



HAL
open science

Influence de la consommation alimentaire en sucre sur la sévérité de la colite chez l'animal et modulation du microbiote intestinal

Djésia Arnone

► **To cite this version:**

Djésia Arnone. Influence de la consommation alimentaire en sucre sur la sévérité de la colite chez l'animal et modulation du microbiote intestinal. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0247 . tel-03274646

HAL Id: tel-03274646

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03274646v1>

Submitted on 30 Jun 2021

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Djésia Arnone**

Influence de la consommation alimentaire en sucre sur la sévérité de la colite chez l'animal et modulation du microbiote intestinal

Le 15 Décembre 2020

Membres du jury

Rapporteurs :	Mme Francisca JOLY	PU-PH, Gastroentérologie, MICI et Assistance Nutritive, Hôpital Beaujon, Inserm U1149, Clichy, France
	M. Abdelilah WAKKACH	DR CNRS, Laboratoire de PhysioMédecine Moléculaire, Université Côte d'Azur, Nice, France
Examineurs :	Mme Brigitte LEININGER-MULLER	PU, Inserm U1256, Université de Lorraine, Nancy, France
	M. Laurent PEYRIN-BIROULET Directeur de thèse	PU-PH, Gastroentérologie, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, Inserm U1256, Nancy, France
Invités :	M. Franck HANSMANNEL Co-directeur de thèse	MCU, Inserm U1256, Université de Lorraine, Nancy, France
	M. Jean-Yves JOUZEAU	PU-PH, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, UMR 7635 CNRS-UL, Nancy, France
	Mme Véronique REGNAULT	DR, UMR1116 Inserm - Université de Lorraine, Nancy, France
	M. David MEYRE	PU-PH, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, Inserm U1256, Nancy, France

UMR1256 INSERM, Laboratoire de Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux (NGERE), 9 avenue de la forêt de Haye – Campus Santé 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

« C'est parce qu'il y a un vrai danger, de vrais échecs, une vraie damnation terrestre, que les mots de victoire, de sagesse ou de joie ont un sens. »

Simone de Beauvoir

Remerciements

Ce travail signe la fin de près de quatre années de travaux, mais il est aussi et surtout le fruit d'innombrables rencontres. Je souhaite ici remercier toutes celles et ceux qui m'ont soutenue au cours de cette période.

Je remercie tout d'abord la **Fondation pour la Recherche Médicale** pour avoir permis de financer mon travail. Je suis particulièrement fière que ces travaux aient obtenu un financement de la part d'un organisme reconnu d'utilité publique, uniquement basé sur les dons et legs qu'elle reçoit.

Mes remerciements vont ensuite à chacun des membres du jury, présidé par le **Pr Brigitte Leininger-Muller**. Pour m'avoir fait l'immense honneur d'être les rapporteurs de ce travail, je remercie le **Pr Francisca Joly** et le **Dr Abdelilah Wakkach**. Pour avoir eu la gentillesse de participer à ce jury, je remercie également le **Pr Jean-Yves Jouzeau**, le **Dr Véronique Regnault** et le **Pr David Meyre** pour leurs expertises.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à mon directeur de thèse le **Pr Laurent Peyrin-Biroulet** pour m'avoir fait confiance pour ce projet et les suivants ! J'ai eu la chance de bénéficier de toute ton expérience, de ta disponibilité et ta compréhension malgré tes nombreuses activités, soit assuré de mon plus grand respect. Merci pour toutes les responsabilités que tu m'as confiées et l'ensemble des opportunités que tu m'as offertes ainsi que ton soutien et ta motivation à toute épreuve que j'admire très sincèrement. Toute ma reconnaissance également au **Dr Franck Hansmann** qui a co-dirigé ce travail et qui m'a encouragée à poursuivre en thèse.

Je remercie très sincèrement les membres de mon comité, qui m'ont suivie et accompagnée avec la plus grande bienveillance, le **Pr Franck Galland** avec lequel les échanges ont été parmi les plus constructifs et le **Pr Jean-Yves Jouzeau**, que j'ai retrouvé avec plaisir à chaque conseil scientifique et pour qui j'éprouve la plus grande admiration depuis de nombreuses années, votre soutien a été plus important que vous ne l'imaginez et je vous en remercie chaleureusement.

Merci également au laboratoire NGERE Inserm U1256 dirigé par le **Pr Jean-Louis Guéant** qui m'a accueillie dans un laboratoire profondément humain où les compétences sont si nombreuses. Merci au **Pr David Meyre**, dont la rencontre récente me fait presque regretter de terminer mon séjour au laboratoire ainsi qu'au **Pr Jean-Pierre Bronowicki** et l'association des chefs de service du CHRU de Nancy pour le financement de nombreuses expérimentations.

Ce travail est également le fruit de différentes collaborations extérieures que je souhaite vivement remercier ici : le **Dr Marie Vallier** pour son analyse de nos données microbiote, on ira fêter ça quand tu reviendras à Nancy je l'espère ! Merci également à **Aurélie Aubertin** et au **Dr Marie-France Champy** pour l'accueil chaleureux que vous m'avez fait à l'institut clinique de la souris de Strasbourg pour notre dosage des cytokines, ce fut un plaisir et j'espère que mon prochain séjour chez vous sera un peu plus long. De même, je remercie **Nathalie Nicot** et l'équipe Protéome et Génome du Luxembourg Institute of Health pour le microarray. Merci également à l'équipe du **Dr Mathias Chamaillard** pour son accueil à l'institut Pasteur de Lille. Enfin, merci aux **Drs Aude Bressenot-Marchal** et **Hélène Busby** pour leur expertise histologique.

Je voudrais tout particulièrement remercier le **Dr Tunay Kökten**, sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir. Merci pour tout, tu as toujours été là, ton aide inconditionnelle et fraternelle a été si précieuse. Tu m'as tout appris, on a toujours pu compter l'un sur l'autre même les week-ends et je t'en serais éternellement reconnaissante.

Mille mercis ne suffiraient pas pour exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à deux femmes exceptionnelles qui m'ont accompagnée le **Dr Natacha Dreumont** et **Pr Brigitte Leininger-Muller**. Vous ne mesurez probablement pas à quel point votre présence presque maternelle a été précieuse toutes ces années. Merci pour les sourires, le temps que vous m'avez consacré à la paillasse pour Natacha, ta patience m'impressionnera toujours et les discussions toujours bienveillantes avec vous Brigitte. Merci à vous, je n'oublierai jamais tout ce que vous avez pu faire pour moi.

Merci également au **Dr Ndeye Coumba Ndiaye**, pour ta disponibilité et ta réactivité malgré mes questions à répétition, pour tes conseils et ton soutien dans les situations délicates ont été précieux. De même, merci au **Dr Anne Sapin**, sur qui j'ai toujours pu compter, tes conseils, ta douceur et nos discussions rassurantes m'ont aidée à tenir le coup.

Un IMMENSE merci au **Dr Jean-Marc Alberto**, notre sauveur à tous ! Disponible en toutes circonstances, dont l'accent chantant et le sourire sont un cadeau inestimable ! Je te dois des années de tiramisu et c'est promis je n'oublie jamais. Je remercie également toute l'équipe technique **Aurélié Robert, Jérémie Raso, Amélia Julien, Pierre Rouyer** et **Rémy Umoret**. Je sais que je n'ai pas été facile tous les jours mais je vous suis reconnaissante de toute l'aide que vous avez pu m'apporter.

Encore merci à **Sébastien Hergalant** même si je n'ai pas arrêté de te le répéter, je te remercie pour les longues heures à me réexpliquer parfois plusieurs fois la même chose sans t'agacer, pourtant on sait tous comme je peux être « insistante » dirons-nous mais tu m'as permis de m'initier brièvement à la bio-informatique en gardant tous mes cheveux et j'espère que nous aurons d'autres occasions de travailler ensemble.

En espérant n'oublier personne mais notre unité est très grande ! Je remercie également le **Pr Carine Pourié** pour ton soutien, **Dr Grégory Pourié** merci infiniment pour ton aide avec mes souris, **Dr David Coelho** pour nos échanges souriants et ton soutien, **Dr Céline Chéry** reçois toute mon admiration pour ta persévérance et ton travail acharné, **Dr Isabelle Koscinski** pour nos quelques discussions toujours enrichissantes, **Dr Shyue-Fang Hsu-Battaglia** et **Dr Farès Namour** qui me demandent toujours chaleureusement comment ça va, **Dr Julien Broséus** pour ces petits moments du quotidien au laboratoire et nos discussions rassurantes. Merci également au **Pr Didier Quilliot** pour son aide et avec qui j'ai véritablement adoré discuter des perspectives de ce travail. Enfin, force et honneur aux doctorants du labo et merci pour leur aide à ceux qui sont déjà partis : **Racha Zgheib, Lynda Saber-Cherif, Jérémy Willekens, Pauline Dimofski, Vincent Bijan-Haghn, Maëlle Quéré, Marion Divoux, Célia Schellenberg** et **Marie Muller** ne t'inquiètes pas ça va aller, merci infiniment pour ton aide sur ce manuscrit et on fête ça très vite c'est promis. Merci à tous mes stagiaires, tout particulièrement notre princesse **Caroline Chabot** que je n'ai pas réussi à retenir en thèse ! Force à **Pauline Billard** depuis Lyon, et **Anne-Charlotte Dupont** merci de votre soutien, c'est bientôt votre tour !

Un tout grand merci à ma camarade de thèse, **Pauline Mosca**, ma Blanche-Neige ! On l'a fait ! Si on avait su... Quand j'y repense il y a 4 ans rien ne nous prédestinait à tout ça mais rien que pour t'avoir rencontré ça en valait la peine. Covid oblige je ne pourrais pas te serrer dans mes bras mais le cœur y est ! Quel meilleur binôme de travail aurais-je pu espérer ?! merci d'avoir été là Pau, vraiment.

Merci également à **Myriam Choukour**, l'équivalent de notre sauveur du labo mais versant CHRU ! Reçois toute mon admiration pour ton travail aux côtés de Laurent et ta présence rayonnante en toutes circonstances !

De même, je souhaite remercier toutes les personnes de l'université qui m'ont apporté leur aide très souvent, le **Dr David Moulin** qui m'a sauvée plusieurs fois et fait gagner un temps précieux pour le broyage de mes échantillons notamment. Merci au **Dr Kevin Carrasco** et **Dr Amir Boufenzer** même si mes talons aiguilles vous ont embêtés à l'étage du dessous vous êtes toujours disponibles merci beaucoup ! Merci au **Dr Huguette Louis** qui est restée parfois très tard au laboratoire pour moi.

Enfin, toutes ces années n'auraient pas été les mêmes au laboratoire sans notre superbe équipe du secrétariat toujours le mot pour rire et reconforter, vous me manquerez terriblement **Mamie Lyne, Docteur Fred** et **Catherine** !

Sur une note plus personnelle encore, je dédie ce travail à **mon père**, je sais que tu n'y comprends pas grand-chose à tout ce parcours tumultueux mais ta plus grande « n'a pas fini de t'en faire voir » comme tu dis toujours. Je suis toujours trop audacieuse, toujours impatiente et excessivement obstinée (comme toi) mais j'espère que tu en es fière aujourd'hui. Puisse le ciel te laisser vieillir encore longtemps à mes côtés Papa.

À **mes sœurs Nafissa, Lamria, Meïssa, Essia, Anissa** : mes (trop) longues études nous ont éloignées mais j'espère que vous serez fière de moi comme je suis fière d'être à la tête d'une si belle famille, gardez la tête haute les filles, et puis on est toutes les six ! Tout commence par relever la tête, et ne jamais baisser les bras. À ma cousine **Vanessa** et ses enfants, **Alicia et Lucas**, merci pour ton soutien indéfectible ma chérie. Tu es la grande sœur que je n'ai jamais eue tu le sais.

Merci à ma (presque) belle-famille : **Françoise** et **Michel Teboul** pour l'accueil inespéré dans votre si belle famille, vos encouragements toutes ces années. Sans oublier mes belles-sœurs, **Loreline** qui est venue me réajuster pendant la rédaction de ce long travail et qui m'a accueillie à Paris lors de mes formations où l'on a pu rendre visite à **Alice, Arnaud** et leurs enfants. Merci à tous, sincèrement.

Les amis c'est une famille que l'on choisit et j'ai la meilleure qui soit alors merci à **Cécile** et **Baptiste** ainsi que **Laurent** et **Valérie** pour toutes les soirées partagées à vos côtés, à **Pascal** également, notre bucheron alsacien qu'on aime tant ! Savoir que l'on peut compter sur vous en toutes circonstances, pour un apéro comme pour un coup de main et un soutien sans faille, c'est rare et je souhaite à chacun d'avoir des amis en or tels que vous.

Merci également à toute mon équipe de bénévoles de l'association BARF-ASSO, **Céline, (Cris)Tina, Aline, Gaby, Cam, Maïa, Stéphanie, Iseult, Mel, Marie**. Mon absence liée à ce travail n'a pas été sans conséquences pour vous et je vous remercie du fond du cœur d'avoir tenu l'asso !

Merci du fond du cœur au **Dr Sylvia Morand**, la véto qui a changé ma vie et m'a aussi beaucoup aidée à ne rien lâcher durant ces longues années de thèse et qui m'a ouvert les yeux sur un monde insoupçonné qui me terrifiait.

Aussi et surtout, à ceux qui ne pourront jamais lire ceci mais qui continuent de veiller sur moi ici-bas ou de là-haut. Merci de m'avoir tant appris, de m'avoir apaisée et donné une force dont je ne savais même pas être capable, merci de votre patience et de votre indulgence, merci d'avoir tant donné mes bébés.

Enfin, au pilier de mon équilibre, **Guillaume**, mon tout, merci d'avoir supporté tout cela et tout ce que nous avons traversé ensemble depuis bientôt 15 ans. Notre nouvelle vie commence enfin, et je crois qu'on l'a bien mérité tous les deux. Je t'aime.

Liste des communications et publications

PUBLICATIONS

Arnone D, Vallier M*, Hergalant S*, Chabot C, Marchal-Bressenot A, Louis H, Alberto J-M, Boulard O, Ndiaye NC, Sapin A, Dreumont N, Hansmannel F, Chamaillard M, Kökten T, Peyrin-Biroulet L. **Deleterious effects of high sucrose diet on the intestine.** *Manuscript submitted - Gut*

Kökten T, Hansmannel F, Ndiaye NC, Heba A-C, Dreumont N, **Arnone D**, Peyrin-Biroulet L. **Dietary restriction as a new treatment of inflammatory diseases.** *Adv Nutr.* 2021 Feb 8:nmaa179. doi: 10.1093/advances/nmaa179.

Muller M, Broséus J, Feugier P, Thieblemont C, Laurent B, Danese S, **Arnone D**, Ndiaye NC, Kökten T, Houlgatte R, Peyrin-Biroulet L. **Characteristics Of Lymphoma In Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review.** *J Crohns Colitis.* 2020 Sep 19:jjaa193. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa193

Fauny M, Moulin D, D'Amico F, Netter P, Petitpain N, **Arnone D**, Jouzeau J-Y, Loeuille D, Peyrin-Biroulet L. **Paradoxical gastrointestinal effects of interleukin-17 blockers** *AnnRheumdis* 2020; 217927. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-217927

Muller M, Hansmannel F, **Arnone D**, Choukour M, Ndiaye NC, Kökten T, Houlgatte R, Peyrin-Biroulet L. **Genomic and molecular alterations in human inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer.** *United European Gastroenterol J.* 2020 Jul;8(6):675-684. doi: 10.1177/2050640620919254.

POSTERS / COMMUNICATIONS ORALES :

Arnone D, Dreumont N, Leininger-Muller B. **Le sucre dans tous ses états.** *Communication affichée Journée portes ouvertes Faculté de Pharmacie de Nancy 2020*

Arnone D, Chabot C, Kökten T, Hansmannel F, Peyrin-Biroulet L. **Influence of weight and nutritional status on the severity of colitis in mice: Role of the intestinal microbiota.** *Communication orale 10 min. Journée de la Recherche Sciences du Vivant – Faculté des Sciences et Technologies de Nancy 2019*

Arnone D. **Sucreries et MICI, le bonheur et dans la flore intestinale !** *Article de vulgarisation scientifique. Journal de l'association de doctorants de l'Université de Lorraine n°13 – 2^{ème} semestre 2018. Edition spéciale « La place des femmes dans les sciences » 2018.*

Arnone D, Kökten T, Hansmannel F, Peyrin-Biroulet L. **Impact de l'apport calorique alimentaire sur l'inflammation intestinale chez la souris.** *Communication orale 30 min. Journée Pharma-Recherche 2018, Faculté de Pharmacie de Nancy.*

Hansmannel F, Kökten T, Melhem H, **Arnone D**, Peyrin-Biroulet L. **Recherches sur la physiopathologie des MICI.** *Communication affichée Bus MICI & moi – MICILOR Réseau Lorrain des maladies inflammatoires chroniques intestinales – CHRU Nancy 2017.*

SOMMAIRE

Liste des figures	4
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Partie 1 INTRODUCTION	11
1. Obésité, surpoids et habitudes alimentaires	12
1.1. Industrialisation de l'alimentation.....	13
1.2. Rappels concernant les sucres	17
1.3. Définitions du surpoids et de l'obésité	20
1.4. Physiopathologie de l'obésité.....	21
1.5. Pathologies associées à l'obésité.....	23
1.6. Système immunitaire et métabolisme au cours de l'obésité.....	25
2. Interface digestive et microbiote intestinal	29
2.1. La muqueuse digestive	29
2.2. Le microbiote intestinal.....	37
3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....	53
3.1. Épidémiologie descriptive.....	53
3.2. Maladie de Crohn (MC)	54
3.3. Rectocolite hémorragique (RCH).....	55
3.4. Physiopathologie des MICI.....	56
3.5. Facteurs génétiques	57
3.6. Facteurs de risque environnementaux et MICI	58
3.7. Microbiote et MICI	59
3.8. Mécanismes cellulaires	61
3.9. Prise en charge des MICI	66
Partie 2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	68
Partie 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES	72
1. Expérimentation animale.....	73
1.1. Choix du modèle animal	73
1.2. Conditions d'élevage.....	73
1.3. Protocole préliminaire MICICAL 2017	74
1.4. Protocole MICICAL 2018.....	74
1.5. Protocole MICICAL 2019.....	75
1.6. Prélèvements <i>in vivo</i>	76
1.7. Traitement colitogène.....	76
1.8. Score clinique d'inflammation	77
1.9. Mesure de la perméabilité intestinale.....	77
1.10. Examen coloscopique.....	77
1.11. Prélèvements et préparation des échantillons biologiques	79
2. Étude histologique.....	79
3. Dosage de la lipocaline fécale	79
4. Étude des cellules immunitaires intestinales et spléniques	81
4.1. Préparation des échantillons.....	81
4.2. Cytométrie en flux.....	81

5.	Analyses par Western blot.....	83
5.1.	Broyage des tissus et extraction des protéines	83
5.2.	Dosage des protéines	84
5.3.	Électrophorèse et immunodétection	84
6.	Analyses sanguines	86
7.	Dosage des cytokines	86
7.1.	Préparation des échantillons de côlon	86
7.2.	Immunoessai Bio-plex.....	87
8.	Analyse transcriptomique.....	88
8.1.	Extraction d'ARN	88
8.2.	Puces à ADN	89
8.3.	Analyses transcriptomiques.....	89
9.	Étude du microbiote intestinal.....	90
9.1.	Séquençage ARNr 16s	90
9.2.	Dosage des métabolites bactériens acides gras à chaînes courtes (AGCC)	92
10.	Modèle <i>ex vivo</i> d'épithélium intestinal	93
10.1.	Culture cellules Caco-2	93
10.2.	Viabilité des cellules selon les conditions de culture	93
10.3.	Immunofluorescence	94
10.4.	Étude de perméabilité.....	95
11.	Analyses statistiques	96
Partie 4 RÉSULTATS.....		97
1.	Protocole préliminaire effet différentiel des régimes hypercaloriques	98
1.1.	Conséquences de la consommation des régimes hypercaloriques	98
1.2.	Conséquences sur la colite chimio-induite.....	101
1.3.	Étude du score endoscopique	102
1.4.	Analyse protéique par Western-Blot dans la muqueuse colique.....	104
1.5.	Étude du microbiote fécal	108
2.	Conséquences de la consommation du régime hyperglucidique.....	112
2.1.	Conséquences de la consommation d'un régime enrichi en sucre	112
2.2.	Prédisposition et aggravation de la colite.....	115
2.3.	Transcriptome colique.....	122
2.4.	Altération de la réponse immunitaire	132
2.5.	Dysbiose du microbiote intestinal	139
3.	Réversibilité partielle des effets d'une surconsommation de sucre chez la souris.....	150
3.1.	Conséquences de la consommation des régimes	150
3.2.	Conséquences sur la colite expérimentale.....	152
3.3.	Transcriptome colique.....	157
3.4.	Correction partielle de la dysbiose intestinale.....	166
4.	Effet différentiel du glucose et du fructose <i>in cellulo</i>	172
4.1.	Architecture cellulaire	172
4.2.	Perméabilité.....	174

Partie 5 DISCUSSION	175
1. Effet sexe-dépendant de la consommation des régimes hypercaloriques	177
1.1. Effets différentiels des régimes hyperlipidique et hyperglucidique	177
1.2. Effets différentiels des régimes sur la colite chimio-induite	178
1.3. Implication de l'autophagie	179
1.4. Perte de diversité du microbiote intestinal	180
2. Effet du sucre sur l'inflammation intestinale	181
2.1. Surconsommation de sucre et état « pré-MICI »	182
2.2. Surconsommation de sucre et immunodépression	184
2.3. Altération du transcriptome colique	186
2.4. Dysbiose intestinale	187
Partie 6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	190
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	195
ANNEXES	222

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence de l'obésité chez l'adulte dans le monde (OMS, 2017).....	12
Figure 2 : Consommation mondiale de sucre et comparaison des différents types de régimes alimentaires dans le monde (adapté de Barrington <i>et al.</i> , 2018 ; Lustig, Schmidt et Brindis, 2012).	15
Figure 3 : Réaction de glycation des protéines (Jaisson et Gillery, 2018).	16
Figure 4 : Classification des glucides selon leur structure chimique (d'après Cummings et Stephen, 2007).....	17
Figure 5 : Principales entreprises consommatrices de sucre de canne dans le monde en 2017 (D'après Voora <i>et al.</i> , 2019).....	18
Figure 6 : Consommation mondiale en sucre et édulcorants depuis les années 1960 (FAO, 2014).....	19
Figure 7 : Déterminants de l'obésité (Elisha <i>et al.</i> , 2013)..	21
Figure 8 : Obésité, inflammation et pathologies (adapté de Tchernof et Després, 2013 ; Heymsfield et Wadden, 2017)..	24
Figure 9 : Cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative (d'après Dranoff, 2004).....	25
Figure 10 : Régulation de la sensibilité à l'insuline par les cellules immunitaires (D'après Lackey et Olefsky, 2016).....	26
Figure 11 : L'infection induit une insulino-résistance (D'après Chawla <i>et al.</i> , 2011).....	27
Figure 12 : Lien entre le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation dans les cellules spécialisées au cours de l'obésité (d'après Zhang et Kaufman, 2008).....	28
Figure 13 : Aspect histologique de la paroi digestive (Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie et Sokol, 2014).	29
Figure 14 : Anatomie détaillée de la muqueuse intestinale et son système immunitaire (d'après Mowat et Agace, 2014).....	31
Figure 15 : Barrière épithéliale et système immunitaire intestinal (d'après Magalhaes, Tattoli et Girardin, 2007).....	32
Figure 16 : Activation de l'immunité dans la muqueuse intestinale (adapté de Khor <i>et al.</i> , 2011; Turner, 2009).....	33
Figure 17 : Tolérance immunitaire (a) et réponse à une infection digestive (b) (adapté de Mowat 2003).	35
Figure 18 : Arbre phylogénétique des différentes espèces bactériennes (Cassard et Thomas, 2019). .	38
Figure 19 : Facteurs modulant le microbiote intestinal de l'enfant selon les différents stades de vie (d'après Milani <i>et al.</i> , 2017).....	39
Figure 20 : Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans le tube digestif (adapté de Sartor 2008).	40
Figure 21 : Facteurs modulateurs et évolution de la composition du microbiote intestinal au cours de la vie (adapté de Nagpal <i>et al.</i> , 2018 ; Vaiserman, Koliada, et Marotta, 2017)..	41
Figure 22 : Barrière immunitaire intestinale : coopération de nombreux mécanismes conjointement à la colonisation bactérienne de l'intestin (Gaboriau-Routhiau et Cerf-Bensussan, 2016)..	44
Figure 23 : Digestion des glucides par le microbiote intestinal (El Kaoutari <i>et al.</i> , 2014).	46
Figure 24 : Digestion microbienne des protéines (Marteau et Doré, 2017).	47
Figure 25 : Facteurs modulant l'homéostasie intestinale chez l'adulte (adapté de Marteau et Doré, 2017 ; Konkel, 2013).....	48
Figure 26 : Effets physiologiques des prébiotiques sur la flore intestinale (d'après Delzenne et Cani, 2008).....	49
Figure 27 : Incidence des MICI dans le monde en 2015 (d'après Kaplan, 2015).....	53

Figure 28 : Progression de l'incidence de la MC entre 1988 et 2008 dans la population des moins de 20 ans (A) et évolution de l'incidence de MC selon l'année de naissance (B) (Registre EPIMAD – Observatoire National de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique).....	54
Figure 29 : Étiologie des MICI et mécanismes physiopathologiques impliqués (d'après Kaplan et Ng, 2017; Rogler, 2013).....	56
Figure 30 : Facteurs impliqués dans le développement des MICI (adapté de Ananthakrishnan, 2015).58	
Figure 31 : Dysbiose intestinale observée chez les patients atteints de MICI (d'après Kökten <i>et al.</i> , 2016).	59
Figure 32 : Comparaison microbiote intestinal "sain" au microbiote observé chez les patients atteints de MICI (adapté de Peterson <i>et al.</i> , 2008).....	60
Figure 33 : Comparaison entre une muqueuse saine et inflammée atteinte de MICI (d'après Sommer <i>et al.</i> , 2017).	61
Figure 34 : Présentation des trois voies de l'autophagie (d'après Cuervo, 2011).....	63
Figure 35 : Présentation du mécanisme séquentiel de la macro-autophagie (adapté de Patel et Stappenbeck, 2013).	64
Figure 36 : Autophagie et régulation immunologique MICI (Nys <i>et al.</i> , 2013).....	65
Figure 37 : Hypothèse du lien alimentation, microbiote intestinal et MICI (d'après Khalili <i>et al.</i> , 2018)..	70
Figure 38 : Schéma général du projet préliminaire MICICAL 2017.....	74
Figure 39 : Schéma du protocole animal MICICAL 2018.	75
Figure 40 : Schéma du protocole animal MICICAL 2019.	75
Figure 41 : Chronologie des protocoles expérimentaux. Les animaux sont soumis aux régimes à partir de l'âge de la puberté pendant une durée de 8 semaines puis le traitement colitogène est administré durant 5 jours et les animaux sont mis à mort à J10. Les souris non traitées avec le DSS (Sulfate de Dextran Sodique) ont été utilisées comme référence.	76
Figure 42 : Stratégie d'analyse des cellules immunitaires spléniques et coliques.	82
Figure 43 : Représentation schématique d'un immuno-essai Multiplex.....	87
Figure 44 : Étude de l'absorption sur cellules Caco-2 cultivées en monocouche sur Transwell®.....	95
Figure 45 : Suivi de la prise alimentaire chez les mâles (A) et les femelles (B).	98
Figure 46 : Étude de la prise de poids chez les mâles (A) et les femelles (B).....	99
Figure 47 : Analyses sanguines des souris.	100
Figure 48 : Étude des signes cliniques de la colite expérimentale. La perte de poids, la consistance des selles et la présence de sang ont été suivies quotidiennement pour chaque souris.....	101
Figure 49 : Visualisation des images endoscopiques (A-B) et étude des scores endoscopiques de la colite chimio-induite (C-D).....	103
Figure 50 : Étude de l'effet des régimes et du DSS sur l'expression des protéines de l'inflammation dans la muqueuse colique des souris.	105
Figure 51 : Étude de l'effet des régimes et du DSS sur l'expression des protéines de l'autophagie dans la muqueuse colique des mâles.....	107
Figure 52 : Étude de l'effet des régimes et du DSS sur l'expression des protéines de l'autophagie dans la muqueuse colique des femelles..	108
Figure 53 : Étude de l'alpha-diversité du microbiote sur les selles des souris mâles traitées ou non au DSS.....	109
Figure 54 : Effet du temps, du traitement colitogène et des régimes alimentaires sur la Beta-diversité du microbiote fécal des souris mâles.....	110
Figure 55 : Effet du temps et des régimes alimentaires sur la β -diversité du microbiote des souris... 111	
Figure 56 : Consommation alimentaire (A) et hydrique (B) des animaux au cours du protocole expérimental.....	112

Figure 57 : Poids des souris au terme des 8 ou 16 semaines de régime alimentaire..	113
Figure 58 : Étude de la glycémie sanguine des animaux après 8 semaines de régime.....	114
Figure 59 : Étude des signes cliniques de la colite expérimentale.	115
Figure 60 : Visualisation des images endoscopiques (A) et Score endoscopique (B-C).....	116
Figure 61 : Visualisation des coupes histologiques de côlon (A-C) et scores histologiques dans la muqueuse colique des souris (B-D).....	118
Figure 62 : Dosage de la lipocaline-2 sur selles de souris.....	119
Figure 63 : Visualisation de l'aspect et de la taille des colons (A-C). Longueur moyenne des colons en fonction des régimes alimentaires (B-D).....	120
Figure 64 : Étude de la perméabilité intestinale in-vivo.....	121
Figure 65 : Volcano plot représentant les gènes dérégulés au cours de la colite expérimentale.....	122
Figure 66 : Volcano plot représentant les gènes dérégulés chez les souris soumises au traitement colitogène après 8 semaines de régime hyperglucidique vs régime contrôle.....	123
Figure 67 : Principales voies fonctionnelles impactées par le régime hyperglucidique chez les souris au cours de la colite expérimentale.	124
Figure 68 : Principaux gènes sur- ou sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris durant la colite..	126
Figure 69 : Volcano plot représentant les gènes dérégulés chez les souris ayant consommé 8 semaines de régime hyperglucidique vs régime contrôle..	127
Figure 70 : Principales voies fonctionnelles impactées par le régime hyperglucidique chez les souris sans colite expérimentale..	128
Figure 71 : Principaux gènes sur/sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris..	130
Figure 72 : Dosages des cytokines circulantes dans le plasma des souris.....	133
Figure 73 : Dosages des cytokines dans la muqueuse colique des souris..	135
Figure 74 : Visualisation de la taille des rates (A) et étude du poids de la rate (B-C).	136
Figure 75 : Étude des cellules immunitaires dans la rate (A-F) et le côlon (G-I) des souris.....	138
Figure 76 : Influence de la colite expérimentale sur l'alpha-diversité du microbiote fécal des souris.	139
Figure 77 : Influence de la colite expérimentale sur la beta-diversité du microbiote fécal des souris.	140
Figure 78 : Composition du microbiote intestinal au cours de la colite expérimentale..	142
Figure 79 : Influence du régime alimentaire sur l'alpha-diversité du microbiote fécal des souris.....	143
Figure 80 : Influence du régime alimentaire sur la beta-diversité du microbiote fécal des souris..	144
Figure 81 : Composition du microbiote intestinal selon le régime alimentaire.....	145
Figure 82 : Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) significativement modifiées par le régime alimentaire.....	148
Figure 83 : Dosage des acides gras à chaînes courtes dans les selles et le contenu caecal des souris..	149
Figure 84 : Consommation alimentaire (A) et hydrique (B) des animaux au cours du protocole expérimental.	150
Figure 85 : Suivi de la prise de poids des souris au cours des 16 semaines de régime.	151
Figure 86 : Étude des signes cliniques de la colite expérimentale..	152
Figure 87 : Visualisation des images endoscopiques (A) et Score endoscopique moyen (B).....	153
Figure 88 : Visualisation des coupes histologiques de côlon (A-C) et étude des scores histologiques dans la muqueuse colique des souris (B-D).....	154
Figure 89 : Visualisation de l'aspect et de la taille des colons (A-C). Longueur moyenne des colons en fonction des régimes alimentaires (B-D).....	155
Figure 90 : Étude du poids de la rate au cours de la colite expérimentale.	156
Figure 91 : Classification hiérarchique des gènes différentiellement exprimés dans le transcriptome colique des souris nourries avec le régime contrôle, hyperglucidique, et contrôle + hyperglucidique..	161

Figure 92 : Principaux gènes sur/sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris.	163
Figure 93 : Influence des régimes alimentaires sur l'alpha-diversité du microbiote fécal.....	166
Figure 94 : Influence des régimes alimentaires sur la beta-diversité du microbiote fécal.....	167
Figure 95 : Composition du microbiote intestinal selon le régime alimentaire consommé (hyperglucidique, contrôle ou les deux).	168
Figure 96 : Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) identifiées comme modifiées par le régime alimentaire.....	170
Figure 97 : Marquage de la protéine ZO-1 après exposition 24 heures à différents sucres.....	172
Figure 98 : Marquage de la protéine ZO-1 après exposition à des doses croissantes de glucose, fructose ou glucose + fructose.....	173
Figure 99 : Effet de la concentration en sucre (glucose ou fructose) sur la perméabilité du tapis cellulaire.....	174
Figure 100 : Répartition intestinale des cellules immunitaires chez la souris (d'après Mowat et Agace, 2014).....	185
Figure 101 : Bilan des principales conclusions démontrées.....	191
Figure 102 : Rôle de NOD2 dans l'homéostasie et la physiopathologie des MICI (Philpott <i>et al.</i> , 2014).	192
Figure 103 : Schéma expérimental du protocole de transfert de flore.....	193

