangite sclérosante primitive (maladie inflammatoire rare touchant les voies biliaires et souvent associée à une MICI) (Pardi *et al.* 2003).

Pour conclure,

Notre stratégie d'isolement nous a permis d'isoler et d'identifier 22 nouvelles souches productrices de coprostanol. Elles pourront être analysées plus précisément pour leur cinétique de production de coprostanol et sont déjà actuellement criblées pour d'autres activités (BSH notamment). Nous avons identifié 55 clones à partir du criblage fonctionnel de deux banques génomiques. Ils devront être confirmés avant d'être analysés en détail dans le but d'identifier les gènes bactériens responsables de l'activité de conversion du cholestérol en coprostanol. Enfin, nos études *in vivo* ont montré que i) toutes les souches coprostanoligènes colonisent le TGI de la souris, ii) la bactérie *B. dorei* produit du coprostanol *in vivo*, iii) le coprostanol ne semble pas avoir d'effet sur la cholestérolémie et la physiologie de l'hôte et iv) la souche *P. distasonis* diminue la cholestérolémie selon un mécanisme encore inconnu.

Les MCVs, principales causes de décès dans le monde représentent un vrai challenge à traiter du fait de la multitude de pathologies pouvant les induire (obésité, hypertension,

diabète, etc.). Le contrôle de la cholestérolémie est un point clé pour moduler l'incidence de ces maladies. Cette étude montre la difficulté de relier une activité particulière du microbiote intestinal à un phénotype chez l'hôte et vice versa : un phénotype particulier chez l'hôte à un mécanisme ou une activité d'une seule bactérie. Le bond en avant technologique permis par le séquençage haut-débit autorise l'étude de l'écosystème intestinal en termes de présence/absence, sous-abondance/surabondance de bactéries particulières ou de voies métaboliques théoriques ou non. Cependant, notre étude ainsi que la littérature développée dans ce manuscrit montrent l'utilité de la vérification de ces observations par des approches plus traditionnelles de la microbiologie et des expérimentations *in vivo*. Enfin, le microbiote intestinal ayant co-évolué avec l'être humain, constitue une cible intéressante pour la régulation des paramètres physiologiques de l'hôte même s'il reste encore de nombreux mécanismes à explorer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

- Aagaard, K. et al., 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237), p.237ra65.
- Abdollahi-Roodsaz, S. et al., 2008. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1), pp.205–216.
- Abrahamsson, T. et al., 2014. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(6), pp.842–850.
- De Aguiar Vallim, T.Q., Tarling, E.J. & Edwards, P.A., 2013. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism*, 17(5), pp.657–669.
- Al-Asmakh, M. & Zadjali, F., 2015. Use of germ-free animal models in microbiota-related research. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(10), pp.1583–1588.
- Alikhani, N. et al., 2014. Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model. *Oncogene*, 32(8), pp.961–967.
- Ambrose, D. & Ambrose, B.A., 1961. *Gas chromatography*, London: G. Newnes.
- Arck, P. et al., 2010. Is there a “gut-brain-skin axis”? *Experimental Dermatology*, 19(5), pp.401–405.
- Arima, K. et al., 1969. Agricultural and Biological Chemistry Microbial Transformation of Sterols. *Agricultural and Biological Chemistry*, 3311(April), pp.1636–1650.
- Armougom, F. et al., 2009. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS ONE*, 4(9), pp.1–8.
- Arora, T. & Bäckhed, F., 2016. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *Journal of internal medicine*, pp.1–11.
- Arumugam, M. et al., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), pp.174–180.
- Azad, M.B. et al., 2015. Infant gut microbiota and food sensitization: Associations in the first year of life. *Clinical and Experimental Allergy*, 45(3), pp.632–643.

B.

- Bäckhed, F. et al., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-

- free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), pp.979–984.
- Bäckhed, F. et al., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*, 101(44), pp.15718–23.
- Baker, G.C., Smith, J.J. & Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), pp.541–555.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), p.IN26-IN27.
- Begley, M., Hill, C. & Gahan, C.G.M., 2006. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp.1729–1738.
- Benton, D., Williams, C. & Brown, A., 2007. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *European journal of clinical nutrition*, 61(3), pp.355–361.
- Bernalier-Donadille, A. & Pochart, P., 2017. Microbiote intestinale et capacités métaboliques. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 85–93.
- Bertolotti, M., Crosignani, A. & Del Puppo, M., 2012. The use of stable and radioactive sterol tracers as a tool to investigate cholesterol degradation to bile acids in humans *in vivo*. *Molecules*, 17(2), pp.1939–1968.
- den Besten, G. et al., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), pp.2325–2340.
- Biasucci, G. et al., 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*, 86(SUPPL. 1), pp.13–15.
- Bisgaard, H. et al., 2011. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3).
- Björkhem, I., Gustafsson, J.-A. & Wrange, Ö., 1973. Microbial Transformation of Cholesterol into Coprostanol: Properties of a 3-Oxo- Δ^4 -Steroid 5 β -Reductase. *European Journal of Biochemistry*, 37(1), pp.143–147.
- Björkhem, I. & Gustafsson, J.A., 1971. Mechanism of microbial transformation of cholesterol into coprostanol. *European journal of biochemistry*, 21(3), pp.428–432.
- Blanchard, C., Moreau, F. & Cariou, B., 2014. L'excrétion trans-intestinale de cholestérol (TICE) Une nouvelle voie plasmatique. *Medicine Science*, 30, pp.896–901.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8).

- Bondzynski, S. & Humnicki, V., 1896. Ueber das Schicksal des Cholesterins im thierischen Organismus. *Zeitsch. physiol. Chern.*, 22(September), pp.396–410.
- Van den Bossche, L. et al., 2017. Ursodeoxycholic acid and its taurine- or glycine-conjugated species reduce colitogenic dysbiosis and equally suppress experimental colitis in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7).
- Braniste, V. et al., 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263), p.263ra158.
- Brinkley, A.W., Gottesman, A.R. & Mott, G.E., 1982. Isolation and Characterization of New Strains of Cholesterol-Reducing Bacteria from Baboons. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(1), pp.86–89.

C.

- Campeotto, F. et al., 2007. Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 31(5), pp.533–542.
- Cani, P.D. et al., 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(July), pp.1761–1772.
- Cani, P.D., Everard, A. & Duparc, T., 2013. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), pp.935–940.
- Cash, H.L. et al., 2006. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science*, 313(August), pp.1126–1131.
- Cassard, A.-M., Gérard, P. & Perlemuter, G., 2017. Microbiote et foie : maladies hépatiques métaboliques et nutritionnelles. In *Le Microbiote Intestinal Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 201–211.
- Cekanaviciute, E. et al., 2017. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), p.201711235.
- Chambers, E.S. et al., 2015. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*, 64(11), pp.1744–1754.
- Champy, M.F. et al., 2004. Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mammalian Genome*, 15(10), pp.768–783.
- Charbonneau, A. & The, V.L., 2001. Genomic organization of a human 5beta-reductase and its pseudogene and substrate selectivity of the expressed enzyme. *Biochimica et biophysica acta*, 1517(2), pp.228–235.

- Charlton-Menys, V. & Durrington, P.N., 2008. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental physiology*, 93(1), pp.27–42.
- Le Chatelier, E. et al., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), pp.541–546.
- Chawla, A. et al., 2001. A PPAR-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular Cell*, 7(1), pp.161–171.
- Cheetham, P.S., Dunnill, P. & Lilly, M.D., 1982. The characterization and interconversion of three forms of cholesterol oxidase extracted from *Nocardia rhodochrous*. *The Biochemical journal*, 201(3), pp.515–521.
- Chen, J. et al., 2016. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*, 6, p.28484.
- Chen, Y. et al., 2011. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 54(2), pp.562–572.
- Chiang, Y.R. et al., 2008. Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), pp.905–914.
- Chiba, T. et al., 2008. Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 196(1), pp.68–75.
- Del Chierico, F. et al., 2016. Gut microbiota profiling of pediatric NAFLD and obese patients unveiled by an integrated meta-omics based approach. *Hepatology*, pp.1–14.
- Chiu, C.C. et al., 2014. Monocolonization of germ-free mice with *Bacteroides fragilis* protects against dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *BioMed Research International*, 2014.
- Chiu, C.M. et al., 2014. Systematic analysis of the association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics approaches. *BioMed Research International*, 2014, pp.1–11.
- Choi, M.-S. et al., 2017. Long-Term Dietary Supplementation with Yerba Mate Ameliorates Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorders in Mice by Regulating Energy Expenditure and Lipid Metabolism. *Journal of Medicinal Food*, pp.1–8.
- Chowdhury, S.S.R. et al., 2007. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC genomics*, 8(215).
- Collado, M.C. et al., 2009. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *Journal of clinical pathology*, 62(3), pp.264–269.
- Cotillard, A. et al., 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500(7464), pp.585–8.

- Crumeyrolle-Arias, M. et al., 2014. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 42, pp.207–217.
- De Cruz, P. et al., 2015. Association between specific mucosa-associated microbiota in Crohn's disease at the time of resection and subsequent disease recurrence: A pilot study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 30(2), pp.268–278.
- Cui, X.-B. et al., 2015. RGC32 deficiency protects against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *The Journal of endocrinology*, 224(2), pp.127–37.
- Custodis, F. et al., 2008. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 117(18), pp.2377–2387.

D.

- Dam, H., 1934. The formation of coprosterol in the intestine. The action of intestinal bacteria on cholesterol. *Biochemistry Journal*, 28, pp.820–825.
- Dao, M.C. et al., 2016. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), pp.426–436.
- Delpino, M.V. et al., 2007. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infection and Immunity*, 75(1), pp.299–305.
- Dethlefsen, L. et al., 2008. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11).
- Ding, S. et al., 2010. High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS ONE*, 5(8).
- Ding, T. & Schloss, P.D., 2014. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 509(7500), pp.357–60.
- Dominguez-Bello, M.G. et al., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS*, 107(26), pp.11971–11975.
- Doré, J., Tap, J. & Ehrlich, D., 2017. Composition du microbiote intestinal. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 13–23.
- Dorée, C. & Gardner, J.A., 1908. CLVIII-Coprosterol. Part I. *Proc Roy Soc*, pp.1625–1633.

- Doukyu, N. et al., 2009. Cloning, sequence analysis, and expression of a gene encoding *Chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), pp.479–490.
- Ducrotté, P., 2017. Microbiote et troubles fonctionnels intestinaux. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 113–124.
- Duncan, H.E. & Edberg, S.C., 1995. Host-Microbe Interaction in the Gastrointestinal Tract. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(2), pp.85–100.
- Duncan, S.H. et al., 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity*, 32(11), pp.1720–1724.
- Dziarski, R. et al., 2016. Pglyrp-Regulated gut microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* enhance and *Alistipes finegoldii* attenuates colitis in mice. *PLoS ONE*, 11(1), pp.1–24.

E.

- Eckburg, P.B. et al., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, pp.1635–1638.
- Einarsson, K., Gustafsson, J. & Gustafsson, B.E., 1977. Hepatic 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Reductase Activity in Germfree Rats. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, (154), pp.319–321.
- Elson, C.O. et al., 2005. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews*, 206, pp.260–276.
- Emoto, T. et al., 2016. Analysis of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease Patients: a Possible Link between Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, pp.908–921.
- Everard, A. et al., 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS*, 110, pp.9066–71.
- Everard, A. & Cani, P., 2017. Syndrome métabolique/diabète. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 189–200.
- Eyssen, H. et al., 1983. Cooperative formation of ω -muricholic acid by intestinal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(1), pp.141–147.
- Eyssen, H. & Parmentier, G., 1974. Biohydrogenation of sterols and fatty acids by the intestinal microflora. *The American journal of clinical nutrition*, (27), pp.1329–1340.

Eyssen, H.J. et al., 1973. Biohydrogenation of sterols by *Eubacterium* ATCC 21 408-Nova species. *European Journal of Biochemistry*, 36, pp.411–421.

F.

Fadden, K. et al., 1999. Steroid metabolism along the gastrointestinal tract of the cannulated pig. *European Journal of Cancer Prevention*, 8(1), pp.35–40.

Faith, J.J. et al., 2013. The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science*, 341(6141), pp.1237439-1-1237439–8.

Ferrier, L. et al., 2006. Impairment of the Intestinal Barrier by Ethanol Involves Enteric Microflora and Mast Cell Activation in Rodents. *The American Journal of Pathology*, 168(4), pp.1148–1154.

Fetissov, S.O., 2017. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), pp.11–25.

Forslund, K. et al., 2015. Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. *Nature*, 528(7581), pp.262–266.

Freier, T.A. et al., 1994. Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a Cholesterol-Reducing Anaerobe. *International journal of systematic bacteriology*, 44(1), pp.137–142.

Frost, G. et al., 2014. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, 5(3611), pp.1–11.

Fujishiro, K. et al., 2002. Purification and properties of a new *Brevibacterium sterolicum* cholesterol oxidase produced by *E. coli* MM294/pnH10. *FEMS Microbiology Letters*, 215(2), pp.243–248.

Fujita, H. et al., 2002. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*, 37(7), pp.509–516.

Fukuyama, M. & Miyake, Y., 1979. Purification and some properties of cholesterol oxidase from *Schizophyllum commune* with covalently bound flavin. *Journal of biochemistry*, 85(5), pp.1183–1193.

Furet, J. et al., 2010. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to bariatric surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 59, pp.3049–3057.

G.