Liste des tableaux

Tableau I : Exemples de quantité de sucres correspondant à 10% de l'apport journalier selon les niveaux de besoins caloriques (Plamondon et Paquette, 2017)	19
Tableau II : Classification des adultes en fonction de l'IMC (OMS, 2003).....	20
Tableau III : Cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et principales fonctions (d'après Marteau et Doré, 2017).....	30
Tableau IV : Cellules du système immunitaire intestinal (d'après Peterson 2012).	34
Tableau V : Principaux médiateurs de l'inflammation et fonctions principales.	36
Tableau VI : Principales anomalies immunitaires décrites dans les modèles axéniques par rapport aux modèles conventionnels (d'après Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010 ; Marteau et Doré, 2017)	45
Tableau VII : Principales pathologies dans lesquelles une dysbiose intestinale a été observée.....	52
Tableau VIII : Caractéristiques cliniques et anatomiques de la MC et de la RCH (D'après Kökten <i>et al.</i> , 2016).....	55
Tableau IX : Principaux gènes de susceptibilité des MICI et fonctions biologiques associées (d'après Kökten <i>et al.</i> , 2016).	57
Tableau X : Critères utilisés pour calculer le score DAI « Disease Activity Index » (d'après Murthy <i>et al.</i> 1993)..	77
Tableau XI : Critères utilisés pour calculer le score UCEIS : « Ulcerative Colite Endoscopic Index of Severity » (d'après Travis <i>et al.</i> 2012).....	78
Tableau XII : Anticorps et conditions utilisées en Western Blot.	85
Tableau XIII : Sous-scores histologiques. Le score est établi selon l'échelle de Riley <i>et al.</i> , 1991. ...	117
Tableau XIV : Annotations fonctionnelles des gènes dérégulés durant la colite expérimentale chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique vs régime contrôle.....	125
Tableau XV : Annotations fonctionnelles des gènes dérégulés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique vs régime contrôle..	131
Tableau XVI : Dysbiose intestinale au cours de la colite expérimentale.).....	141
Tableau XVII : Dysbiose intestinale provoquée par le régime hyperglucidique.....	146
Tableau XVIII : Principales voies des gènes dérégulés chez les souris nourries avec un régime hyperglucidique, contrôle ou après consommation des deux régimes..	158
Tableau XIX : Annotations fonctionnelles des gènes dérégulés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique, contrôle ou les deux.	165
Tableau XX : Correction partielle de la dysbiose intestinale provoquée par le régime hyperglucidique..	169
Tableau XXI : Études liant le métabolisme glucidique à l'inflammation intestinale chez la souris ...	181

Liste des abréviations

5-ASA : acide 5-aminosalicylique	EPIC : <i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
6-MMP : 6-méthylmercaptapurine	ESPEN : <i>European Society for Clinical Nutrition and Metabolism</i>
6-MP : 6-mercaptapurine	FAO : <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
AAM : macrophage alternativement activé	FC : <i>Fold Change</i>
AFA : Association François Aupetit (Vaincre la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique)	FITC-Dextran : Fluoro-isothiocyanate-Dextran
AG : Acides Gras	GALT : <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
AGCC : Acide Gras à Courte Chaîne	GLP-1 : <i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
AGEs : <i>Advanced Glycation End products</i>	HAS : Haute Autorité de Santé
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens	HBSS ; Hank's Balanced Salt Solution
AIEC : <i>Escherichia Coli</i> Adhérent Invasif	HG : Hyperglucidique
ASCA : Anticorps Anti-Saccharomyces Cerevisiae	HL : Hyperlipidique
ATG : <i>Autophagy-Related Genes</i>	HRP : <i>Horseradish peroxidase</i>
ATM : Macrophage du tissu adipeux	HSC70 = HSPA8 : <i>Heat Shock Cognate protein 70 kDa</i>
BCA : <i>BiCinchoninic acid Assay</i>	HSP90 : <i>Heat Shock Protein 90 kDa</i>
BSA : <i>Bovine Serum Albumin</i>	IFN γ : Interféron γ
CARD15 : <i>Caspase Recruitment Domain-containing protein 15</i>	IgA, IgG : Immunoglobulines A, G
CCL et CXCL : chemokines	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6... : Interleukines
CD : Cellule Dendritique	ILC : Cellules Lymphoïdes Innées
CMA : <i>Chaperone Mediated Autophagy</i>	IMC : Indice de Masse Corporelle
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène	IOIBD : <i>International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases</i>
CREGG : Club de Réflexion des Cabinets et Groupes d'Hépatogastroentérologie	IRGM : <i>Immunity Related GTPase M</i>
CRP : protéine C-réactive	LAMP-2A : <i>Lysosomal Associated Membrane protein 2A</i>
DAI : <i>Disease Activity Index</i>	LB : Lymphocyte B
DEXA : <i>Dual x-ray absorptiometry</i> : absorptiométrie biphotonique à rayons X	LC3 : <i>Light Chain 3</i>
DMEM : <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	LPS : Lipopolysaccharide
DMSO : DiMéthylSulfOxyde	LT : Lymphocyte T
DSS : Dextran Sulfate de Sodium	LTh : Lymphocyte T <i>Helpers</i>
ECCO : <i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>	LT CD4 ⁺ : Lymphocyte T naïf
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique	LT CD8 ⁺ : Lymphocyte T cytotoxique
	MC : Maladie de Crohn
	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
 MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
 MUC : Mucine
 NAFLD : *Non-alcoholic fatty liver disease*
 NK : *Natural killer*
 NLR : *NOD-Like Receptors*
 NOD2 : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2*
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 OTU : *Operationnal Taxonomic Unit*
 TBST : *Tris-Buffered Saline-Tween 20*
 PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*
 pANCA : Anticorps Anti-Neutrophiles Cytoplasmiques périnucléaires
 PE : Phosphatidyl-Ethanolamine
 PGE2 : Prostaglandine E2
 PI3P : Phosphatidylnositol 3-Phosphate
 PI3K : Phosphatidylinositol-3-Phosphate Kinase
 PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyl
 PN : Polynucléaire
 PRR : *Pattern Recognition Receptor*
 PVDF : Polyvinylidene Fluoride
 RAGE : Récepteur aux AGEs
 RCH : Rectocolite Hémorragique
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RIPA : *RadioImmunoPrecipitationAssay*
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
 RR : Risque Relatif
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
 SA-PE : Streptavidine-Phycoérythrine
 SVF : Sérum de veau fœtal
 TEER : *Trans-Epithelial Electric Resistance*
 TG : Triglycérides
 TGF- β : *Transforming Growth Factor*
 TLR : *Toll-Like Receptors*
 TNBS : Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
 TNF- α : *Tumor Necrosis Factor*
 TRUC : T-bet-/- RAG2-/- ulcerative colitis
 UCEIS : *Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity*
 UFC : Unité Formant Colonies
 ULK1 : *Unc-51-Like autophagy activating kinase 1*
 UPR : *Unfolded Protein Response*
 ZO-1 : *Zonula occludens*

Partie 1

INTRODUCTION

1. Obésité, surpoids et habitudes alimentaires

La prévalence du surpoids et de l'obésité n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies en France comme dans le reste du monde, en particulier dans les pays fortement industrialisés (**Figure 1**), et ceci concerne de plus en plus d'enfants et de jeunes adultes (Verdot *et al.*, 2017). Le principal responsable serait notre mode d'alimentation qui s'est profondément transformé depuis environ 50 ans. En effet, selon le dernier rapport de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) concernant les comportements alimentaires des Français, on observe comme dans la plupart des pays européens, une augmentation de la part respective des sucres et des graisses dans la disponibilité calorique totale : jusqu'à 55 % pour les sucres et 40 % pour les graisses (Etievant *et al.*, 2010).

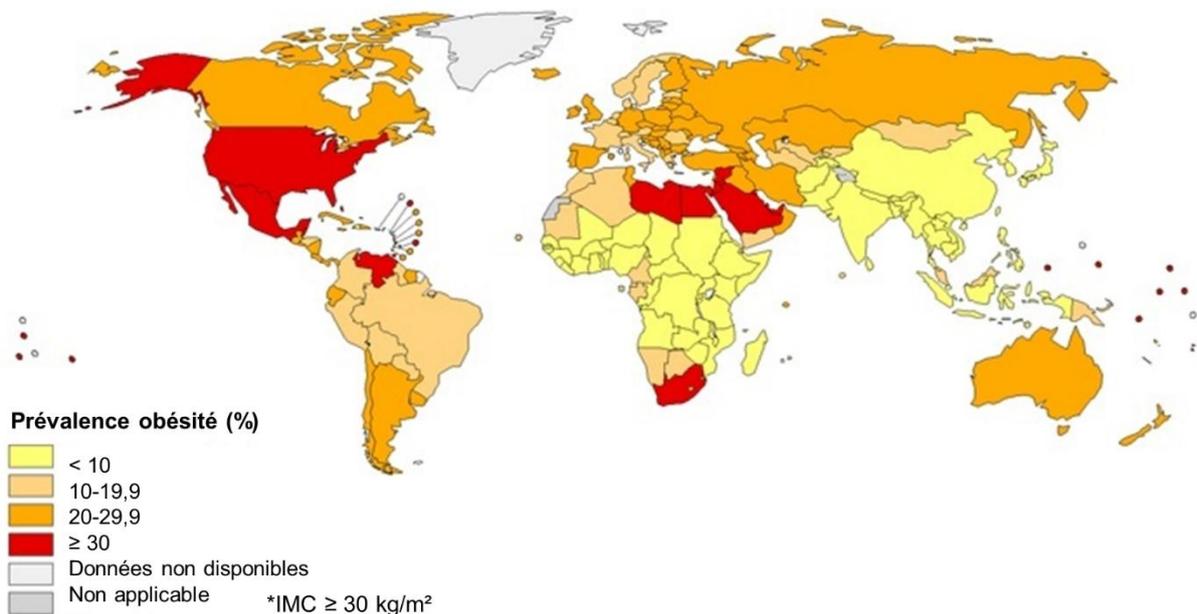


Figure 1 : Prévalence de l'obésité chez l'adulte dans le monde (OMS, 2017). On observe une plus forte prévalence de l'obésité parmi les populations à faibles revenus dans les pays industrialisés. Il existe une légère prédominance féminine, en particulier en milieu urbain, et une corrélation négative avec le niveau socio-économique de ces dernières.

Les pays concernés sont les plus fortement industrialisés, où le mode de vie se traduit par une consommation excessive de graisses saturées et d'oméga-6, une réduction des apports en oméga-3 et une surconsommation de sel, de sucres raffinés et de produits transformés : c'est ce qu'on appelle le régime « *Western diet* » ou régime occidental dans lequel les fast-food et les produits préparés occupent une part importante des apports alimentaires, alors que les fruits et légumes frais sont de moins en moins consommés (Myles, 2014). En effet, plus les aliments sont transformés par l'industrie agro-alimentaire, plus on y retrouve de sucres ajoutés et de graisses saturées (Fardet *et al.*, 2015).

La surcharge pondérale entraînée par la consommation excessive de produits transformés, riches en sucres et en graisses, a pour conséquences la recrudescence de nombreuses pathologies telles que le diabète, des troubles musculo-articulaires, des maladies cardiovasculaires ou encore certains cancers (Hruby et Hu, 2015). D'autre part, sans obligatoirement souffrir de surpoids ou d'obésité, ce phénomène de « malbouffe » est à l'origine d'autres pathologies graves comme la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD pour « *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* »), appelée également « maladie du soda », une pathologie inflammatoire du foie dont la prévalence ne cesse également d'augmenter (Li *et al.*, 2018a). En effet il est important de rappeler que 40 % des personnes avec un poids « normal » souffrent de diabète, d'hypertension ou de NAFLD (Lustig *et al.*, 2012).

En termes de prévalence, le surpoids comme l'obésité augmentent aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement à un rythme alarmant : en 2016, plus de 1,9 milliards d'adultes et près de 340 millions d'enfants et adolescents âgés de 5 à 19 ans étaient en surpoids (Abarca-Gómez *et al.*, 2017). Dans les pays les plus pauvres, il est fréquemment observé que dénutrition et obésité coexistent. En effet, dans les pays d'Afrique et d'Asie en particulier, les populations urbaines sont les plus touchées (OMS, 2003). Selon l'OMS, « d'ici 2022, le nombre des enfants et des adolescents obèses dans le monde sera supérieur à celui des enfants dont le poids est insuffisant » bien que les taux d'obésité se soient relativement stabilisés dans les pays les plus riches.

1.1. Industrialisation de l'alimentation

Selon une étude récente ayant évalué les consommations alimentaires et leurs conséquences sur la santé dans 195 pays du monde, près de 11 millions de décès et 255 millions de vies écourtées seraient attribuables à des facteurs de risques d'origine alimentaire (Afshin *et al.*, 2019). Avant le développement à l'échelle industrielle de l'agriculture et de l'élevage, les choix alimentaires des Hommes étaient limités à des produits peu transformés. En considérant non seulement les qualités nutritives et les types d'aliments disponibles, ainsi que leur quantité consommée, il est évident que l'alimentation s'est industrialisée à mesure que les pays se sont occidentalisés (Cordain *et al.*, 2005).

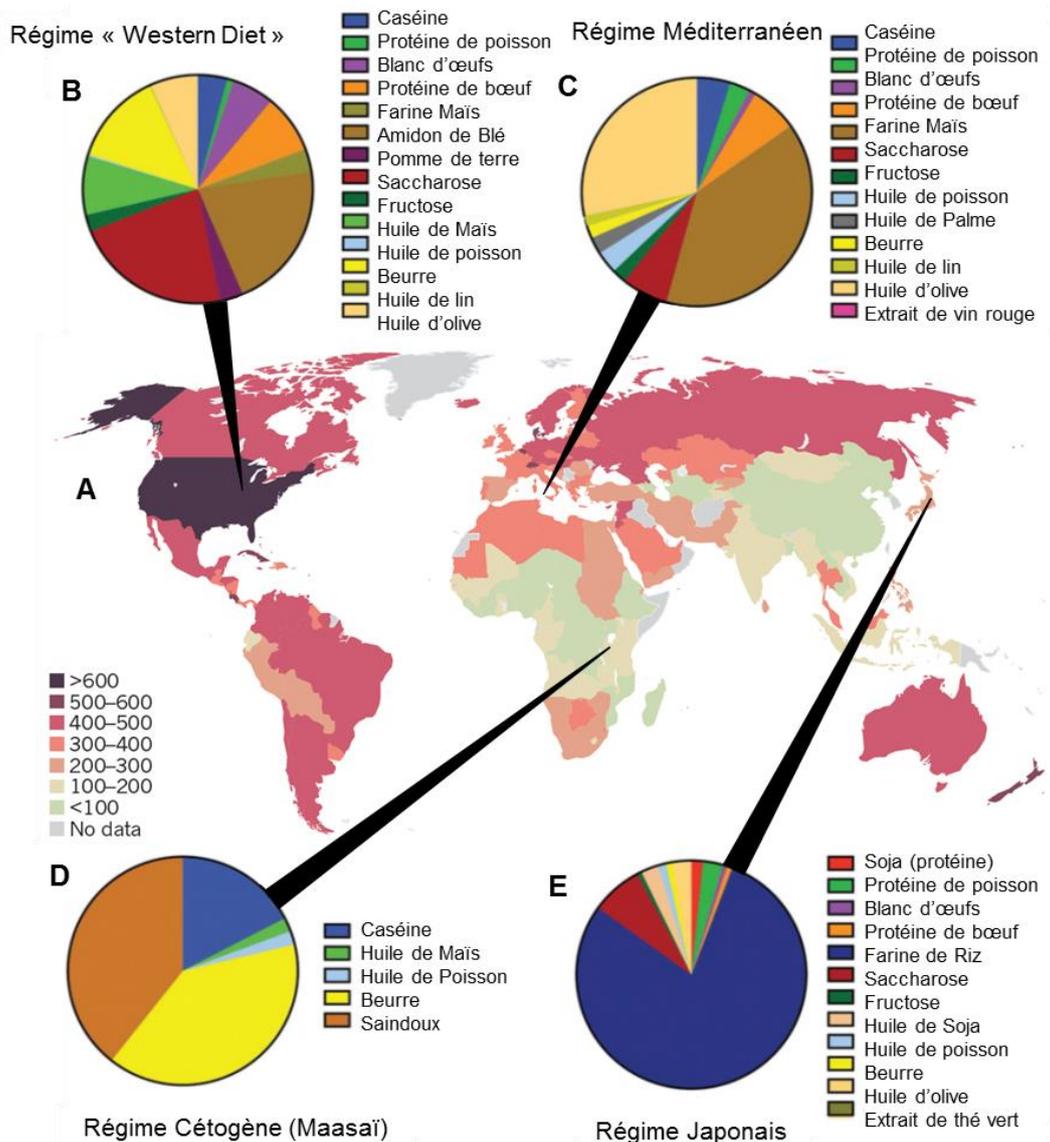
Par exemple, aux États-Unis près de 75% de l'énergie quotidienne totale est apportée par des produits laitiers et céréales transformés, des sucres raffinés, des huiles végétales raffinées et de l'alcool (Cordain *et al.*, 2000), soit 3 calories sur 5 qui proviennent d'aliments transformés/ultra-transformés (Martínez Steele *et al.*, 2016). Les pays d'Amérique ne sont pas les seuls concernés, près de 36% de l'apport énergétique des français est constitué de nourriture ultra-transformée bien que cela reste plus faible qu'au Canada (61,7%) ou en Angleterre (53%) (Julia *et al.*, 2018).

La cohorte Nutrinet Santé a pu établir des liens entre les aliments ultra-transformés et les risques de cancers (Diallo *et al.*, 2018), de syndrome métabolique (Baudry *et al.*, 2018) et de maladies cardiovasculaires (Lelong *et al.*, 2017), ou encore de troubles digestifs (Buscail *et al.*, 2017b, 2017a). En dehors des procédés de transformation (extrusion, hydrogénation) et des additifs (colorants, émulsifiants, texturants), les trois principaux facteurs alimentaires responsables de troubles sur la santé sont la forte teneur en sel, la faible teneur en céréales complètes, en fruits et légumes frais, ainsi que la forte teneur en graisses saturées (aux dépens des acides gras insaturés) (Afshin *et al.*, 2019).

Les études récentes s'intéressent de plus en plus au rôle du sucre dans notre alimentation, bien que peu de liens significatifs n'aient pu être établis, en dehors du risque d'obésité et de diabète (Rippe et Angelopoulos, 2016b). Pourtant, depuis le début de la révolution industrielle dans les pays occidentaux il y a environ 200 ans, la consommation de tous les sucres raffinés n'a cessé d'augmenter si bien qu'elle atteint des sommets sans précédent au cours de l'évolution (Kiple et Ornelas, 2000). Pour rappel, l'OMS recommande un apport maximal de 50 grammes par jour en sucres simples (hors lactose/galactose) pour un adulte et 25 grammes chez l'enfant soit 1/3 des glucides de l'alimentation (10% de la ration énergétique totale) et incite à réduire à 5% ces apports en sucres (Geneva : World Health Organization, 2015). Or les français consomment aujourd'hui près de 100 grammes de sucre par jour, incluant les sucres ajoutés qui contribuent en moyenne à 50% de la consommation en sucre (ANSES, 2009).

Ces sucres pourraient avoir des conséquences chroniques sur le cerveau, le cœur, l'intestin et le foie (Rippe et Angelopoulos, 2016a). Il semblerait d'ailleurs que plus l'exposition à d'importantes quantités de sucre est précoce dans la vie de l'enfant (voire *in-utero*), plus la prédisposition aux maladies non transmissibles augmente (Ronto *et al.*, 2018).

En effet, si on compare les différents types de régimes alimentaires dans le monde, on observe que le sucre occupe une place non négligeable (**Figure 2**). L'industrialisation de l'alimentation s'accompagne d'une augmentation de la teneur en sucre *via* les « sucres cachés » ou sucres ajoutés. Cela concerne particulièrement les produits destinés aux enfants et adolescents (Winpenny *et al.*, 2017).



Un autre phénomène résultant de l'industrialisation de notre alimentation est le traitement thermique des produits alimentaires. En effet, la cuisson à très haute température est l'un des processus de transformation de l'industrie agro-alimentaire en particulier dans les préparations infantiles, afin de garantir leur sécurité et leur durée de vie. Ce traitement thermique génère des produits de glycations avancées (AGEs) par la réaction de Maillard (**Figure 3**).

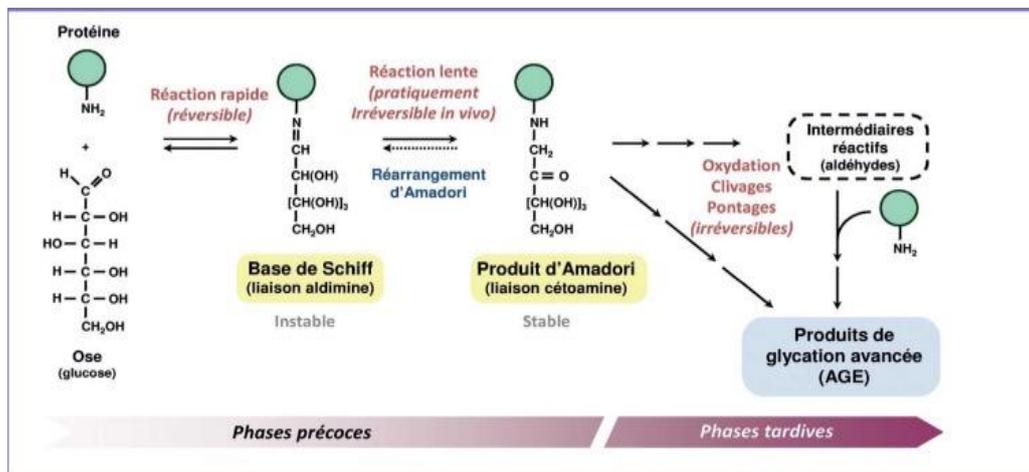


Figure 3 : Réaction de glycation des protéines (Jaisson et Gillery, 2018). Sous action de la chaleur, il y a formation d'une base de Schiff entre le groupement aminé des protéines et les oses dont le glucose. Cette base de Schiff subit ensuite un réarrangement formant alors une cétoamine stable appelée produit d'Amadori. À plus long terme, ce dernier est soumis à de multiples réactions de clivage, d'oxydation, de réticulation, qui vont mener à la formation d'un groupe hétérogène de composés appelés les Produits de Glycation Avancée (AGE, Advanced Glycation End-products).

Ces produits sont également générés *in vivo* en situation d'hyperglycémie et leur accumulation (endogène ou exogène) altère de nombreux processus et induit un stress oxydant et inflammatoire (Prasad *et al.*, 2017).

Les AGEs exogènes peuvent prédisposer à une inflammation à bas bruit et jouent ainsi un rôle dans les maladies chroniques : il a été supposé qu'ils participent aux maladies métaboliques et cardiovasculaires (Baskara *et al.*, 2019). Ainsi, l'activation de cellules immunitaires induit une expression accrue des récepteurs aux AGEs (RAGE), et d'autant plus en présence d'un ligand (Akirav *et al.*, 2014).

1.2. Rappels concernant les sucres

L'apport en glucide chez l'Homme représente entre 45 et 55% de l'apport énergétique total mais seulement 5 à 10% sont des sucres (FAO, 1998). Classiquement, le terme « sucre » fait référence aux mono- et aux disaccharides, c'est-à-dire le glucose, le saccharose et le fructose qui peuvent être naturels ou ajoutés (on parle de « sucres libres »). Parmi ces glucides certains sont dits digestibles d'autres non-digestibles (**Figure 4**). Nous verrons plus loin que ces glucides dits « résistants » ou non glycémiques sont fermentés par les bactéries du microbiote intestinal.

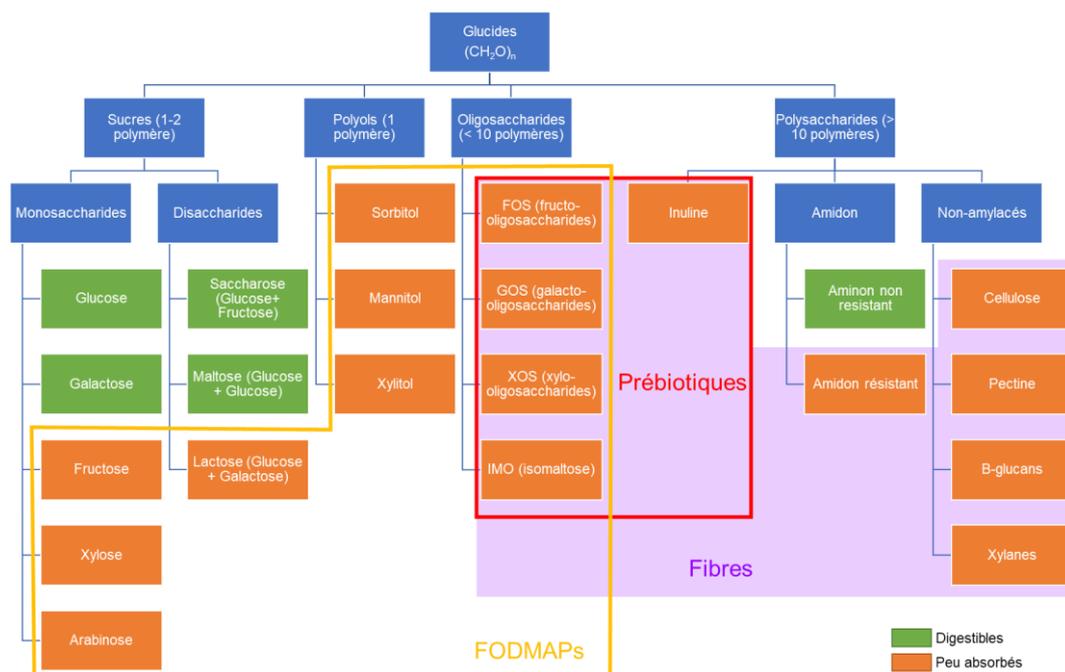


Figure 4 : Classification des glucides selon leur structure chimique (d'après Cummings et Stephen, 2007). FODMAPs : Fermentable Oligo- Di- Mono-saccharides and Polyols. Ce sont des glucides peu absorbés par l'intestin grêle à l'inverse des glucides digestibles dont la fonction principale est de servir de source d'énergie aux cellules.

Les différentes enquêtes alimentaires nationales à travers le monde ont démontré que les pays occidentaux ont pratiquement tous un apport excessif en sucre. Ainsi, sur un échantillon représentatif d'adultes français, 41% dépassent le seuil des 10 % de l'apport total énergétique en sucres recommandés par l'OMS (Lluch *et al.*, 2017). Cette surconsommation en sucres est d'autant plus importante chez les enfants et les adolescents. Par exemple, une étude rapporte qu'aux Pays-Bas, l'apport en sucres représente 34,8 % de l'énergie totale chez les enfants de 4 à 6 ans et 29,6 % chez les adolescentes en Allemagne (Newens et Walton, 2016).

Cette consommation excessive de sucre est principalement liée à l'utilisation de produits alimentaires transformés / ultra-transformés dont la teneur en sucres ajoutés est souvent très importante (Martínez Steele *et al.*, 2016). En effet, les plus grandes entreprises consommatrices de sucre sont des sociétés agro-alimentaires productrices de sodas et sucreries (**Figure 5**).

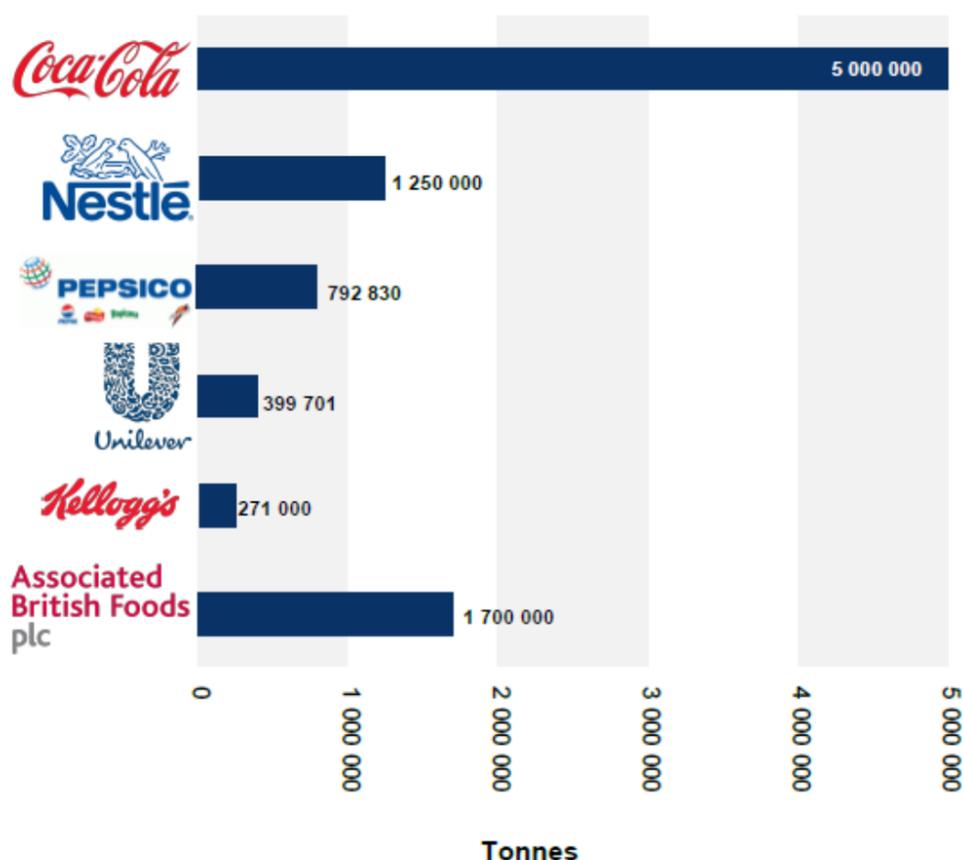


Figure 5 : Principales entreprises consommatrices de sucre de canne dans le monde en 2017 (d'après Voora et al., 2019).

Ainsi, il est relativement difficile de limiter sa consommation en sucres à 100 calories par jour (soit 25 grammes) chez l'enfant, 50 grammes chez l'adulte comme le recommande l'OMS dans la mesure où près de 80% des produits vendus en supermarché en contiennent sous près de 50 appellations : glucose, fructose, dextrose, saccharose, maltose... Par ailleurs, la teneur en sucre d'un même produit peut varier selon le pays de commercialisation : par exemple, avant l'arrêté de la loi Lurel de 2016 (visant à garantir la qualité de l'offre alimentaire en outre-mer) certains produits comme les yaourts pouvaient contenir jusqu'à 22% de sucre ajoutés lorsqu'ils étaient commercialisés en Outre-Mer par rapport à ceux commercialisés en métropole (JO n°0019 du 24 mai 2016).

Tableau I : Exemples de quantité de sucres correspondant à 10% de l'apport journalier selon les niveaux de besoins caloriques (Plamondon et Paquette, 2017)

Besoin quotidien en énergie	Exemples de profils d'individus	Qté max. de sucre recommandée par jour	Aliments dont la teneur totale en sucres ajoutés correspond à l'apport maximal recommandé par jour
3000 calories	- Hommes actifs de 19-30 ans - Hommes actifs de 31-50 ans	75 g \approx (18 c. à thé)	1 tasse de flocons de maïs givrés + 1 tranche de pain + 1 barre granola + 1 boisson pour sportif + 1 barre de chocolat
2700 calories	- Garçons légèrement actifs de 14-16 ans - Hommes légèrement actifs de 19 à 30 ans	68 g \approx (16 c. à thé)	2 tranches de pain + 1 c. à table de confiture + 1 gros berlingot de lait au chocolat + 1 c. à table de <i>ketchup</i> + 3 biscuits au chocolat
2350 calories	- Filles actives de 14-16 ans - Femmes actives de 19-30 ans - Hommes sédentaires de 31-50 ans - Hommes légèrement actifs de 51-70 ans	59 g \approx (14 c. à thé)	1 tasse de flocons de maïs givrés + 1 barre de chocolat + 1 petit yogourt aux fruits + 1 barre granola
2000 calories	- Femmes légèrement actives de 31-50 ans - Hommes sédentaires de 71 ans et +	50 g \approx (12 c. à thé)	1 tranche de pain + ½ c. à table de confiture + 1 canette de boisson gazeuse
1800 calories	- Garçons actifs de 6-7 ans - Fillettes actives de 8-9 ans - Femmes légèrement actives de 51-70 ans	40 g \approx (10 c. à thé)	1 petite bouteille de punch aux fruits + 6 bonbons durs
1500 calories	- Garçons actifs de 2-3 ans, - Fillettes actives de 4-5 ans - Femmes sédentaires de 71 ans et +	37,5 g \approx (9 c. à thé)	1 tasse de flocons de maïs givrés + 1 petit yogourt aux fruits + 1 barre granola

Comme illustré dans le **Tableau I**, on constate que la consommation de boissons sucrées laisse peu de place pour d'autres aliments sucrés. En effet, une canette de boisson gazeuse contient environ 10 cuillères à thé de sucre soit plus de la moitié de la quantité de sucre recommandé chez un adulte légèrement actif de 19 à 30 ans.

Ainsi, de par l'industrialisation de l'alimentation la consommation en sucre est passée de 2 kg par an au XIX^{ème} siècle à 100 grammes par jour environ en France (**Figure 6** ; Grigg, 1999).

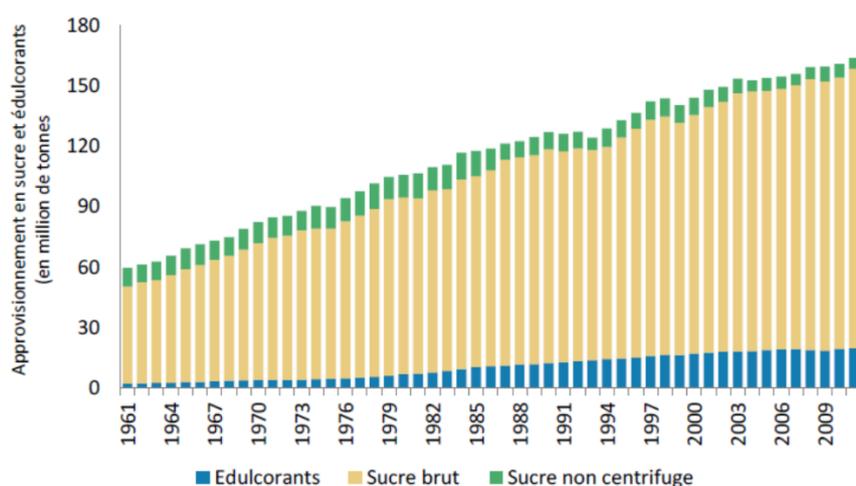


Figure 6 : Consommation mondiale en sucre et édulcorants depuis les années 1960 (FAO, 2014). Cette consommation a pratiquement triplé depuis la 2^{ème} guerre mondiale. Le sucre non centrifuge est un produit résiduel obtenu par évaporation de l'eau contenue dans le jus de sucre de canne.

1.3. Définitions du surpoids et de l'obésité

L'obésité est une maladie chronique, définie comme une accumulation anormale ou excessive de graisse dans les tissus adipeux qui peut nuire à la santé. Elle engendre divers problèmes de santé tels que des troubles métaboliques dont le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle), respiratoires (apnée du sommeil), de l'arthrose et même certains cancers (Hruby et Hu, 2015).

L'indice de masse corporelle (IMC) ou indice de Quételet, constitue la mesure la plus simple du surpoids et la plus couramment utilisée. Bien qu'il ne tienne pas compte des variations interindividuelles en termes de répartition des graisses, il permet une bonne estimation de la prévalence de l'obésité et des risques associés (OMS, 2003). L'IMC est calculé selon la relation suivante et est corrélé à la quantité de masse adipeuse : $IMC = \frac{\text{poids en kg}}{(\text{taille en m})^2}$. À partir de cet indice, des grades d'obésités ont été établis (**Tableau II**).

Cependant, plusieurs publications laissent penser que l'utilisation de l'IMC pris isolément conduit à une sous-estimation de la présence de facteurs de risque (HAS, 2011). Les données les plus récentes en épidémiologie démontrent une prévalence nettement augmentée ces dix dernières années, si bien qu'en France, près de 7 millions de personnes souffrent d'obésité, soit une augmentation de 75 % entre 1997 et 2012 (Matta *et al.*, 2016).

Tableau II : Classification des adultes en fonction de l'IMC (OMS, 2003)

Classification	IMC	Risque de morbidité associée
Insuffisance pondérale	< 18,50	Faible (mais risque accru d'autres problèmes cliniques)
Éventail normal	18,50 – 24,99	Moyen
Surpoids	≥ 25,00	Moyen
Pré-obésité	25,00 – 29,99	Modéré
Obésité de classe I	30,00 – 34,99	Accru
Obésité de classe II	35,00 – 39,99	Important
Obésité de classe III	≥ 40,00	Très important

De plus, ces enquêtes épidémiologiques démontrent un lien entre le surpoids, les catégories socio-professionnelles et l'âge : il semble ainsi qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre le niveau de revenus d'un foyer et la prévalence de l'obésité ; de même, le surpoids touche désormais des patients de plus en plus jeunes (Ng *et al.*, 2014).

En effet, même si les causes de l'obésité sont complexes, le surpoids reste la conséquence d'une alimentation trop riche et d'une baisse de l'activité physique. Cependant, il faut briser les idées reçues concernant l'obésité ou l'excès de poids : il ne s'agit pas d'une simple surnutrition (par opposition à la dénutrition) mais plutôt d'une forme de malnutrition (Delisle, 2017). En France, comme dans la majeure partie des pays fortement industrialisés, les habitudes alimentaires se sont fortement dégradées et ce dès le plus jeune âge si bien que les experts parlent d'un phénomène épidémique mondial. Boissons gazeuses, sandwiches, peu de produits frais et un apport calorique quotidien bien supérieur aux besoins journaliers recommandés ont pour conséquences un surpoids juvénile puis une obésité à l'âge adulte (OMS, 2002).

1.4. Physiopathologie de l'obésité

L'obésité est reconnue comme une maladie depuis 1997, puisque l'obésité altère le bien-être physique, psychique et social des patients (Gatta-Cherifi, 2016). C'est avant tout le résultat d'un échec de mécanismes de régulation (**Figure 7**) : elle résulte de l'ingestion, sur une période relativement longue de trop de calories, accompagnée d'une dépense énergétique insuffisante (Elisha *et al.*, 2013).

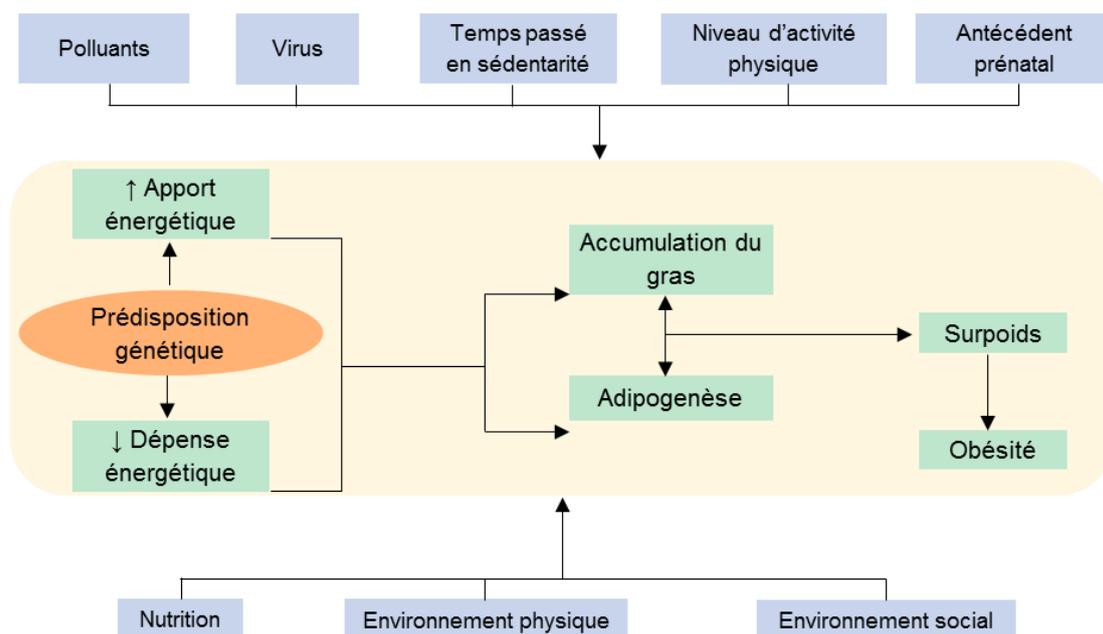


Figure 7 : Déterminants de l'obésité (Elisha *et al.*, 2013). C'est une pathologie multifactorielle résultant de facteurs environnementaux et génétiques mais principalement liée à l'alimentation et au manque de dépense énergétique, favorisant ainsi une balance calorique positive.

En dehors des facteurs génétiques, les principaux responsables restent le comportement alimentaire et physique des patients. L'apport calorique et les dépenses énergétiques nécessaires au maintien d'un poids ou à une croissance saine ont toujours été au centre des préoccupations ; la restriction calorique reste aujourd'hui l'une des priorités des approches de gestion du poids (Hruby et Hu, 2015).

L'obésité débute par une phase « non visible », sans excès de poids, allant de la vie intra-utérine jusqu'au début de la prise de poids. Cette phase préclinique est suivie d'une prise de poids importante mais sans conséquence clinique. La véritable phase d'obésité constituée, durable, chronique s'installe généralement à l'âge adulte (Farah *et al.*, 2012). Avec le vieillissement elle peut aboutir à une diminution de la masse maigre (perte de fonction et de la masse musculaire) : on parle alors d'obésité sarcopénique, particulièrement difficile à prendre en charge (Boirie *et al.*, 2016).

Il existe différents types d'obésité dont principalement l'obésité androïde (abdominale) et gynoïde (autour des hanches). Les risques respiratoires, articulaires et d'infertilité sont les mêmes mais c'est l'obésité androïde qui est la plus à risque de complication métabolique et de diabète (Tchernof et Després, 2013). L'excès de masse grasse résulte à la fois d'une hypertrophie des adipocytes au fur et à mesure qu'ils accumulent des lipides et d'une hyperplasie : la masse du tissu adipeux ne cesse de s'accroître puisque ces cellules ont la capacité de recruter de nouvelles cellules quand elles ne peuvent plus se charger en graisse (Arner *et al.*, 2010).

Cependant, toutes les personnes exposées à un environnement « obésogène » ne deviennent pas obèses. Bien que les estimations varient, le taux d'héritabilité d'un IMC élevé peut aller de 40 à 70% (Bray *et al.*, 2016). On reconnaît 11 formes rares d'obésité monogénique, incluant la déficience en leptine par exemple ou la mutation du gène codant pour le récepteur à la mélanocortine-4, forme la plus courante d'obésité monogénique (Pigeyre *et al.*, 2016).

À ceci s'ajoutent de nombreux mécanismes polygéniques conférant une susceptibilité accrue à l'obésité : différents changements transcriptionnels et traductionnels conditionnés par l'environnement ont été étudiés à l'échelle de l'épigénome, permettant d'élucider des expositions prénatales et postnatales pouvant influencer le profil métabolique des patients (Van Dijk *et al.*, 2015).

1.5. Pathologies associées à l'obésité

L'obésité elle-même est reconnue comme une maladie chronique, définie par une adiposité accrue. Elle s'accompagne d'un syndrome métabolique : plus la quantité de masse grasse augmente, plus l'organisme devient résistant à l'insuline, jusqu'à l'apparition du diabète. Plus de 80 % des diabètes de type 2 peuvent être attribués à l'obésité (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (France), 2008).

Différentes cohortes ont permis de mettre en évidence un lien de causalité entre l'adiposité (corporelle ou abdominale) et certaines pathologies (**Figure 8**) :

- Diabète de type 2 (Guh *et al.*, 2009; Merlotti *et al.*, 2014)
- Cancer (adénocarcinome œsophagien, pancréatique, colorectal, sein, de l'endomètre, du rein...) (Wiseman, 2008)
- Cardiopathies et maladies cardio-vasculaires (hypertension, AVC...) (Guh *et al.*, 2009)
- Maladies hépatiques (SIGN, 2010)
- Troubles ostéoarticulaires (arthrose) (Hsieh *et al.*, 2000; SIGN, 2010)
- Reflux gastro-œsophagien (Nadaletto *et al.*, 2016)
- Fécondité/Fertilité et anomalies fœtales (Mills *et al.*, 2010; National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK), 2004; Tennant *et al.*, 2011)
- Troubles anxiodépressifs (Sutaria *et al.*, 2019)
- Troubles cutanés (maladies veineuses, lymphatiques, mycoses...) (Basdevant et Guy-Grand, 2004)
- Troubles respiratoires (asthme, apnées du sommeil) (Andersen *et al.*, 2019; Bates *et al.*, 2017)
- Troubles rénaux et urinaires (Hawkins *et al.*, 2011; Waetjen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008)

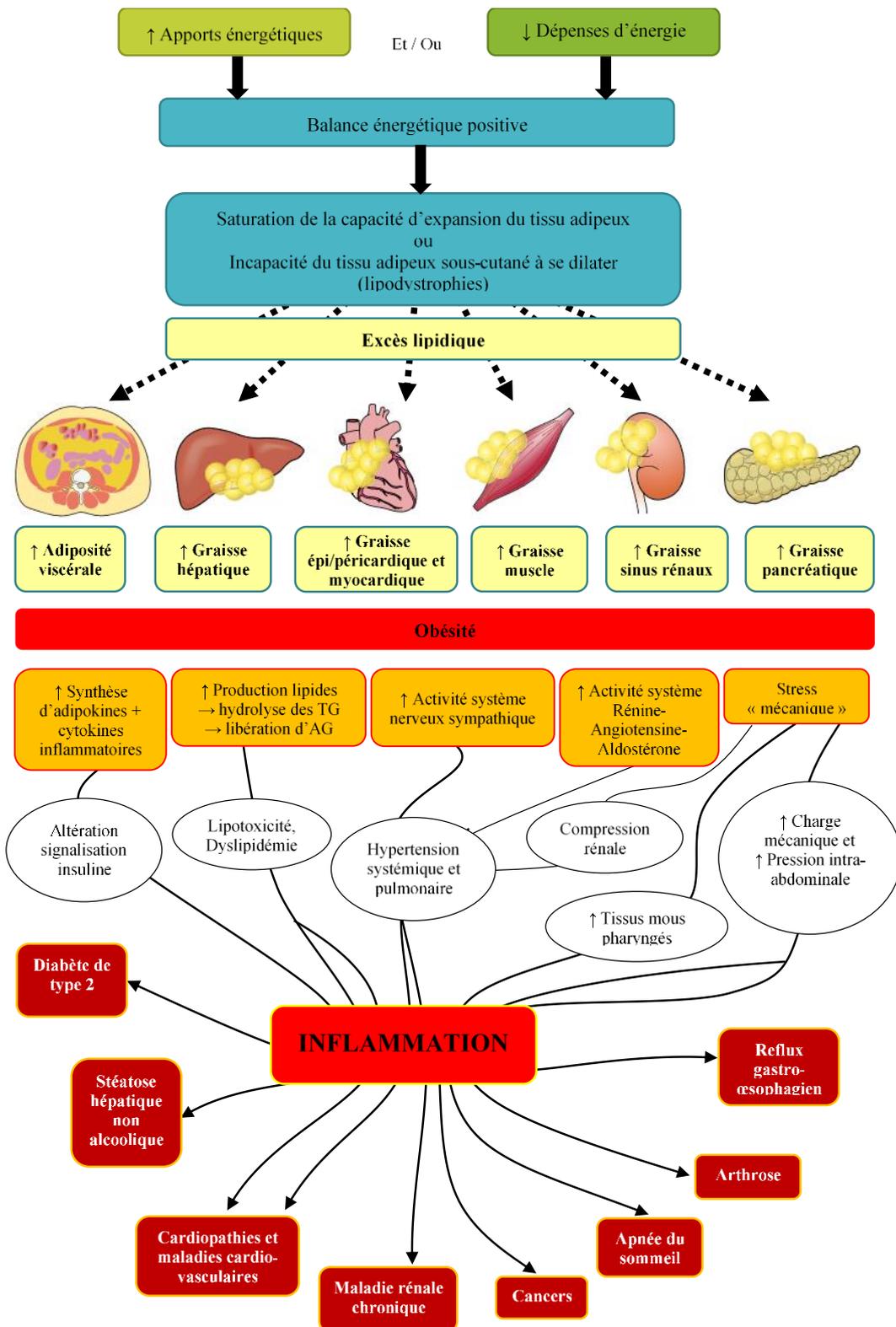


Figure 8 : Obésité, inflammation et pathologies (adapté de Tchernof et Després, 2013 ; Heymsfield et Wadden, 2017). Quelques voies par lesquelles l'excès adipeux mène à des facteurs de risques majeurs et à des maladies chroniques fréquentes. Lorsque le tissu adipeux sous-cutané ne peut plus s'étendre et saturer, l'excès lipidique atteint les organes, ce qui provoque un état inflammatoire généralisé, responsable de diverses pathologies chroniques. TG : Triglycérides, AG : Acides Gras.

1.6. Système immunitaire et métabolisme au cours de l'obésité

Le système immunitaire est constitué de nombreux types cellulaires permettant de prévenir et d'éliminer les agents infectieux mais également de protéger l'organisme contre le développement de cellules tumorales. Ainsi, toute agression induit une réponse de défense de la part de l'organisme : l'immunité innée, en première ligne, reconnaît un organisme comme pathogène et provoque une réponse inflammatoire aiguë qui stimule la réponse adaptative, spécifique et qui induit une réponse mémoire (**Figure 9**).

Ces deux systèmes agissent en complémentarité et résultent d'un subtil équilibre. Toute rupture de cette homéostasie est responsable d'un excès d'inflammation, d'un défaut de réparation et donc de maladies inflammatoires chroniques.

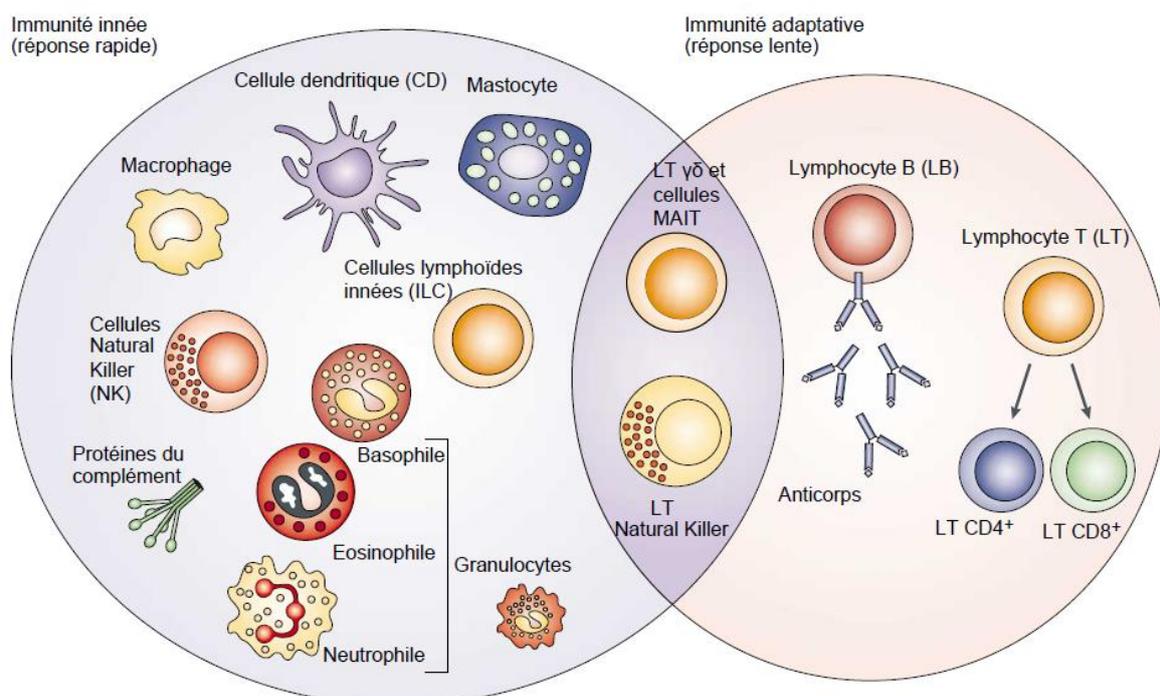


Figure 9 : Cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative (d'après Dranoff, 2004). La réponse immunitaire innée intervient en premier lors d'une infection. Ce système immunitaire se compose de facteurs solubles comme les protéines du complément ou de cellules comme les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), mastocytes, macrophages, cellules dendritiques ou encore les cellules Natural Killer (NK). La réponse adaptative est plus lente, se caractérise par une spécificité antigénique et bénéficie d'une mémoire immunitaire. Ce système adaptatif se compose donc d'anticorps et de lymphocytes. Certaines cellules sont à l'interface entre les deux systèmes immunitaires : c'est le cas des lymphocytes cytotoxiques $\gamma\delta$, lymphocytes T NK et des cellules MAIT « mucosal-associated invariant T cells »).

L'obésité se caractérise par une inflammation de bas grade c'est-à-dire chronique mais sans les caractéristiques classiques retrouvées dans l'inflammation (rougeur, gonflement, douleur et chaleur) (Hotamisligil, 2006). Ainsi, on retrouve au cours de l'obésité aussi bien chez l'Homme que dans les modèles animaux, un recrutement de cellules immunitaires dans le tissu adipeux (mais aussi dans le foie, les muscles, le pancréas et l'intestin ainsi qu'une augmentation modérée dans la circulation de protéines telles que la protéine C réactive (CRP), des cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6), IL-8, IL-10 ou encore le TNF- α provoquant une inflammation systémique et tissulaire (Dalmas *et al.*, 2011; Hotamisligil, 2006). Cette inflammation de bas grade contribue à l'état d'insulino-résistance (**Figure 10**) observé chez les patients obèses souffrant de diabète de type 2 (Lackey et Olefsky, 2016).

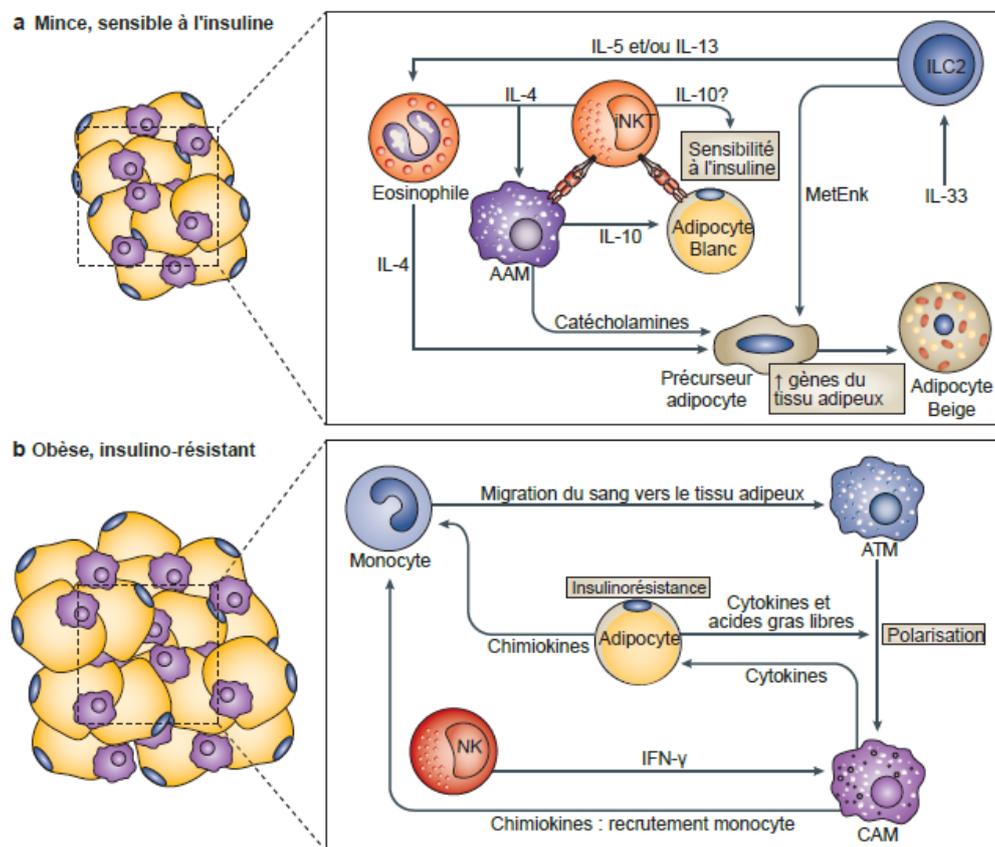


Figure 10 : Régulation de la sensibilité à l'insuline par les cellules immunitaires (d'après Lackey et Olefsky, 2016). Chez les personnes non obèses, sensibles à l'insuline (a), l'IL-33 stimule les cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2) qui produisent à leur tour de l'IL-5 et de l'IL-13 maintenant la chimiotaxie des éosinophiles. Ces derniers produisent de l'IL-4 qui permettent de maintenir les macrophages du tissu adipeux (ATM) dans un état de macrophage alternativement activé (AAM) qui favorisent la sensibilité à l'insuline adipocytaire par l'intermédiaire de l'IL-10. En cas d'obésité (b), les adipocytes produisent des chimiokines telles que MCP-1 en réponse à des signaux pro-inflammatoires (TNF- α ou acides gras) induisant la migration des monocytes de la circulation vers le tissu adipeux où ils se différencient en ATM et se polarisent en macrophages activés classiquement (CAM). Les cellules NK activées produisent de l'IFN- γ qui induit la polarisation des ATM en CAM. Ces derniers produisent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires qui altèrent la signalisation de l'insuline et des chimiokines favorisant une accumulation supplémentaire de CAM.

Il existe donc un lien étroit entre le système immunitaire et le métabolisme, lorsque l'homéostasie métabolique est rompue au cours de l'obésité, les signaux inflammatoires résultants participent au déséquilibre du système immunitaire (Lumeng et Saltiel, 2011). Ainsi, la lutte contre les infections et la gestion énergétique sont deux processus adaptatifs intrinsèquement liés (Hotamisligil, 2006).

Pour preuve, en cas d'infection sévère (sepsis) et en dehors de tout contexte d'obésité, il existe un processus adaptatif d'insulino-résistance : l'inflammation liée à l'infection provoque une résistance à l'insuline qui conduit à une activation des processus de lipolyse adipeuse, de néoglucogenèse hépatique et de glycogénolyse musculaire afin d'augmenter les capacités énergétiques et participe à l'activation du système immunitaire (**Figure 11** ; Olefsky et Glass, 2010; Chawla *et al.*, 2011).

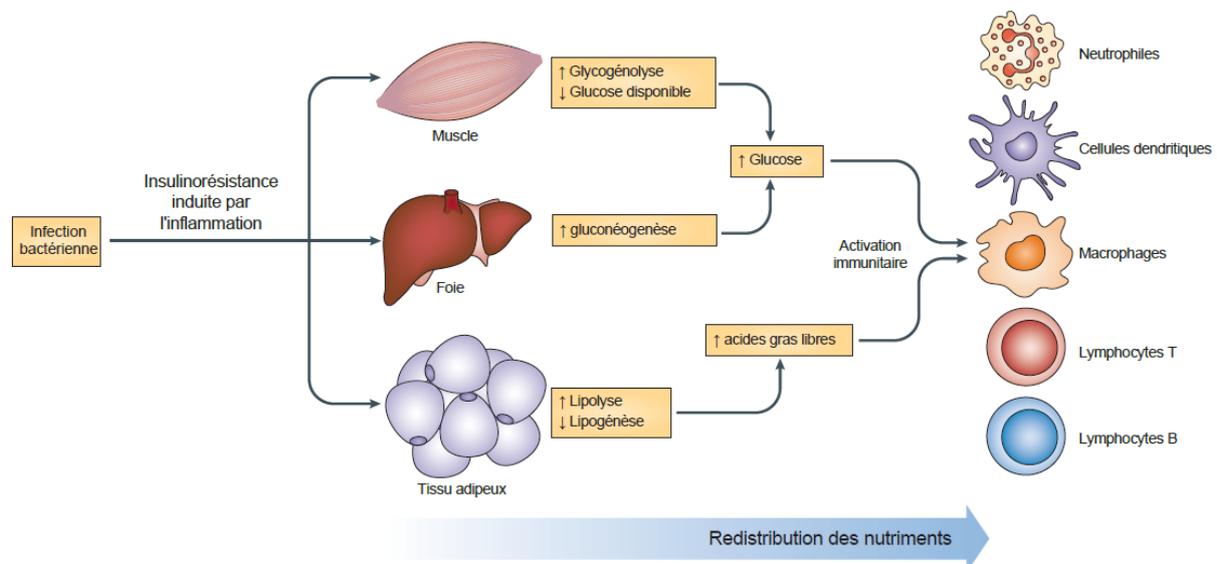


Figure 11 : L'infection induit une insulino-résistance (d'après Chawla *et al.*, 2011). L'activation du système immunitaire inné en cas d'infection bactérienne provoque la libération de cytokines pro-inflammatoires qui interviennent dans la résistance à l'insuline et permettent ainsi d'augmenter les niveaux circulants de glucose, nutriment nécessaire aux cellules immunitaires innées adaptatives pour leur activation. En parallèle, la résistance à l'insuline augmente la quantité d'acides gras libres qui peuvent également être utilisés pour soutenir les demandes énergétiques des cellules immunitaires ou non immunitaires.

De façon cohérente, on observe des altérations immunitaires dans différentes situations de désordres métaboliques (McNelis et Olefsky, 2014) aussi bien en cas de dénutrition mais aussi en cas de surnutrition où on observe une augmentation du risque d'infection (Blackburn, 2001; Gregor et Hotamisligil, 2011; Lumeng et Saltiel, 2011).

Bien que cela puisse paraître paradoxal, les deux situations métaboliques diamétralement opposés sont à l'origine d'une immunodépression. En effet, la sensibilité des diabétiques aux infections est connue de longue date mais les causes précises sont difficiles à établir. Une étude réalisée chez 51 patients en 2013 a démontré que les cellules NK étaient déficientes chez les patients diabétiques (la dégranulation par ces cellules libère moins d'enzymes) mais aussi que l'hyperglycémie était directement liée au nombre de cellules NK. (Berrou *et al.*, 2013).

D'autre part, il a été démontré que chez les patients diabétiques, les leucocytes produisaient des niveaux accrus d'espèces réactives de l'oxygène (Hand *et al.*, 2007). De même, le stress du réticulum endoplasmique (**Figure 12**) induit par l'hyperglycémie peut influencer les populations de cellules immunitaires (lymphocyte T cytotoxiques et cellules NK) chez les patients obèses non diabétiques (Lynch *et al.*, 2009; Zhang et Kaufman, 2008).

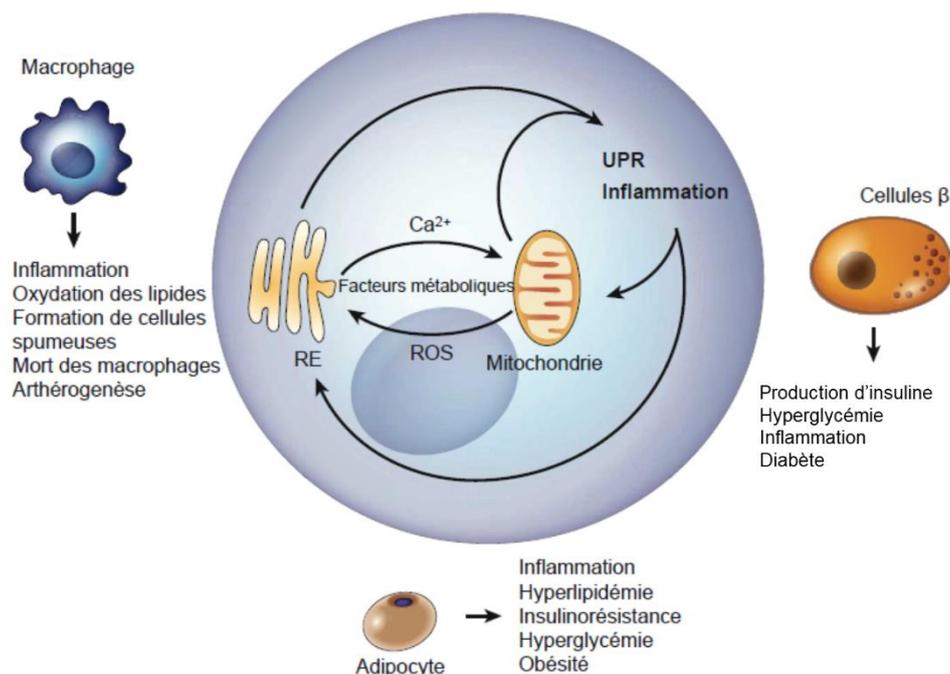


Figure 12 : Lien entre le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation dans les cellules spécialisées au cours de l'obésité (d'après Zhang et Kaufman, 2008). Les macrophages, adipocytes et les cellules β sont des cellules sécrétant de nombreuses protéines. La signalisation des réponses au stress du réticulum endoplasmique UPR (« Unfolded Protein Response ») et inflammatoire est déclenchée par un excès chronique de facteurs métaboliques comme les lipides, le glucose, les cytokines, hormones ou acides gras non estérifiés. Ces derniers stimulent la synthèse des protéines, la signalisation du calcium et la production d'espèce réactives de l'oxygène (ROS) en ciblant les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE) dans les cellules. L'augmentation de la demande de repliement des protéines et la signalisation impliquant calcium et ROS induisent une réponse inflammation et UPR conduisant à la transcription de gènes dont les produits montent une réponse inflammatoire plus large. Un excès de facteurs métaboliques peut stimuler d'avantage la réponse UPR et l'inflammation, contribuant ainsi à une altération du métabolisme des lipides et du glucose, à l'insulino-résistance et à l'apoptose. Cette boucle stress du réticulum endoplasmique et inflammation pourrait augmenter davantage la signalisation du stress inflammatoire et ainsi contribuer à la détérioration métabolique retrouvée dans l'obésité et le diabète de type 2 selon le type cellulaire impliqué.