- Gagné, F. et al., 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environmental Toxicology*, 17(3), pp.149–159.
- Gagné, F. et al., 2006. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143(2), pp.179–186.
- Gagné, F. et al., 2001. Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution*, 115(1), pp.97–106.
- Gangadaran, S. & Cheema, S.K., 2017. A high fat diet enriched with sea cucumber gut powder provides cardio-protective and anti-obesity effects in C57BL/6 mice. *Food Research International*, 99(April), pp.799–806.
- Van der Geize, R. et al., 2007. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *PNAS*, 104(6), pp.1947–1952.
- Gérard, P. et al., 2007. *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), pp.5742–5749.
- Gérard, P., 2014. Metabolism of Cholesterol and Bile Acids by the Gut Microbiota. *Pathogens*, 3(1), pp.14–24.
- Gérard, P., 2012. Microbiote intestinale et lipides : impact sur la santé humaine. *OCL*, 19(4), pp.223–227.
- Ghasemian, A. et al., 2009. Overexpression, one-step purification, and characterization of a type II cholesterol oxidase from a local isolate *Rhodococcus* sp. PTCC 1633. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), pp.773–779.
- Go, A.S. et al., 2014. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, 129, pp.e28–e292.
- Golden, E. et al., 2017. An extended N-H bond, driven by a conserved second-order interaction, orients the flavin N5 orbital in cholesterol oxidase. *Scientific Reports*, 7(40517).
- Gordon, H.A., Bruckner-Kardoss, E. & Wostmann, B.S., 1966. Aging in germ-free mice: life tables and lesions observed at natural death. *Journal of gerontology*, 21(3), pp.380–387.
- Gregory, J.C. et al., 2015. Transmission of Atherosclerosis Susceptibility with Gut Microbial Transplantation. *The Journal of biological chemistry*, 290(9), pp.5647–5660.
- Guo, Z. et al., 2016. Intestinal Microbiota Distinguish Gout Patients from Healthy Humans. *Scientific reports*, 6(20602).
- Gustafsson, B.E., 1959. Lightweight Stainless Steel Systems for Rearing Germfree Animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 78(1), pp.17–28.

H.

- Hamilton, J.P. et al., 2007. Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(1), pp.G256–G263.
- Han, Y.W. et al., 2000. Interactions between Periodontal Bacteria and Human Oral Epithelial Cells: *Fusobacterium nucleatum* Adheres to and Invades Epithelial Cells. *Infection and immunity*, 68(6), pp.3140–3146.
- Haro, C., Garcia-Carpintero, S., et al., 2016. The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, pp.27–31.
- Haro, C., Montes-Borrego, M., et al., 2016. Two healthy diets modulate gut microbial community improving insulin sensitivity in a human obese population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(1), pp.233–242.
- Hashimoto, S. et al., 1996. Effects of β -lactam antibiotics on intestinal microflora and bile acid metabolism in rats. *Lipids*, 31(6), pp.601–609.
- Hashimoto, T. et al., 2000. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), pp.28918–28928.
- Heijboer, A.C. et al., 2005. Sixteen hours of fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *Journal of lipid research*, 46(3), pp.582–8.
- Heijtz, R.D. et al., 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), pp.3047–3052.
- Hoban, A.E. et al., 2016. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Translational Psychiatry*, 6(e774).
- Hoffmann, T.W. et al., 2016. Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *The ISME Journal*, 10(2), pp.460–477.
- Hofmann, A.F. & Eckmann, L., 2006. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *PNAS*, 103(12), pp.4333–4334.
- Hong, C. & Tontonoz, P., 2014. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 13(6), pp.433–444.
- Hudcovic, T. et al., 2009. Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiological Research*, 58, pp.101–110.

Hupfeld, S. et al., 2006. Liposome Size Analysis by Dynamic/Static Light Scattering upon Size Exclusion-/Field Flow-Fractionation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(9), pp.3025–3031.

I.

Ignacio, A. et al., 2016. Correlation between body mass index and fecal microbiota from children. *Clin Microbiol Infect*, 22, p.258.e1-258.e8.

Ikegami, T. & Matsuzaki, Y., 2008. Ursodeoxycholic acid: Mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatology Research*, 38(2), pp.123–131.

Ikonen, E., 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews*, 9(2), pp.125–138.

J.

Jaeger, K.E. et al., 1994. Bacterial Lipases. *Fems Microbiology Reviews*, 15(1), pp.29–63.

Janssen, A.W.F. & Kersten, S., 2015. The role of the gut microbiota in metabolic health. *FASEB Journal*, 29(8), pp.3111–3123.

Jiang, H. et al., 2015. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, pp.186–194.

Jones, B. V. et al., 2008. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *PNAS*, 105(36), pp.13580–5.

Joseph, S.B. et al., 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *PNAS*, 99(11), pp.7604–7609.

Jumpertz, R. et al., 2011. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), pp.58–65.

K.

Kakiyama, G. et al., 2013. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 58(5), pp.949–955.

Kandori, H. et al., 1996. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp Anim*, 45(2), pp.155–160.

Karlsson, F.H. et al., 2013. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), pp.99–103.

- Karlsson, F.H. et al., 2012. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature communications*, 3(1245).
- Kasahara, K. et al., 2017. Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis. *Journal of lipid research*, 58(3), pp.519–528.
- Kellogg, T.F., 1974. Steroid balance and tissue cholesterol accumulation in germfree and conventional rats fed diets containing saturated and polyunsaturated fats. *Journal of lipid research*, 15(6), pp.574–579.
- Keshavarzian, A. et al., 2015. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 30(10), pp.1351–1360.
- Kim, M., Morrison, M. & Yu, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), pp.81–87.
- Kim, U. jin et al., 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Research*, 20(5), pp.1083–1085.
- Kleiner, D.E. et al., 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), pp.1313–21.
- Koeth, R.A. et al., 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine*, 19(5), pp.576–585.
- Koren, O. et al., 2011. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *PNAS*, 108 Suppl, pp.4592–4598.
- Kostic, A.D., Howitt, M.R. & Garrett, W.S., 2013. Exploring host – microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*, 27, pp.701–718.
- Kruit, J.K. et al., 2006. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 12(40), pp.6429–6439.
- Kruit, J.K. et al., 2005. Increased Fecal Neutral Sterol Loss Upon Liver X Receptor Activation Is Independent of Biliary Sterol Secretion in Mice. *Gastroenterology*, 128, pp.147–156.
- Kuang, Y.-S. et al., 2017. Connections between the human gut microbiome and gestational diabetes mellitus. *GigaScience*, 6(8), pp.1–12.
- Kumari, L., 2012. Cholesterol Oxidase and Its Applications. *Advances in Microbiology*, 2(2), pp.49–65.
- Kverka, M. et al., 2011. Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(2), pp.250–259.

L.

- Lakhdari, O. et al., 2011. Identification of NF- κ B modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Lassenius, M.I. et al., 2011. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*, 34(8), pp.1809–1815.
- Lathrop, S.K. et al., 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478(7368), pp.250–254.
- Lay, C. et al., 2005. Colonic Microbiota Signatures across Five Northern European Countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), p.4153.
- Lee, Y.K. et al., 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *PNAS*, 108(Supplement_1), pp.4615–4622.
- Leeder, S. et al., 2004. *A Race Against Time | The Challenge of Cardiovascular Disease in Developing Economies*, New York.
- Lepercq, P. et al., 2004. Epimerization of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by *Clostridium baratii* isolated from human feces. *FEMS Microbiology Letters*, 235(1), pp.65–72.
- Lepercq, P. et al., 2004. Isolates from normal human intestinal flora but not lactic acid bacteria exhibit 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Microb Ecol Health Dis*, 16(4), pp.195–201.
- Ley, R. et al., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), pp.1022–3.
- Ley, R.E. et al., 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, 320, pp.1647–1651.
- Ley, R.E. et al., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS*, 102(31), pp.11070–11075.
- Li, J. et al., 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*, 32(8), pp.834–841.
- Li, L. et al., 1995. A resting-cell assay for cholesterol reductase activity in *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(5), pp.887–892.
- Li, L., 1995. *Characterization and application of a novel cholesterol-reducing anaerobe, Eubacterium coprostanoligenes ATCC 51222*. Iowa State University.
- Li, L. et al., 1998. Effect of Feeding of a Cholesterol-Reducing Bacterium, *Eubacterium*

- coprostanoligenes*, to Germ-Free Mice. *Laboratory Animal Science*, 48(3), pp.253–255.
- Li, L. et al., 1996. Effect of orally administered *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 on plasma cholesterol concentration in laying hens. *Poultry science*, 75(6), pp.743–745.
- Li, L. et al., 1995. Hypocholesterolemic effect of *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 in rabbits. *Letters in applied microbiology*, 20(3), pp.137–40.
- Li, T. & Chiang, J.Y.L., 2009. Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR research*, 2009, p.11.
- Lichtman, A.H. et al., 1999. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(8), pp.1938–1944.
- Lin, H. V. et al., 2012. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS ONE*, 7(4), pp.1–9.
- Lin, X. et al., 2005. Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice: results of a strain survey. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 288(6), pp.G1179–G1189.
- Llopis, M. et al., 2016. Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut*, 65(5), pp.830–839.
- Lloyd-Jones, D. et al., 2010. Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the american heart association. *Circulation*, 121(7), pp.46–215.
- Lohmann, C. et al., 2009. Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periadventitial and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets. *Atherosclerosis*, 207(2), pp.360–367.
- Lorin, A. et al., 2004. Les liposomes: Description, fabrication et applications. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 8(3), pp.163–176.
- Lukovac, S. et al., 2014. Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. *mBio*, 5(4).
- Lye, H.-S., Rusul, G. & Liong, M.-T., 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of dairy science*, 93(4), pp.1383–1392.

M.

- MacLachlan, J. et al., 2000. Cholesterol oxidase: Sources, physical properties and analytical applications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 72(5), pp.169–195.

- Malamut, G., 2017. Microbiote et maladie coeliaque. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 125–132.
- Marchesi, J.R. et al., 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), pp.330–339.
- Marteau, P., 2017a. Diarrhées infectieuses et diarrhées dues aux antibiotiques. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 103–112.
- Marteau, P., 2017b. Microbiote intestinal et dermatologie. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 263–266.
- Marteau, P. & Doré, J., 2017. *Le microbiote intestinal : Un organe à part entière* John Libbe., Montrouge.
- Martin-Gallausiaux, C., Lapaque, N. & Blottière, H., 2017. Microbiote intestinal et système immunitaire. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 73–84.
- Mazmanian, S.K. et al., 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), pp.107–118.
- McCall, I.C. et al., 2009. Effects of phenol on barrier function of a human intestinal epithelial cell line correlate with altered tight junction protein localization. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(1), pp.61–70.
- McNeish, J. et al., 2000. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *PNAS*, 97(8), pp.4245–50.
- Mendis, S., Puska, P. & Norrving, B., 2011. Global Atlas on Cardiovascular disease Prevention and Control. *World Health Organization*, p.164.
- Messaoudi, M. et al., 2011. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *The British journal of nutrition*, 105(5), pp.755–764.
- Midtvedt, A. & Midtvedt, T., 1993. Conversion of cholesterol to coprostanol by the intestinal microflora during the first two years of human life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 17(2), pp.161–168.
- Midtvedt, T. et al., 1987. Establishment of a biochemically active intestinal ecosystem in ex-germfree rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), pp.2866–2871.
- Midtvedt, T. et al., 1990. Intestinal microbial conversion of cholesterol to coprostanol in man. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 98, pp.839–844.
- Miele, L. et al., 2009. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 49(6), pp.1877–1887.

- Miyake, S. et al., 2015. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to *Clostridia* XIVa and IV clusters. *PLoS ONE*, 10(9), pp.1–16.
- Modi, S.R., Collins, J.J. & Relman, D.A., 2014. Antibiotics and the gut microbiota. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), pp.4212–4218.
- Mott, G.E. & Brinkley, A.W., 1979. Plasmenylethanolamine : Growth Factor for Cholesterol-Reducing Eubacterium. *Journal of bacteriology*, 139(3), pp.755–760.
- Mouzaki, M. et al., 2013. Intestinal Microbiota in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*, (58), pp.120–7.
- Murphy, E.F. et al., 2013. Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health? *Gut*, 62, pp.220–226.
- Mutlu, E.A. et al., 2012. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9), pp.G966–G978.

N.

- Naseribafrouei, A. et al., 2014. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(8), pp.1155–1162.
- Neufeld, K.M. et al., 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(3), pp.255–265.
- Nichols, M. et al., 2012. *European Cardiovascular Disease Statistics 2012th ed.*, Brussels: European Society of Cardiology.
- Nie, Y. et al., 2017. Anti-hyperlipidemic effect of rice bran polysaccharide and its potential mechanism in high-fat diet mice. *Food Funct.*
- Nistal, E. et al., 2012. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: Effect of age, gluten diet, and disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(4), pp.649–656.

O.

- O'Hara, A.M. & Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), pp.688–693.
- Ogata, M. et al., 2009. On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. *Atherosclerosis*, 205(2), pp.413–419.
- Ogbonnaya, E.S. et al., 2015. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome.

Biological Psychiatry, 78(4).

Ohvo-Rekilä, H. et al., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1), pp.66–97.

Okuda, A. & Okuda, K., 1984. Purification and Characterization of Δ^4 -3-Ketosteroid 5 β -Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(12), pp.7519–7524.

Oram, J.F., 2002. ABCA1 as a new therapeutic target for treating cardiovascular disease. *Drug News & Perspectives*, 15(1), p.24.

Oram, J.F. & Lawn, R.M., 2001. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *Journal of lipid research*, 42(8), pp.1173–1179.

Org, E. et al., 2015. Genetic and Environmental Control of Host-Gut Microbiota Interactions. *Genome Res*, 25, pp.1558–69.

Ott, S.J. et al., 2006. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*, 113(7), pp.929–937.

P.

De Palma, G. et al., 2010. Interplay between human leukocyte antigen genes and the microbial colonization process of the newborn intestine. *Current issues in molecular biology*, 12(1), pp.1–10.

Palmer, C. et al., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), pp.1556–1573.