2. Interface digestive et microbiote intestinal

L'intestin constitue une entité anatomique et fonctionnelle : on parle d'interface digestive. C'est une zone d'interaction entre la muqueuse et la flore intestinale, en coordination symbiotique, mais également avec le milieu extérieur : les aliments.

Le système digestif s'étend de la bouche à l'anus et est associé aux glandes salivaires, foie et pancréas ainsi qu'au système immunitaire. L'intestin à lui seul constitue la plus grande surface d'échange de l'organisme (plus que la peau) : plus de 300 m² chez l'adulte de par la longueur de l'intestin grêle mais aussi grâce aux très nombreux replis de la muqueuse digestive (Carlson, 2019). La fonction principale de l'intestin est l'absorption des différents nutriments : après dégradation mécanique, chimique, et enzymatique, aidée par des bactéries pour certains, les aliments sont dégradés en de plus petites molécules, qui sont ensuite absorbées dans l'intestin (Treuting *et al.*, 2018).

2.1. La muqueuse digestive

- **Constitution de la paroi digestive**

La paroi digestive est constituée de 3 parties : la muqueuse et la sous-muqueuse, la musculaire et la sous-séreuse puis la séreuse (**Figure 13**). La muqueuse du tube digestif étant en contact direct avec ce milieu extérieur, elle assure la défense de l'hôte d'une part en assurant une fonction de barrière, et d'autre part en impliquant les acteurs de l'immunité. Elle est constituée de l'épithélium, la *lamina propria* et la musculaire-muqueuse (Treuting *et al.*, 2018).

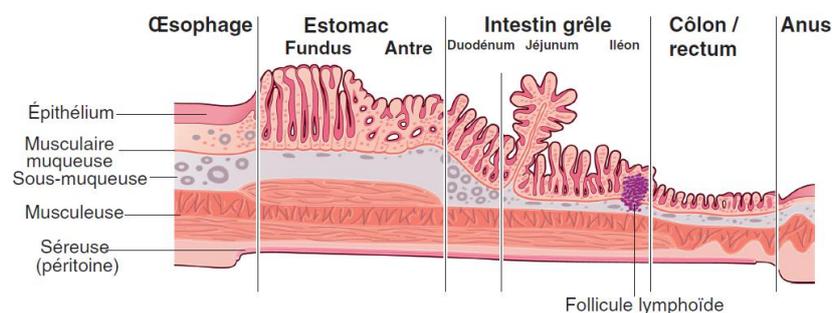


Figure 13 : Aspect histologique de la paroi digestive (Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie et Sokol, 2014). De l'œsophage à l'anus, la muqueuse reflète les fonctions de chaque portion : l'estomac est constitué de nombreuses cellules sécrétrices de mucus, pepsine, acide chlorhydrique ou encore facteur intrinsèque et gastrine servant à transformer les aliments en nutriments. L'intestin grêle est ensuite essentiellement constitué d'entérocytes puisque c'est l'organe dédié à l'absorption des nutriments, en particulier le jéjunum où l'on retrouve de très nombreux replis appelés villosités. Suivent enfin l'iléon puis le côlon dans lesquels les cryptes contiennent de nombreuses cellules sécrétrices de mucus et de défensines.

L'épithélium intestinal constitue une barrière physique entre le milieu extérieur (lumière du tube digestif) et le milieu interne (**Figure 13**). On retrouve différents types de cellules disposées en monocouche (**Tableau III**) : tout d'abord, les entérocytes sont les cellules absorbantes, les plus nombreuses. Puis, les cellules caliciformes (ou cellules en gobelet présentes dans l'épithélium de la muqueuse intestinale) sécrètent un mucus qui joue le rôle de barrière physico-chimique contre les pathogènes (McGuckin *et al.*, 2009). Ce gel composé de différentes mucines est présent à la surface de la barrière épithéliale et la protège contre les pathogènes en limitant les contacts directs entre les micro-organismes et leur hôte (Johansson et Hansson, 2016).

Tableau III : Cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et leurs principales fonctions (d'après Marteau et Doré, 2017).

Cellules	Fonctions principales
Entérocytes	Cellule la plus représentée tout au long de l'intestin. Bordure en brosse au pôle apical et pôle basal en contact direct avec un capillaire sanguin. Absorption nutriments et eau. Transporteurs membranaires pour les micronutriments. Sécrétion de cytokines.
De Paneth	À la base des cryptes, surtout iléales. Sécrétion de peptides anti-microbiens : lectine C, lysozyme, phospholipase A2, α défensines. Participent au maintien des cellules souches.
Caliciformes	4% des cellules duodénales, jusqu'à 16% des cellules du côlon distal. Sécrétion de mucines, peptides en forme de trèfle et anti-microbiens. Participent à la surveillance immunitaire.
Entéro-chromaffines	Plus de 15 types identifiés, synthèse d'hormones et de peptides : gastrine, gréline, CCK, sécrétines, GLP1 et 2, PYY, sérotonine, histamine... Impliquées dans l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire.
Souches	Renouvellement intestinal et prolifération cellulaire.
M	Participent à la surveillance immunitaire
Tuft	Sécrétion d'endorphine, fonctions immunitaires encore mal connues, sentinelles ?

Différents peptides anti-microbiens tels que les défensines et le lysozyme sont sécrétés par les cellules de Paneth dans cette couche de mucus, afin d'éliminer les micro-organismes qui y ont pénétré. Enfin les cellules entérochromaffines (ou entéroendocrines) qui sécrètent différents médiateurs endocriniens et des cellules souches permettant le renouvellement de l'épithélium dont certaines sont activées en cas d'agression ou d'infection de l'épithélium (Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie *et al.*, 2014).

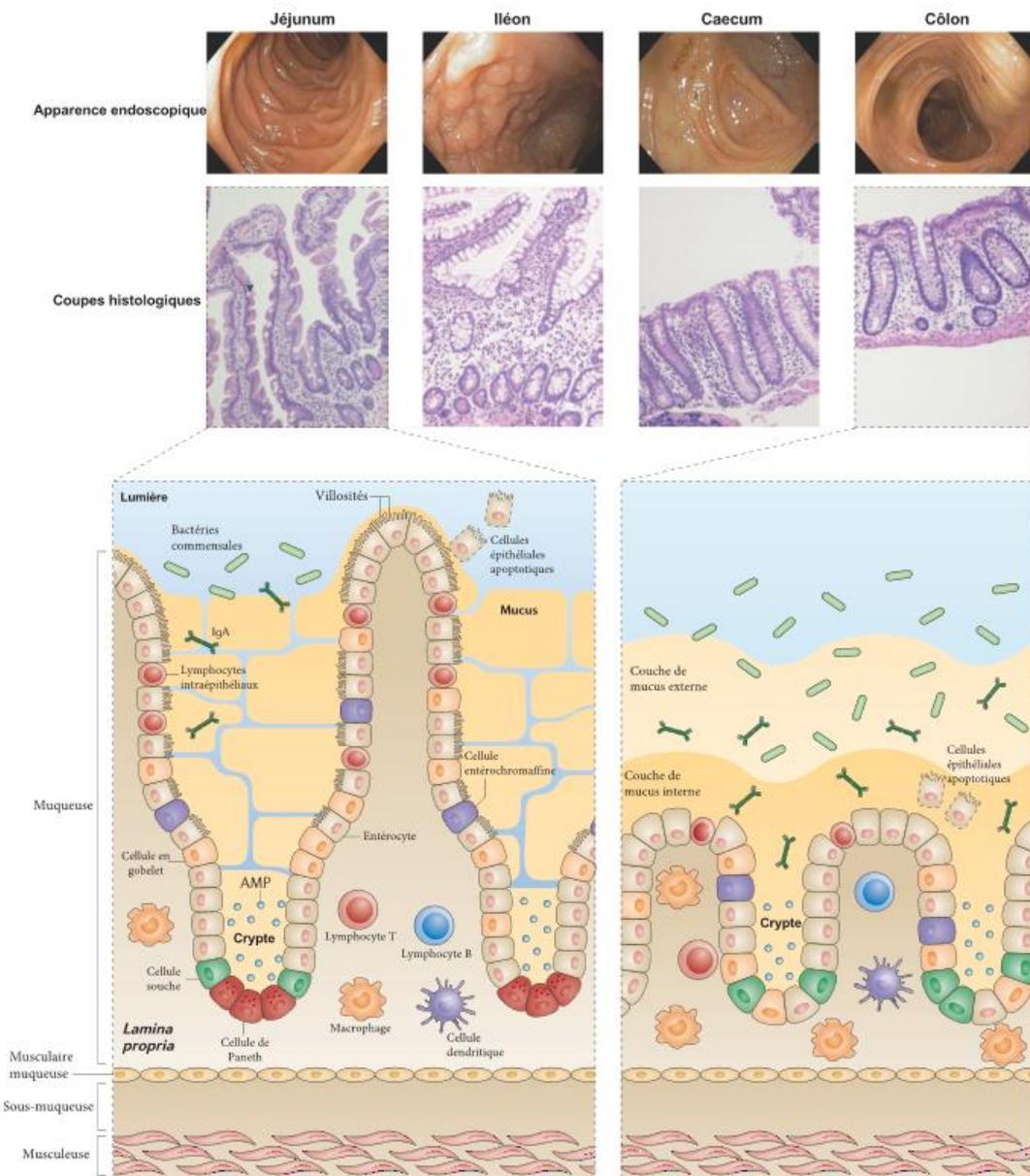


Figure 14 : Anatomie détaillée de la muqueuse intestinale et son système immunitaire (d'après Mowat et Agace, 2014). Les différents segments de l'intestins ont une structure bien distincte à l'endoscopie (photographies en haut). L'intestin grêle est constitué de longues villosités assez minces recouvertes d'un épithélium de surface qui a une bordure en brosse comprenant des microvillosités. Ces dernières fournissent une vaste surface pour la digestion (elles contiennent des enzymes digestives) et l'absorption des nutriments. Les cellules épithéliales sont produites à partir de cellules souches dans le fond des cryptes. Après quelques jours, ces cellules sont remplacées par de nouvelles qui migrent vers le haut depuis les cryptes. Les cellules souches donnent également des cellules en gobelet qui sécrètent du mucus et aux cellules de Paneth (caractérisé par la présence de granules dense contenant les peptides antimicrobiens AMP) qui elles, migrent vers le bas de la crypte. La partie centrale des villosités comprend la lamina propria où se situent la majorité des cellules immunitaires tandis que certains lymphocytes sont intraépithéliaux. En descendant vers l'iléon, les villosités sont plus courtes et les cellules de Paneth et caliciformes sont plus nombreuses. Le caecum est une poche comprenant la première partie du gros intestin et agit comme un réservoir pour les bactéries commensales impliquées dans la fermentation des glucides non digérés par les enzymes digestives. Enfin, dans le côlon les villosités sont absentes et les cryptes sont plus petites : la fonction principale de l'épithélium étant de réabsorber l'eau des matières fécales et d'agir comme une barrière contre les bactéries. Ceci est facilité par le grand nombre de cellules caliciformes qui produisent une couche très épaisse de mucus. Les cellules de Paneth et les lymphocytes intraépithéliaux sont beaucoup plus rares que dans le grêle.

- **Système immunitaire intestinal**

Toutes les surfaces muqueuses, en particulier celles de l'intestin, sont des sites essentiels de la régulation immunitaire innée et adaptative, puisqu'elles sont en contact direct et permanent avec le milieu extérieur (Turner, 2009). C'est pourquoi il existe des tissus lymphoïdes (appelés GALT) situés sous la muqueuse (dans la *lamina propria*) où l'on trouve notamment les plaques de Peyer (Mowat, 2003), qui jouent un rôle majeur dans la distinction entre la flore commensale et les micro-organismes pathogènes, afin d'assurer une défense immunitaire rapidement efficace. De nombreuses cellules immunitaires telles que des macrophages, des polynucléaires ou encore des cellules dendritiques sont présentes dans la muqueuse intestinale afin de lutter contre une infection éventuelle (**Figure 15**).

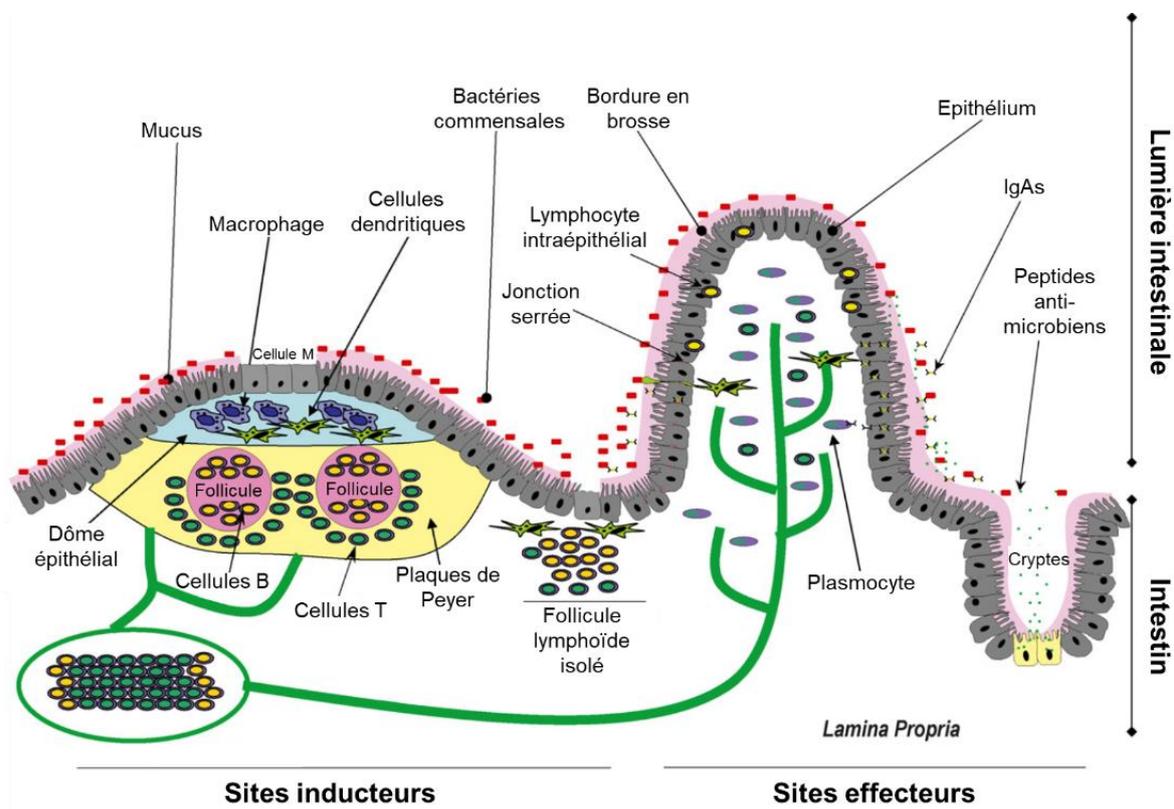


Figure 15 : Barrière épithéliale et système immunitaire intestinal (d'après Magalhaes, Tattoli et Girardin, 2007). Les cellules de l'épithélium intestinal sont associées fortement entre elles grâce à des jonctions serrées et sont recouvertes de mucus piégeant les micro-organismes. Les antigènes bactériens sont détectés puis internalisés par les cellules de l'épithélium puis transférés aux cellules dendritiques du dôme sous-épithélial permettant ainsi d'éliminer les pathogènes avant l'invasion de la muqueuse.

D'autre part, toutes les cellules de la muqueuse possèdent des jonctions cellulaires assurant une certaine imperméabilité de la muqueuse aux bactéries. De plus, ces cellules possèdent une importante capacité de renouvellement de l'épithélium vieillissant, ce qui assure une réparation rapide et efficace des zones lésées (Okamoto et Watanabe, 2004; Roda, 2010).

En effet, afin de rendre cette barrière muqueuse étanche, les cellules épithéliales sont solidement fixées entre elles par des jonctions serrées, adhérentes, des desmosomes et des jonctions communicantes (**Figure 16**) (Turner, 2009). Ainsi, la monocouche épithéliale intestinale forme une barrière perméable aux nutriments, eau et électrolytes mais limite l'entrée d'agents pathogènes (Chelakkot *et al.*, 2018).

La protection de la barrière est également assurée par les cellules épithéliales elles-mêmes, qui sont capables de reconnaître et distinguer les micro-organismes (pathogènes ou commensaux) *via* les récepteurs TLR (membranaires) et NOD2/CARD15 (intracellulaires) pour elles aussi présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT) naïfs (McGuckin *et al.*, 2009).

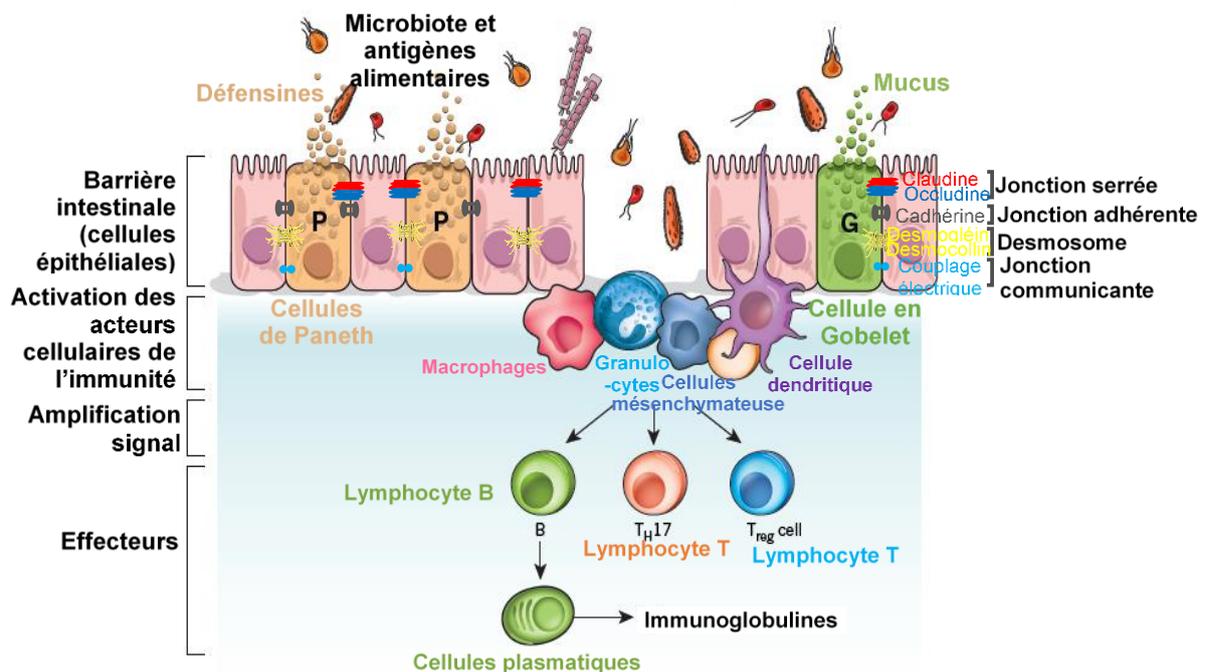


Figure 16 : Activation de l'immunité dans la muqueuse intestinale (adapté de Khor *et al.*, 2011; Turner, 2009). L'homéostasie intestinale résulte de l'action coordonnée des cellules de l'immunité innée et adaptative. La perte d'intégrité de la barrière intestinale chez les patients atteints de MICI conduit à l'invasion de la muqueuse intestinale par des micro-organismes. La reconnaissance d'antigènes alimentaires, bactériens, ou viraux par les cellules épithéliales de la barrière intestinale engendre alors le recrutement de médiateurs de l'immunité innée et de cellules de l'immunité adaptative permettant de répondre à l'infection en produisant diverses cytokines et immunoglobulines (Ig).

Le système immunitaire intestinal est le 1^{er} organe de défense immunitaire : 60 à 70% des cellules immunitaires de l'organisme sont situées dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT), soit environ 10^{12} cellules lymphoïdes par mètre d'intestin grêle (Randolph *et al.*, 2017). Les principales cellules sont répertoriées dans le **Tableau IV**. Lorsqu'une bactérie est présente dans la lumière intestinale, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques, macrophages, épithéliales et mésenchymateuses présentes dans le dôme épithélial sont capables de l'identifier comme étant commensale ou pathogène, et de conditionner la réponse immunitaire (Hamada *et al.*, 2002).

Tableau IV : Cellules du système immunitaire intestinal (d'après Peterson 2012).

Cellules	Médiateurs	Fonction principale
Macrophages	TNF- α , IL-1 β IL-6, IL-12, IL-18, CXCL8, CCL (chemokines)	Provient de la différenciation des monocytes, joue le rôle de CPA. Rôle phagocytaire.
Cellules dendritiques	IL-6, TNF- α , IFN- α , IL12, IL-23	Rôle phagocytaire et CPA permettant l'activation de la réponse immunitaire adaptative (LT et LB).
PN ou granulocytes	TNF- α , IL-1, IL-17	Neutrophiles : phagocytose Basophiles : réaction allergique Éosinophiles : antiparasitaire
Cellules NK	IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-22	Cellule tueuse, détruit les cellules de façon spécifique (en faisant intervenir des CMH de classe I).
Lymphocytes B		Responsable de l'immunité humorale. Se différencie en plasmocytes ou en LB mémoire. Joue également le rôle de CPA.
Lymphocytes T		
Cellules naïves	Th0	Peut se différencier en LT effecteur ou régulateur selon la situation.
Cellules effectrices	Th1	IFN- γ , IL-12, TNF- α , CCL5
	Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13
	Th22	IL-22, IL-13, TNF- α FGF CXCL10
	Th9	IL-9
	Th17	IL-17, IL-21 IL-22, CCL5
Cellules régulatrices	Treg	TGF- β , IL-10, IL-23, IL-5, IL-2,
	Tr1	IL-10
	iTreg	TGF- β , IL-10
	Th3	TGF- β , IL-10

- **Tolérance immunitaire et reconnaissance infectieuse**

Si la bactérie est reconnue comme étant non pathogène (commensale) (**Figure 17a**), les cellules épithéliales, mésenchymateuses et les macrophages sécrètent des cytokines TGF- β et PGE₂ permettant la maturation des cellules dendritiques, leur migration vers les ganglions mésentériques et la production importante de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), puis une différenciation des LT naïfs en LT régulateurs synthétisant IL-10 et IFN- γ . Ces cytokines anti-inflammatoires permettent de limiter la production de cytokines pro-inflammatoires par les effecteurs. L'équilibre entre les différents systèmes effecteurs et régulateurs de l'immunité assure ainsi une tolérance du système immunitaire intestinal et maintient une homéostasie face à l'exposition de la muqueuse à de nombreux antigènes (Mowat, 2003).

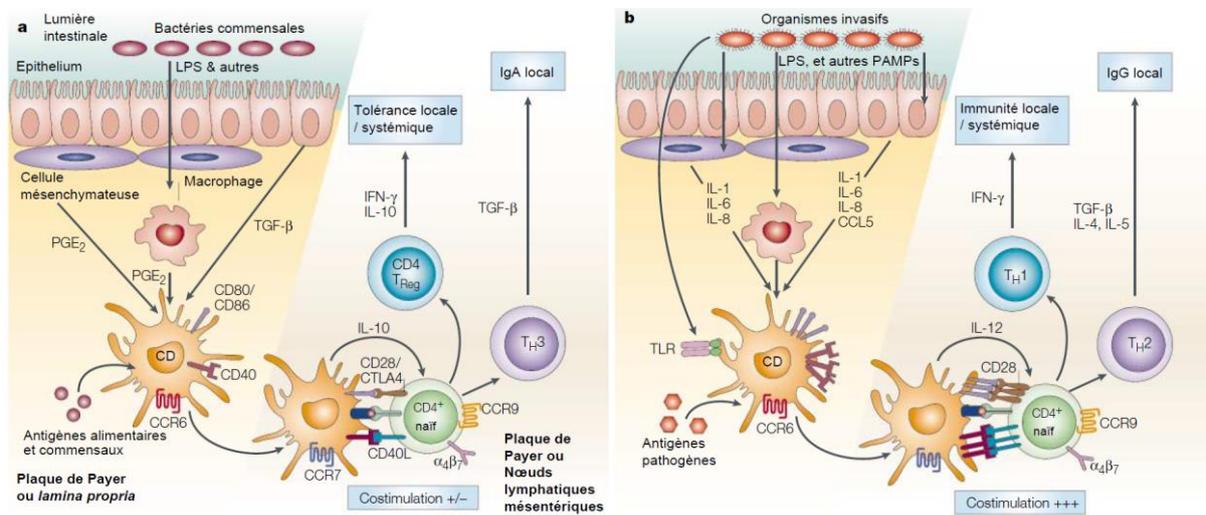


Figure 17 : Tolérance immunitaire (a) et réponse à une infection digestive (b) (adapté de Mowat 2003). Les antigènes de la flore commensale sont reconnus (a) par les cellules dendritiques (CDs), qui activent la sécrétion de cytokines (prostaglandines PGE₂, TGF- β) par les macrophages, les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales. Ces dernières déclenchent la migration et la maturation partielle des CDs vers les ganglions lymphatiques, où elles présentent les antigènes reconnus aux lymphocytes T naïfs CD4⁺ et sécrètent une cytokine anti-inflammatoire IL-10. Ce processus engendre la différenciation des LT naïfs en LT régulateurs et active la voie Th3. Ces LT sécrètent à leur tour d'autres cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IFN γ et le TGF- β , lesquelles vont conduire à la production d'immunoglobuline A (IgA) par les Lymphocytes B (LB) et à la tolérance immunitaire pour assurer l'homéostasie intestinale. Lorsqu'un composant d'un agent pathogène est reconnu (b) par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), via leurs récepteurs membranaires (TLR) et intracellulaires (NOD), un ensemble de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8) est sécrété afin d'induire la maturation complète des cellules dendritiques. Les CDs matures vont alors migrer vers les ganglions lymphatiques pour engendrer la différenciation des LT naïfs (via la sécrétion d'IL-12) en LT effecteurs comme les LTh1 et LTh2. Ces LT effecteurs vont sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , TGF- β , IL-4 et IL-5 qui vont induire une réponse immunitaire locale en sécrétant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et des IgG (en plus des IgA) afin d'éliminer l'agent pathogène.

En revanche, après détection d'une bactérie pathogène (**Figure 17b**), les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes aux LT immatures (LT naïfs CD4⁺) et vont induire leur différenciation en lymphocytes LTh1, LTh2 et LTh17. Elles activent également les lymphocytes B (LB) pour protéger la muqueuse intestinale en produisant des immunoglobulines A et G. Les LTh1 activent les LT cytotoxiques CD8⁺ ainsi que les macrophages pour contribuer à l'élimination de l'agent pathogène. D'autre part, les LTh2, intervenant dans la réponse immunitaire adaptative, activent les LB sécrétant des IgA et IgG pour enrayer l'infection. Et enfin, les LTh17 vont permettre le recrutement de cellules de l'immunité telles que les cellules NK et les polynucléaires (neutrophiles), responsables de l'amplification de l'inflammation en sécrétant à leur tour d'autres cytokines pro-inflammatoires et l'induction de lésions intestinales. Les principales cytokines médiatrices de l'inflammation sont présentées dans le **Tableau V**.

Tableau V : Principaux médiateurs de l'inflammation et fonctions principales.

Molécule	Sécrété par	Fonction
IFN-γ	Lymphocytes T, Cellules NK, Cellules dendritiques, Neutrophiles	Active macrophages, lymphocytes et cellules NK, induit la synthèse de molécules pro-inflammatoires et la migration des neutrophiles.
TNF-α	Macrophages, cellules dendritiques, mastocystes, cellules NK, Lymphocytes T	Stimule la production de chimiokines par les cellules endothéliales, le recrutement de leucocytes, active la phagocytose et la différenciation des LT et B, active la production de facteurs de croissance (indispensable à la réparation des tissus).
TGF-β	Cellules épithéliales, lymphocytes, macrophages	Prolifération et différenciation lymphocytes, cellules épithéliales, induit la production d'IgA.
PGE2	Cellules mésenchymateuses et macrophage	Stimule l'activation et la migration des cellules dendritiques, inhibe l'activation des leucocytes.
IL-1β	Cellules épithéliales, dendritiques, mésenchymateuses, et macrophages	Stimule l'activation et la migration de lymphocyte T et macrophages vers le site enflammé. Responsable des effets systémiques (fièvre) permettant de combattre l'infection.
IL-2, IL-4	Lymphocytes T, cellules NK	Stimule la prolifération, l'activation et la différenciation lymphocytaire (LT CD4 ⁺) en LT auxiliaire (LTh2) et aide à la différenciation des LB en plasmocytes.
IL-6	Macrophages, cellules dendritiques, endothéliales, lymphocytes B et T	Induit l'activation et la différenciation des lymphocytes T et B, production de protéine de la phase aigüe (fièvre).
IL-8	Cellules épithéliales, dendritiques, lymphocytes T, macrophages	Chimiokine assurant le recrutement des granulocytes, induit la phagocytose.
IL-10	Cellules épithéliales, dendritiques, macrophages, lymphocytes T	Cytokine anti-inflammatoire : inhibition des macrophages et cellules dendritiques.
IL-12, IL-18	Cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B	Module l'activation des lymphocytes T, induit la différenciation des LT CD4 ⁺ en LT auxiliaire (LTh1), stimule la production d'IFN γ et TNF- α
IL-23	Cellules dendritiques, macrophages	Permet la différenciation des LT-CD4 en LTh17.
CXCL8	Monocytes, Macrophages, endothélium, fibroblastes	Chimiokine ciblant les macrophages.
CXCL10	Monocytes, Lymphocytes T, fibroblastes, endothélium	Chimiokine ciblant les monocytes et les cellules NK.
CXCL1,2 et 3	Monocytes, endothélium, fibroblastes	Chimiokine ciblant les neutrophiles.
CCL2	Monocytes, macrophages, fibroblastes	Chimiokine ciblant les macrophages et les basophiles.
CCL5	Lymphocytes T, endothélium	Chimiokine ciblant les basophiles et les lymphocytes T.

2.2. Le microbiote intestinal

Chez l'Homme, comme pratiquement chez tous les animaux, un microbiote anciennement appelé flore est associé à chaque muqueuse : la peau, la bouche, le vagin, le poumon, la surface oculaire et le système digestif (Cassard et Thomas, 2019). Le microbiote intestinal est le plus étudié. Jusque récemment, les moyens d'études techniques (culture *in vitro*) étaient limités, si bien que la symbiose entre l'organisme et cette flore était supposée mais mal connue : la fraction cultivable étant de 30% soit environ 400 espèces.

Aujourd'hui, grâce aux techniques de séquençage à haut débit, même si les prélèvements fécaux ne donnent qu'un reflet imparfait, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent aux interactions hôte-microbiote ainsi qu'à celles entre micro-organismes et leur incidence en matière de santé (Doré *et al.*, 2017).

Ce microbiote correspond à l'ensemble des populations de micro-organismes peuplant l'intestin d'un individu (bactéries, virus, levures...). Chez l'Homme, il est concentré dans le côlon et est essentiellement bactérien (98 %). Il constitue un organe à part entière avec près de 60 000 milliards de bactéries, pesant jusqu'à 40 % du poids fécal (1 à 2 kg) (Koboziev *et al.*, 2014).

- **Composition et évolution du microbiote intestinal**

On compte environ 160 espèces différentes par individu, 10 fois le nombre de cellules de l'organisme, 19000 fonctions et une activité métabolique bactérienne intense. Propre à chaque individu, à l'instar de l'empreinte génétique le microbiote est unique aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif. Il existe cependant un socle commun d'une soixantaine d'espèces environ (200 000 gènes) dominantes chez l'Homme. Parmi ces dernières on distingue 3 à 4 grands phyla (**Figure 18**) : *Firmicutes* (30 à 53 %), *Bacteroidetes* (18 à 42 %), *Actinobacteria* (1 à 13 %) et *Proteobacteria* (Scott *et al.*, 2013).

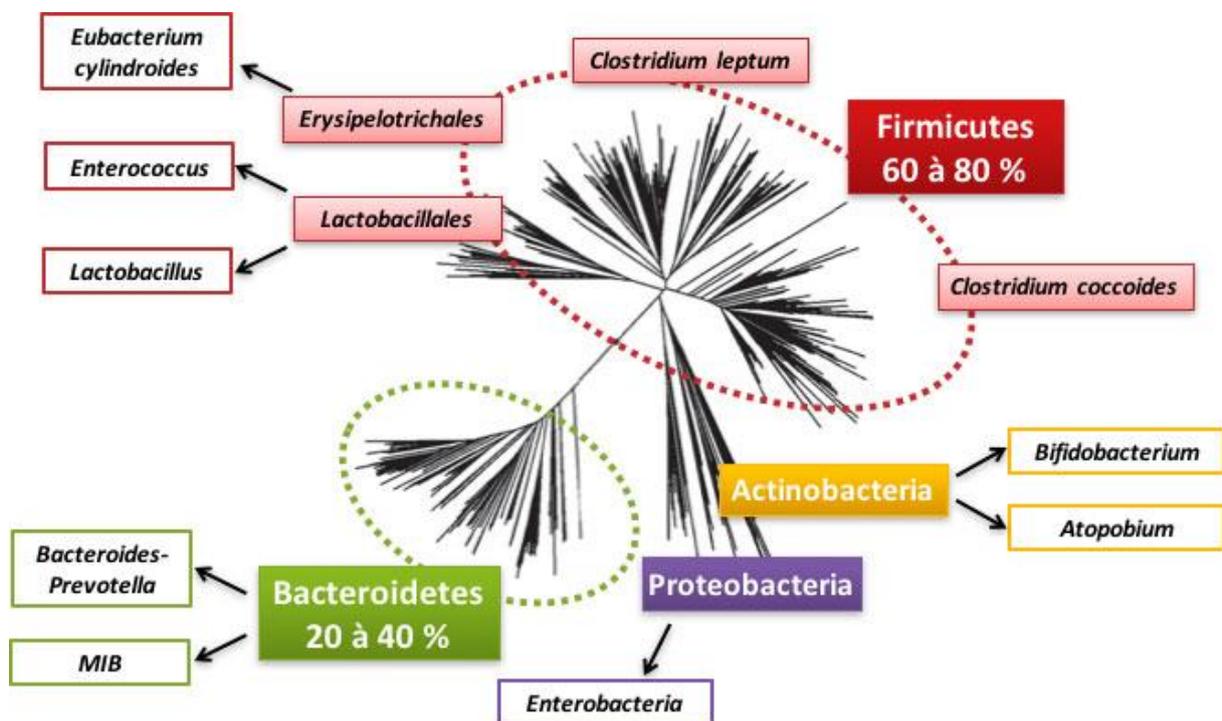


Figure 18 : Arbre phylogénétique des différentes espèces bactériennes (Cassard et Thomas, 2019). Les différentes espèces bactériennes sont regroupées en sous-ensembles bactériens appelés phyla qui regroupent des familles bactériennes dans lesquelles on retrouve des genres bactériens puis enfin les espèces.

Ce microbiote s'établit dès la vie *in utero* via le placenta et le méconium (Aagaard *et al.*, 2014; DiGiulio, 2012), puis s'enrichit dès la naissance au contact de la flore vaginale pour les enfants nés par voie basse, ou au contact de l'environnement (Rutayisire *et al.*, 2016). La colonisation est progressive : d'abord les bactéries aérobies-anaérobies facultatives (entérocoques, staphylocoques, entérobactéries) puis, puisqu'elles consomment l'oxygène présent dans l'intestin, cela favorise l'implantation de bactéries anaérobies strictes (*bacteroides*, *clostridium*, *bifidobacterium*) (Marteau et Doré, 2017). Enfin, l'allaitement puis la diversification alimentaire, l'hygiène, les traitements médicaux (antibiothérapie notamment), l'environnement ainsi que la génétique font évoluer la composition du microbiote durant les premières années de vies (**Figure 19**) (Arrieta *et al.*, 2014).

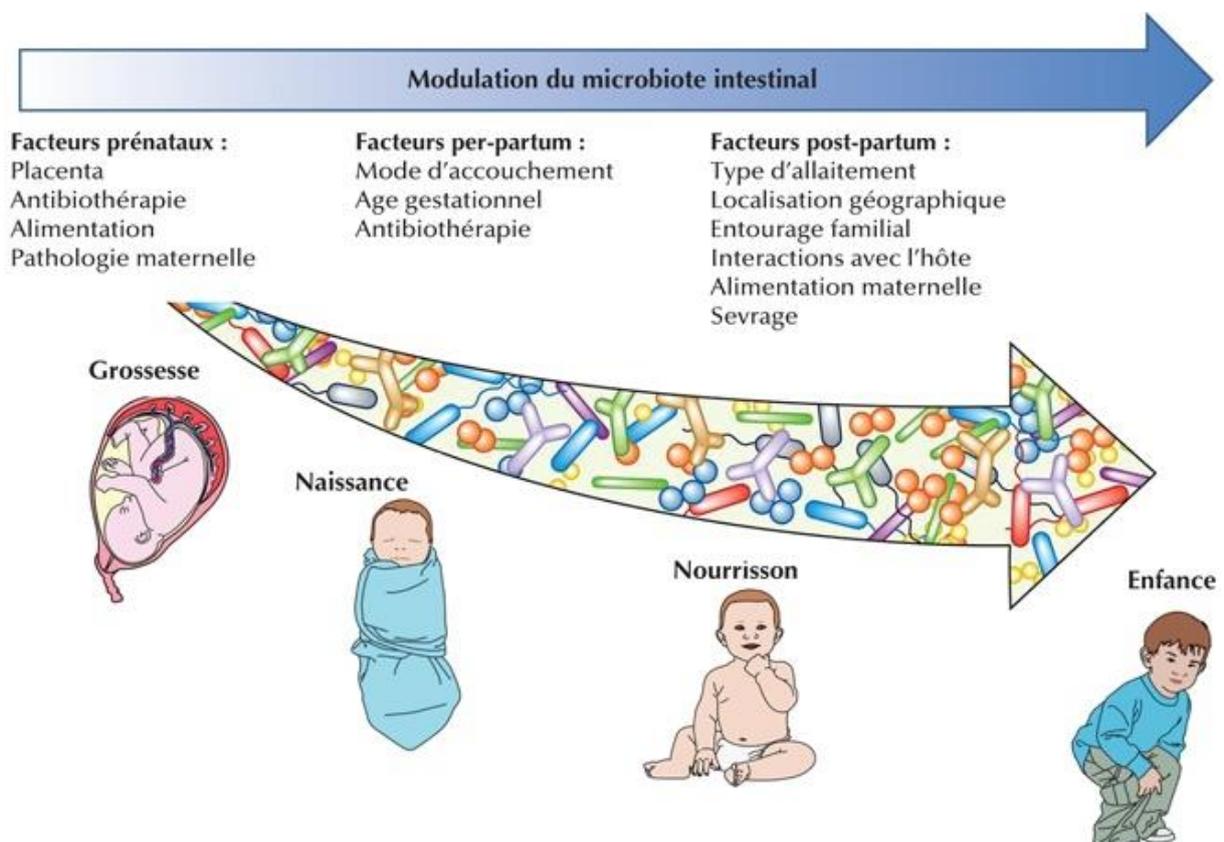


Figure 19 : Facteurs modulant le microbiote intestinal de l'enfant selon les différents stades de vie (d'après Milani *et al.*, 2017). Dès la vie *in utero*, de nombreux facteurs influencent le microbiote intestinal de l'enfant : les microbiotes maternels puis l'environnement.

La concentration en micro-organismes le long du tube digestif est assez stable entre les individus : ainsi elle est croissante depuis la bouche jusqu'au côlon où elle atteint près de 10^{12} bactéries par gramme de contenu intestinal (**Figure 20**) (Tojo *et al.*, 2014). Évidemment, la composition et la diversité varient également avec l'âge et en situation pathologique. En effet, la faible diversité du microbiote dominant est retrouvée chez de nombreux patients atteints de diabète, d'obésité, et même de dépression (Landman et Quévrain, 2016).

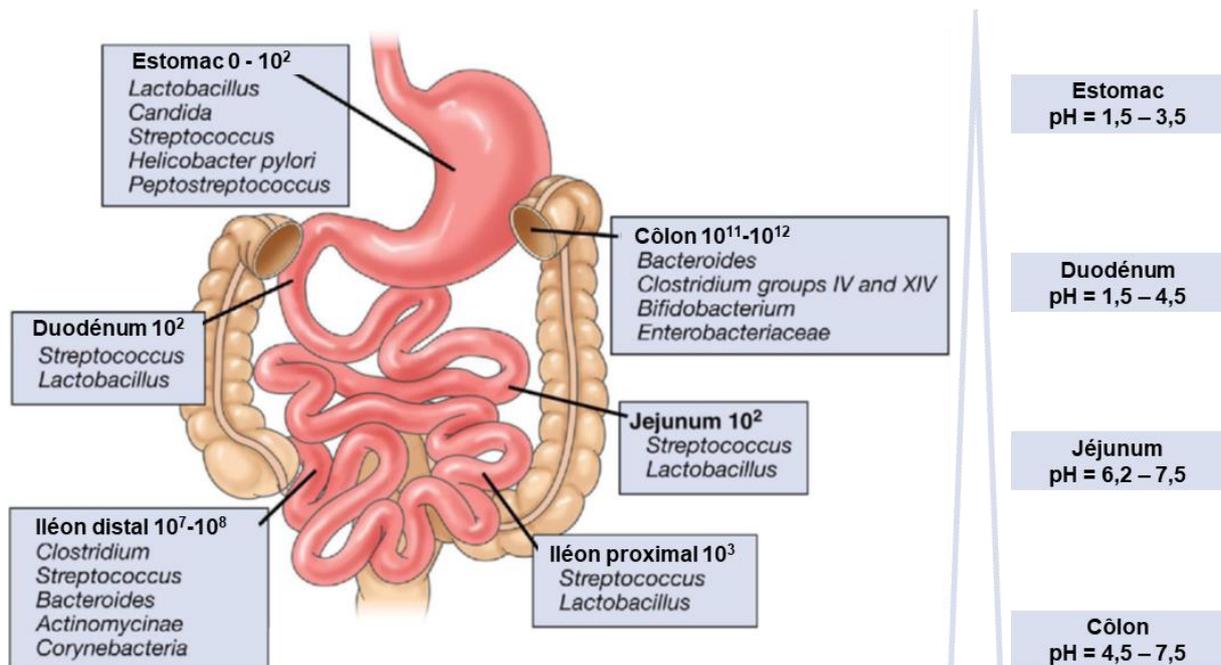


Figure 20 : Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans le tube digestif (adapté de Sartor 2008). Concentration en UFC : unité formant colonies.

La biomasse que représente ce microbiote intestinal est considérée comme stable à partir de l'âge de 3 ans environ (Yatsunenکو *et al.*, 2012). Les événements hormonaux de la vie adulte (puberté, grossesse...) provoquent des modulations encore mal connues (Flores *et al.*, 2012; Koren *et al.*, 2012). Puis, à partir de 65 ans, sous l'influence de diverses pathologies (polymédication, hospitalisation, alimentation...) une diminution de la diversité avec une grande variabilité a été observée (**Figure 21**) (Vaiserman *et al.*, 2017; Woodmansey, 2007).

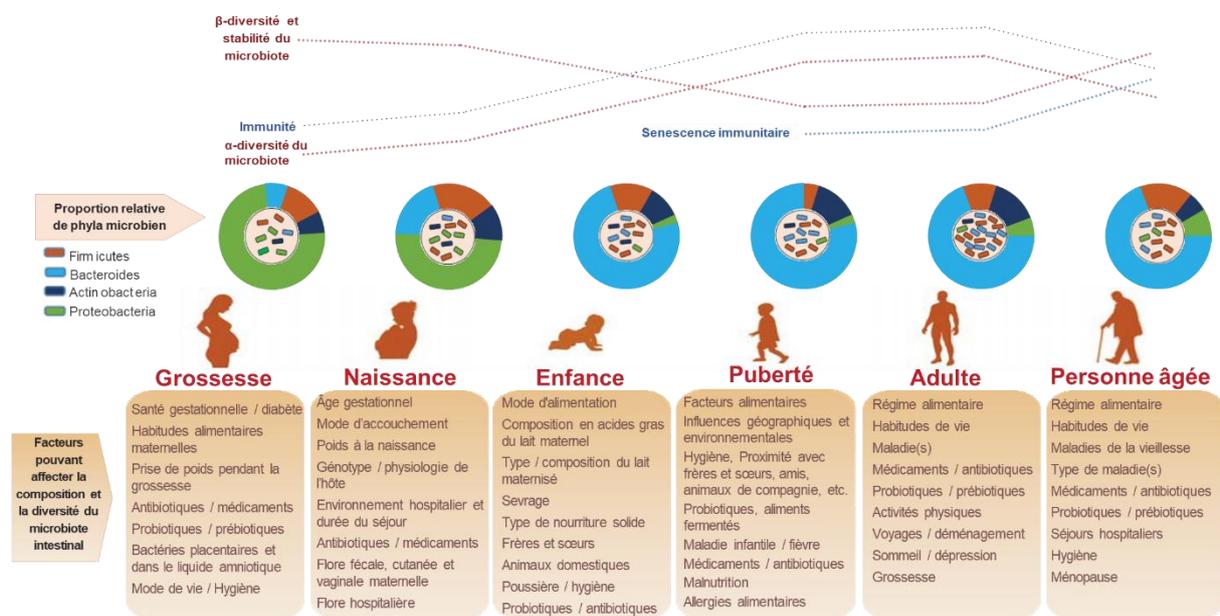


Figure 21 : Facteurs modulateurs et évolution de la composition du microbiote intestinal au cours de la vie (adapté de Nagpal *et al.*, 2018 ; Vaiserman, Koliada, et Marotta, 2017). La composition bactérienne du microbiote évolue aux étapes clés de la vie depuis l'établissement jusqu'à l'âge de 2-3 ans où il se stabilise. Puis, les conditions environnementales et les différents stress rencontrés le modifient rarement jusqu'à l'âge de 65 ans environ où l'on trouve une plus grande variété inter-individuelle, ainsi qu'une diminution de la diversité.

- **Fonctions et interactions hôte-microbiote**

L'épithélium intestinal est une structure dynamique complexe, avec laquelle le microbiote interagit de manière symbiotique dès la naissance. Ainsi, si on élève des rats axéniques (dépourvus de microbiote intestinal), on observe une physiologie intestinale totalement différente : l'intestin grêle est plus petit et le côlon plus long que chez les animaux conventionnels, avec des atrophies villositaires et une hyperperméabilité provoquant une capacité d'absorption plus importante (Gordon *et al.*, 1966). De plus, la fonction et le métabolisme d'autres organes comme le foie et le cœur sont également modifiés chez les animaux axéniques : ils souffrent d'un développement insuffisant du système immunitaire : moins de ganglions mésentériques, une proportion réduite de lymphocytes, etc (Parker *et al.*, 2018).

De même, le mucus est la première barrière physico-chimique et il constitue une niche écologique pour les bactéries du microbiote intestinal. Il est constitué de plusieurs couches de protéines fortement glycosylées, les mucines (MUC), qui s'enchevêtrent et forment un gel, d'épaisseur croissante du duodénum jusqu'au côlon où il forme deux couches distinctes : l'une externe et lâche, peuplée de bactéries, et la couche interne qui en est dépourvue (Johansson *et al.*, 2011).

En raison des mouvements péristaltiques et du bol alimentaire, le mucus est également une structure dynamique, en continuel renouvellement comme l'épithélium. Le maintien de cette couche est contrôlé par deux types de sécrétions : constitutive (de base), et inductible, qui réagit rapidement notamment en cas de translocation bactérienne (Johansson, 2012). Ainsi, l'absence de mucus (ou une couche plus fine) provoque des réactions inflammatoires exacerbées. Des modifications (faible glycosylation de MUC2 ou sialylation de certaines protéines) de ce mucus inhibent son effet protecteur et bactéricide (Linden *et al.*, 2008).

Enfin, le simple fait de la présence de communautés bactériennes complexes rend difficile l'invasion de la niche intestinale par une bactérie pathogène. Ainsi les animaux axéniques ou traités aux antibiotiques sont plus sensibles à des bactéries comme *E.Coli*, *V.Cholerae*, ou *C.Rodentium* (Kamada *et al.*, 2012; Reeves *et al.*, 2012). Le microbiote à lui seul, ainsi que ses interactions avec l'épithélium et le mucus, constituent donc une véritable barrière protectrice.

D'autre part, le microbiote interagit perpétuellement avec l'organisme tout entier *via* l'intestin qu'il habite et c'est ainsi qu'il stimule le système immunitaire, grâce à son étroite relation avec l'épithélium intestinal. Ceci grâce à des systèmes de reconnaissance et de surveillance des bactéries intestinales dont les récepteurs de type *Toll Like* (TLR) et *NOD-like* (NOD) appartenant aux *Pattern Recognition Receptors* (PRR) qui assurent la transmission des informations au système immunitaire. Lorsqu'ils sont activés, ces récepteurs sentinelles activent l'inflammasome et la voie NF- κ B notamment, impliquée dans l'activation de la transcription de très nombreux gènes (Liu *et al.*, 2017b).

Les phagocytes, éosinophiles et neutrophiles mais aussi les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les cellules dendritiques, participent toutes à la reconnaissance et la réponse immunitaire innée, rapidement mobilisable (Gaboriau-Routhiau et Cerf-Bensussan, 2016). La maturation du système immunitaire intestinal passe ensuite par les cellules de l'immunité adaptative, à savoir les lymphocytes T matures effecteurs et plasmocytes à IgA qui peuplent progressivement la muqueuse à partir de la naissance (Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010) (**Figure 22**).

Enfin, l'immunité intestinale n'est pas la seule impactée par le microbiote intestinal, le reste du système immunitaire semble être également impacté mais les liens sont encore mal compris. On sait par exemple que le traitement par antibiotiques de souriceaux nouveau-nés modifie leur microbiote intestinal et augmente leur risque de développer un asthme allergique (Russell *et al.*, 2012).

De la même façon, les animaux axéniques sont protégés contre la polyarthrite rhumatoïde expérimentale médiée par les Th17 (Liu *et al.*, 2016). À l'inverse, certaines bactéries intestinales semblent avoir un effet protecteur : dans le modèle de souris diabétiques non-obèses, les axéniques sont plus sujettes au développement de diabète que les animaux conventionnels (Schnupf *et al.*, 2013) (**Tableau VI**).

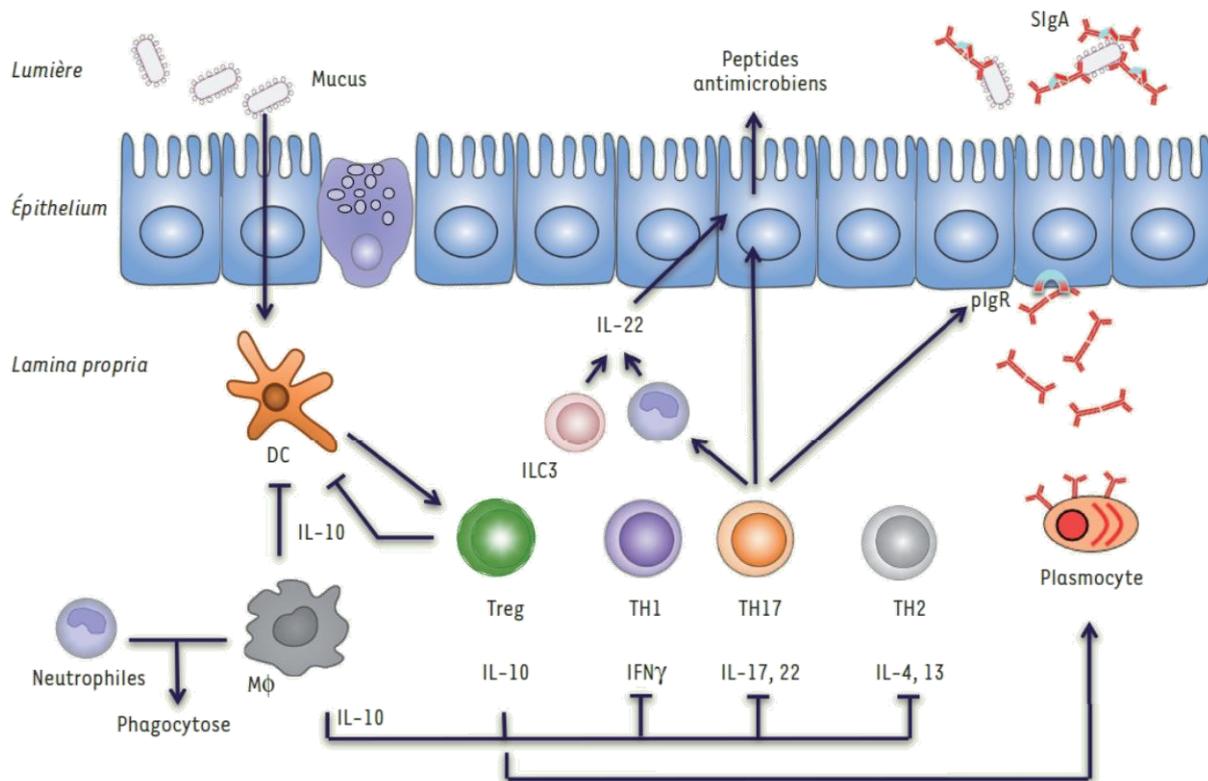


Figure 22 : Barrière immunitaire intestinale : coopération de nombreux mécanismes conjointement à la colonisation bactérienne de l'intestin (Gaboriau-Routhiau et Cerf-Bensussan, 2016). Les signaux bactériens tels que les lipopolysaccharides (LPS) sont captés par les cellules épithéliales via leurs récepteurs spécialisés (NOD, TLR) ou transmis par l'intermédiaire des cellules dendritiques (DC) afin d'activer la réponse immunitaire innée via notamment les cellules lymphoïdes innées (ILC3) et les macrophages ($M\phi$) qui renforcent la production de peptides anti-microbiens et exercent leur propriété de phagocytose. Les cellules dendritiques activées par les bactéries participent aussi à l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Les plasmocytes sécrètent des IgA, transportées vers la lumière intestinale sous forme d'IgA sécrétoires après fixation avec le récepteur des Ig. Elles forment alors des complexes avec les bactéries afin de les éliminer dans le mucus. En complément, de nombreuses populations de lymphocytes T $CD4^+$ (caractérisées par les cytokines qu'elles sécrètent) sont induites simultanément. L'homéostasie intestinale s'équilibre en maintenant une inflammation basale, physiologique sous le contrôle des lymphocytes T régulateurs (Treg) et la sécrétion d'interleukine-10 qui avec d'autres facteurs sécrétés par les cellules épithéliales notamment (TGF- β ou encore l'acide rétinoïque) vont permettre de réduire l'activation des cellules dendritiques afin de limiter la réponse inflammatoire. C'est la tolérance immunitaire. Bien que potentiellement pro-inflammatoires, les TH17 vont recruter via la sécrétion d'IL-17 des neutrophiles qui, outre leur fonction de phagocytose sont capables de produire de l'IL-22 et stimuler ainsi la barrière anti-microbienne. En cas de lésion dans la barrière intestinale, les bactéries normalement présentes dans le mucus entrent en contact direct et prolongé avec la muqueuse ce qui amplifie les réponses TH17 et TH1, en provoquant une inflammation pathologique.

Tableau VI : Principales anomalies immunitaires décrites dans les modèles axéniques par rapport aux modèles conventionnels (d'après Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010 ; Marteau et Doré, 2017)

Défaut immunologique	Phénotype chez la souris axénique
Développement de l'intestin grêle	Diminution du nombre et de la taille des plaques de Peyer. <i>Lamina propria</i> plus fine et amoindrie en lymphocytes. Moins de plasmocytes dans les centres germinatifs. Follicules lymphoïdes isolés plus petits Niveau d'ATP réduit dans l'intestin
Développement des ganglions mésentériques	Centres germinatifs plus petits avec moins de plasmocytes.
Lymphocytes T	LT CD8+ intra-épithéliaux moins nombreux et moins cytotoxiques LT CD4+ moins nombreux dans la <i>lamina propria</i> , diminution des Th17 dans le grêle mais pas dans le côlon. Cellules MAIT absentes de la <i>lamina propria</i> . Réduction du nombre de LT CD4+ et CD8+ et de la production de cytokines dans la rate. Diminution de l'expression de FoxP3 et capacités suppressives réduites des LT CD4+ et CD25+ dans les ganglions mésentériques.
Expression peptides antimicrobiens	Réduction par les cellules de Paneth.
Production Ig	Réduction de la production d'IgA par les LB, moins d'Ig sériques également. Taux fortement réduit d'IgG et IgM sériques
Expression de CMH, TLR	Expression du CMH de classe II et TLR2, 4 et 9 réduite dans les cellules épithéliales intestinales. Niveau d'IL-25 réduit.
Activation des récepteurs microbiens	Diminution de l'immunité des poumons face au virus influenza (Ichinohe <i>et al.</i> , 2011) ou à <i>Staphylococcus aureus</i> (Gauguet <i>et al.</i> , 2015)
Allergie médiée par les IgE	Surproduction d'IgE et d'IL-13. Augmentation des éosinophiles ou de la synthèse d'IL-5.

Enfin, le microbiote intestinal participe également au métabolisme en dégradant des nutriments et en participant à la synthèse de certaines molécules. En effet, la biotransformation de substrats d'origine alimentaire non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif suppose l'existence de très nombreuses activités métaboliques des bactéries. Bien que la composition du microbiote soit extrêmement variable d'un individu à l'autre, les fonctions métaboliques telles que la synthèse d'acides gras à chaîne courte (AGCC), d'acides aminés essentiels et de vitamines a été mise en évidence chez tous les individus (Marteau et Doré, 2017).

Le microbiote humain est particulièrement bien adapté à la dégradation des polysides. Selon le régime alimentaire, 10 à 60 grammes de glucides fermentescibles parviennent au côlon chaque jour (Bernalier-Donadille, 2010). Hormis le lactose, le saccharose (glucose + fructose) et une partie de l'amidon, l'Homme est incapable de digérer la plupart des polysaccharides. Ces glucides proviennent principalement des céréales, fruits et légumes dont les sucres complexes ne sont pas digérés par les enzymes digestives : ce sont les enzymes bactériennes du microbiote intestinal qui se chargent alors de dégrader ces polysaccharides en glucides simples qui seront fermentés (*Figure 23*).

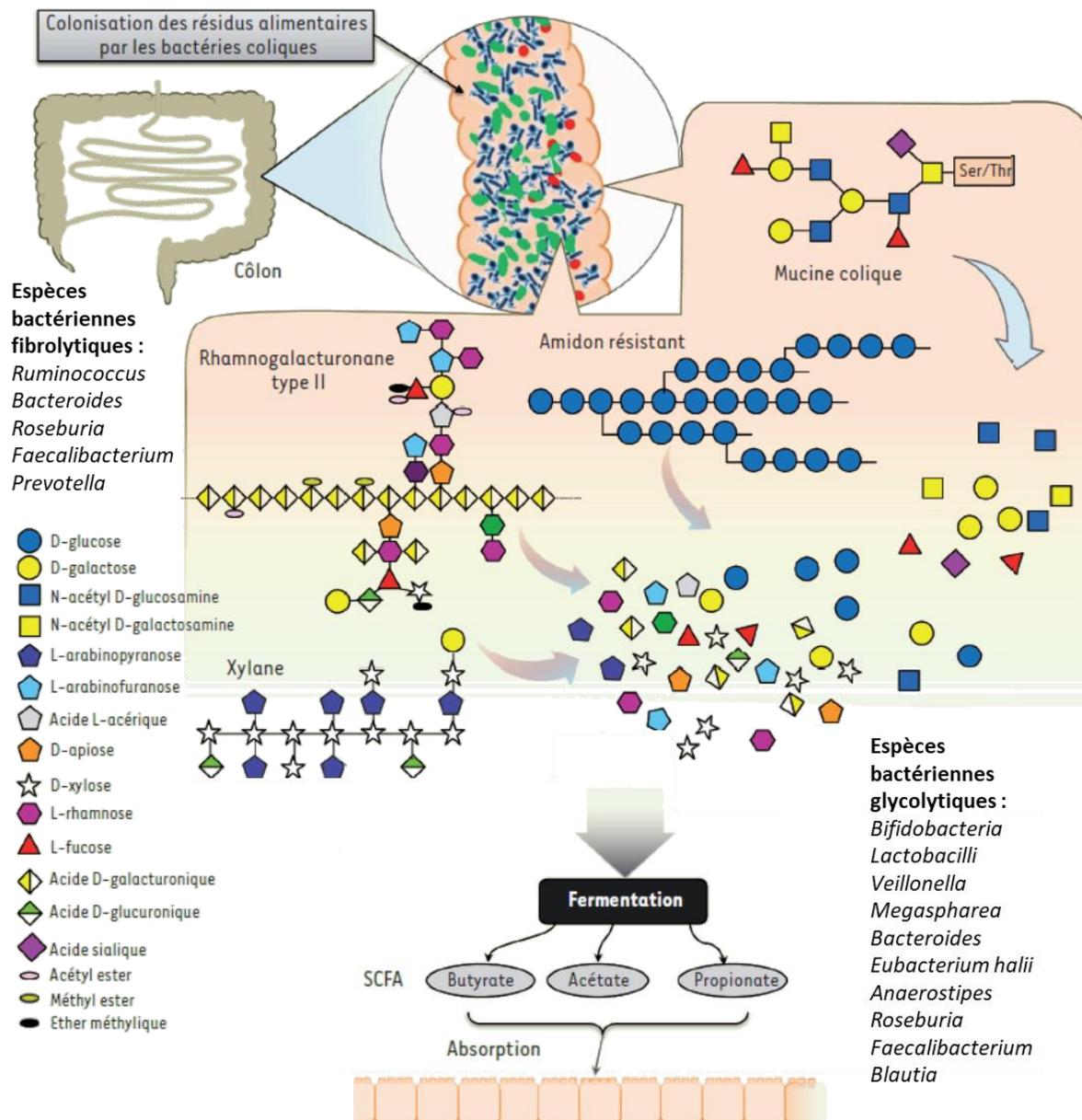


Figure 23 : Digestion des glucides par le microbiote intestinal (El Kaoutari et al., 2014). L'Homme n'est pas capable de digérer la plupart des glucides complexes comme le xylane, les constituants de la pectine comme le rhamnogalacturonane ou certaines fractions de l'amidon. On parle de fibres pour désigner ces polysaccharides non digérés. Les enzymes bactériennes sont capables de dégrader ces glucides en sucres plus simples puis la fermentation bactérienne de ces glucides simples produit des acides gras à courte chaîne (AGCC ou SCFA pour « short chain fatty acid ») qui sont absorbés par l'intestin.

Les produits terminaux de la fermentation à savoir les AGCC et les gaz contribuent au maintien de la diversité microbienne colique et fournissent de l'énergie aux entérocytes (Donohoe *et al.*, 2011). De nombreuses fonctions bénéfiques sont attribuées à ces acides gras : anti-inflammatoire par inhibition de la voie NF- κ B (Inan *et al.*, 2000), anti-cancéreuse par inhibition de la prolifération tumorale et stimulation de la prolifération des colonocytes sains (Vanhoutvin *et al.*, 2009). Ils auraient même un rôle dans la résistance à l'insuline et l'obésité (Gao *et al.*, 2009).

Les protéines et peptides constituent quant à eux la principale source d'azote pour les bactéries du microbiote. Un grand nombre de bactéries possèdent une activité protéolytique (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*) (Bernalier-Donadille, 2010). À l'inverse de la fermentation des glucides, la dégradation protéique par le microbiote génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques : ammoniacque, phénols, sulfures ainsi que quelques AGCC et AGCC ramifiés qui sont un marqueur de protéolyse colique car spécifique de la désamination par le microbiote intestinal (**Figure 24**).

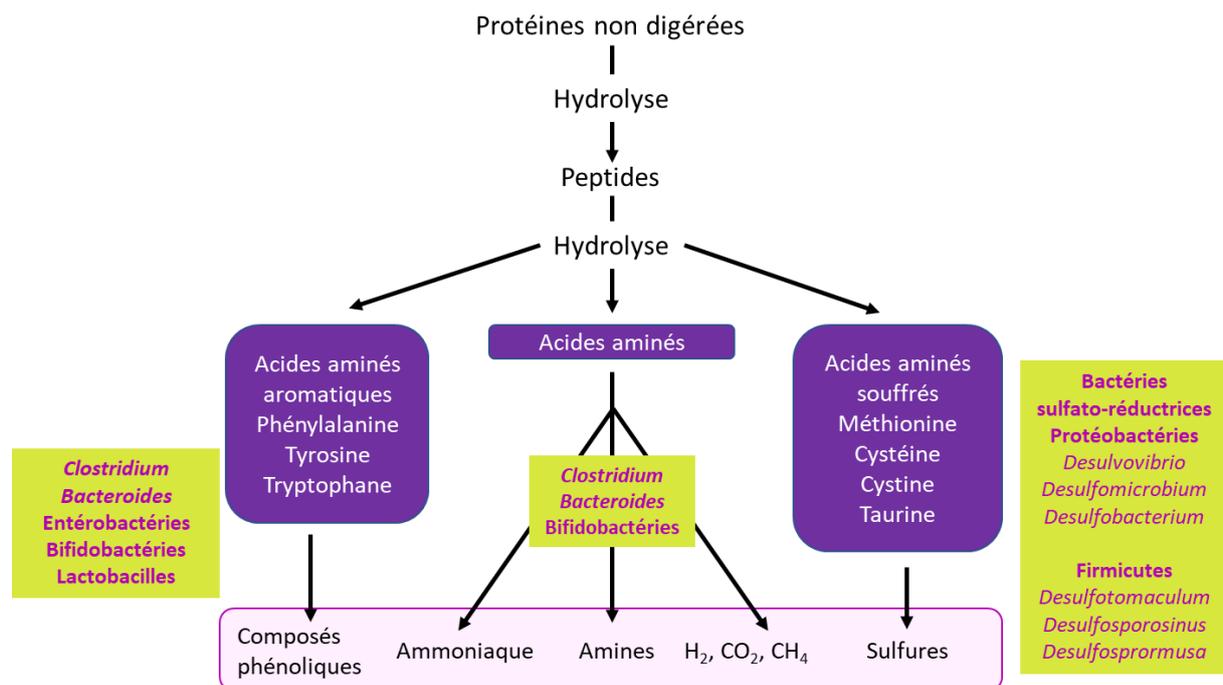


Figure 24 : Digestion microbienne des protéines (Marteau et Doré, 2017). L'hydrolyse bactérienne des peptides dans le côlon produit des composés potentiellement toxiques (ammoniacque, phénols...). Cependant la fermentation des glucides contribue à diminuer la disponibilité de ces composés en stimulant la protéolyse bactérienne. La concentration en ammoniacque par exemple résulte d'un équilibre entre la désamination bactérienne et l'utilisation de l'ammoniacque libéré par les cellules pour leur biosynthèse protéique.