Panda, S.K., Chattoraj, S.C. & Broitman, S.A., 1999. Correlation of neomycin, faecal neutral and acid sterols with colon carcinogenesis in rats. *British journal of cancer*, 80(8), pp.1132–6.

Pande, C., Kumar, A. & Sarin, S.K., 2009. Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 29(12), pp.1273–1281.

Pardi, D.S. et al., 2003. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 124(4), pp.889–893.

Pathak, L. et al., 2015. Artificial intelligence versus statistical modeling and optimization of cholesterol oxidase production by using *Streptomyces* sp. *PLoS ONE*, 10(9), p.e0137268.

Pedersen, H.K. et al., 2016. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, 535(7612), pp.376–81.

Van de Peer, Y., Chapelle, S. & De Wachter, R., 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic acids research*, 24(17), pp.3381–3391.

- Perry, R.J. et al., 2016. Acetate mediates a microbiome-brain-b cell axis promoting metabolic syndrome. *Nature*, 534(7606), pp.213–217.
- Peuchant, E., Salles, C. & Jensen, R., 1987. Relationship between fecal neutral steroid concentrations and malignancy in colon cells. *Cancer*, 60, pp.994–999.
- Pleasant, J.R., 1959. Rearing Germfree Cesarean-Born Rats, Mice, and Rabbits Through Weaning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 78(1), pp.116–126.
- Pollegioni, L., Piubelli, L. & Molla, G., 2009. Cholesterol oxidase: biotechnological applications. *The FEBS journal*, 276(23), pp.6857–70.
- Pop, M. et al., 2014. Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in wintestinal microbiota composition. *Genome Biology*, 15(6), pp.1–12.
- Potiron, A. et al., 2015. Recent Patents on Hypocholesterolemic Therapeutic Strategies: An Update. *Recent Advances in DNA and Gene Sequences*, 9(1), pp.36–44.
- Poupon, R.E. et al., 1993. Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 17(4), pp.577–582.
- Poznansky, M.J. & Weglicki, W.B., 2010. Biochemical and Biophysical Research Communications. *Analysis*, 396(4), pp.101–104.

Q.

- Qi, Y. et al., 2015. Bile acid signaling in lipid metabolism: Metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851(1), pp.19–29.
- Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Nature*, 464, pp.59–67.
- Qin, J. et al., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), pp.55–60.

R.

- Rabot, S. et al., 2010. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *The FASEB Journal*, 24(12), pp.4948–4959.
- Rabot, S., Naudon, L. & Daugé, V., 2017. Microbiote intestinale et maladies psychiatriques et neurodégénératives. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 247–256.

- Rajilić-Stojanović, M., 2013. Function of the microbiota. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 27(1), pp.5–16.
- Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H. & De Vos, W.M., 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*, 9(9), pp.2125–2136.
- Ramirez-Farias, C. et al., 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *The British journal of nutrition*, 101(4), pp.541–50.
- Rao, R., 2009. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 50(2), pp.638–644.
- Rath, H.C. et al., 1996. Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human β 2 microglobulin transgenic rats. *Journal of Clinical Investigation*, 98(4), pp.945–953.
- Reddy, B.S., Martin, C.W. & Wynder, E.L., 1977. Fecal Bile Acids and Cholesterol Metabolites of Patients with Ulcerative Colitis, a High-Risk Group for Development of Colon Cancer. *Cancer Research*, 37(June), pp.1697–1701.
- Reddy, S. et al., 1998. Faecal pH, bile acid and sterol concentrations in premenopausal Indian and white vegetarians compared with white omnivores. *British journal of nutrition*, 79(6), pp.495–500.
- Reinhardt, C. et al., 2012. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature*, 483(7391), pp.627–631.
- Ren, D. et al., 1996. Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. *Steroids*, 61(1), pp.33–40.
- Reyniers, J.A., Trexler, P.C. & Ervin, R.F., 1946. Rearing germ-free albino rats. *Lobund reports*, (1), pp.1–84.
- Ridaura, V.K. et al., 2013. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*, 341(6150), pp.1241214–1241214.
- Ridlon, J. et al., 2014. Bile acids and the Gut Microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 30(3), pp.332–338.
- Ridlon, J.M. et al., 2013. Cirrhosis, bile acids and gut microbiota: unraveling a complex relationship. *Gut microbes*, 4(5), pp.382–387.
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J. & Hylemon, P.B., 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*, 47(2), pp.241–259.
- Robert, C. & Bernalier-Donadille, A., 2003. The cellulolytic microflora of the human colon:

- Evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(1), pp.81–89.
- Róg, T. et al., 2009. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(1), pp.97–121.
- Rosenfeld, R.S. et al., 1954. The transformation of cholesterol to coprostanol. *J Biol Chem*, 211, pp.301–311.
- Rosenfeld, R.S. & Hellman, L., 1971. Reduction and esterification of cholesterol and sitosterol by homogenates of feces. *J Lipid Res*, 12(2), pp.192–197.
- Le Roy, T. et al., 2013. Intestinal micorbiota determines development of non-alcoholic fatty liver. *Gut*, 62(1), pp.1787–1794.
- S.**
- Sadzikowski, M., Sperry, J. & Wilkins, T., 1977. Cholesterol-reducing bacterium from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(4), pp.355–362.
- Saitoh, S. et al., 2002. *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(1), pp.54–9.
- Sakamoto, M. & Benno, Y., 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. no., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. n. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), pp.1599–1605.
- Sanchez, E. et al., 2010. Intestinal *Bacteroides* species associated with coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, 63(12), pp.1105–1111.
- Sánchez, E. et al., 2013. Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), pp.5472–5479.
- Santacruz, A. et al., 2010. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *British Journal of Nutrition*, 104(1), pp.83–92.
- Sayin, S.I. et al., 2013. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metabolism*, 17(2), pp.225–235.
- Scanlan, P.D. et al., 2008. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environmental Microbiology*, 10(3), pp.789–798.

- Scheperjans, F. et al., 2015. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), pp.350–358.
- Scher, J.U. et al., 2015. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis and Rheumatology*, 67(1), pp.128–139.
- Scher, J.U. et al., 2013. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2, p.e01202.
- Schneeberger, M. et al., 2015. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*, 5(1), p.16643.
- Schroeder, B.O. & Bäckhed, F., 2016. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*, 22(10), pp.1079–1089.
- Schwartz, A. et al., 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), pp.190–195.
- Seki, E. & Schnabl, B., 2012. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of Physiology*, 590(3), pp.447–458.
- Sekimoto, H. et al., 1983. Interrelationship between serum and fecal sterols. *Japanese journal of medicine*, 22(1), pp.14–20.
- Serfaty, L. et al., 2003. Ursodeoxycholic acid therapy and the risk of colorectal adenoma in patients with primary biliary cirrhosis: an observational study. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(1), pp.203–9.
- Sherwin, M.R. et al., 1993. Coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol) in lagoonal sediments and mussels of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 26(9), pp.501–507.
- Shin, N.-R. et al., 2014. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 63(5), pp.727–735.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X. & Kiemle, D.J., 2005. *Spectrometric identification of organic compounds* 7th Editio., Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Sjögren, K. et al., 2012. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(6), pp.1357–1367.
- Smith, E.A. & Macfarlane, G.T., 1997. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3(5), pp.327–337.
- Sobhani, I. et al., 2011. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE*, 6(1).

- Sokol, H., 2017. Microbiote et effet de barrière. In *Le Microbiote Intestinal: Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 65–72.
- Sommer, F. & Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature reviews*, 11(4), pp.227–38.
- Sorg, J.A. & Sonenshein, A.L., 2008. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, 190(7), pp.2505–2512.
- Soumian, S. et al., 2005. ABCA1 and atherosclerosis. *Vascular Medicine*, 10(2), pp.109–119.
- Spor, A., Koren, O. & Ley, R., 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews*, 9(4), pp.279–290.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L. V & Gordon, J.I., 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS*, 99(24), pp.15451–15455.
- Stebbins, S. et al., 2002. Comparison of the faecal microflora of patients with ankylosing spondylitis and controls using molecular methods of analysis. *Rheumatology*, 41(12), pp.1395–1401.
- Szabo, G., 2015. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 148(1), pp.30–36.

T.

- Taneja, V., 2014. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS Letters*, 588(22), pp.4244–4249.
- Tang, W.H.W. et al., 2013. Intestinal Microbial Metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, 368(17), pp.1575–1584.
- Tang, W.H.W. & Hazen, S.L., 2014. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), pp.4204–4211.
- Taurog, J.D. et al., 1994. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of experimental medicine*, 180(6), pp.2359–64.
- Thomas, A.M. et al., 2010. Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology*, 51(4), pp.1410–1419.
- Tiniakos, D.G., Vos, M.B. & Brunt, E.M., 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annual review of pathology*, 5, pp.145–171.
- Tomas, J. et al., 2015. Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *Isme Journal*, 9(1), pp.46–58.
- Tomas, J. et al., 2013. Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during

conventionalization. *FASEB Journal*, 27(2), pp.645–655.

Tomioka, H., Kagawa, M. & Nakamura, S., 1976. Some enzymatic properties of 3beta-hydroxysteroid oxidase produced by *Streptomyces violascens*. *Journal of biochemistry*, 79(5), pp.903–915.

Tremaroli, V. & Bäckhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), pp.242–249.

Tung, B.Y. et al., 2001. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med*, 134(2), pp.89–95.

Turnbaugh, P.J. et al., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), pp.1027–1031.

Turnbaugh, P.J. et al., 2008. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host and Microbe*, 3(4), pp.213–223.

U.

Ulsemer, P. et al., 2012. Safety assessment of the commensal strain *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 62(2), pp.336–346.

De Vadder, F. et al., 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156(1–2), pp.84–96.

V.

van der Veen, J.N. et al., 2009. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), pp.19211–19219.

Veiga, P. et al., 2005. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiology Letters*, 242(1), pp.81–86.

Velagapudi, V.R. et al., 2010. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of lipid research*, 51(5), pp.1101–1112.

van der Velde, A.E., Brufau, G. & Groen, A.K., 2010. Transintestinal cholesterol efflux. *Current Opinion in Lipidology*, 21(3), pp.167–171.

Verdam, F.J. et al., 2013. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity*, 21(12), pp.607–615.

Vidal, R. et al., 2015. Crohn associated microbial communities associated to colonic mucosal biopsies in patients of the western Mediterranean. *Systematic and Applied Microbiology*,

38(6), pp.442–452.

Visek, W., 1978. Diet and cell-growth modulation by ammonia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31(10), pp.S216–S220.

Vítek, L. & Haluzík, M., 2016. The role of bile acids in metabolic regulation. *The Journal of endocrinology*, 228(3), pp.85–96.

Volontè, F. et al., 2010. Production of recombinant cholesterol oxidase containing covalently bound FAD in *Escherichia coli*. *BMC biotechnology*, 10, p.33.

Vrieze, A. et al., 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), p.913–916.e7.

W.

Waidmann, M. et al., 2003. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, 125(1), pp.162–177.

Waligora-Dupriet, A.-J. & Chatel, J.-M., 2017. Microbiote et réactions allergiques. In *Le Microbiote Intestinal : Un organe à part entière*. Montrouge, pp. 239–246.

Wang, M. et al., 2008. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(1), pp.129–134.

Wang, Z. et al., 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472(7341), pp.57–63.

Wei, B. et al., 2001. Molecular Cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-Linked Outer Membrane Protein Identified by an Inflammatory Bowel Disease Marker Antibody. *Infection and Immunity*, 69(10), pp.6044–6054.

Whitman, W.B., Coleman, D.C. & Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), pp.6578–6583.

Wilkins, T.D. & Hackman, A.S., 1974. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer Research*, 34(9), pp.2250–2254.

Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. *Microbiology*, 51(2), pp.221–271.

Wong, J.M. et al., 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 40(3), pp.235–243.

Wostmann, B.S., 1973. Intestinal bile acids and cholesterol absorption in the germfree rat. *The Journal of nutrition*, 103(7), pp.982–990.

Wostmann, B.S., 1981. The germfree animal in nutritional studies. *Annual review of nutrition*,

1(102), pp.257–79.

Wrzosek, L. et al., 2013. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology*, 11, p.61.

Wu, H.J. et al., 2010. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 32(6), pp.815–827.

X.

Xie, G. et al., 2016. Distinctly altered gut microbiota in the progression of liver disease. *Oncotarget*, 7(15).

Xin, Y. et al., 2011. Expression and comparison of recombinant cholesterol oxidases (COD) in *Escherichia coli* with native cholesterol oxidase expressed in *Brevibacterium* sp. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), pp.14968–14976.

Y.

Yang, B., Wang, Y. & Qian, P.-Y., 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), p.135.

Yang, W. et al., 2012. Serum lipids and lipoproteins in chinese men and women. *Circulation*, 125(18), pp.2212–2221.

Yang, X. et al., 2017. Flavonoid-enriched extract from *Hippophae rhamnoides* seed reduces high fat diet induced obesity, hypertriglyceridemia, and hepatic triglyceride accumulation in C57BL/6 mice. *Pharmaceutical biology*, 55(1), pp.1207–1214.

Yatsunenکو, T. et al., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, pp.222–228.

Yeoh, N. et al., 2013. The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Current Rheumatology Reports*, 15(3).

Yi, P. & Li, L., 2012. The germfree murine animal: An important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Veterinary Microbiology*, 157, pp.1–7.

Yvan-charvet, L., Wang, N. & Tall, A.R., 2011. The role of HDL, ABCA1 and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), pp.139–143.

Z.

- Zanotti, I. et al., 2015. Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), pp.6813–6829.
- Zeller, G. et al., 2014. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular systems biology*, 10(11), p.766.
- Zhang, X. et al., 2015. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, 21(8), pp.895–905.
- Zhang, X., Osaka, T. & Tsuneda, S., 2015. Bacterial metabolites directly modulate farnesoid X receptor activity. *Nutrition & metabolism*, 12, p.48.
- Zheng, S. et al., 2008. Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *European Journal of Pharmacology*, 584(1), pp.118–124.
- Zhu, L. et al., 2013. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, 57(2), pp.601–609.
- Zitomersky, N.L. et al., 2013. Characterization of Adherent Bacteroidales from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 8(6).

ANNEXES

8. ANNEXES

I. Recent Patents on Hypocholesterolemic Therapeutic Strategies: An Update

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Recent Advances in DNA and Gene Sequences, 2015, 9, 000-000

1

Recent Patents on Hypocholesterolemic Therapeutic Strategies: An Update

Aline Potiron¹, Philippe Gérard¹, Tiphaine Le Roy^{2,3}, Philippe Lesnik^{2,3}, Emmanuelle Maguin^{1,*} and Moez Rhimi^{1,*}



M. Rhimi

¹INRA, UMR1319 MICALIS, Jouy-en-Josas, France, AgroParisTech, UMR MICALIS, Jouy-en-Josas, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR5 1166 ICAN, Hôpital de la Pitié, Pavillon Benjamin Delessert, Paris, France; ³Institute of CardioMetabolism and Nutrition (ICAN), Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

Received: October 03, 2015 Revised: November 07, 2015 Accepted: November 09, 2015



E. Maguin

Abstract: Worldwide, the cardiovascular diseases constitute a major cause of death with an ever growing incidence. Many medical approaches were developed against this physiopathology and patented; however up to now, no efficient treatment exists. Future developments are not only focusing on the identification of new therapeutic strategies against the cardiovascular diseases but also on a better understanding of the determinants of these multifactorial diseases. In this report, we reviewed the most recent patents that have been reported in this field of research.

Keywords: Cardiovascular diseases, Atherosclerosis, Cholesterolemia, Therapeutic strategies, Patents, Health.

INTRODUCTION

The assertion that elevated blood cholesterol concentrations may lead to an increased risk to develop atherosclerosis and Cardiovascular Diseases (CVD) [1] is now well established. CVDs are a major cause of death representing around 31% of the total worldwide mortality in 2012 [2]. In 2014, the world health organization (WHO) established that 17.5 million people died through CVD [2] and it is predicted that this number will exceed 20 million in 2030 [2]. In addition to its impact on the mortality rate, CVD has a heavy financial burden. Indeed the health expenses associated to CVD are increasing in many countries. The European Union (UE) spent about 169 billion € in 2003 [3] and 196 billion € in 2009 [4]. In the same trend, the USA spent 368.4 billion \$ in 2003 [5] and 503.2 billion \$ in 2010 [6]. The link between CVD and the blood cholesterol levels drove the WHO to recognize that this risk factor has a priority in the Global Atlas on Cardiovascular Diseases [7]. Worldwide, elevated cholesterol defined by a cholesterolemia superior or equal to 5 mmol/L is observed in 37% of males and 40% of females [7]. Based on these observations, governments are looking for efficient treatment reducing the blood cholesterol level. In the early 70's, health care programs aimed at the prevention of hypercholesterolemia were implemented. These programs limited the dramatic increase of patients and deaths by CVD especially in developed countries [8] but did not until now,

significantly decrease their numbers [2]. That is why, many patents described new treatments like statins, fibrates, resins, niacin, ezetimibe, squalene synthase inhibitors, Microsomal Triglyceride transfer Protein (MTP) inhibitors, Acyl-Coenzyme A:cholesterol Acyl-Transferase (ACAT) inhibitors, Ileal sodium-dependant Bile Acid Transporter (IBAT) inhibitors, Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) inhibitors, ATP-Binding Cassette transporter (ABC) called ABCA1 activators and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) activators [9-12]. These molecules are at different stages of development but a lot of them display deleterious secondary effects [9, 10, 13-17] and more importantly, a significant number of patients are not responding to these compounds [18, 19].

The aim of this report is to provide an updated review of the current knowledge and patents on the hypocholesterolemic treatments and to discuss the perspectives in this research field.

ATHEROSCLEROSIS AND CHOLESTEROLEMIA

CVDs correspond to a set of disorders affecting the heart and blood vessels. According to the WHO they include: coronary heart disease (CHD), cerebrovascular disease (stroke), peripheral artery disease, rheumatic heart disease, congenital heart defects, deep vein thrombosis and pulmonary embolism [7]. These diseases affect mainly the developed countries where they are the main cause of mortality, but they are also increasing in countries with low- and middle-income [20]. In these countries, this set of diseases constitutes the second cause of death however, in 1998 it alone accounted for 80-85% of global CVD mortality [20, 21].

*Address correspondence to these authors at the INRA, UMR1319 MICALIS, Jouy-en-Josas, France, AgroParisTech, UMR MICALIS, Jouy-en-Josas, France; Tel: +33 1 34 63 22 94 / Fax: +33 1 34 63 25 21; E-mails: moez.rhimi@jouy.inra.fr, emmanuelle.maguin@jouy.inra.fr

Therefore, CVDs are a heavy worldwide cause of mortality [22]. For thirty years, the burden of the global CVD mortality has increased which explains the potential conferred to the studies aiming to understand these diseases [23, 24].

Atherosclerosis corresponds to a slow and chronic inflammation that begins in childhood and can remain asymptomatic for decades [25]. It starts with an endothelial dysfunction caused by several factors including an increase of the circulating low density lipoproteins (LDL) [26]. In fact, cholesterol is carried on different lipoproteins including LDL and high density lipoprotein (HDL). Remarkably, LDL known as "bad cholesterol", are mainly composed of cholesterol (70%) and have proatherogenic effects. However, HDL known as "good cholesterol", contain low cholesterol level and may have a protective effect [27]. In this context, hypercholesterolemia constitutes one of the most important risk factors for atherosclerosis development [7]. High blood cholesterol level is a syndrome common to large number of people all around the world [4, 7, 28, 29]. Therefore, lowering cholesterol constitutes an attractive target to fight the development of atherosclerosis, and numerous strategies to achieve this purpose were patented (Fig. 1).

THERAPEUTIC STRATEGIES AGAINST ELEVATED BLOOD CHOLESTEROL

Several strategies were set out aiming at treating hypercholesterolemia. The first strategy is to develop prevention by decreasing the daily cholesterol intake as recommended in the WHO guidelines [30]. Although, a low cholesterol diet can reduce cholesterolemia, this approach remains inadequate to efficiently treat existing hypercholesterolemia. An alternate strategy is focusing on the identification of medica-

tions curing hypercholesterolemia by targeting the different transporters and the metabolism of cholesterol in the host.

Transport Inhibitors

The incoming dietary cholesterol follows a circuit in the body from the intestine to the liver through the enterocytes and the blood stream. In the small intestine, the dietary cholesterol is captured by the enterocytes. In their endoplasmic reticulum (ER), the cholesterol is incorporated in the chylomicrons (CM) which are released in the lymph and transferred in the blood where the lipoprotein lipases (LPL) hydrolyze part of the CM triglycerides for energy and storage. Ultimately, the CM loaded with cholesterol, reach the liver where the endogenous cholesterol is synthesized. The endogenous cholesterol is transported from the liver to the lymph via very low density lipoproteins (VLDL). As they circulate in the blood, the VLDL are maturing, encountering (as CM) the lipoprotein lipases and CETP which remove triglycerides. They become intermediate density lipoproteins (IDL) and then LDL when the cholesterol content becomes higher than the triglycerides content. The LDL can also transport cholesterol to peripheral tissues and then return to the liver via LDL-Receptor to be degraded in free cholesterol, fatty acids and amino acids [31]. HDL are responsible for reverse transport of cholesterol, from tissue to liver. The cholesterol (and phospholipids) efflux from the cells, carried out by the ABCA1 transporter located in the membrane, will be associated with apolipoprotein A1 forming lipoprotein. LDL and CM can exchange cholesterol with HDL due to the Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP inhibitors target) [31]. Drugs developed to lower the blood cholesterolemia target different stages of this circuit as explained below.

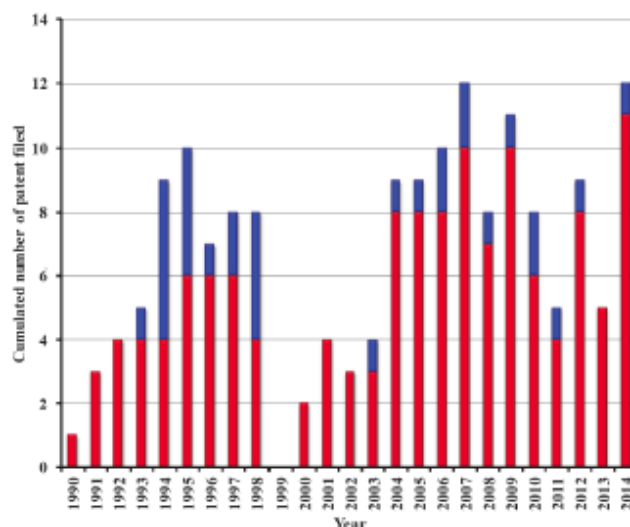


Fig. (1). Number of patents on molecules targeting hypercholesterolemia granted each year for the period 1990 to 2014. In red and blue the patents corresponding to transport and metabolism targets, respectively.

In the small intestine, the incoming cholesterol is solubilized by the bile acids and forms micelles. These compounds are then absorbed by enterocytes via the Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) transporter. Ezetimibe involved in several patents [32, 33], can bind NPC1L1, inhibiting the formation of the cholesterol-NPC1L1 complex and in this way, decreasing the absorption of exogenous cholesterol.

Once the cholesterol is internalized, it is transported to the endoplasmic reticulum (ER) where it is esterified by the ACAT-2 enzyme (targeted by the ACAT Inhibitors) and added to the apolipoprotein B48 (ApoB) with triglycerides by the microsomal transfer protein (targeted by the MTP Inhibitors) to form chylomicrons. Then the CM are secreted in the lymph via the vesicle transport system [9, 31-34]. Two types of ACAT exist and both perform cholesterol esterification. The ACAT-2 is located in the enterocytes and works as explained above. The ACAT-1 is located in the peripheral tissues and fulfills the first step of the cholesterol storage [34, 35]. To date, the patented ACAT inhibitors are not specific and inhibit both enzymes. Two types of ACAT inhibitors exist: the fatty acid aniline derivatives [36, 37] and the urea-derived compounds [38, 39]. All of them act as competitive inhibitors [40] and through this mode of action, decrease the cholesterol absorption [12].

The MTP Inhibitors limit the assembly of the (i) CM in the enterocytes and (ii) the VLDL in the liver [41] reducing the release of cholesterol in the lymph and consequently in the blood. Several components were selected to target the MTP, these are often amides [42-44] or piperidine [45, 46] derivatives. However, their modes of action are not fully understood [47] although some MTP inhibitors (Triamide-substituted indoles, benzofuranes and benzothiofenenes) are likely to inhibit the apoB-MTP protein-protein interaction [48].

The fibrates are synthetic ligands and activators of PPAR α [49] which induce the expression of several genes including those encoding for the lipoprotein lipase. Fibrates activate the expression of the PPAR α encoding gene allowing the increase of the LPL activity and cholesterol consumption which reduce blood LDL and increase blood HDL [50]. Plenty of components such as quinoline [51], pyrazole phenyl [52] or amide derivatives [53] (see Table 1) are acting on PPAR receptor like. Another component known as Niacin associated to patents EP1310253A1, WO2012051107, WO2014107730, WO2014179845 [54-57] (see Table 1) increases the expression of PPAR γ and stimulates ABCA1 in the macrophages. However, this molecule has several side targets, inhibiting hepatic VLDL secretion and HDL catabolism allowing the reduction of VLDL and LDL plasma level and the increase of circulating HDL [16]. Finally, the CETP mediated lipid transfer consists in at least two rate-limiting steps. In the first step, the CETP binds to the lipoproteins through electrostatic interactions with the negative charges present at the lipoprotein surface. In the second step and after a conformational change of the CETP, one neutral lipid molecule binds to a hydrophobic site in the C terminus of the CETP prior to the transfer of lipoprotein acceptor [58]. Many molecules targeting CETP were described and patented (see Table 1) but they often have a similar shape: cyclic with an amine function [59-66]. For example, dalcetrapib (JTT-705) component (stopped in

phase III due to non significant effects) and its analogs inactivate a free sulfhydryl group in the hydrophobic site on CETP resulting in an irreversible inhibition of the binding and transfer of neutral lipids [67], while, torcetrapib (also stopped in phase III due to high mortality rate) induces a shift of CETP from a free form to an HDL-bound, non-productive complex [68]. Together CETP inhibitors increase HDL levels, cholesterol efflux and decrease LDL levels [17]. However, recent data proved that CETP inhibitors including evacetrapib can form a complex i) with HDL and ii) between themselves. Therefore, CETP inhibitors can interfere with many physiologic functions related to HDL, such as cholesterol reverse transport which underlines the deficiency of CETP inhibitors. Furthermore, many patents described several peptidomimetic molecules adapted for enhancement of reverse cholesterol transport in mammals (Table 1).

The cholesterol is not only a product used by the cells; it is also a precursor of many other components [69, 70] such as the bile acids (BA). The BA represent an important component in the intestinal cholesterol absorption because once secreted in the duodenum, they facilitate the cholesterol solubilization and the creation of micelles [71]. Before reaching the colon, the BA are re-absorbed by the enterocytes via the ileal bile acids transporter (IBAT) [9]. A therapeutic approach to limit the cholesterol blood level is to reduce the BA absorption or to increase the elimination of the BA from the body to stimulate the BA synthetic pathway which consumes cholesterol. The IBAT inhibitors [72-75] mimic the BA structure and bind the BA receptor but block the internalization into the cell [76]. In addition, the IBAT inhibitors increase the transcription of the main enzyme responsible for the BA synthesis leading to an increase of BA synthesis and therefore cholesterol consumption [77]. The resins [77, 78] like colestyramine [79] and colesvelam (see Table 1) are non-absorbable anions exchange resins that bind BA and are eliminated from the body. As these resins increase the elimination of BA, they stimulated the BA biosynthetic pathway and stimulate the consumption of cholesterol [9].