La fraction de lipides parvenant au côlon est assez faible, environ 5 à 8 grammes par jour selon les régimes alimentaires (Rajilić-Stojanović, 2013). La plupart des espèces bactériennes possèdent des lipases et peuvent ainsi hydrolyser les triglycérides à chaîne longue. Le microbiote est également capable de convertir le cholestérol en coprostanol bien que les espèces bactériennes ne soient pas encore bien identifiées. De plus, les bactéries sont également capables de métaboliser les hormones stéroïdiennes excrétées dans la bile ainsi que les sels biliaires associés à l'ingestion de lipides et qui échappent au cycle entéro-hépatique (Ridlon *et al.*, 2006).

- **Microbiote et alimentation**

À l'âge adulte, de nombreux facteurs environnementaux tels que l'exposition aux antibiotiques, à certains antiacides ou les changements alimentaires modulent la composition du microbiote intestinal (*Figure 25*). Cependant on estime que 5% seulement de la variabilité inter-individuelle dans la composition du microbiote serait due aux habitudes alimentaires (Tap *et al.*, 2009).

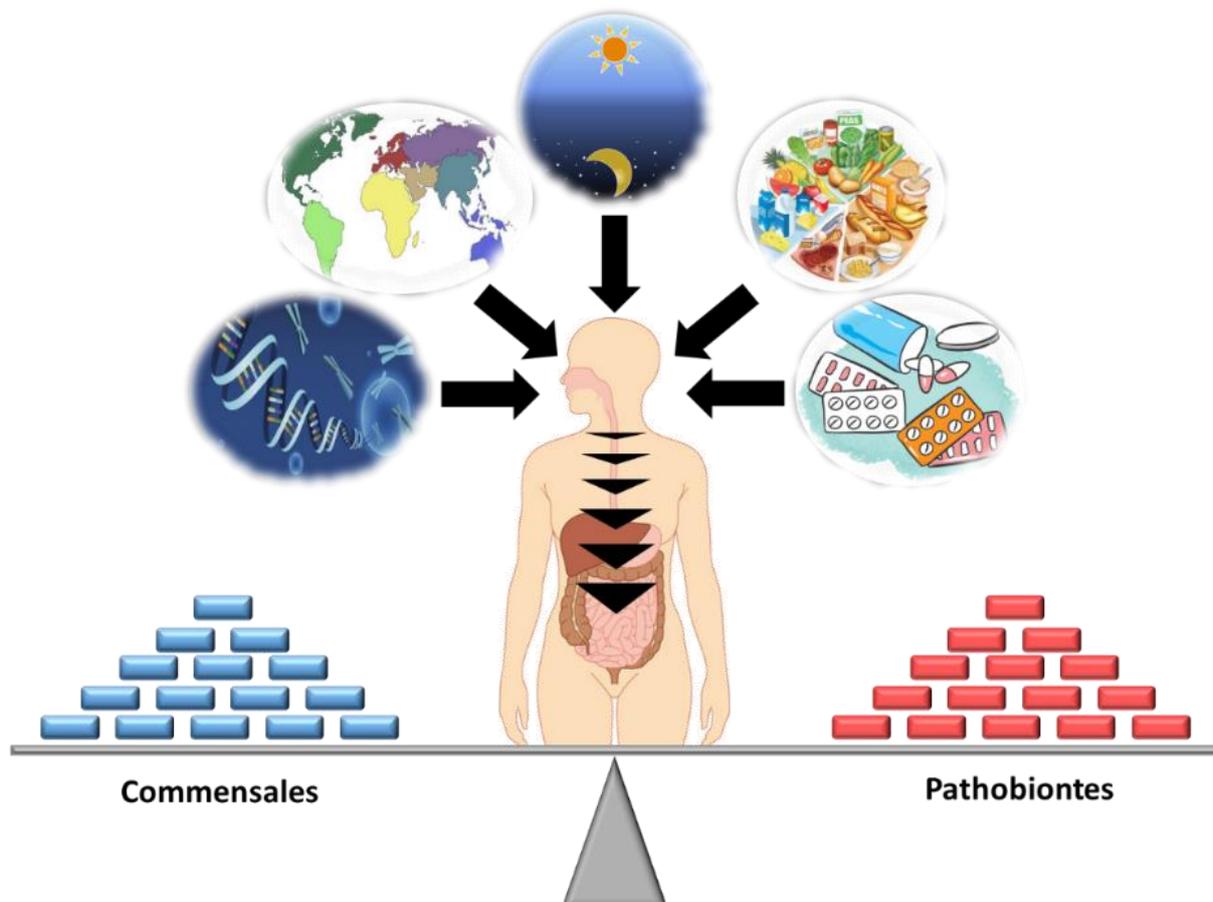


Figure 25 : Facteurs modulant l'homéostasie intestinale chez l'adulte (adapté de Marteau et Doré, 2017 ; Konkel, 2013). La génétique, la localisation géographique, le rythme circadien, l'alimentation ainsi que de nombreux médicaments (antibiotiques mais aussi anti-acides, anti-inflammatoires, contraceptifs) peuvent moduler l'homéostasie du microbiote intestinal.

Parmi les très nombreux métabolites du microbiote intestinal, on retrouve également certaines vitamines comme la ménaquinone (vitamine K2), la cobalamine (vitamine B12) et la biotine (vitamine B8) qui sont produites en très grande quantité par le microbiote intestinal. D'autres comme les vitamines B1, B2, B6 et B9 sont produites en trop faibles quantités pour constituer un apport suffisant (Qin *et al.*, 2010; Bernalier-Donadille, 2010; McDermott et Huffnagle, 2014).

Ainsi, l'alimentation va moduler la composition du microbiote. Une grande partie des aliments que nous ingérons n'est pas digérée par l'intestin grêle et sera alors fermentée par le microbiote intestinal. Par exemple, une alimentation trop riche en protéines et en graisses animales provoque une augmentation des *Bacteroidetes* dans le microbiote dominant et pourra conduire à une surproduction de sulfure par les bactéries sulfato-réductrices (Wu *et al.*, 2011).

De même, de nombreuses études suggèrent que l'alimentation riche en fibres favorise la richesse du microbiote intestinal, avec de nombreux bienfaits (Cotillard *et al.*, 2013). C'est ainsi que les prébiotiques (glucides non digestibles) peuvent diminuer le poids corporel, la stéatose hépatique, le développement de la masse adipeuse ou encore la sévérité du diabète dans différents modèles animaux (Cani et Delzenne, 2009) (**Figure 26**).

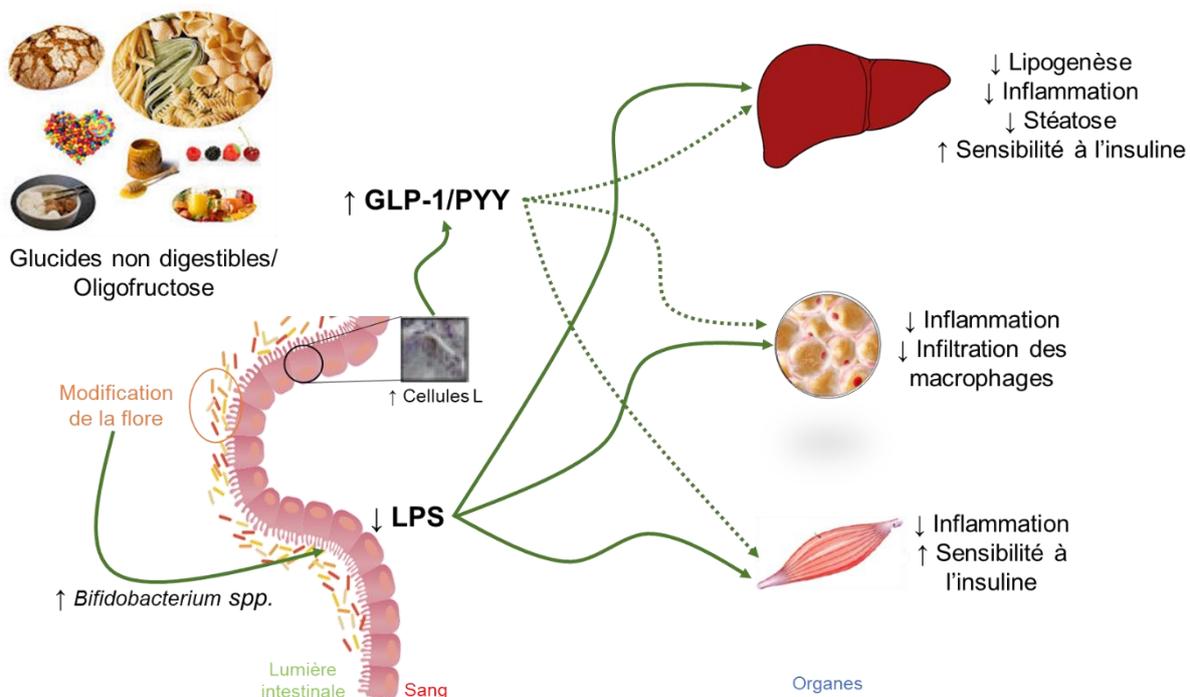


Figure 26 : Effets physiologiques des prébiotiques sur la flore intestinale (d'après Delzenne et Cani, 2008). L'ingestion de fibres enrichit la flore intestinale en bifidobactéries ce qui s'accompagne d'une diminution de lipopolysaccharides (LPS) dans le sang et donc d'une diminution de l'inflammation. De plus, la fermentation de ces fibres augmente le nombre de cellules intestinales produisant du GLP-1 (glucagon-like peptide-1) et du PYY (peptide YY) impliqués tous les deux dans la régulation de l'homéostasie glucidique et de la satiété.

Le régime alimentaire a donc une forte influence sur la composition bactérienne, c'est pourquoi les nombreuses études comparatives montrent que les Américains ont un microbiote plus riche en *Firmicutes*, les Japonais en *Actinobacteria*, les Chinois en *Bacteroidetes* (Nam *et al.*, 2011).

On retrouve également des différences significatives selon le mode de vie, les pratiques culturelles et le statut socio-économique : tous ces facteurs influencent l'alimentation (richesse en viande ou en produits transformés, fruits et légumes frais etc...) (Tyakht *et al.*, 2013).

Comme nous l'avons vu, les glucides non digestibles sont métabolisés par le microbiote intestinal. Ainsi, une alimentation enrichie en prébiotiques comme l'inuline (que l'on retrouve dans les endives et l'artichaut par exemple) permettra de cibler spécifiquement certaines bactéries. Il est donc primordial de garder à l'esprit que se nourrir c'est également nourrir son microbiote intestinal et ainsi prévenir des pathologies telles que la stéatose hépatique ou l'obésité (Cani, 2005; Cani *et al.*, 2005; Delzenne *et al.*, 2007).

De la même manière, les régimes riches en graisses saturées et pauvres en poisson (acides gras insaturés) sont corrélés à une modification du microbiote intestinal (Caesar *et al.*, 2015). Tandis que le régime méditerranéen, riche en fruits et légumes frais, légumineuses, oléagineuses, huile d'olives et céréales complètes, a montré une modulation du microbiote intestinal et ce, même si les signes cliniques du syndrome métabolique persistent. Passé un an, ce régime s'avère protecteur face au diabète grâce en partie, à l'enrichissement du microbiote en *Roseburia* spp (Haro *et al.*, 2016a, 2016b).

Concernant les régimes végétariens, de par leur richesse en fibres et leur faible teneur en matière grasse, ils modifient également le microbiote intestinal : on y trouve une dominance de *Clostridium coccooides* et *Clostridium ramosum* mais l'absence de *Faecalibacterium prausnitzii* (Hayashi *et al.*, 2002), plutôt retrouvé chez les consommateurs de poisson et de viande (Mueller *et al.*, 2006). Les régimes les plus stricts, végétaliens, provoquent une nette diminution de *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* et des Entérobactéries spp. (Cotillard *et al.*, 2013 ; Zimmer *et al.*, 2012).

Enfin, les régimes hypocaloriques, riches en glucides à faible indice glycémique et en fibres solubles, ont un impact sur la richesse bactérienne et sur des groupes bactériens spécifiques tels que *Akkermansia muciniphila*, souvent associée à la richesse en fibres de l'alimentation et liée à un meilleur métabolisme glucidique et lipidique (Dao *et al.*, 2016; Everard *et al.*, 2011; Le Chatelier *et al.*, 2013).

- **Microbiote et pathologies**

Le microbiote intestinal contribue à l'absorption des glucides et des lipides et il régule le stockage des graisses et est impliqué dans la prise de poids (Backhed *et al.*, 2004). En effet, des expérimentations ont démontré le rôle du microbiote dans la régulation du poids : des souris axéniques et soumises à un régime hyperlipidique ne prennent que peu de masse grasse malgré des apports caloriques accrus, tandis qu'après transfert de flore fécale, ces souris axéniques prennent du poids très rapidement (Turnbaugh *et al.*, 2008).

De même, le transfert de flore fécale de patients obèses à des souris axéniques les fait grossir davantage et provoque plus d'anomalies métaboliques que celles recevant des selles de patients non obèses en dehors de modifications alimentaires (Ridaura *et al.*, 2013). D'autres études montrent qu'une restriction calorique est associée à une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes* aussi bien chez l'Homme (Ley *et al.*, 2006) que chez la souris (Turnbaugh *et al.*, 2008).

Le microbiote n'étant pas une simple collection de micro-organismes indépendants mais un véritable système structuré, avec de nombreuses interactions. Il est difficile de définir un microbiote sain ou une dysbiose spécifique d'une pathologie, cependant le microbiote a été identifié comme un facteur majeur de diverses pathologies digestives ou non (**Tableau VII**).

Tableau VII : Principales pathologies dans lesquelles une dysbiose intestinale a été observée.

Pathologie	Référence
Diarrhées infectieuses et notamment les infections à <i>Clostridium difficile</i> , seule pathologie où la transplantation fécale est actuellement curative	(Liubakka <i>et al.</i> , 2016)
Syndrome de l'intestin irritable où des perturbations quantitatives du microbiote et des altérations métabolomiques ont été décrites	(Zhuang <i>et al.</i> , 2017)
Maladie cœliaque où les <i>Firmicutes</i> et <i>Proteobacteria</i> sont retrouvées en abondance	(Losurdo <i>et al.</i> , 2016)
Syndrome du grêle court où la dysbiose colique et la pullulation bactérienne intestinale intraluminaire dans le grêle exposent à de nombreuses complications	(Piper, 2018)
MICI (voire chapitre suivant)	
Entérocolites ulcéro-nécrosantes, dont la physiopathologie reste incomplètement expliquée mais dans laquelle de nombreux arguments impliquent le genre <i>Clostridium</i>	(Schönherr-Hellec <i>et al.</i> , 2017)
Cancers digestifs, en particulier le cancer colorectal dans lequel une dysbiose spécifique est observée et pour lequel le rôle de l'alimentation « occidentale » est clairement établi	(Keku <i>et al.</i> , 2015).
Obésité, chirurgie bariatrique : l'alimentation aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif module le microbiote intestinal de ces patients, bien que le rôle causal ne soit pas encore clairement établi	(Sen <i>et al.</i> , 2017)
Syndrome métabolique et diabète : certaines bactéries contribueraient au développement du diabète de type 2 et d'autres pourraient exercer un effet bénéfique en agissant sur la production d'hormones régulatrices de l'appétit et de la glycémie	(Everard <i>et al.</i> , 2014) (Zhang <i>et al.</i> , 2009)
Maladies hépatiques : il existe une dysbiose au cours de la cirrhose qu'elle qu'en soit la cause, avec une translocation de bactéries buccales au niveau intestinal. Au cours des stéatoses métaboliques ou de stéato-hépatites on retrouve notamment une augmentation des <i>Lactobacillus</i> et <i>E.coli</i> ainsi qu'une diminution de <i>Oscillibacter</i>	(Bashiardes <i>et al.</i> , 2016)
Maladies cardiovasculaires : le microbiote intestinal pourrait influencer la prolifération endothéliale, l'instabilité des plaques d'athéromes ; il pourrait avoir un rôle dans la fibrose et l'insuffisance cardiaque	(Tang <i>et al.</i> , 2017)
Polyarthrite rhumatoïde : l'interprétation des observations reste complexe mais certains micro-organismes ont été identifiés comme plus arthritogéniques que d'autres dans les modèles animaux, et le microbiote des patients atteints de spondylarthropathies ou de polyarthrite diffèrent	(Breban <i>et al.</i> , 2017; Liu <i>et al.</i> , 2016)
Maladies psychiatriques et neurodégénératives : le rôle du microbiote dans la maturation de l'axe intestin-cerveau est maintenant établi et plusieurs études suggèrent un rôle bactérien dans les troubles anxieux dépressifs, l'autisme ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer	(Lv <i>et al.</i> , 2017)(Jiang <i>et al.</i> , 2017) (Pietrucci <i>et al.</i> , 2019) (Mangiola <i>et al.</i> , 2016)
Réactions allergiques : des perturbations du microbiote ont été observées avant tout symptôme allergique mais les résultats des études restent à ce jour relativement limités, cela impliquerait les clostridies et leurs interactions avec les cellules Treg	(Stefka <i>et al.</i> , 2014)
Psoriasis, acné : une dysbiose intestinale a été observée chez les patients atteints de psoriasis, et des arguments épidémiologiques supposent un lien entre l'axe intestin-cerveau-peau	(Tan <i>et al.</i> , 2018)
Gynécologie : le microbiote est suspecté dans les vaginoses et infections urinaires mais non démontré bien que des probiotiques oraux peuvent influencer la flore vaginale	(Bohbot <i>et al.</i> , 2012; Homayouni <i>et al.</i> , 2014)

3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les MICI regroupent principalement deux maladies distinctes : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), qui se différencient en fonction de leurs manifestations cliniques (décrites ci-dessous et résumées dans le **Tableau VIII**). Environ 15 % des patients présentent des colites dites indéterminées. La distinction entre ces colites s'appuie sur l'âge au diagnostic, la localisation, l'évolution phénotypique (inflammatoire, sténosante, fistulisante), la sévérité et les atteintes extra-digestives.

3.1. Épidémiologie descriptive

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies dont la prévalence augmente dans les pays industrialisés (**Figure 27**). Plus de 200 000 personnes sont atteintes en France selon les estimations de l'Association Française Aupetit (AFA – Vaincre la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique) et 2,5 millions en Europe. Ces affections peuvent atteindre la totalité du tube digestif. Elles sont particulièrement invalidantes, récidivantes et incurables. Par conséquent, les MICI représentent un véritable enjeu de santé publique compte tenu de leur caractère idiopathique (Molodecky *et al.*, 2012).

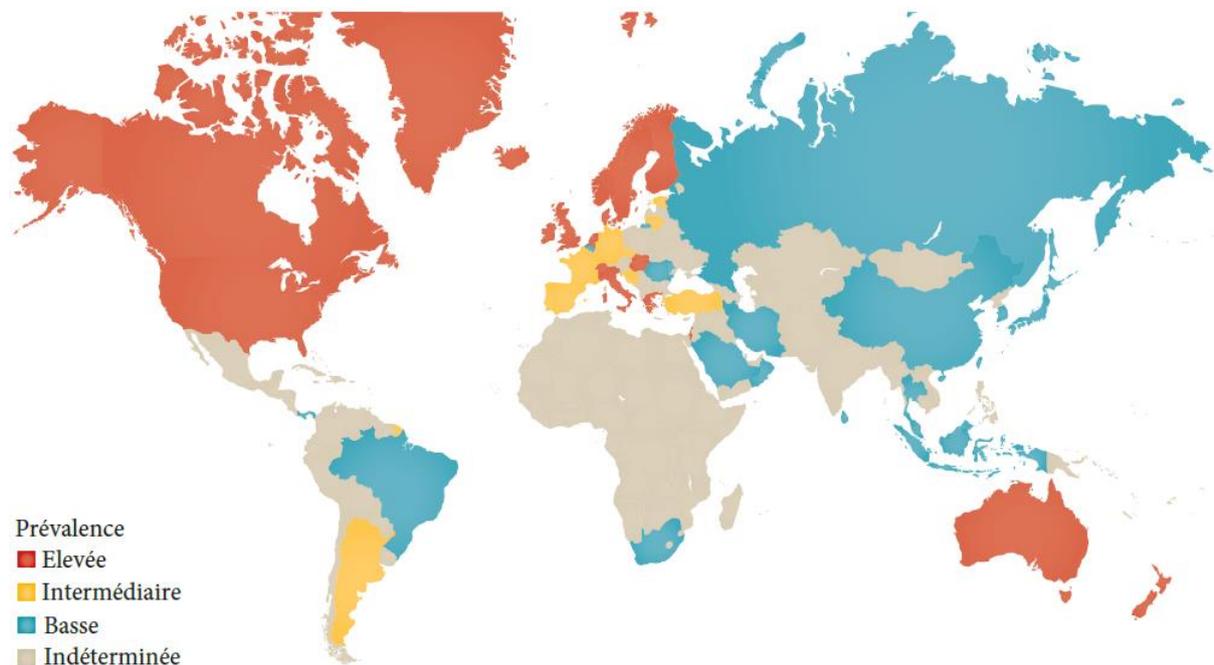


Figure 27 : Incidence des MICI dans le monde en 2015 (d'après Kaplan, 2015). Données épidémiologiques de Molodecky *et al.*, 2012. Ces pathologies touchent majoritairement les pays industrialisés, laissant suggérer un lien entre MICI et facteurs environnementaux (habitudes alimentaires).

Elles évoluent par poussées inflammatoires entrecoupées de phases asymptomatiques. L'étiologie de ces pathologies est à l'heure actuelle encore mal connue et la prise en charge des patients se limite à la gestion des poussées inflammatoires par des traitements palliatifs. La qualité de vie des patients reste fortement impactée. Dans les cas les plus graves, la chirurgie permet de retirer les zones les plus lésées, mais sans effet curatif, et le risque de récurrences reste important (Kökten *et al.*, 2016).

Il existe deux pics d'apparition des MICI : entre 20 et 30 ans puis, plus rarement entre 50 et 60 ans, mais 15 % des cas concernent des enfants, et selon l'Observatoire National des MICI, l'augmentation de l'incidence des MICI chez les moins de 20 ans est un phénomène relativement récent (*Figure 28*).

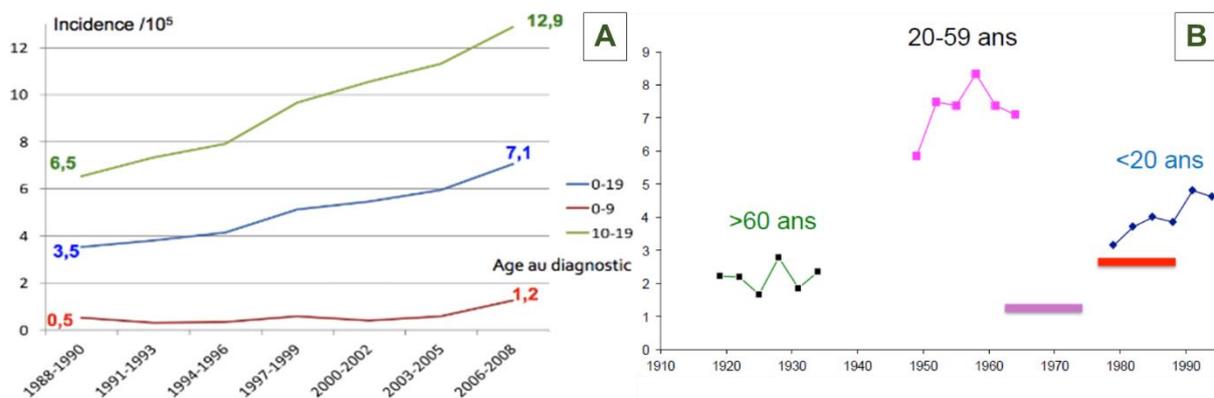


Figure 28 : Progression de l'incidence de la MC entre 1988 et 2008 dans la population des moins de 20 ans (A) et évolution de l'incidence de MC selon l'année de naissance (B) (Registre EPIMAD – Observatoire National de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique). Les MICI touchent des patients de plus en plus jeunes depuis ces dernières décennies, il existe un effet « période » qui confirme l'augmentation de l'incidence de MC chez les moins de 20 ans depuis les années 1980. Ces observations laissent supposer des facteurs de risque récents.

3.2. Maladie de Crohn (MC)

Décrite pour la première fois en 1932 par un médecin américain du nom de Burril B Crohn, cette maladie peut toucher l'intégralité du tube digestif (de la bouche jusqu'à l'anus). Les lésions sont toutefois majoritairement iléo-coliques (Torres *et al.*, 2017).

Les patients sont généralement diagnostiqués entre 20 et 30 ans mais la maladie peut survenir à tout âge. Évoluant sous forme de poussées inflammatoires (on parle alors de période d'activité de la MC) séparées par des périodes de rémission, la MC provoque des douleurs abdominales, accentuées après les repas, des diarrhées pouvant être sanglantes et un risque de lésions anales important.

Les lésions ano-périnéales sont d'ailleurs spécifiques de la MC. L'état général des patients est souvent altéré (perte d'appétit, perte de poids, fièvre...) et les poussées inflammatoires s'accompagnent fréquemment de manifestations extra-intestinales (articulaires, cutanées, oculaires...).

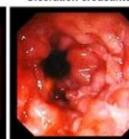
La distribution lésionnelle est discontinue : on observe des zones de paroi saine entrecoupées d'ulcérations aphthoïdes ou linéaires (illustrées dans le *Tableau VIII*). Les lésions sont transmurales puisqu'elles atteignent les couches de la musculuse ou de la séreuse, ce qui présente un risque accru de fistule, de perforation et d'abcès. La paroi intestinale est épaissie et on peut noter la présence de follicules lymphoïdes (on parle alors d'hyperplasie lymphoïde).

3.3. Rectocolite hémorragique (RCH)

Dans la RCH, l'atteinte est surtout rectale, et bien qu'on puisse observer parfois une extension en amont vers le caecum, l'intestin grêle n'est jamais atteint. Comme pour la MC, la RCH évolue par poussées inflammatoires, provoquant une altération de l'état général, des douleurs abdominales et rectales, des rectorragies et des diarrhées inconstantes avec émission de glaires (Ungaro *et al.*, 2017).

Contrairement à la MC, la distribution lésionnelle est diffuse et continue, limitée à la muqueuse et dans de rares cas à la partie superficielle de la sous-muqueuse. Les ulcérations sont superficielles mais peuvent évoluer vers des ulcérations creusantes sans pour autant former de fistule.

Tableau VIII : Caractéristiques cliniques et anatomiques de la MC et de la RCH (d'après Kökten et al., 2016)

	Maladie de Crohn	Rectocolite Hémorragique
Situation	Tout le tube digestif	Rectum et côlon distal
Clinique commune	Altération de l'état général Douleurs abdominales Évolution par poussées	
Clinique spécifique	Masse abdominale, Diarrhée avec ou sans saignements	Diarrhées et glaires
Distribution lésionnelle	Lésions discontinues, hétérogènes et transmurales	Lésions continues homogènes et superficielles
Complications	Fistules fréquentes, Lésions anales fréquentes Risque d'occlusion digestive	Risque de colite aiguë grave
Coloscopie	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <small>Ulcération aphthoïde</small>  </div> <div style="text-align: center;"> <small>Ulcération linéaire</small>  </div> </div>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <small>Ulcération superficielle</small>  </div> <div style="text-align: center;"> <small>Ulcération creusante</small>  </div> </div>

3.4. Physiopathologie des MICI

Ce sont des maladies multifactorielles très complexes : sans que ces maladies ne soient purement héréditaires, de nombreux gènes de susceptibilité ont été identifiés. Les facteurs environnementaux modulant le risque d'apparition d'une MICI ou son évolution sont encore mal connus. En revanche, le microbiote intestinal est apparu comme étant un élément fondamental dans la pathophysiologie des MICI et l'étude de son rôle dans ces pathologies est actuellement un enjeu majeur. La combinaison de ces trois facteurs conduit à une dérégulation de l'équilibre symbiotique entre le microbiote et son hôte, responsable d'une activation excessive et incontrôlée du système immunitaire intestinal contre la flore chez les individus prédisposés génétiquement (**Figure 29**).

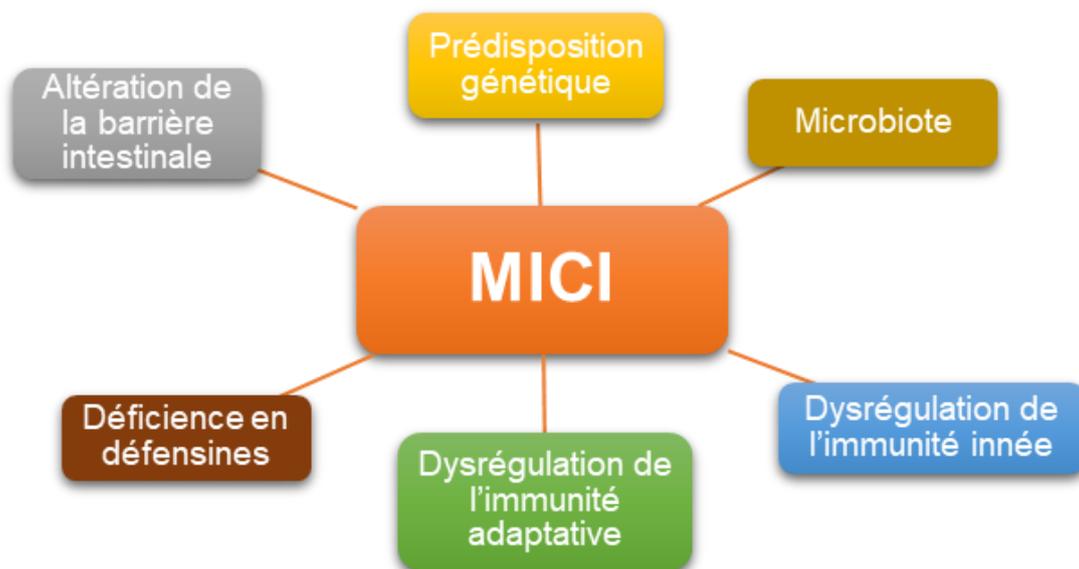


Figure 29 : Étiologie des MICI et mécanismes physiopathologiques impliqués (d'après Kaplan et Ng, 2017; Rogler, 2013). Ce sont des pathologies multifactorielles complexes dont l'étiologie précise est encore mal comprise.

3.5. Facteurs génétiques

Bien que les MICI ne soient pas des maladies purement génétiques, des enquêtes d'épidémiologie étiologique ont mis en évidence qu'environ 15 % des patients atteints présentent des antécédents familiaux de MICI (Kökten *et al.*, 2016). Depuis l'association du gène *NOD2* (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2) avec les MICI, près de 160 *loci* ont été identifiés comme étant impliqués dans la prédisposition génétique aux MICI (Jostins *et al.*, 2012). Un grand nombre des gènes identifiés ont un rôle dans la réponse immunitaire mais également dans des mécanismes de stress cellulaires et autophagique (**Tableau IX**).

Tableau IX : Principaux gènes de susceptibilité des MICI et fonctions biologiques associées (d'après Kökten *et al.*, 2016).

Fonction biologique	Mutation génique
Barrière épithéliale	<i>GNAI2, HNF4A, CDH1, ERRF1, MUC19, ITLN1</i>
Recrutement de cellules immunitaires	<i>IL8RA, IL8RB, CCL11, CCL2, CCL7, CCL8, CCR6, MST1</i>
Présentation antigénique	<i>ERAP2, LNPEP, DENND1B</i>
Voie Th17	<i>IL21, STAT3, IL23R, JAK2, TYK2, ICOSLG, TNFSF15</i>
Régulation des lymphocytes T	<i>IL2, IL7R, PIM3, TNFRSF9, TNFSF8, IFNG, NDFIP1, TAGAP, IL2R, TNFSF8, IL12B, IL23, PRDM1, ICOSLG</i>
Régulation lymphocytes B	<i>IL7R, IRF5, IL5, IKZF1, BACH2</i>
Tolérance immunitaire	<i>IL1R1, IL1R2, IL27, SBNO2, NOD2, IL10, CREM</i>
Migration cellulaire	<i>ARPC2, LSP1, AAMP</i>
Autophagie	<i>DAP, PARK7, ATG16L1, IRGM, NOD2, LRRK2, CUL2</i>
Apoptose	<i>DAP, PARK7, ATG16L1, IRGM, NOD2, LRRK2, CUL2</i>
Stress oxydatif	<i>HSPA6, DLD, PARK7, PRDX5, BACH2, ADO, GPX4, GPX1, SLC22A4, LRRK2, NOD2, CARD9, UTS2, PEX13</i>
Stress du réticulum endoplasmique	<i>SERINC3, CPEB4, ORMDL3, XBP1</i>

3.6. Facteurs de risque environnementaux et MICI

L'impact de l'environnement sur les MICI est illustré par plusieurs études ayant montré que chez des populations migratoires, l'arrivée dans un pays occidental industrialisé déclenche l'apparition de cas de MICI dans des populations jusqu'alors préservées dans leurs pays d'origine. Face à cette nette corrélation entre l'apparition des MICI et les changements environnementaux, de nombreuses études ont été menées afin d'identifier les facteurs déclenchants ou aggravants des MICI (**Figure 30**) (Foster et Jacobson, 2013; Molodecky *et al.*, 2012).