Metabolism Inhibitors

The biosynthesis of cholesterol is also targeted by some drugs designed to reduce the cholesterol blood level. Overall, four main steps can be distinguished in the cholesterol biosynthetic pathway. The first step involves the Hydroxy-Methyl-Glutaryl CoA Reductase (HMGCoAR) which synthesizes the mevalonate from the Acetyl CoA. This first step is irreversible and leads to the second step which produces the Isopentenyl-Pyrophosphate (IPP). The third step is the synthesis of squalene by the squalene synthase. The fourth step is the cholesterol synthesis from squalene after several enzymatic reactions [34, 80]. Some cholesterol lowering drugs target two main steps of this biosynthesis pathway.

(i) The first step of the cholesterol biosynthesis i.e. the formation of mevalonate is affected by the statins that inhibit the HMGCoAR enzyme. The statins (see Table 2) such as the patented component Atorvastatin [81], act not only as competitive inhibitors of the HMGCoAR enzyme but they can also reversibly bind the enzyme inducing a conformational change, inhibiting thus the enzyme activity [82, 83].

Table 1. Selection of relevant patents covering products targeting the cholesterol transport.

Patent	Year	Title	Inventors
ABCA1 activators:			
No patent found			
ACAT inhibitors:			
US 5030653	1991	Antihyperlipidemic and antiatherosclerotic compounds and compositions	Trivedi B.K.
US 5153226	1992	Acet inhibitors for treating hypocholesterolemia	Chucholowski A.W., Creswell M.W., Roark W.H., Sircar I.
US 5254589	1993	Sulfonyl urea and carbamate ACAT inhibitors	Picard J.A., Roark W.H., Roth B.D.
US 5288757	1994	Aminosulfonyl urea ACAT inhibitors and a method of lowering blood cholesterol levels therewith	Picard J.A., Slinkovic D.R.
US 5491170	1996	Beta-carboxy sulfonamide ACAT inhibitors	Lee H.T., Picard J.A., Slinkovic D.R.
US 5596001	1997	4-aryl-3-(heteroarylsulfonyl)quinoline derivatives	Hamanaka E.S.
EP 0823420	1998	Substituted vinylurea derivatives and their use as ACAT inhibitors	Kanamura Y., Hirota H., Shibata A., Komoto T., Naito H., Tachibana K., Ohtsuka M., Ishii F., Sato S.
EP 1203767	2002	Heterocyclic-substituted alkylamide acet inhibitors	Lee H.T., O'Brien P.M., Picard J.A., Purchase C.F.Jr, Roth B.D., Slinkovic D.R., White A.D.
CN 1414848	2003	Prevention of plaque rupture by ACAT inhibitors	Bocan T.M.A.
CETP inhibitors:			
EP 0818448	1998	Cycloalkano-pyridine as CETP inhibitors	Schmidt G., Brandes A., Angerbauer R., Loeggers M., Mueller-Gleemann M., Schneck C., Bremm K.-D., Bischoff H., Schmidt D., Schumacher J., Giera H., Paulsen H., Naab P., Conrad M., Stoltefuss J.
EP 1670765	2006	CETP inhibitors and metabolites thereof	Dalvie D.K., Ruggieri R.B.
EP 1710231	2006	CETP activity inhibitors	Shinkai H., Maeda K., Okamoto H.
EP 1765793	2007	Anacetrapib and other CETP inhibitors	Ali A., Napolitano J.M., Deng Q., Lu Z., Sinclair P.J., Taylor G.E., Thompson C.F., Quraishi N., Smith C.J., Hunt J.A., Dowst A.A., Chen Y.-H., Li H.
WO 2007107843	2007	Methods of treatment with CETP inhibitors	Ruggieri R.B.
EP 1979331	2008	Trisubstituted amine compounds as inhibitors of cholesteryl ester transfer protein CETP	Nakamura Y., Hayashi N., Higashijima T., Kubota H., Oka K.
US 20090018054	2009	Cholesteryl ester transfer protein inhibitors	Ali A., Sinclair P.J., Taylor G.E.
EP 2029560	2009	1,3-oxazolidin-2-one derivatives useful as CETP inhibitors	Ali A., Lu Z., Sinclair P.J., Chen Y.-H., Smith C.J., Li H.
EP 2049517	2009	Amino-piperidine derivatives as CETP inhibitors	Imase H., Iwaki Y., Kawanami T., Miyake T., Mogi M., Ohmori O., Qin H., Umemura I., Yamada K., Yasochima K.
CN 101443324	2009	Benzylamine derivatives as CETP inhibitors	Konishi K., Iwaki Y.
EP 2166847	2010	CETP inhibitors derived from benzoxazole arylamides	Hunt J.A., Sinclair P.J., Sweiss R.F.
EP 2348859	2011	Prodrugs of oxazolidinone CETP inhibitors	Mills S.G., Ali A., Smith C.
CN 102718759	2012	Heterocyclic CETP inhibitors	Yang W., Wang Y.
Ezetimibe			
EP 1939174	2008	Inclusion complex of ezetimibe and a cyclodextrin and processes in the preparation thereof	Selic L., Ham Z.
CN 101394837	2009	Ezetimibe compositions	Zahir I., Pal B.
WO 2012116349	2012	Novel cocrystals of ezetimibe	Childs S.L., Barishansky N., Lingireddy S.R.
US 20130210794	2013	Nanostructured ezetimibe compositions, process for the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them	Filipceai G., Orvos Z., Heltoics G., Darvas F.

(Table 1) Contd....

Patent	Year	Title	Inventors
Fibrates			
EP 1539117	2005	Formulations of fenofibrates and/or fenofibrate derivatives with improved bioavailability	Shojaei A.H., Dorahim S.A., Burnside B.A.
US 20050124557	2005	Use of benzothiazepines having activity as inhibitors of ileal bile acid transport for reducing cholesterolemia	Lindqvist A.-M.
PT 1345918	2007	1,5 benzothiazepines and their use as antihyperlipidemics	Starke I., Dahlstrom M.U.J., Blomberg D.
MTP inhibitors:			
US 6281228	1998	Heterocyclic inhibitors of microsomal triglyceride transfer protein and method	Tino J.A.
WO 2001005762	2001	Biphenyl derivatives, production thereof and use as MTP inhibitors	Lehmann-Lintz T., Heckel A., Thomas L., Mark M.
US 6472414	2002	Conformationally restricted aromatic inhibitors of microsomal triglyceride transfer protein and method	Billar S.A., Dickson J.K., Lawrence R.M., Magnin D.R., Posa M.A., Robl J.A., Shushchik W.A., Sulsky R.B., Tino J.A.
US 20030114442	2003	Substituted piperazine derivatives as mtp inhibitors	Heckel A., Lehmann-Lintz T., Thomas L., Mark M.
mxPA/a/2005/006744	2005	Microsomal transfer protein inhibitors	Bertinato P., Bronk B., Cheng H., Chang G., Cole B.M., Li J., Ruggieri R.B.
US 20060205726	2006	Ester derivatives and medical use thereof	Hagiwara A., Ikenogami T., Mera Y., Sumida Y., Iida A., Taniguchi T., Takahashi M.
US 20090036481	2009	Azaindole inhibitors of MTP and ApoB	Gasvel A.C., Vidal C., Roux B., Chevruil O.
WO 2013106358	2013	Method of treating hyperlipidemia and atherosclerosis with miR-30C	Hussain M.M., Soh J.
Niacin			
US 4911917	1990	Cholesterol-lowering combination compositions of magnesium salt and niacin	Kuhrts E.H.
US 5118510	1992	Niacin drink mix formulation	Kuhrts E.H.
CA 1333997	1995	Cholesterol-lowering combination compositions of guar gum and niacin	Kuhrts E.H.
PT 1274429	2008	Topical formulation for the transdermal delivery of niacin prodrugs and methods of treating hyperlipidemia	Jacobson M.K., Kim H., Kim M., Jacobson E.L., Qasem J.G.
US 20120077808	2012	Niacin mimetics, and methods of use thereof	Bachovchin W.W., Lai H., O'Connell D.P., Wu W., Kristy C.P.
US 20130217714	2013	Non-flushing niacin analogues, and methods of use thereof	Bachovchin W.W., Lai H.
WO 2014179845	2014	Niacin formulation	Mulet X., Sato G.Y.F., Kammar D.
PPAR activators:			
EP 1149063	2001	Ureido-thiobutyric acid derivatives as PPAR-agonists	Brown P.J., Chapman J.M., Oplinger J.A., Smart L.W., Willson T.M., Wu Z.
US 6468996	2002	Substituted hetero-polycyclic compounds as PPAR α and PPAR γ activators	Jeppesen L., Bury P.S., Sauerberg P.
CN 1549713	2004	Diaryl cycloalkyl derivatives, the use thereof as PPAR activators and pharmaceutical compositions containing thereof	Keil S., Falk E., Frick W., Glombik H., Schwink L., Schaefer H.-L., Wendler W.
WO 2006045581	2006	The use of 1, 2, 4-thiadiazolidine-3,5-diones as PPAR activators	Martinez Gil A., Alonso Cascon M., Navarro Rico M.L., Medina Padilla M., Morales Alcega S., Perez Castillo A., De Luna Medina R.
US 20100120748	2010	Benzoxepin-oxy-acetic acid derivatives as PPAR-delta agonists used for the increase of HDL-C, lower LDL-C and lower cholesterol	Kuo G.-H., Zhang Y., Shen L., Lu S., Demarest K.T., Pelton P.

(Table 1) Contd....

Patent	Year	Title	Inventors
US 20120289525	2011	Pyrimidine ether derivatives and methods of use thereof	Neelankavil S.F., Stamford A., Chackalamanni S., Greenlee W.J.
US 20110183982	2011	Phenoxy acetic acids as PPAR δ activators	Ebdrup S.
Resins			
WO 1991003249	1991	Preparations containing colestyramine for reducing lipid levels	Moest T., Spiegel E.
CA 2047453	1992	Low moisture colestyramine composition	Vegana R.V.K., Gore A.Y., Polli G.P.
CN 103585128	2014	Medicine composition containing colesvelam hydrochloride and preparation method thereof	Han W., Liu L., Wu Y., Zhang W., Xiao X., Liu Y., Zhou L.
CN 103768023	2014	Dry colesvelam suspension and preparation method thereof	Han W., Liu L., Wu Y., Zhang W., Xiao X., Liu Y., Zhou L.
Peptidomimetic			
S 5962636 A	1998	Peptides capable of modulating inflammatory heart disease	Bachmaier K., Hessel A.J., Neu N., Penninger M.J.
US 2005/0277690 A1	2005	Small molecules for the treatment of hypercholesterolemia and related diseases	Jagadish C.S., Haripada K., Richard J.T., kashinatham A., Victor C., Igor N.

Table 2. Selection of relevant patents covering products targeting the cholesterol metabolism.

Patent	Year	Title	Inventors
Squalene synthase inhibitors			
US 5385912	1995	Multicyclic tertiary amine polyaromatic squalene synthase inhibitors	Neuenschwander K., Amin D., Scotese A.C., Morris R.L.
US 5770608	1998	Heterocyclic derivatives	Brown G.R., Mallion K.B., Harrison P.J.
EP 0596057	1998	Quinuclidine derivatives as squalene synthase inhibitors	Brown G.R., Mallion K.B., Harrison P.J.
US 5831115	1998	Inhibitors of squalene synthase and protein farnesyltransferase	Arendsen D.L., Baker W.R., Fakhoury S.A., Fung K.L.A., Garvey D.S., Mac Clellan W.J., O'Connor S.J., Prasad R.N., Rockway T.W., Rosenberg S.H., Stein H.H., Shen W., Stout D.M., Sullivan G.M., Angeri D.J.
US 20040072830	2004	N-aryl-substituted cyclic amine derivative and medicine containing the same as active ingredient	Okada T., Kurusu N., Tanaka K., Yoshikawa S., Shimmyo D., Ikuta H., Hiyoshi H., Sasaki T., Yanagimachi M., Ito M.
DE 102004006325	2005	New benzazepine derivatives useful for treating or preventing dyslipidemia, arteriosclerosis, restenosis and ischemia	Griebenow N., Flessner T., Raabe M., Bischoff H.
Statins			
EP 1638548	2006	Preventing atrial fibrillation (AF) with the use of statin drugs	Nattel S.
CN 1993121	2007	Novel statin pharmaceutical compositions and related methods of treatment	Guzman H., Remsenar J., Almarsson O.
US 20070072942	2008	Statin derivatives	Benedini F., Ongini E., Del Soldato P.
US 20090226515	2009	Statin compositions	Schmitt B., Imler L.
US 20100086602	2010	Pharmaceutical composition containing statin-encapsulated nanoparticle	Egashira K.
US 20100137400	2010	Pharmaceutical formulation containing an HMG-COA reductase inhibitor and method for the preparation thereof	Karavas E., Koutris E., Ioannidou E., Stathaki E., Bikiaris D.
US 20120270933	2012	Liquid statin formulation	Phelps K., Qasem J., Gold L.

(ii) The third step of the biosynthetic pathway leading to the formation of squalene, is targeted by the squalene synthase inhibitors (see Table 2). Two types of squalene inhibitors exist : the FPP substrate-like molecules [84] and the carbocation intermediate-like molecules [85-88]. The former are competitive inhibitors of the FPP substrate. The latter are transition-state analogs that mimic the electrostatic and topological properties of the putative carbocation intermediates in the catalytic conversion of FPP in squalene. Due to the large catalytic cavity of the squalene synthase enzyme, these analogs can bind in several ways inhibiting the formation of squalene [89] and reducing cholesterolemia [90-93].

CURRENT AND FUTURE DEVELOPMENTS

CVD represent a major cause of death in the world. The incidence of this physiopathology is increasing leading to a worldwide concern for this illness. Several studies demonstrate that the blood cholesterol level constitutes a major risk factor of CVD. Many drugs were patented aiming at combating the occurrence of CVD by targeting the metabolism or the transport of cholesterol; however until now there is no efficient treatment against CVD. Therefore, the development of new medication with a higher efficiency in the Human population remains a challenge of worldwide interest. In this context, the recent scientific reports regarding an association between the initial stages of CVD development and the Human microbiota [94] constitutes a new way to examine and understand this multifactorial physiopathology and to investigate new therapeutic strategies.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French National Institute for Agricultural Research (Centre of Jouy-en-Josas, France). A. Potiron received funding from the French National Institute for Agricultural Research. Patents were searched through the WIPO website (<http://www.wipo.int/pctdb/en/>) and USPTO website (<http://www.uspto.gov>).

REFERENCES

- Rose G. Incubation period of coronary heart disease. *BMJ* 1982; 284: 1600-1.
- World Health Organization. Fact sheet No. 310, May 2014. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (Accessed on : June 22, 2015).
- Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, et al. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J* 2006; 27: 1610-19.
- Nichols M, Nick T, Scarborough P, et al. European cardiovascular disease statistics. Logstrup S, O'Kelly S, editors. Brussels: European HeartNetwork and Antibes; Euro Soc Cardiol 2012.
- American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2004 Update. Dallas: Ameri Heart Assoc 2003.
- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the American heart association. *Circul* 2010; 121: 46-215.
- Mendis S, Puska P, Norrving B, editors. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva: World Health Organ 2011.
- Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circul* 1998; 97: 596-601.
- Charlton-Mezys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol* 2008; 93: 27-42.
- Izzat NN, Dehazer ME, Looze-Mitchell DS. New molecular targets for cholesterol-lowering therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 315-20.
- Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 900-21.
- Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2000; 151: 357-79.
- Alshelkh-Ali AA, Kurvin JT, Karas RH. Risk of adverse events with fibrates. *Am J Cardiol* 2004; 94: 935-38.
- Hussain MM, Bakillah A. New approaches to target microsomal triglyceride transfer protein. *Changes* 2012; 29: 997-1003.
- Huyah T, Cordato D, Yang F, et al. HMG Co.A reductase-inhibitor-related myopathy and the influence of drug interactions. *Intern Med J* 2002; 32: 486-90.
- Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of Action of Niacin. *Am J Cardiol* 2008; 101: 20-6.
- Tall AR, Yvan-Charvet L, Wang N. The failure of torcetrapib: Was it the molecule or the mechanism? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 257-60.
- Baigent C, Keech A, Kearney P, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366: 1267-78.
- Thompson GR, O'Neill F, Seed M. Why some patients respond poorly to statins and how this might be remedied. *Eur Heart J* 2002; 23: 200-6.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2095-128.
- Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, et al. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circul* 2001; 104: 2746-53.
- Murray CJL, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2197-223.
- Evers SMAA, Struijs JN, Ament AJHA, et al. International comparison of stroke cost studies. *Stroke* 2004; 35: 1209-15.
- Gaziano TA. Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. *Circul* 2005; 112: 3547-53.
- McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, et al. Association of coronary heart disease risk factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circul* 2000; 102: 374-79.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-41.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-53.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A Report from the American Heart Association. *Ameri Hear Assoc* 2014.
- Yang W, Xiao J, Yang Z, et al. Serum lipids and lipoproteins in chinese men and women. *Circul* 2012; 125: 2212-21.
- World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease : guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. Geneva: World Health Organ 2007.
- Bronen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 125-38.
- Jackowski G, Macrweaney R, Shaikh N, Yantua J, Schini-Kerth V. Azetidinone cholesterol absorption inhibitor (ezetimibe) and omega 3 fatty acids (EPA,DHA, DPA) for the reduction of cholesterol and for the reduction of cardiovascular events. WO2013122624A1, 2013.
- Sundaram V, Rajan ST, Ramayya VP, Vardhan SV, Subrahmanyam B, Sasikala CVA. Polymorphs of ezetimibe and processes for the preparation thereof. WO2005062897A2, 2005.

- [34] Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6429-39.
- [35] Olivo-Rakita H, Ramstedt B, Leppimäki P, et al. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 2002; 41: 66-97.
- [36] Wilde RG, Higley CA, Billheimer JT, Wenker RR. Imidazoles for the treatment of atherosclerosis. WO93023381, 1993.
- [37] O'Brien PM, Slinkovic DR. Amide tetrazole ACAT inhibitors. WO95032953, 1995.
- [38] Leon C, Hill JS, Wasan KM. Potential role of Acyl-coenzyme A:cholesterol transferase (ACAT) inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerosis drugs. *Pharm Res* 2005; 22: 1578-88.
- [39] Binet J, Guffroy C, Kasai H, Wagatsuma N. 2-Ureido-benzamide derivatives. WO96034836, 1996.
- [40] Ikenoya M, Yoshinaka Y, Kobayashi H, et al. A selective ACAT-1 inhibitor, K-604, suppresses fatty streak lesions in fat-fed hamsters without affecting plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2007; 191: 290-7.
- [41] Morozova S, Suc-Royce I, Amvex J. Modulateurs du métabolisme du cholestérol et avenir du traitement de l'athérosclérose. *Med/Sci* 2004; 20: 685-90.
- [42] Chang G, Qualllich GJ. Apo B-secretion/MTP inhibitory amides. WO98023593, 1998.
- [43] Kaender GM. Carboxamides useful as inhibitors of microsomal triglyceride transfer protein and of apoB secretion. WO01053260A1, 2001.
- [44] Bertinato P, Blize AE, Brook BS, Cheng H, Huanan H, Li J, Mason CP. Triamide-substituted indoles, benzofuranes and benzothiofenones as inhibitors of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and/or apolipoprotein B (ApoB) secretion. WO03002533A1, 2003.
- [45] Guedat P, Collonges F, Dumas H, Otholand JY, Decerprit J, Barbançon J, Foster RJ, Kane P, Wendt B. Thiazolypiperidine derivatives as MTP inhibitors. WO2005003128A1, 2005.
- [46] Guevel AC, Fesval D, Collonges F, Guernier D, Chevrel O. 4-(biphenyl carbonylamino) piperidine derivatives as mtp inhibitors. WO03042291, 2003.
- [47] Lettner P, Sutton A, Mansouri A, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: Another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 133-40.
- [48] Bakillah A, Nayak N, Saxena U, et al. Decreased secretion of ApoB follows inhibition of ApoB-MTP binding by a novel antagonist. *Biochem* 2000; 39: 4892-9.
- [49] Milne JC, Jronsek MR, Bemis JE, Vu CB. Fatty acid ebrates derivatives and their uses. WO2011044141A1, 2011.
- [50] Wang TY, Liu M, Portincasa P, et al. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest* 2013; 43: 1203-23.
- [51] Chang G. Tetrahydroquinoline derivatives as PPAR α activators. WO2004103997A1, 2004.
- [52] Ackermann J, Aebi J, Binggeli A, Hirth et al. Pyrazole phenyl derivatives as PPAR activators. MXPA06012093A, 2007.
- [53] Ackermann J, Aebi J, Binggeli A, et al. Amide derivatives as PPAR activators. MX20070069343A, 2007.
- [54] O'Neill VA, Evenstad KL. Niacin-containing sustained-release tablets and kits. EP1310253A1, 2003.
- [55] Kulers EH. Niacin formulations and methods with reduced flushing side-effect. WO2012051107A2, 2012.
- [56] Bemis JE, Milne JC, Jronsek MR, et al. Use of fatty acid niacin conjugates for treating diseases. WO2014107730A2, 2014.
- [57] Mulet X, Sato GYF, David K. Niacin formulation. WO2014179845A1, 2014.
- [58] Dumont L, Gauthier T, Pais De Barros JP, et al. Molecular mechanism of the blockade of plasma cholesteryl ester transfer protein by its physiological inhibitor apolipoprotein CI. *J Biol Chem* 2005; 280: 38108-16.
- [59] Kuo GH, Wang A, Rano T, Prouty C, Demarest KT, Pelton P. 3,4-dihydro-2H-benzo[1,4]oxazine and thiazine derivatives as CETP inhibitors. WO200734149A2, 2007.
- [60] Rano T, Kuo G-H, Sieber-McMaster E, et al. 1,2,3,4-tetrahydroquinoline derivatives as CETP inhibitors. WO2008079427A1, 2008.
- [61] Imase H, Kishida M. Heterocyclic derivatives as CETP inhibitors. WO2008058961A1, 2008.
- [62] Kishida M, Matsumura N, Imase H, et al. Bicyclic derivatives as CETP inhibitors. WO20070128368, 2007.
- [63] Lu Z, Chen YH, Smith C, et al. Cyclic amine substituted oxazolidinone CETP inhibitor. WO2012058187A1, 2012.
- [64] Bornah A, Alkumji S. Substituted heterocyclic amine compounds as cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors. WO2013024558A2, 2013.
- [65] Oudeyka D, Qian X, Vachal P, Tyagarajan S, Smith CJ, Li H, Bao J. Spirocyclic CETP inhibitors. WO2014099836A1, 2014.
- [66] Shao PP, Ye F, Vachal P, Sha D, Katipally RR, Lin J, Sun W. Fused bicyclic oxazolidinone CETP inhibitor. WO2013063217A1, 2013.
- [67] Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, et al. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor amantadine [letter]. *Nature* 2000; 406: 203-7.
- [68] Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2004; 350: 1505-15.
- [69] Li T, Chiang JYL. Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Resear* 2009; 2009: 1-11.
- [70] Bertolotti M, Crocignani A, Del Puppo M. The use of stable and radioactive sterol tracers as a tool to investigate cholesterol degradation to bile acids in humans in Vivo. *Molecul* 2012; 17: 1939-68.
- [71] Hofmann AF, Eckmann L. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4333-4.
- [72] Starke I, Alenfallk S, Nordberg MP, et al. Benzothiazepine and benzothiazepine derivatives. WO2004076430A1, 2004.
- [73] Gillberg PG, Starke I, Grafnar H, et al. IBAT inhibitors for treatment of metabolic disorders and related conditions. WO2012064268A1, 2012.
- [74] Starke I, Dahlstrom MUJ, Blomberg D. Chemical compounds. WO02050051A1, 2002.
- [75] Starke I, Dahlstrom MUJ, Blomberg D. 1,5 benzothiazepines and their use as hypolipidemics. WO01066533A1, 2001.
- [76] Enhsen A, Kramer W, West G. Bile acids in drug discovery. *Drug Discovery Today* 1998; 3: 409-18.
- [77] Li H, Xu G, Shang Q, et al. Inhibition of ileal bile acid transport lowers plasma cholesterol levels by inactivating hepatic farnesoid X receptor and stimulating cholesterol 7 α -hydroxylase. *Metabol* 2004; 53: 927-32.
- [78] Root C, Smith CD, Winegar DA, et al. Inhibition of ileal sodium-dependent bile acid transport by 2164U90. *J Lipid Res* 1995; 36: 1106-15.
- [79] Degan B, Feldner K. Colestyramine as products containing lipid-lowering agents are described. ZA9007130, 1992.
- [80] Atimovic J, Rozman D. Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis. *Molecules* 2013; 18: 4002-17.
- [81] Briggs CA, Jennings RA, Wade RA, et al. Crystalline [(R*(R*))]-2-(4-fluorophenyl)-beta,delta-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-phenyl-4-[[[phenylamino]carbonyl]-1H-pyrrole-1-heptanoic acid hemi calcium salt (Atorvastatin). WO97003959, 1997.
- [82] Stancu C, Sims A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 378-87.
- [83] Kumbhani AS, Dipchandani JG, Pal RK, et al. Novel statin derivatives. WO2006123355, 2006.
- [84] Harris GH, Milligan JA, Lingham RB, et al. Biologically active compounds isolated from aerobic fermentation of *Trichoderma viride*. WO94018157, 1994.
- [85] Treiber LR, Arison BH, Chen ST, et al. Zaragocic acid derivatives and methods of treating hypercholesterolemia, fungal growth, and cancer therewith. WO94007485, 1994.
- [86] Ullrich JW, Kieszow TJ, Neunschwander KW, et al. Cycloalkyl amine bis-aryl squalene synthase inhibitors. WO94014435, 1994.
- [87] Neunschwander K, Gronenberg RA, Morris RL, et al. 3-hydroxyquinclidin-3-ylphenylquinolines as squalene synthase inhibitors. WO95031458, 1995.
- [88] Morris RL, Neunschwander K, Learn KS, et al. Amino bi- and tri-carbocyclic alkane bis-aryl squalene synthase inhibitors. WO95000146, 1995.
- [89] Park J, Mavralis AN, Berglinis AM, et al. Human isoprenoid synthase enzymes as therapeutic targets. *Front Chem* 2014; 2: 1-50.

Recent Patents on Hypocholesterolemic Therapeutic Strategies


- [90] Byrne KM, Kaplan L, Omstead MN, *et al.* Cholesterol lowering compounds produced by directed biosynthesis. WO93017557, 1993.
- [91] Berger GD, Robichaud AJ, Marquis RWI, *et al.* Novel cholesterol lowering compounds. WO94001104, 1994.

Recent Advances in DNA and Gene Sequences, 2015, Vol 9, No. 1 9

- [92] Biffo T, Burk RM, Kuo CH, *et al.* Cholesterol lowering agents. WO94002134, 1994.
- [93] Treiber LR. Cholesterol lowering compounds. WO94015911, 1994.
- [94] Hansen TH, Gobel RJ, Hansen T, *et al.* The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome Medicine*. 2015, 7: 33-49.