Actuellement, les seuls facteurs environnementaux indiscutablement associés aux MICI sont le tabagisme et l'appendicectomie. Ainsi, le tabagisme possède paradoxalement un effet protecteur vis-à-vis de la survenue des poussées chez les patients RCH (par une diminution de la perméabilité membranaire et une augmentation du mucus au niveau colique) et délétère pour la MC (augmentant le recours à la chirurgie, le risque d'infarctus) (Torres *et al.*, 2017).

De même, l'appendicectomie avant l'âge de 20 ans réduit le risque de 70 % d'apparition de RCH alors qu'elle semble augmenter le risque de MC (Ungaro *et al.*, 2017). Aucun consensus sur l'association entre les autres facteurs environnementaux (alimentation, antibiothérapie, contraceptifs, vaccination...) n'a été trouvé.

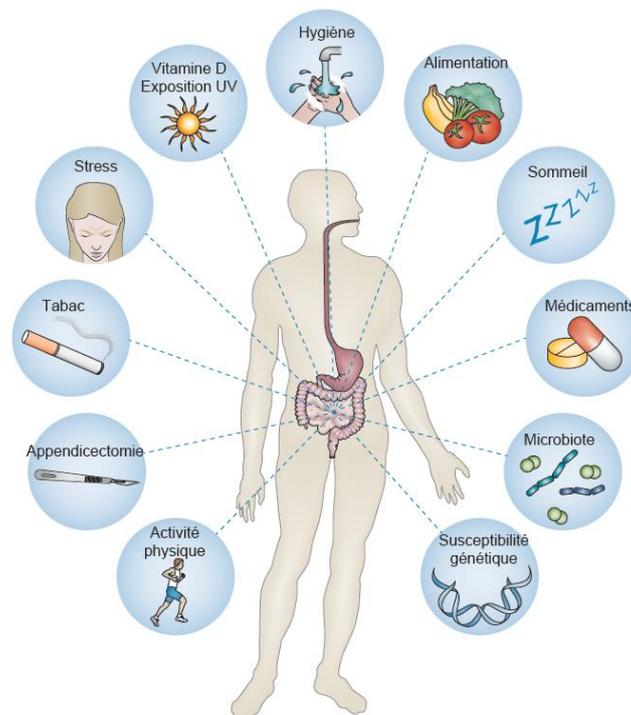


Figure 30 : Facteurs impliqués dans le développement des MICI (adapté de Ananthkrishnan, 2015). Aucun des facteurs de risques seul n'est suffisant pour le développement de la maladie. Il existe des interactions complexes entre chaque facteur qui conduisent au développement d'une MICI.

3.7. Microbiote et MICI

Le microbiote est un facteur clé de la physiopathologie des MICI puisque de très nombreuses études montrent une dysbiose intestinale chez les patients (Manichanh, 2006; Miyoshi et Chang, 2017). Ce déséquilibre ne concerne pas seulement les bactéries, on observe également des altérations du compartiment fongique, marquées par une diminution de la biodiversité, de la composition et une désorganisation totale du microbiote provoquant une surproduction de cytokines inflammatoires (**Figure 31**) (Sokol *et al.*, 2008, 2017).

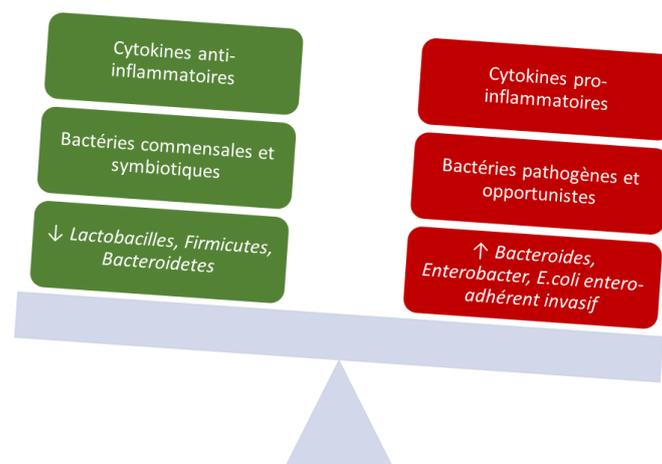


Figure 31 : Dysbiose intestinale observée chez les patients atteints de MICI (d'après Kökten *et al.*, 2016). La dysbiose correspond à un déséquilibre entre les bactéries dites « protectrices » du microbiote intestinal et les bactéries « délétères ». Il en résulte une surproduction de cytokines pro-inflammatoires majorant la réponse immunitaire et donc l'inflammation.

En effet, l'inflammation chez les patients MICI touche particulièrement les zones de fortes concentrations en micro-organismes, à savoir l'iléon distal et le côlon (Elson *et al.*, 2005). On observe notamment chez ces patients une diminution des *Firmicutes* par rapport à des témoins sains (Frank *et al.*, 2007), et en particulier la perte de *Faecalibacterium prausnitzii* (une bactérie sécrétant une protéine aux effets anti-inflammatoires par inhibition de la voie NF- κ B sur des modèles de colites expérimentales) qui semble être prédictive des récurrences post-opératoires de la MC, de même que de faibles taux fécaux de micro-organismes (Rajca *et al.*, 2014) (**Figure 32**).

Parallèlement, on observe une augmentation de *E.coli adhérente invasive* (AIEC) chez 36 % des sujets atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Cette bactérie intracellulaire est capable de survivre et se multiplier dans les macrophages sans induire de mort cellulaire, ces derniers sécrètent alors des taux élevés de TNF- α (Palmela *et al.*, 2018).

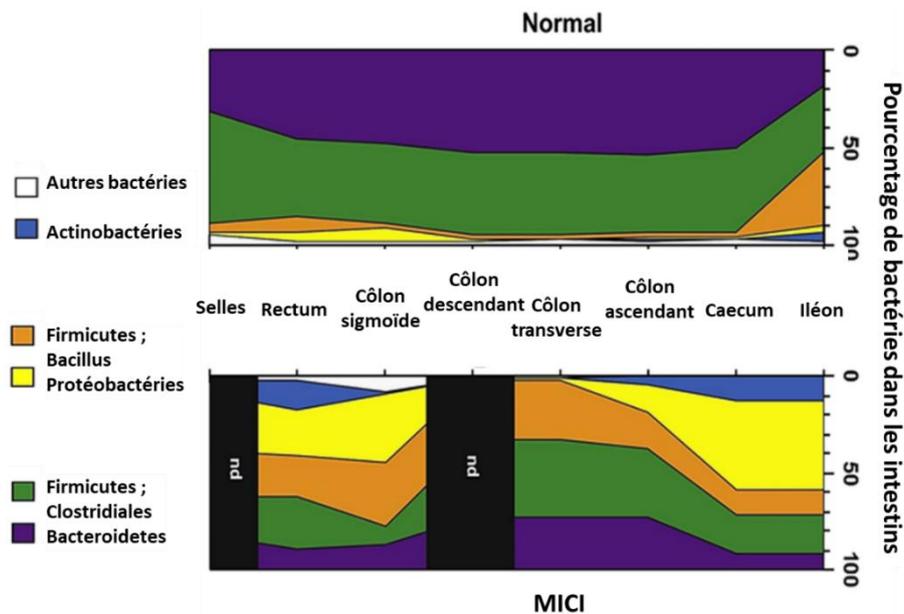


Figure 32 : Comparaison microbiote intestinal "sain" au microbiote observé chez les patients atteints de MICI (adapté de Peterson *et al.*, 2008). La distribution des phylas bactériens prédominants dans le tractus digestif est représenté depuis l'iléon aux selles : l'abondance relative des bactéries a été mesurée chez 5405 patients MICI et 13 000 témoins.

Dans la plupart des modèles murins, la présence du microbiote intestinal est nécessaire au développement d'une colite spontanée ou induite (Elson *et al.*, 2005). Il est également décrit chez la souris qu'une mutation du gène *NOD2* est associée à une dysbiose (Natividad *et al.*, 2012). Le développement du modèle TRUC (T-bet^{-/-} RAG2^{-/-} ulcerative colitis) a permis de découvrir de façon inattendue que le facteur de transcription T-bet (régulateur des programmes génétiques de l'immunité innée et adaptative) influence le microbiote intestinal : la perte de ce facteur influence les populations bactériennes rendant le microbiote « colitogène » et transmissible à des hôtes sans prédisposition génétique (Garrett *et al.*, 2007).

Afin de valider les observations faites chez les patients MICI, notamment le déficit en *F.prausnitzii* (une bactérie appartenant au groupe *Clostridium IV*) (Sokol *et al.*, 2009), 17 souches bactériennes appartenant aux clusters *Clostridium* ont été administrées par voie orale à des souris adultes chez qui une colite a été chimio-induite au TNBS (Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique) par voie rectale : l'atténuation de la colite a été observée (Atarashi *et al.*, 2013).

D'autre part, l'analyse métabolomique de prélèvements fécaux a récemment montré des niveaux réduits de méthylamine et de triméthylamine ainsi qu'une quantité élevée d'acides aminés. Une dysbiose affectant l'absorption des nutriments pourrait être impliquée mais reste à démontrer (Marchesi *et al.*, 2007).

3.8. Mécanismes cellulaires

- **Système immunitaire**

Dans le contexte pathologique des MICI, l'équilibre entre le microbiote intestinal et son hôte est rompu. Bien que les mécanismes déclenchant soient encore mal compris, on sait que l'inflammation de la muqueuse et les lésions intestinales observées sont la conséquence d'une activation excessive du système immunitaire qui résulte de la dysbiose intestinale d'une part, et de la perte d'intégrité de la barrière muqueuse d'autre part (**Figure 33**).

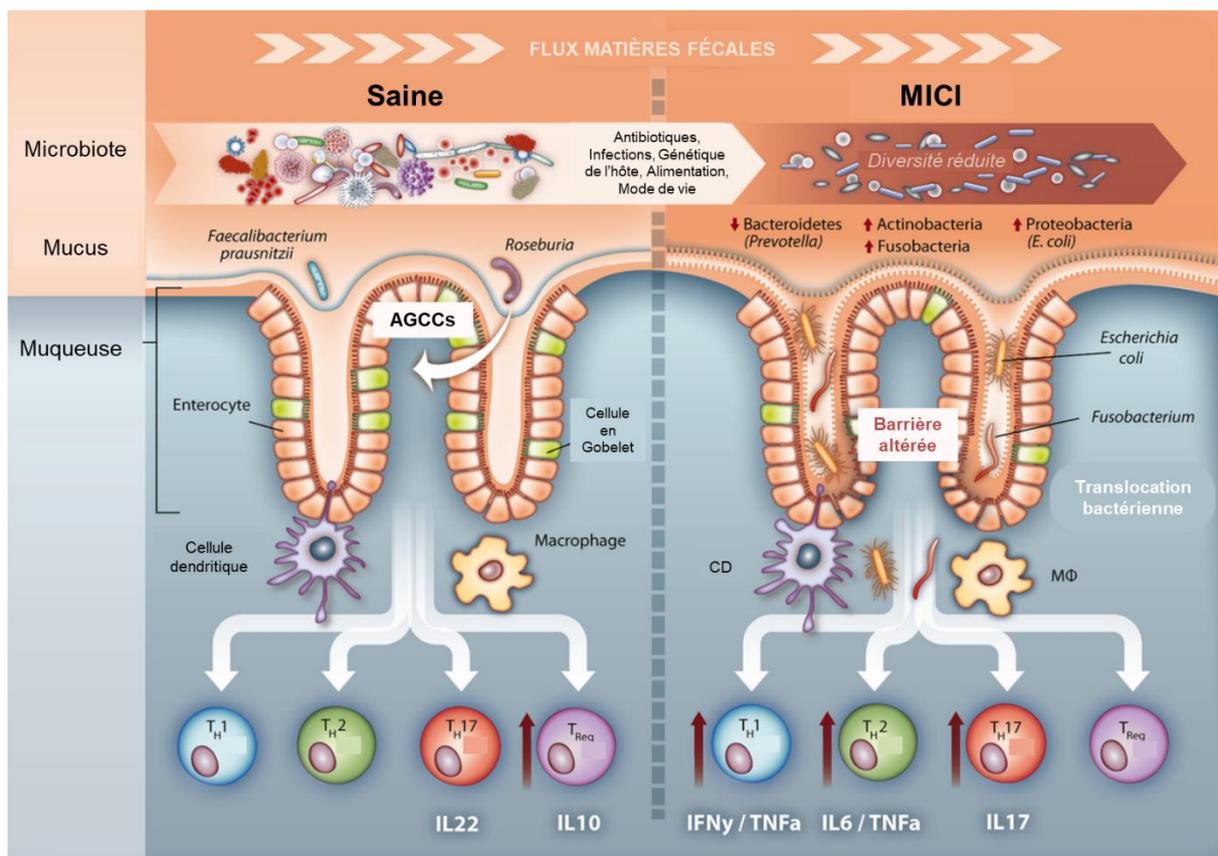


Figure 33 : Comparaison entre une muqueuse saine et inflammée atteinte de MICI (d'après Sommer et al., 2017). La dysbiose du microbiote intestinal conjointement à la perte d'intégrité de la barrière intestinale (diminution de la sécrétion de mucus et dégradation des jonctions cellulaires) conduisent à une hyperperméabilité intestinale, favorisant l'invasion de la lamina propria à laquelle le système immunitaire répond en activant les voies inflammatoire Th1, 2 et 17. AGCCs : Acides Gras à Chaîne Courte, CD : cellules dendritiques, Mφ : macrophage.

La dysbiose conduit à une surreprésentation des micro-organismes « délétères » (pro-inflammatoires) par rapport aux bactéries « protectrices ». Cette perte d'homéostasie du microbiote intestinal est aggravée par une perte de l'intégrité de la barrière intestinale. La baisse de sécrétion de mucus par les cellules en gobelet et de défensines par les cellules épithéliales et les cellules de Paneth, conduit à la possibilité de contacts directs et prolongés entre les bactéries et l'épithélium.

Finalement, la perte de certaines jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium rend la barrière intestinale perméable aux bactéries intestinales et permet l'invasion de la *lamina propria* (Khor *et al.*, 2011). Par conséquent, la dysbiose intestinale et la perte d'intégrité de la barrière muqueuse vont donc conjointement faciliter l'invasion de la muqueuse et déclencher l'activation du système immunitaire en réponse à l'activation par les antigènes bactériens des récepteurs TLR et NOD2 des cellules épithéliales, mésenchymateuses et des macrophages et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL-6 et IL-8).

Ces cytokines induisent la maturation et la migration vers les ganglions lymphatiques des cellules dendritiques qui vont synthétiser de l'IL-12 pro-inflammatoire au lieu de l'IL-10 anti-inflammatoire (produite habituellement en réponse aux antigènes commensaux). Les LT naïfs CD4⁺ vont alors se différencier en LT effecteurs (LTh1, LTh2 et LTh17) sous l'action d'IL-6 et IL-12 qui vont amplifier l'inflammation en libérant eux aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN γ , TNF- α , IL-1 β , et IL-17 (Mowat, 2003).

- **Autophagie**

L'autophagie est un mécanisme ubiquitaire responsable de la dégradation des constituants cellulaires par le lysosome. Ce processus peut être déclenché par les infections microbiennes, mais aussi l'accumulation de protéines malformées dans la cellule ou encore le stress oxydatif. Il permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en recyclant les composants et organites endommagés de la cellule. Il est également impliqué dans le développement du système immunitaire (*via* la présentation antigénique par les CMH).

Lorsqu'une bactérie est reconnue comme pathogène par les cellules de l'épithélium intestinal, elle active une cascade immunitaire afin qu'elle soit éliminée. Après avoir été reconnue par divers récepteurs (NOD et TLR) au niveau des macrophages ou des cellules épithéliales, elle est internalisée pour être dégradée par le lysosome.

Le rôle de l'autophagie ne se limite pas à l'élimination des micro-organismes ayant envahis la muqueuse. Elle participe également à la présentation d'épitopes de la bactérie digérée aux autres cellules de l'immunité (LTh, LT cytotoxiques, macrophages) afin de les activer.

On distingue trois formes d'autophagie (**Figure 34**). La micro-autophagie correspond à l'encapsulation du composé à dégrader par invagination directe de la membrane lysosomiale. La macro-autophagie nécessite la formation autour de l'élément à dégrader d'un autophagosome à double membrane, qui fusionnera avec le lysosome pour former une structure appelée autolysosome qui déverse son contenu dans le lysosome afin qu'il y soit dégradé. Enfin, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) permet une dégradation spécifique par le lysosome de composés cytosoliques (Yang *et al.*, 2015).

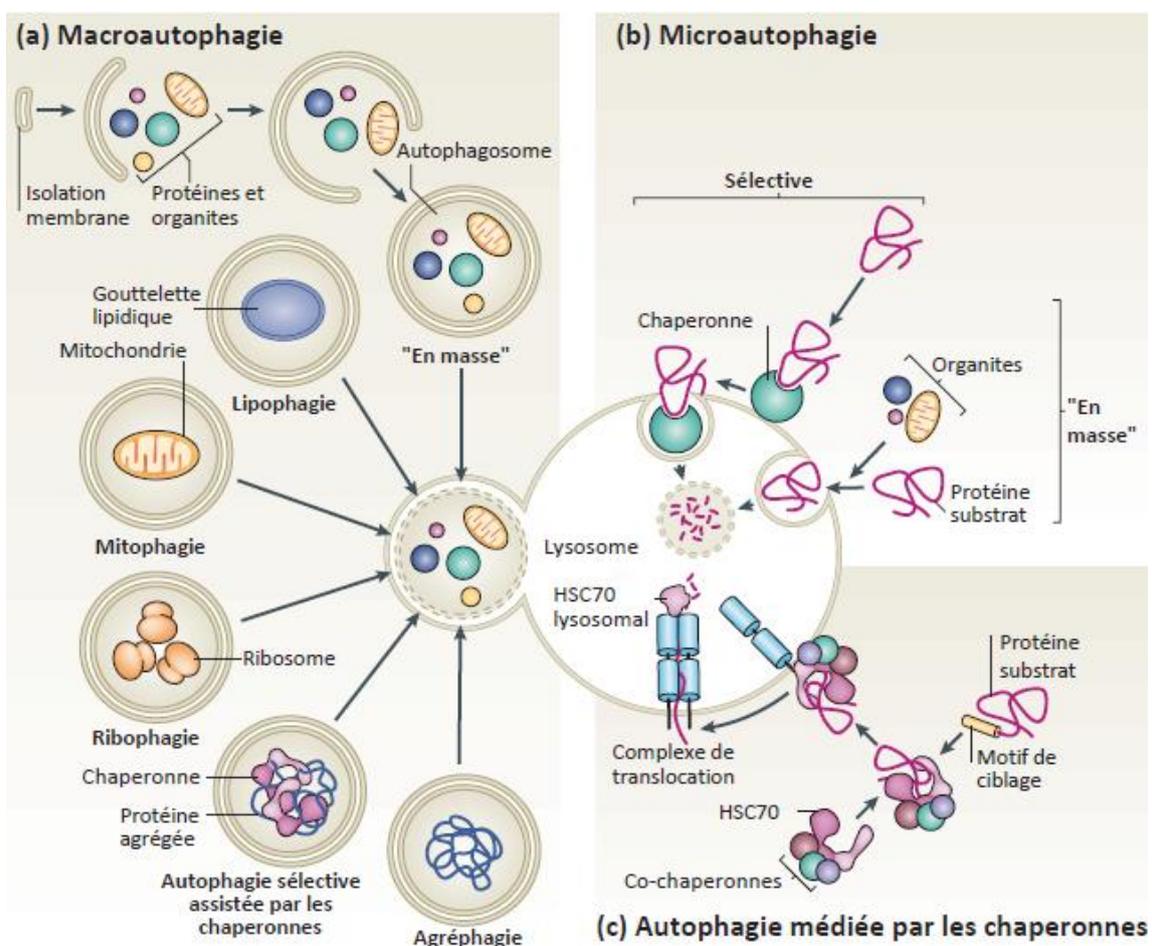


Figure 34 : Présentation des trois voies de l'autophagie (d'après Cuervo, 2011). La macro-autophagie (a) caractérisée par l'internalisation de la bactérie dans une structure membranaire (phagosome) qui fusionnera avec le lysosome. La micro-autophagie (b) qui correspond à l'internalisation directe par le lysosome de composants cytoplasmiques par invagination de sa membrane. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (c) permettant l'adressage au lysosome de protéines cytosoliques malformées possédant un motif (KFERQ) grâce aux protéines chaperonnes HSPA8 et HSC70 et au récepteur membranaire LAMP-2A. Une fois dans le lysosome, les protéines sont dégradées par les enzymes lysosomiales.

La voie de la macro-autophagie (**Figure 35**) fait intervenir de nombreux médiateurs : tout d'abord elle est induite par le complexe ULK1 (unc51-like kinase) – FIP200 et ATG13 dont l'activité est régulée par la protéine mTOR (inhibiteur de l'autophagie). Ce complexe permet d'initier la formation du phagophore (une structure membranaire isolée). L'élongation de cette structure est assurée par le complexe protéique ATG5, ATG12, ATG16L1 et LC3 et permettra d'enfermer les éléments à dégrader dans l'autophagosome qui pourra finalement fusionner avec le lysosome de la cellule où son contenu sera dégradé (Patel et Stappenbeck, 2013).

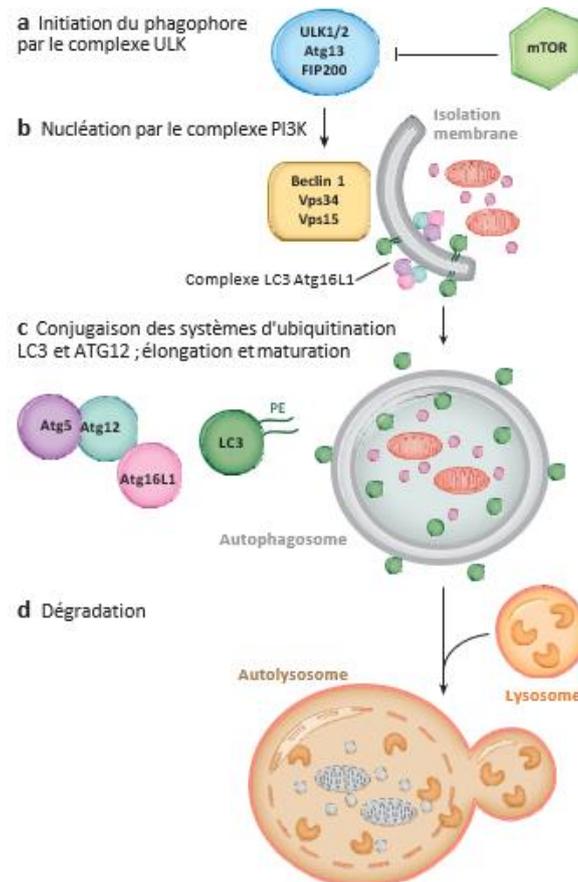


Figure 35 : Présentation du mécanisme séquentiel de la macro-autophagie (adapté de Patel et Stappenbeck, 2013). L'initiation de la formation du phagophore (a) est induite par le complexe ULK1/ATG13/FIP200. Cette structure membranaire est ensuite isolée par le complexe PI3K (b) avant d'être allongée grâce au complexe formé par les protéines LC3/ATG5/ATG12/ATG16L1 afin de former un autophagosome. Cette structure fusionne avec le lysosome de la cellule (d) afin d'en dégrader le contenu.

La CMA permet de dégrader les protéines présentant des anomalies structurales ou oxydées. Son rôle est déterminant en particulier dans un contexte de carence nutritionnelle car elle permet de recycler les acides aminés. C'est une forme de dégradation plus sélective que la macro-autophagie. En effet, les protéines dégradées par cette voie contiennent le motif peptidique KFERQ en position C terminale. Ce motif est spécifiquement reconnu par le complexe de protéines chaperonnes HSC70/HSPA8 afin d'initier l'adressage vers le lysosome.

Au niveau de la membrane lysosomale, ce complexe [Protéine/HSC70/HSPA8] est alors reconnu par le récepteur LAMP-2A présent à la surface du lysosome. En présence de son partenaire HSPA8 lysosomal (HSPA8_{lys}), ce récepteur LAMP-2A permet l'entrée de la protéine à dégrader dans le lysosome (Wang et Muller, 2015).

D'autres protéines chaperonnes, telles que HSP90, sont impliquées dans l'autophagie, mais également dans les différentes réponses au stress cellulaire. Des dysfonctionnements dans le processus autophagique contribuent à la pathogenèse des MICI (**Figure 36**)

Chez les patients souffrants de MICI, des perturbations dans ce mécanisme engendrent un défaut d'élimination des agents pathogènes, qui s'accumulent et favorisent ainsi la dysbiose intestinale. Finalement, ces anomalies conduisent à une réponse exacerbée du système immunitaire intestinal.

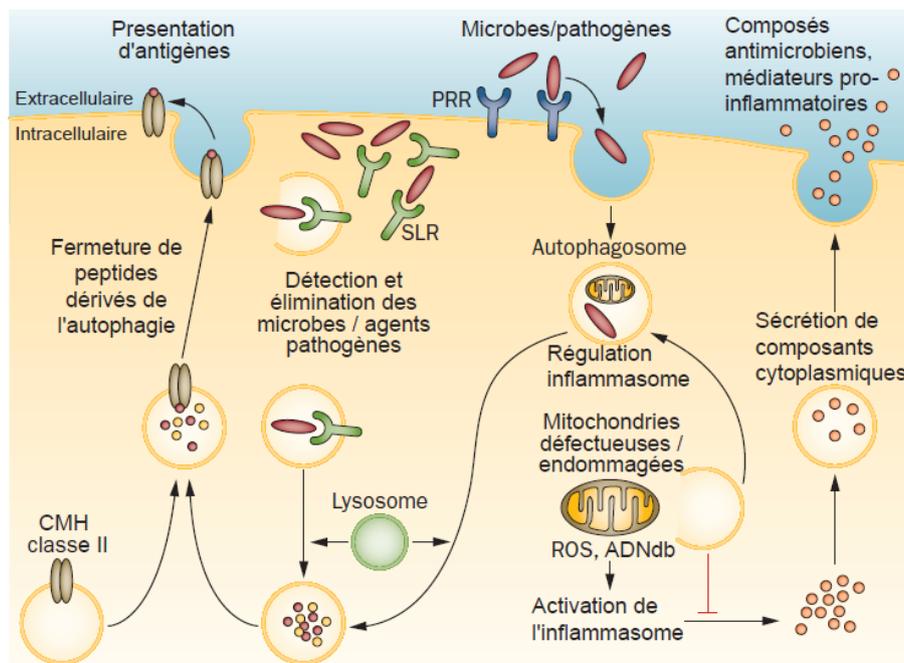


Figure 36 : Autophagie et régulation immunologique dans la pathogenèse des MICI (Nys et al., 2013). L'autophagie interagit avec les étapes essentielles de la réponse immunitaire : ce processus catabolique facilite la détection et l'élimination des pathogènes. Lors de l'activation des PRR (« Pattern Recognition Receptor ») l'autophagie pourrait être induite comme un mécanisme effecteur pendant que les SLR (« sequestosome 1/p62-like receptor ») intracellulaires ciblent les pathogènes de façon directe vers les autophagosomes. L'élimination autophagosomale des organites défectueux (mitochondries libérant des ROS : espèces réactives de l'oxygène et de l'ADN double brin) régule ainsi l'activation de l'inflammasome. L'autophagie pourrait également contribuer à la sécrétion inhabituelle de composés microbiens et médiateurs inflammatoires. Finalement les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes où le contenu y est dégradé et les peptides générés peuvent ensuite être acheminés vers la membrane pour la présentation antigénique de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II entraînant la régulation de la réponse immunitaire adaptative.

3.9. Prise en charge des MICI

Ces pathologies étant cryptogénétiques, la prise en charge thérapeutique actuelle ne permet pas de guérison mais peut limiter la fréquence et la sévérité des poussées. Le diagnostic d'une MICI est difficile à établir, il reste incertain pendant parfois plusieurs années, si bien qu'il peut être récusé 5 ans après sa découverte. En effet, 22,5% des patients initialement diagnostiqués atteints de colite indéterminée, 5,4% des patients diagnostiqués MC et 6,2% des cas de RCH ne sont finalement pas atteints de MICI (Henriksen *et al.*, 2006).

Le diagnostic est généralement établi en période de poussée, mais les patients souffrent de signes peu spécifiques et de façon intermittente, il est donc difficile d'évaluer avec précision la pathologie. De ce fait, de très nombreux scores ont été développés pour comparer la sévérité et évaluer au mieux l'évolution de la maladie chez un même malade (Marteau *et al.*, 2003).

L'éducation thérapeutique des patients est primordiale ; elle est réalisée par tous les professionnels de santé et un soin particulier doit être apporté pour aider le patient à mener une existence « normale ». En effet, au vu du caractère chronique et incurable de ces pathologies, pour garantir une bonne observance des traitements il est important d'accompagner les patients au mieux d'un point de vue psychologique (Dalibon, 2015). Les associations de patients telle que l'AFA en France, tiennent une place importante et sont de véritables partenaires aussi bien pour les autorités de santé que pour les professionnels impliqués (Louis et Marteau, 2019).

En dehors des complications graves et situation d'urgence (drainage des abcès, occlusions, péritonites...) la chirurgie est réservée aux malades résistants au traitement bien conduit. Elle consiste en l'exérèse des lésions inflammatoires et doit être la plus limitée possible tout comme le recours aux stomies, le plus souvent provisoire, mais non rare et impactant fortement la qualité de vie des patients (Caillo et Bourgaux, 2019).

L'alimentation n'est actuellement que peu prise en charge malheureusement, les seules recommandations actuelles sont de conserver une alimentation diversifiée et équilibrée (Hébuterne, 2019). Dans la MC, l'alimentation entérale à débit continu et la nutrition parentérale exclusive ont pourtant une efficacité démontrée en traitement des poussées, en particulier chez l'enfant et aident à corriger la dénutrition associée à la maladie (Wędrychowicz *et al.*, 2016). Dans la RCH, un régime d'épargne intestinale (restriction des fruits et légumes) peut être transitoirement mis en place lors des poussées les plus marquées (HAS, 2008).

L'accompagnement nutritionnel est pourtant capital car les MICI peuvent avoir un retentissement important sur l'état nutritionnel : dénutrition, carences en vitamines et micronutriments (Hébuterne, 2019). On sait aujourd'hui que de nombreux nutriments ont un effet sur l'intestin : les régimes gras et sucrés favorisent la perméabilité intestinale (Martinez-Medina *et al.*, 2014), les acides gras saturés activent la voie TLR4 (Rocha *et al.*, 2016), et la consommation d'antioxydants réduit le risque d'inflammation de la muqueuse (Pierre *et al.*, 2018).

D'autre part, des modèles animaux confirment ce lien entre alimentation et MICI : la consommation de régime hyperlipidique chez des souris $TNF^{\Delta ARE/WT}$ (modèle de MC iléales) provoque une apparition plus précoce de la colite (Gruber *et al.*, 2013), de même qu'il aggrave les colites spontanément développées par les souris $Mdr1a^{-/-}$ (Paik *et al.*, 2013).

Le rôle de la consommation de **sucres raffinés** dans l'apparition de la maladie de Crohn a été souligné mais manque encore de preuves suffisantes (Sakamoto *et al.*, 2005). De plus, l'étude prospective européenne EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) a analysée de manière globale la composition du régime alimentaire de 121 patients atteints de MC et 484 atteints de RCH. Elle montre qu'un profil alimentaire riche en légumes est inversement associé au risque de MC. Des analyses complémentaires sont en cours pour mieux caractériser le type de légumes associé à la diminution du risque. L'effet protecteur pourrait être médié par l'Aryl Hydrocarbon Receptor ou par le maintien d'une eubiose (Racine *et al.*, 2014).

Partie 2

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

L'augmentation de l'incidence des MICI dans les **pays industrialisés** (qui sont caractérisés la consommation de régimes alimentaires riches en sucres et en graisses) et l'implication de la composante environnementale dans leur physiopathologie mettent en avant l'impact majeur de l'alimentation sur la survenue et/ou l'aggravation de ces pathologies (Racine *et al.*, 2016).

Ceci est conforté par l'existence de similitudes entre l'obésité et les MICI : tout d'abord, ce sont deux **pathologies chroniques**, qui touchent les hommes et les femmes de tout âge. Ensuite, on constate que dans les **pays occidentaux**, la prévalence des MICI a suivi la même courbe ascendante que celle de l'obésité (Blain *et al.*, 2002 ; Cosnes *et al.*, 2011). Il a été montré que l'obésité est un facteur aggravant des MICI (Mendall *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2017) et qu'un IMC élevé est associé à de nombreuses complications de ces pathologies (Harper et Zisman, 2016). Par ailleurs, les dernières données épidémiologiques démontrent que le surpoids et les MICI touchent des patients de plus en plus jeunes (Ng *et al.*, 2014) .