II. Fiches fournisseurs des régimes alimentaires utilisés dans la procédure 2 de l'expérimentation *in vivo*

Fiche technique du régime Safe R04-40



SAFE
SCIENTIFIC ANIMAL FOOD & ENGINEERING
www.safe-diets.com

Aliment entretien
Rats, Souris & Hamsters

A04

Composition Nutritive /kg

ACIDES AMINÉS	TOTAL *
Arginine	mg 9 000
Cystine	mg 2 500
Lysine	mg 7 200
Méthionine	mg 2 800
Tryptophane	mg 1 900
Glycine	mg 8 100

ACIDES GRAS	TOTAL *
Acide palmitique	mg 5 900
Acide palmitoléique	mg 150
Acide stéarique	mg 600
Acide oléique	mg 4 800
Acide linoléique	mg 15 000
Acide Inoléique	mg 1 200

MINÉRAUX	TOTAL *
P	mg 5 500
Ca	mg 7 300
Na	mg 2 500
K	mg 6 000
Mg	mg 1 600
Mn	mg 70
Fe	mg 270
Cu	mg 16
Zn	mg 55
Cl	mg 4 000

VITAMINES	TOTAL *
Vitamine A	UI 7 500
Vitamine D3	UI 1 000
Vitamine B1	mg 7
Vitamine B2	mg 6,5
Vitamine B5	mg 15,5
Vitamine B6	mg 2,6
Vitamine B12	mg 0,02
Vitamine E	mg 30
Vitamine K3	mg 2,5
Niacine	mg 75
Ac.Folic	mg 0,5
Biotine	mg 0,04
Choline	mg 1 600

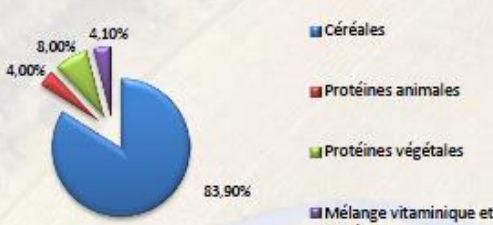
Technologie des Pellets

	Moyenne*
Diamètre	mm 16,43
Résistance à l'écrasement	kg/cm ² 22,7
Résistance à l'abrasion	% 97,3
Masse spécifique	g/l 545
Poids	g 5,319
Longueur	mm 22,54

Composition

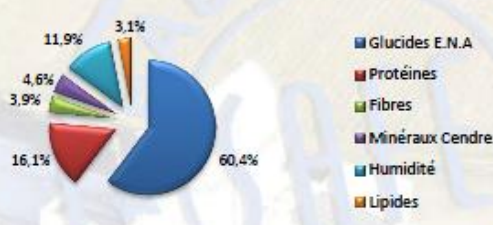
Orge, blé, maïs, tourteau d'extraction de soja, son de blé, protéine de poissons hydrolysée, phosphate bicalcique, prémélange de minéraux, carbonate de calcium, prémélange de vitamines.

Composition Centésimale en %



Catégorie	Pourcentage
Céréales	83,90%
Protéines animales	4,00%
Protéines végétales	8,00%
Mélange vitaminique et minéral	4,10%

Composition Nutritive en %




Catégorie	Pourcentage
Glucides E.N.A	60,4%
Protéines	16,1%
Lipides	3,1%
Humidité	11,9%
Minéraux Cendres	3,9%
Fibres	4,6%

Valeur Energétique**	Kcal/kg	MJ/kg	% Protéines	% Lipides	% Carbohydrates
Atwater	3 338	13,87	18,3	8,4	72,4
ME	3 146	13,17	-	-	-

** Information du calcul de l'Energie:
<http://www.safe-diets.com/fr/produits/informations/energy/aliments-et-energie.html>

Glucides E.N.A. dont	
- Amidon	(en %) 43,6
- Sucres totaux	(en %) 3,2

* Les valeurs sont données à titre d'information. Il s'agit de moyennes calculées sur valeurs brutes du produit. Elles sont indicatives et n'ont pas de valeur contractuelle. Elles sont soumises à des variations liées aux conditions de production, stockage et de méthodes analytiques. Une analyse peut être réalisée sur demande.
Glucides E.N.A. : Extrait non azoté, valeur calculée.



Mise à jour le 22 février 2016

T: +33(0)3 86 53 76 90 • Fax: +33(0)3 86 53 35 96 • info@safe-diets.com

Fiche technique du régime Ssniff® E15749-34

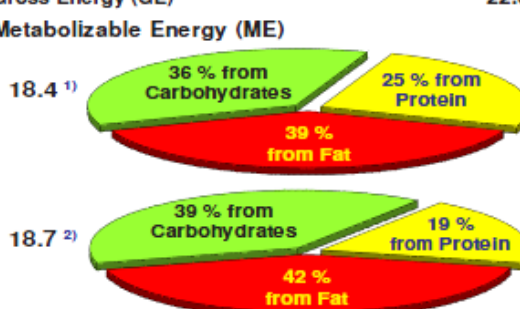
ssniff® EF R/M acc. D12108 mod. *

Experimental diet for rats and mice, high fat and cholesterol content

Description

This experimental diet contains high amounts of fat, in which palmitic, stearic and oleic acid are the predominant fatty acids. Hence, the diet will promote the incidence of diabetes type 2 (NIDDM) and the development of atherosclerotic lesions (plaques) in the cardiovascular system due to the addition of cholesterol. The feeding period until first clinical symptoms will be observed depends largely on the rat or mouse strain and the previous dietary history (fat supply).

Crude Nutrients	[%]	Energy	[MJ/kg]
Dry matter	97.0	Gross Energy (GE)	22.0
Crude protein (Nx 6.25)	21.0	Metabolizable Energy (ME)	
Crude fat	21.0	18.4 ¹⁾	
Crude fibre	5.5		
Crude ash	6.3		
N free extracts	43.3		
Starch	21.0		
Sugar / Dextrines	21.0		



¹⁾ ME calculated according to the pig formula, Annex 4 of the German feed regulation

²⁾ ME calculated with the Atwater factors

Minerals	[%]	Amino acids	[%]	Vitamins	per kg
Calcium	1.09	Lysine	1.71	Vitamin A	15,000 IU
Phosphorus	0.71	Methionine	0.73	Vitamin D ₃	1,500 IU
Sodium	0.19	Cystine	0.39	Vitamin E	150 mg
Magnesium	0.21	Met+Cys	1.12	Vitamin K (as menadione)	20 mg
Potassium	0.97	Threonine	0.93	Vitamin C	30 mg
		Tryptophan	0.27	Thiamin (B ₁)	16 mg
Fatty acids	[%]	Arginine	0.76	Riboflavin (B ₂)	16 mg
C 8:0	—	Histidine	0.66	Pyridoxine (B ₆)	18 mg
C 10:0	—	Valine	1.42	Cobalamin (B ₁₂)	30 µg
C 12:0	—	Isoleucine	1.09	Nicotinic acid	49 mg
C 14:0	0.04	Leucine	2.05	Pantothenic acid	55 mg
C 16:0	4.54	Phenylalanine	1.11	Folic acid	19 mg
C 16:1	0.08	Phe+Tyr	2.22	Biotin	305 µg
C 17:0	—	Glycine	0.43	Choline-Chloride	1,050 mg
C 18:0	5.98	Glutamic acid	4.69	Inositol	80 mg
C 18:1	6.14	Aspartic acid	1.55		
C 18:2	1.72	Proline	2.39	Trace elements	per kg
C 18:3	0.22	Alanine	0.68	Iron	166 mg
C 20:0	0.18	Serine	1.24	Manganese	98 mg
C 20:1	—			Zinc	65 mg
C 20:4	—			Copper	13 mg
C 20:5	—			Iodine	1.16 mg
C 22:6	—			Selenium	0.14 mg
				Cobalt	0.15 mg

Cholesterol 12,350
(added) [mg/kg]

Feed composition
On request

Main products

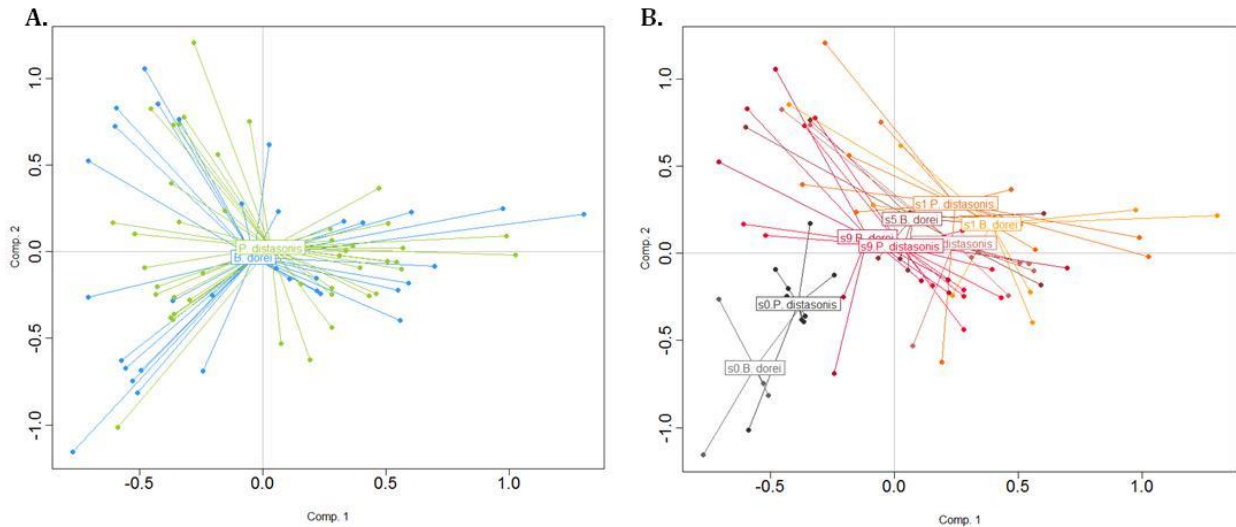
E15749-30 Meal, single ground
E15749-34 10 mm pellets

Production and sale

ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail: mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

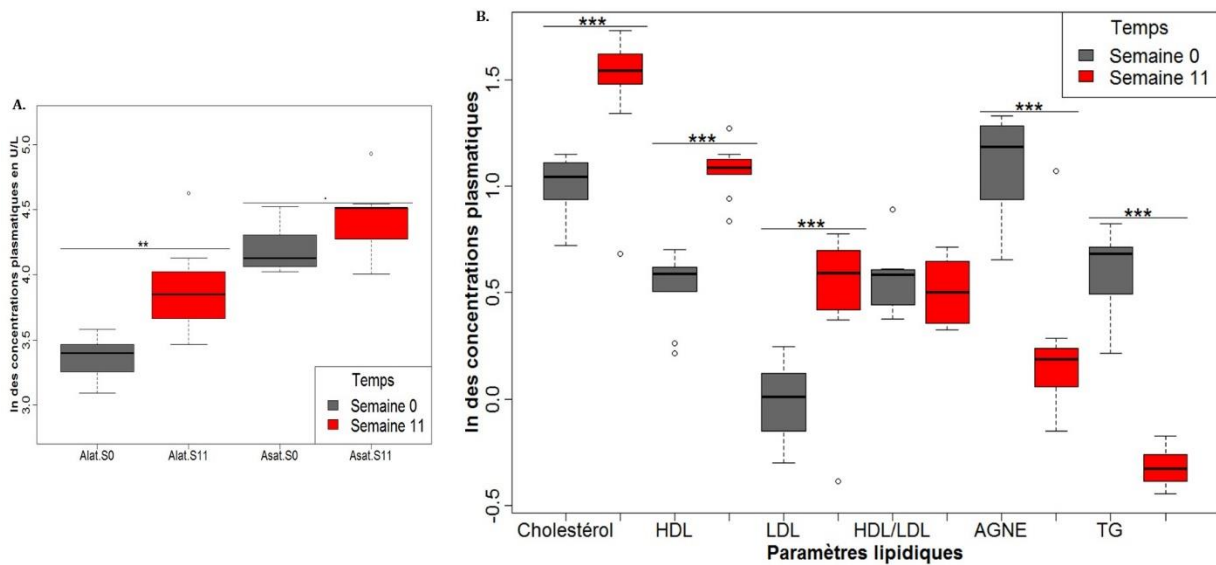
* Research Diets Inc.

III. Analyse en composante principale sur les données dans les selles et la numération bactérienne en fonction du statut bactérien (A) et du statut bactérien et du temps (B)



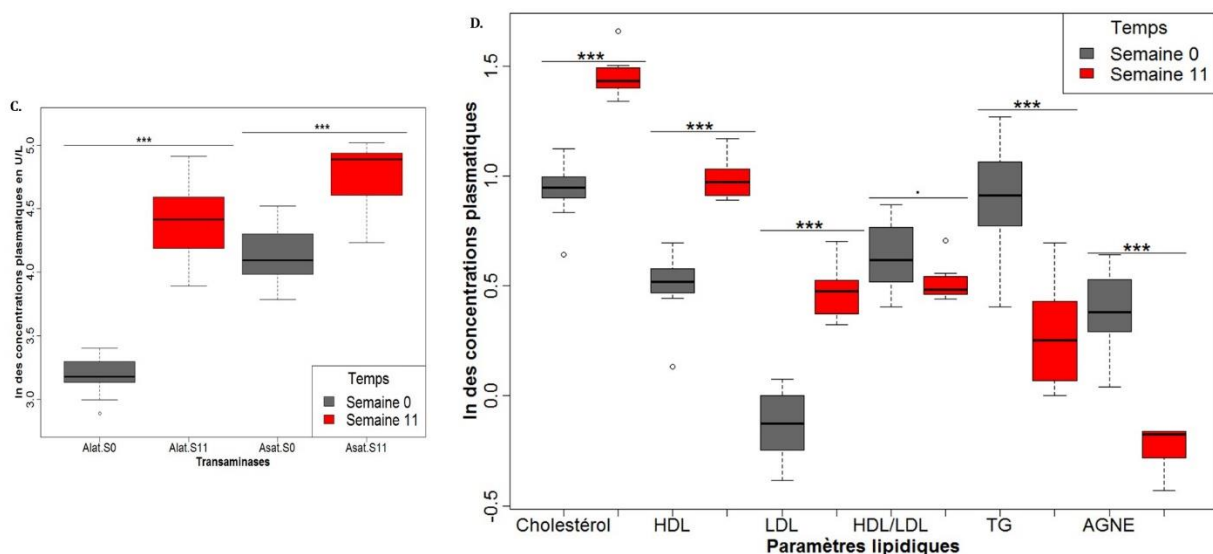
La carte des individus présentée sous la forme de la figure A ne montre aucune séparation entre les deux groupes de souris monocolonisées. En revanche, la représentation B qui distingue en plus du statut bactérien, le point temporel de prise d'échantillon, montre une légère dissociation en S0. Les souris inoculées avec *P. distasonis* sont un peu plus proches du centre de la carte des individus. Ceci peut s'expliquer par une plus faible numération en S-1 (utilisée pour les données de l'ACP en S0 comme aucune différence significative n'a été montrée entre S-1 et S1) que les souris inoculées avec *B. dorei* ($1,04 \cdot 10^{11}$ et $1,52 \cdot 10^{11}$ UFC/g de fèces respectivement) et par un plus fort contenu en coprostanol en S0 même si ces différences ne sont pas significatives en tests univariés.

IV. Tests univariés sur les paramètres plasmatiques des souris monocolonisées avec *B. dorei* (A-B) et *P. distasonis* (C-D)



Les données sont mises sous forme logarithmique pour s'affranchir des différences d'unités. Chaque boîte est la moyenne de $n_{B. dorei} = 9$ souris. ANOVA et test de Tukey : « . » si $p < 0,1$; « * » si $p < 0,05$; « ** » si $p < 0,01$ et « *** » si $p < 0,001$. AGNE : AG non estérifiés et TG : triglycérides.

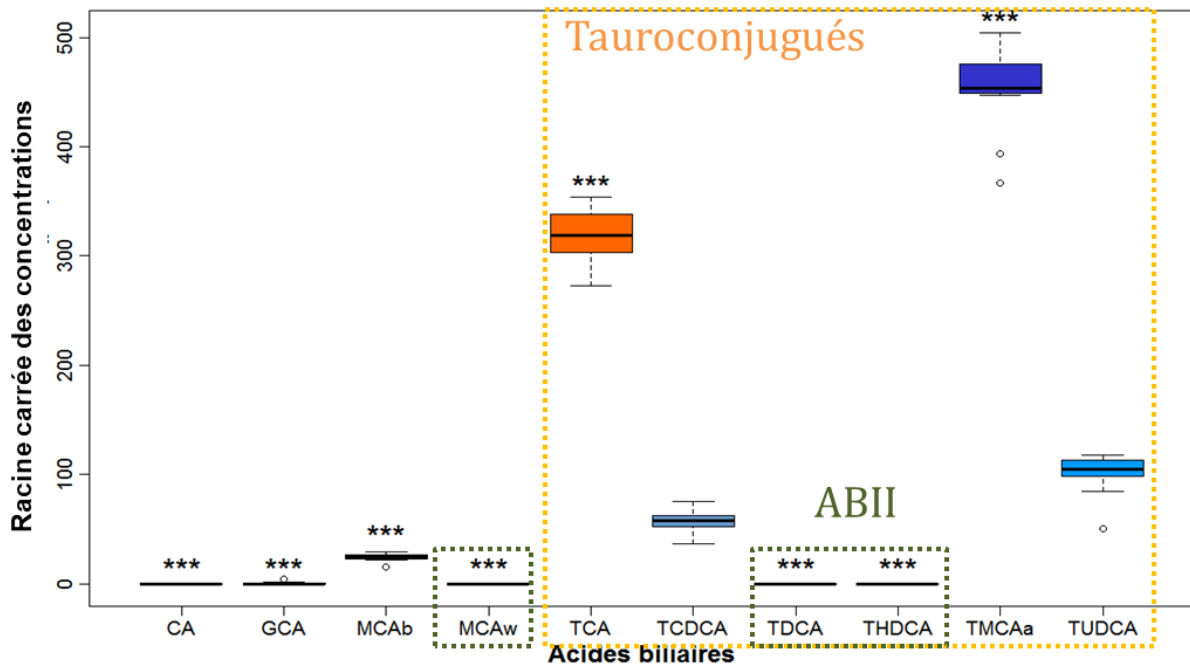
Les paramètres plasmatiques varient avec une augmentation des transaminases Alat et Asat ($p_{Alat} = 6,7 \cdot 10^{-3}$ et $p_{Asat} = 7,6 \cdot 10^{-2}$) pouvant indiquer des lésions dans le foie induites par le régime riche en cholestérol qui est également riche en graisses. Ce régime alimentaire induit également une augmentation du cholestérol, des HDL et des LDL ($p_{Cholestérol} = 5,2 \cdot 10^{-8}$, $p_{HDL} = 3,58 \cdot 10^{-7}$, $p_{LDL} = 5,85 \cdot 10^{-4}$) cohérente avec la forte teneur en cholestérol du régime. De plus, les triglycérides et les acides gras non estérifiés sont diminués entre S0 et S11 ($p_{TG} = 1,22 \cdot 10^{-8}$ et $p_{AGNE} = 2,54 \cdot 10^{-5}$).



Les données sont mises sous forme logarithmique pour s'affranchir des différences d'unités. Chaque boîte est la moyenne de $n_{P.distasonis} = 11$ souris. ANOVA et test de Tukey : « . » si $p < 0,1$ et « *** » si $p < 0,001$. TG : triglycérides et AGNE : AG non estérifiés

Ces analyses montrent les mêmes tendances que pour les souris monocolonisées avec *B. dorei* avec une augmentation des transaminases et de la cholestérolémie ($p_{Asat} = 3,63.10^{-5}$, $p_{Alat} = 1,17.10^{-6}$, $p_{Cholestérol} = 9,3.10^{-9}$, $p_{HDL} = 4,81.10^{-8}$ et $p_{LDL} = 3,86.10^{-8}$) et une diminution des triglycérides et des acides gras non estérifiés ($p_{TG} = 4,99.10^{-6}$ et $p_{AGNE} = 2,29.10^{-4}$) entre S et S11. Cependant, le rapport HDL/LDL est significativement diminué entre S0 et S11 pour les souris monocolonisées avec *P. distasonis* ($p_{HDL/LDL} = 0,065$).

V. Tests univariés sur la concentration en acides biliaires dans la bile des souris monocolonisées avec *P. distasonis*



Les valeurs sont la moyenne de $n_{\text{conventionnalisées}} = 10$ et $n_{B. dorei} = 9$. ANOVA et test de Tukey entre les trois conditions. Seulement la comparaison conventionnalisées/monocolonisées avec *P. distasonis* est signifiée sur ce graphe, « *** » si $p < 0,001$.

Cette figure, comme la figure 61 B réalisée à partir des résultats obtenus sur la bile des souris monocolonisées avec *B. dorei* et présentée dans la section 5.3.3.3.1 de ce manuscrit montre des différences significatives sur tous les acides biliaires sauf TCDCA et TUDCA. Les valeurs moyennes pour les acides biliaires primaires TCA, MCAb et TMCAa sont $101\,693,5 \pm 15\,316,8 \mu\text{M}$; $598,4 \pm 166,2 \mu\text{M}$ et $205\,408,6 \pm 34\,852,9 \mu\text{M}$ respectivement pour les trois ABs ($p_{\text{TCA}} = 9,34 \cdot 10^{-4}$; $p_{\text{MCAb}} = 6,12 \cdot 10^{-3}$ et $p_{\text{TMCAa}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$). Les AB CA, GCA, MCAw, TDCA et THDCA ne sont pas détectés (valeurs égales à 0).

Titre : Conversion du cholestérol en coprostanol par les bactéries du microbiote intestinal humain et impact sur la cholestérolémie

Mots clés : Microbiologie, Cholestérol, Coprostanol, Gnotobiologie, Physiologie de l'hôte, microbiote intestinal

Résumé : La réduction du taux de cholestérol (CH) sanguin est un point clé dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires. L'efficacité contrastée des médicaments disponibles actuellement ainsi que l'intérêt porté autour du microbiote intestinal dans la régulation de la physiologie de l'hôte nous amènent à envisager cette voie comme alternative thérapeutique. La production de coprostanol (CO), dérivé très peu absorbé du CH, par des bactéries de ce microbiote a été corrélée positivement à une faible cholestérolémie. Les objectifs de cette thèse sont i) d'isoler et d'identifier de nouvelles souches bactériennes ayant cette activité, ii) d'identifier les gènes bactériens responsables de cette transformation et iii) de déterminer l'impact de ce métabolisme sur la physiologie de l'hôte.

Nous avons isolé 22 nouvelles souches productrices de CO à partir des selles d'un individu en produisant beaucoup. Nous avons choisi les souches *Bacteroides* sp. D8 et *Bacteroides* sp. BV pour la construction de deux banques génomiques et huit autres pour des essais d'implantation *in vivo* dans le tractus gastro-intestinal (TGI) de souris axéniques. Nous avons identifié 55 clones potentiellement positifs par le criblage fonctionnel des banques génomiques. Leurs analyses supplémentaires devraient nous apporter des informations sur les gènes impliqués dans cette activité. Toutes les bactéries sélectionnées sont capables de coloniser le TGI de la souris axénique. La souche *Parabacteroides distasonis* est la meilleure souche productrice de CO *in vivo*. Nous avons testé son effet sur la cholestérolémie chez des souris axéniques soumises à un régime riche en CH sur 11 semaines en comparaison avec une souche non productrice *in vitro*, *B. dorei*, et avec des souris conventionnalisées comme contrôle. La souche *B. dorei* produit du CO *in vivo*, soulignant l'importance de l'environnement dans l'activité de production de CO déjà supposée d'après la littérature et nos résultats *in vitro*. Des gènes impliqués dans l'excrétion du CH de l'organisme vers les selles sont surexprimés chez ces souris et celles colonisées avec *P. distasonis*. Cependant seules ces dernières présentent une cholestérolémie plus faible que les souris conventionnalisées. Le mécanisme impliqué semble indépendant de la production de CO et de l'excrétion de CH car les mêmes quantités de ces composés sont retrouvées dans les selles indépendamment du statut bactérien. Les concentrations en acides biliaires totaux dans la bile et dans les selles sont supérieures pour les souris monocolonisées comparées au conventionnalisées. Les selles des souris colonisées avec *P. distasonis* présentent plus d'acides urso- et chénodésoxycholiques que les souris conventionnalisées et plus d'acide cholique que les souris colonisées avec *B. dorei*.

En conclusion, nous avons isolé de nouvelles souches et identifier des clones potentiellement positifs. Les études *in vivo* tendent à montrer que l'activité de production de coprostanol n'a pas d'effet sur la cholestérolémie. En revanche, la souche *P. distasonis* semble diminuer la cholestérolémie par un mécanisme encore inconnu.

Title: Cholesterol conversion into coprostanol by bacteria from human gut microbiota and its impact on cholesterolemia

Keywords: Microbiology, Cholesterol, Coprostanol, Gnotobiology, Host physiology, gut microbiota

Abstract: Cholesterol (CH) level management is a keystone to limit cardiovascular diseases. The contrasted efficiency of the drugs currently available as well as the interest around the intestinal microbiota in regulating the host physiology lead us to consider this pathway as a therapeutic alternative. The production of coprostanol (CO), a very poorly absorbed CH derivative, by bacteria of this microbiota has been positively correlated with low CH plasma level. The aims of this thesis are (i) isolate and identify new bacterial strains possessing this activity, (ii) identify the bacterial genes responsible for this transformation and (iii) determine the impact of this metabolism on host physiology.

We isolated 22 new strains producing CO from the stools of a high-coprostanol producing individual. We chose *Bacteroides* sp. D8 and *Bacteroides* sp. BV for the construction of two genomic libraries and eight others for *in vivo* implantation tests in the gastrointestinal tract (GIT) of germ-free mice. We identified 55 potentially positive clones by functional screening of these genomic libraries. Their additional analyzes should provide us with information about the genes involved in this activity. All selected bacteria are capable of colonizing the GIT of germ-free mice. *Parabacteroides distasonis* is the best strain producing CO *in vivo*. We tested its effect on blood cholesterol level in germ-free mice subjected to an 11-week CH-rich diet compared to an *in vitro* non-producing strain, *B. dorei*, and with conventionalized mice as control. The *B. dorei* strain produces CO *in vivo*, emphasizing the importance of the environment in the CO production activity already assumed from the literature and our results *in vitro*. Genes involved in the excretion of CH from body to feces are overexpressed in these mice and those colonized with *P. distasonis*. However, only the latter have lower cholesterolemia than conventional mice. The mechanism involved appears to be independent of CO production and CH excretion because the same amounts of these compounds are found in feces independently of bacterial status. Total biliary acids concentrations in bile and feces are higher for monocolonized mice compared to conventionalized mice. The feces of mice colonized with *P. distasonis* exhibited more urso- and chenodeoxycholic acids than conventionalized mice and more cholic acid than mice colonized with *B. dorei*.

In conclusion, we have isolated new strains and identified potentially positive clones. *In vivo* studies tend to show that coprostanol production activity has no effect on plasma cholesterol. In contrast, *P. distasonis* seems to decrease plasma cholesterol by a still unknown mechanism.