Ces similitudes soulignent l'implication de l'alimentation dans la pathogénie des MICI et cette hypothèse est renforcée par le fait que l'obésité mais également la dysbiose du microbiote intestinal engendrent divers problèmes de santé, en particulier des pathologies inflammatoires chroniques : arthrose, obésité, spondylarthrites (Brebant *et al.*, 2017) et certains cancers (Hruby *et Hu*, 2015).

D'autre part, les résultats de 19 études multicentriques montrent qu'un apport alimentaire élevé en **graisses** augmenterait le **risque du développement des MICI** (Hou *et al.*, 2011). Ainsi, il existe une association entre le risque de MC et les IMC élevés qui définissent l'obésité (Mendall *et al.*, 2011)(Harpsøe *et al.*, 2014). Un IMC élevé est également associé à une **évolution défavorable** des MICI, un risque plus élevé de **rechutes, d'abcès, de complications chirurgicales** et d'hospitalisations (Blain *et al.*, 2002) (Hass *et al.*, 2006).

De nombreuses hypothèses sont à l'étude comme l'implication du microbiote qui semble être modifié dans de très diverses pathologies chroniques. L'alimentation ne peut plus être ignorée puisqu'elle module directement le microbiote intestinal et que lui-même est impliqué dans de nombreuses pathologies qui touchent particulièrement les pays industrialisés (**Figure 37**).

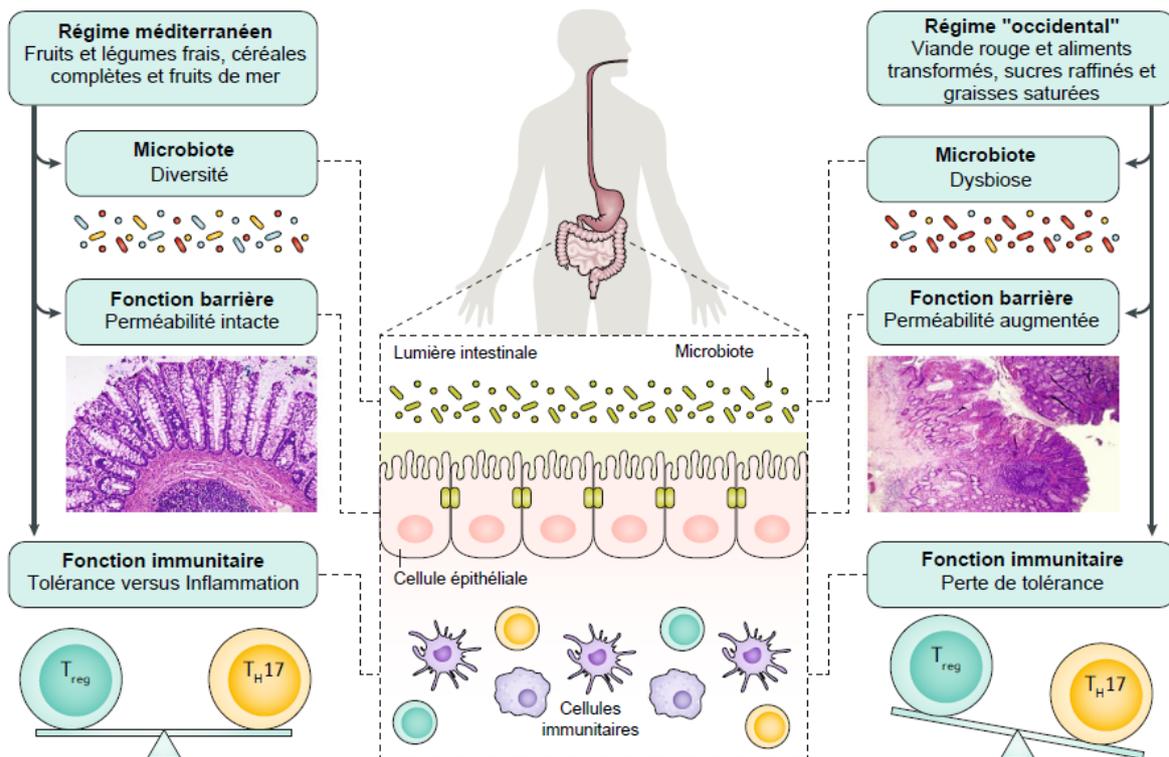


Figure 37 : Hypothèse du lien alimentation, microbiote intestinal et MICI (d'après Khalili et al., 2018). Le régime « Western Diet » pourrait augmenter le risque de MICI contrairement au régime méditerranéen bien que le mécanisme exact sous-entendant l'association entre régime alimentaire et MICI reste inconnu. L'hypothèse repose sur les modifications du microbiote et de la barrière intestinale observées dans les régimes occidentaux qui semblent provoquer un environnement pro-inflammatoire caractérisé par un déséquilibre entre le ratio de cellules Thelper 17 (T_{H17}) et les cellules régulatrices T_{reg} .

Notre hypothèse est qu'une **alimentation hypercalorique** pourrait **favoriser une flore intestinale délétère** accélérant et/ou **aggravant la colite** et activer des mécanismes cellulaires délétères de la pathogénie des MICI alors qu'à l'inverse, un **régime hypocalorique** tel que le **jeûne** pourrait protéger et/ou **diminuer la sévérité de l'inflammation** intestinale, en limitant d'une part la dysbiose, et d'autre part l'activité de mécanismes cellulaires délétères de la pathogénie des MICI.

L'objectif de mon travail de thèse est de **mieux comprendre les liens** entre l'apport alimentaire, la composition du microbiote intestinal, la sévérité d'une colite chimio-induite et la régulation de l'activité de mécanismes clés dans la pathogénie des MICI afin d'améliorer la prise en charge de ces patients.

Pour vérifier ces hypothèses nous avons mis en place plusieurs **protocoles *in vivo***. Une première approche préliminaire visait à évaluer les effets différentiels des sucres et des graisses en utilisant deux régimes **hypercaloriques** (hyperlipidique et hyperglucidique) lorsqu'ils sont consommés durant huit semaines chez des souris mâles et femelles (afin de tenir compte des différences entre les deux sexes).

Les sucres rapides contribuent en moyenne à 9,5 % de l'apport énergétique des adultes français et **41 % des adultes dépassent le seuil de recommandation de OMS** qui est de 10 % de l'apport énergétique journalier (Lluch *et al.*, 2017).

En effet, très récemment, l'organisation internationale pour l'étude des MICI (*IOIBD*) a publié des recommandations diététiques, résultant d'un consensus établi par le groupe de travail nutrition de l'organisation *IOIBD* (Levine *et al.*, 2020). Cette revue souligne le **manque de preuves concernant les sucres raffinés** mais les auteurs espèrent établir des recommandations plus solides dans un avenir proche puisqu'en raison de l'absence d'essai contrôlé randomisé (Levine *et al.*, 2020). Aussi, une étude portant sur un régime d'exclusion des sucres raffinés (saccharose et fructose) a démontré une amélioration clinique et endoscopique des symptômes chez des enfants atteints de MC (Cohen *et al.*, 2014).

C'est pourquoi nous avons choisi dans un second temps de nous intéresser plus particulièrement au **régime enrichi en sucre** et d'étudier ses effets à long terme (16 semaines) ainsi que le potentiel effet réversible de ce régime en réduisant la consommation de sucre après 8 semaines de régime hyperglucidique. Enfin, puisque le saccharose est composé d'une molécule de glucose et de fructose, nous avons étudié l'effet différentiel de ces deux sucres sur un modèle cellulaire d'épithélium intestinal.

Partie 3

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Expérimentation animale

1.1. Choix du modèle animal

Les souris C57BL/6 sont les plus largement utilisées pour l'étude des maladies humaines, suivant les recommandations de l'« US National Committee on Ethics Reflection Experiment » décrites dans le « *Guide for care and use of laboratory animals* » (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Cette souche C57BL/6 est obtenue par croisement consanguin et constitue ainsi une lignée stable. Elle possède de bonnes capacités de reproduction et la facilité de son élevage en fait la souche la plus répandue dans les animaleries de laboratoire. C'est aussi la première lignée dont le génome a été entièrement séquencé en 2002 (Gunter et Dhand, 2002). Par ailleurs, elle sert également de base pour le développement de nombreux modèles transgéniques de souris mimant des pathologies métaboliques dont certains pourraient être utilisés dans le cadre du projet du laboratoire notamment les souris *Nod2*^{-/-}, principal gène de susceptibilité de la MC (Nancey *et al.*, 2017).

1.2. Conditions d'élevage

Les souris sont élevées dans un local fermé de l'animalerie où la température ambiante est maintenue à 22-23°C et l'hygrométrie inférieure à 40 %. La pièce est maintenue en surpression afin de limiter les éventuelles contaminations et chaque cage est reliée à un système de filtration d'air (SmartFlow Teniplast®). Un cycle de lumière/obscurité de 12h est instauré selon les réglementations du Comité National de Réflexion d'Éthique sur l'Expérimentation (décrites dans le « *Guide for care and use of laboratory animals* »). Les souris sont maintenues dans des cages disposant de produits d'enrichissement où elles ont un accès libre à l'eau ainsi qu'à la nourriture. Le projet a reçu un avis favorable du comité d'éthique lorrain CELMEA n°66 (dossier APAFIS9027) et validé par le ministère.

1.3. Protocole préliminaire MICICAL 2017

Des souris âgées de 9 semaines ont été nourries avec 3 régimes alimentaires différents (**Figure 38**). Les animaux ont été répartis en 3 groupes de 8 mâles et 8 femelles et distribués par groupes de 4 animaux par cages. Le régime utilisé pour l'entretien des souris dans l'animalerie a été utilisé comme référence (A04, SafeDiets, Augy, France). Après deux semaines d'acclimatation, les régimes hyperglucidique (enrichi à 30% en saccharose, U8960, SafeDiets, Augy, France) et hyperlipidique (60% de l'énergie apportée par les lipides, U8957, SafeDiets, Augy, France) ont été administrés pendant 8 semaines. Les animaux ont été pesés de façon hebdomadaire, le sang et les selles ont été prélevés tous les mois.

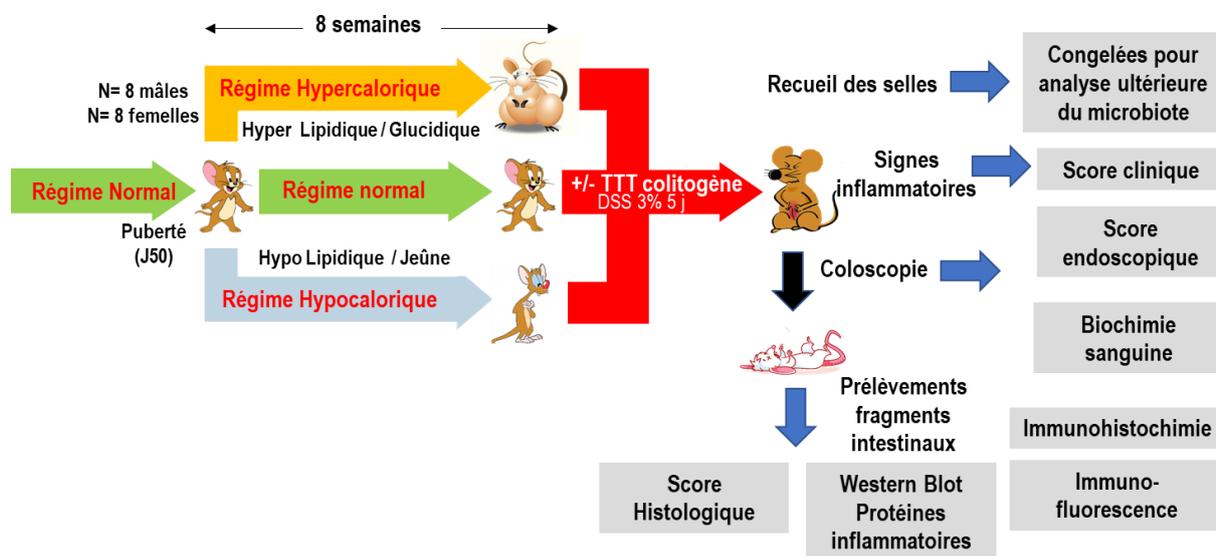
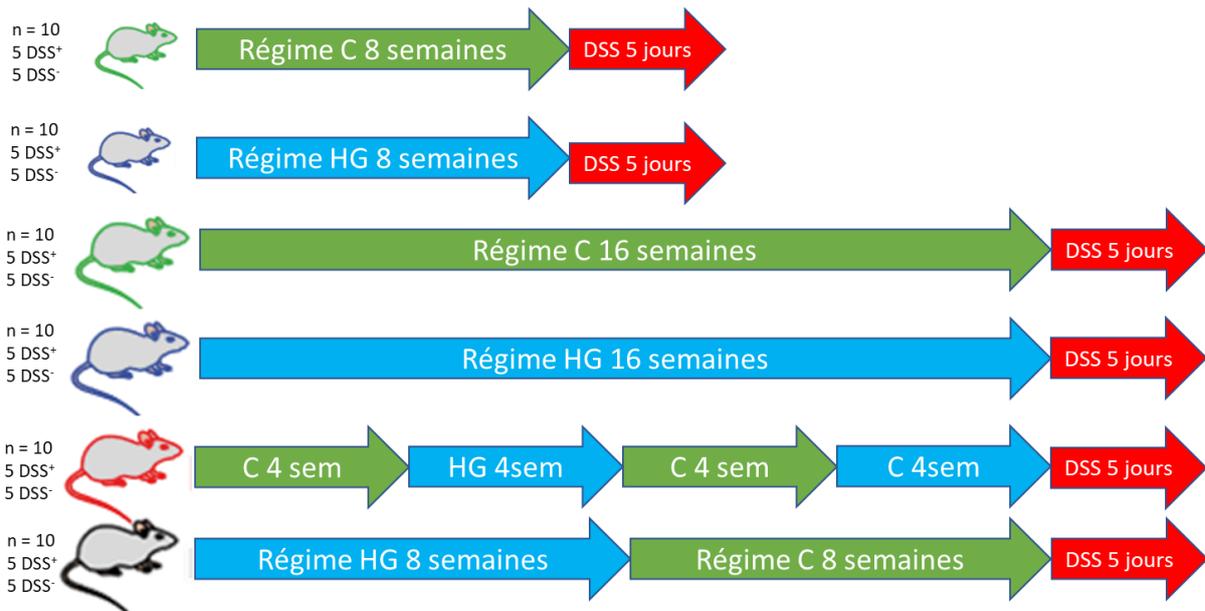


Figure 38 : Schéma général du projet préliminaire MICICAL 2017. Étude in vivo de l'influence des graisses, du sucre et du jeûne sur la colite expérimentale. Des groupes de 4 souris mâles et 4 souris femelles ont été soumis à différents types de régimes alimentaires avant d'induire une colite en administrant du Sulfate de Sodium Dextran (DSS).

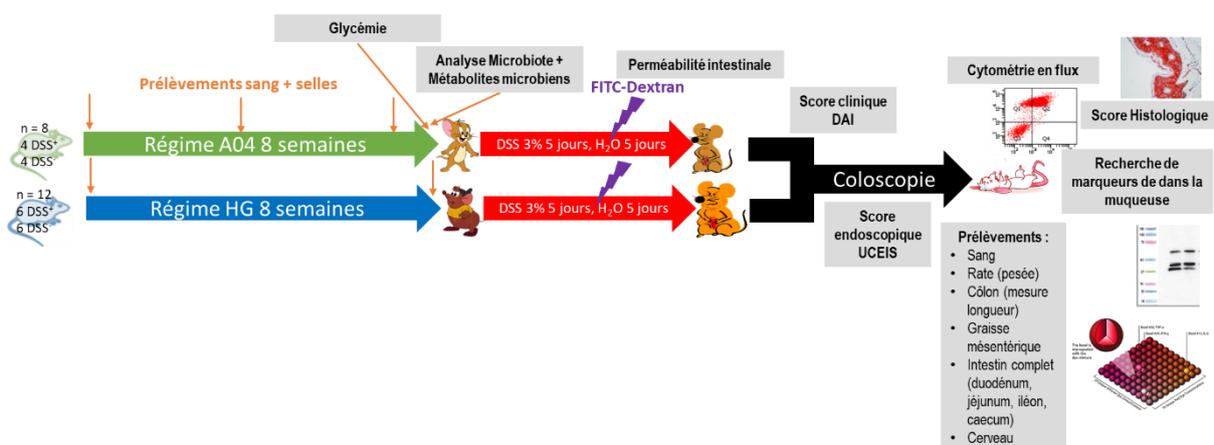
1.4. Protocole MICICAL 2018

Un second protocole a permis de répliquer et compléter nos résultats. En raison des résultats complexes du protocole préliminaires, nous avons choisi de cibler les mâles dans un premier temps. Nous avons donc mis en place un protocole plus long (16 semaines) ainsi que deux régimes alternant hyperglucidique et retour à un régime normal afin d'étudier un éventuel effet « mémoire » du microbiote et la possibilité de corriger les effets du régime hyperglucidique (**Figure 39**). Les animaux ont été suivis quotidiennement et pesés individuellement de façon hebdomadaire tout au long du protocole.



1.5. Protocole MICICAL 2019

En raison d'un épuisement des échantillons nous avons eu besoin de répliquer le protocole animal (**Figure 40**). Aussi, la littérature sur le sujet avait mis en évidence un lien entre l'hyperglycémie et la perméabilité intestinale nous avons donc ajouté différentes procédures sur ce protocole *in vivo* : une mesure de la perméabilité intestinale à l'aide de FITC-Dextran (procédure détaillée en 1.9) ainsi qu'une analyse de la lipocaline fécale (procédure 3) et des cellules immunitaires par cytométrie de flux (procédure 4).



1.6. Prélèvements *in vivo*

Au cours des différents protocoles, les selles des souris ont été prélevées de manière individuelle une fois par semaine (souris isolées le temps du prélèvement puis selles fraîches immédiatement congelées à -80°C). Le sang des souris a également été prélevé mensuellement dans la veine sous-mandibulaire (sous anesthésie ; Golde, Gollobin et Rodriguez, 2005) dans des tubes héparinés avec gel séparateur de plasma ou sur tube au fluorure de sodium (Microtainer® BD medical, Franklin Lakes, NJ) puis immédiatement centrifugé 3 minutes à $2000 \times g$ et à température ambiante puis le plasma a été congelé à -80°C .

1.7. Traitement colitogène

Le sulfate de dextrane sodique (DSS) est un produit chimique permettant d'induire expérimentalement une colite mimant celle observée chez les patients souffrants de MICI. En effet, la prise orale de DSS entraîne des lésions au niveau de l'épithélium intestinal. Celles-ci favorisent le contact entre la flore intestinale et l'épithélium. Ce dernier engendre l'activation du système immunitaire intestinal et le recrutement de cellules inflammatoires. C'est un modèle expérimental hautement reproductible et couramment utilisé au laboratoire comme dans la littérature (Kökten *et al.*, 2018).

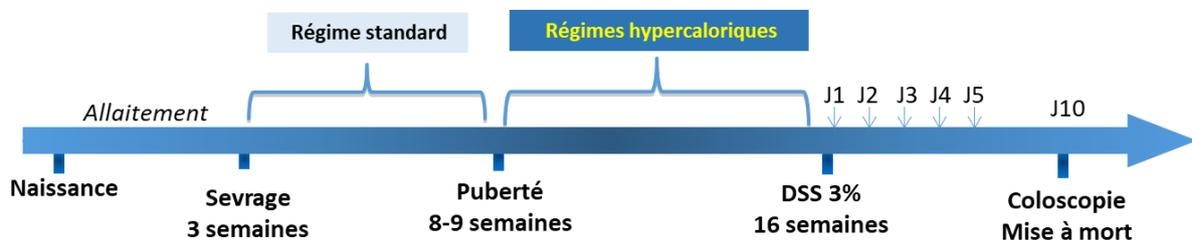


Figure 41 : Chronologie des protocoles expérimentaux. Les animaux sont soumis aux régimes à partir de l'âge de la puberté pendant une durée de 8 semaines puis le traitement colitogène est administré durant 5 jours et les animaux sont mis à mort à J10. Les souris non traitées avec le DSS (Sulfate de Dextran Sodique) ont été utilisées comme référence.

Après chaque régime alimentaire, la moitié des souris pour chaque groupe ont été traitées durant 5 jours avec du DSS dilué à 3 % (m/v) dans l'eau de boisson (PM 36000-50000 MP Biomedicals®, Strasbourg, France) afin d'induire chimiquement une colite. Après 5 jours de traitement, la solution de DSS est remplacée par de l'eau claire durant 5 jours (le processus inflammatoire s'auto-entretient après traitement) et toutes les souris sont finalement mises à mort à J10. La chronologie du protocole est présentée dans la **Figure 41**.

1.8. Score clinique d'inflammation

Durant ces 10 jours, chaque animal a été pesé quotidiennement, son état général a été observé afin d'établir un score clinique d'inflammation ou score DAI pour « *Disease Activity Index* », permettant d'évaluer la sévérité de la colite (Cooper *et al.*, 1993). Ce score s'appuie sur trois critères : la perte de poids, la consistance des selles (normales, molles, diarrhée) ainsi que la présence ou non de sang dans les selles ou de rectorragie (**Tableau X**). Après avoir évalué chaque critère, le score DAI est calculé en faisant la moyenne des scores obtenus chaque jour, pour chacune des souris.

Tableau X : Critères utilisés pour calculer le score DAI « *Disease Activity Index* » (d'après Murthy *et al.* 1993). Le DAI correspond aux scores combinés (poids, selles, saignement) / 3.

Score	Perte de poids (%)	Consistance des selles	Saignement, Rectorragie
0	0	Normales (crottes bien moulées)	Négatif
1	1-5	Molles (pâteuses mais qui ne collent pas à l'anus)	Négatif
2	5-10	Molles (pâteuses mais qui ne collent pas à l'anus)	Sang dans les selles
3	10-15	Diarrhée (liquide qui colle à l'anus)	Sang dans les selles
4	> 15	Diarrhée (liquide qui colle à l'anus)	Saignement rectal

1.9. Mesure de la perméabilité intestinale

Afin d'évaluer la perméabilité intestinale *in vivo*, le marqueur FITC-Dextran 4kDa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissout dans du PBS (80mg/mL) a été administré par voie orale à la dose de 60 mg/100g de poids corporel. Ce marqueur est classiquement utilisé pour étudier la perméabilité colique (Thaiss *et al.*, 2018). Les souris ont été mise à jeun 4 heures avant le gavage, puis le sang a été prélevé 4 heures après sur des tubes héparinés (Microtainer® BD medical, Franklin Lakes, NJ). Après centrifugation 5 minutes à 10 000 *xg*, le plasma est immédiatement placé dans des tubes opaques (le FITC étant sensible à la lumière). La fluorescence est ensuite dosée à l'aide d'un lecteur de plaque (Spectramax ID3, Molecular Devices, USA ; longueurs d'ondes excitation 485 nm émission 530 nm) et comparée à une courbe standard préparée dans du plasma.

1.10. Examen coloscopique

À l'issue du protocole *in vivo*, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane 3 % (Abbvie Forene®), produit volatil d'anesthésie générale distribué dans de l'oxygène à l'aide d'un appareil d'anesthésie mobile distribuant le gaz dans un masque.

Une fois l'animal anesthésié, une coloscopie est réalisée à l'aide d'un endoscope adapté pour le petit animal de laboratoire (Karl Storz® Endoskope 200903-31). La procédure permet de visualiser les éventuelles lésions au niveau du côlon distal (environ 4 cm) et du rectum à l'aide d'un mini endoscope rigide Storz Hopkins II® (longueur 30 cm, diamètre 2mm ; Storz) couplé à un système de caméra Coloview (lampe au xénon 175 et caméra Endovision SLB Telecam Storz®). De l'air est insufflé *via* une canule ainsi que de l'eau à l'aide d'une pompe à basse pression (Rena air 200 ; Rena®). Les images sont observées sur un ordinateur relié au moniteur et enregistrées avec un logiciel de capture vidéo (Studio Movie Board Plus®, Pinnacle).

Les vidéos sont ensuite analysées en aveugle par au moins deux expérimentateurs différents formés par un gastro-entérologue du CHRU de Nancy-Brabois afin d'établir un score endoscopique d'inflammation (UCEIS : « *Ulcerative Colite Endoscopic Index of Severity* ») prenant en compte la vascularisation de la paroi (visibilité du réseau vasculaire), les saignements (superficiels ou profonds) et l'érosion ou l'ulcération de la muqueuse (dépôts de fibrine, ou lésions creusantes de la muqueuse) permettant ainsi d'évaluer la sévérité de la colite. Les critères d'établissement de ce score sont détaillés dans le **Tableau XI**, le score total correspond à la somme des 3 critères (Travis *et al.*, 2012).

Tableau XI : Critères utilisés pour calculer le score UCEIS : « *Ulcerative Colite Endoscopic Index of Severity* » (d'après Travis *et al.* 2012). Le score final est la somme de chaque critère.

Description	Score	Définition
Vascularisation	1 : Normal	Réseau vasculaire normal, capillaires et arborisation vasculaire clairement visible ou avec perte légère des marges capillaires
	2 : Partiellement oblitéré	Réseau vasculaire partiellement visible, oblitération irrégulière
	3 : Oblitéré	Oblitération complète du réseau vasculaire
Saignement	1 : Pas de saignement	Pas de sang visible
	2 : Muqueux	Quelques tâches ou stries de sang coagulé sur la surface de la muqueuse, qui peut être lavé
	3 : Luminal léger	Présence de sang liquide dans la lumière
	4 : Luminal modéré ou sévère	Présence franche de sang dans la lumière devant l'endoscope, suintement visible de la muqueuse après avoir lavé le sang intraluminal ou suintement visible d'un muqueuse hémorragique
Érosions et ulcérations	1 : Pas d'érosion	Muqueuse normale, pas d'érosion ou d'ulcération visible
	2 : Érosions	Petites (≤ 5 mm) lésions dans la muqueuse, de blanche ou jaune, aux bords plats
	3 : Ulcération superficielle	Zones importantes (> 5 mm) lésées dans la muqueuse, ulcères discrets couverts de fibrine mais restent superficiels
	4 : Ulcération profonde	Lésions excavées, profondément creusées dans la muqueuse, avec bord légèrement étiré

1.11. Prélèvements et préparation des échantillons biologiques

Après l'examen endoscopique, les animaux sont mis à mort par décapitation. Différents segments du tube digestif ont ensuite été prélevés : duodénum, jéjunum, iléon, côlon ainsi que la graisse mésentérique, le foie et le sang. La rate a été prélevée et pesée avant d'être congelée. Le côlon a été mesuré avant d'être coupé en fragment. Les fragments intestinaux ont été ouverts de manière longitudinale puis lavés au PBS 1X (2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 6,8 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4).

Les tissus destinés à l'extraction protéique ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C. Ceux destinés à l'histochemie (un fragment de côlon et un fragment de jéjunum) sont fixés dans du paraformaldéhyde 4 % durant une nuit à 4°C, et un morceau est conservé dans l'éthanol dans l'attente d'être inclus en paraffine et envoyé en anatomopathologie au CHRU pour établir un score histologique. L'autre partie est déshydratée dans une solution de sucre avant d'être inclus dans du TissueTEK pour coupes congelées (Richard-Allan Scientific™ Neg-50™ ThermoFischer Scientific) puis conservées à -80°C avant de réaliser des coupes au cryostat pour une analyse en immunofluorescence ultérieure.

2. Étude histologique

Après fixation des échantillons de côlons dans la paraffine, des coupes ont été réalisées au microtome. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) avant lecture « en aveugle » par deux anatomopathologistes des CHU de Nancy et Reims. Un score est ensuite établi en s'appuyant sur six paramètres : l'infiltrat des cellules inflammatoires (polynucléés dans la *lamina propria*), abcès cryptiques, absence des mucines, l'intégrité de l'épithélium, l'infiltrat de cellules inflammatoires chroniques (cellules rondes dans la *lamina propria*) et irrégularités architecturales des cryptes. Chaque paramètre est évalué sur une échelle de 4 points (Morson *et al.*, 2013; Riley *et al.*, 1991)

3. Dosage de la lipocaline fécale

La lipocaline-2 (Lcn-2) est une protéine exprimée par les cellules immunitaires (neutrophiles) et par les cellules épithéliales du tube digestif. C'est un marqueur présentant une excellente corrélation avec la sévérité des colites expérimentales chez la souris (Barnich, 2017). En complément des images endoscopiques, il permet d'objectiver la sévérité de l'inflammation intestinale et est couramment utilisé (Chassaing *et al.*, 2012).

Le dosage a été effectué grâce à un kit ELISA (DuoSet Lcn-2 ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN). Les selles congelées ont été pesées avant d'être reconstituées dans du PBS contenant 0,1% de Tween 20 (100mg/mL) puis vortexées durant au moins 20 minutes afin d'obtenir une suspension homogène de matières fécales. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 12 000 rpm et à 4°C. Le surnageant est collecté puis congelé à -20°C jusqu'à l'analyse.

Une plaque 96 puits a été coatée avec 100 µL d'anticorps de capture Lcn-2 anti-souris dilué (concentration de travail 4 µg/mL) dans le réactif de coating. Après une nuit d'incubation à température ambiante et trois lavages avec 400 µL de tampon de lavage, la plaque est bloquée avec 300 µL de réactif diluant dans chaque puit. Après minimum une heure d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée trois fois à nouveau.

Les échantillons sont ensuite dilués au 1/100^{ème} (1% BSA dans PBS, pH 7,2-7,4) puis déposés dans les puits ainsi que la gamme étalon établie avec le contrôle fourni. La plaque est incubée 2 heures avant d'être lavée. L'anticorps de détection préalablement dilué dans le réactif de travail (concentration 500 ng/mL) est ensuite ajouté (100 µL/puit) et la plaque incubée 2 heures.

Après lavage, la solution de Streptavidine-HRP préalablement diluée 40 fois est déposée (100µL/puit) et la plaque est incubée 20 minutes à l'abri de la lumière. Après lavage, 100 µL de substrat (mélange 1 :1 de solution colorante A et B) sont déposés dans chaque puit et incubés 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, la réaction est arrêtée par ajout de 50 µL de solution stop dans chaque puit. Après agitation de la plaque, l'absorbance est mesurée à 450nm (correction à 540/570 nm pour corriger les imperfections optiques de la plaque selon les recommandations du fabricant) à l'aide d'un lecteur de microplaques (Spectramax ID3, Molecular Devices, USA). La concentration en lipocaline est déterminée à l'aide de la courbe étalon et la quantité est rapportée à la masse de selles préalablement pesée.

4. Étude des cellules immunitaires intestinales et spléniques

4.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de côlon et de rate ont été lavés immédiatement après le prélèvement puis conservés dans du milieu complet Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, 10% Sérum de veau fœtal SVF, pénicilline/streptomycine ; Gibco™ Sigma Aldrich).

Les échantillons de rate ont été directement triturés dans du PBS froid afin de récupérer une suspension cellulaire qui est ensuite filtrée (filtre nylon 70 µM) puis centrifugée 5 minutes à 300 *xg* et à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules suspendues dans du PBS.

Pour les échantillons de côlon, après différentes mises au point, le protocole de digestion retenu a été le suivant (Goodyear *et al.*, 2014; Thaïss *et al.*, 2018): le morceau de côlon est d'abord nettoyé au PBS puis dissocié (pour éliminer toute matière fécale) dans une solution d'EDTA 2 mM à 37°C pendant 20 minutes sous agitation. Après filtration, les échantillons sont lavés 20 minutes à 37°C dans une solution de DTT 200 mM et EDTA 5 mM dans du tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), permettant ainsi de retirer le mucus et les cellules épithéliales. L'échantillon est ensuite filtré sur filtre nylon 70 µm (BD Biosciences, San Jose, CA) et lavé au PBS dans une boîte de pétri avant d'être découpé en très petits morceaux.

La digestion du tissu colique est réalisée dans une solution de collagénase (1 mg/mL) + 200 U/mL Dnase durant 45 minutes à 37°C. L'action de la collagénase est arrêtée par ajout de milieu complet (RPMI + 10% SVF). Après centrifugation 5 min à 300 *xg* et à 4°C le surnageant est retiré et les cellules suspendues dans du PBS.

4.2. Cytométrie en flux

Les suspensions cellulaires ont ensuite été lavées et remises en suspension dans une solution de PBS additionnée de 2% BSA pour une coloration directe. Les suspensions ont été incubées avec un cocktail d'anticorps durant 30 min sur glace : B220-BB700, CD11b-PECy7, CD3-FITC et CD45-APC pour les échantillons coliques et CD45-APC, CD3-BB700, NK.1.1-BV500, CD19-PECy7 pour la rate (tous les anticorps ont été obtenus auprès de BD Biosciences, Becton Dickinson France S.A.S). Pour les mesures de viabilité, les cellules ont été incubées 20 minutes à 4°C et à l'obscurité avec le marqueur Fixable Viability 700 (BD Biosciences, Becton Dickinson France S.A.S).

La stratégie de « gating » des sous-populations de cellules immunitaires est résumée dans la **Figure 42** (Hoving *et al.*, 2018; Thaiss *et al.*, 2018). Les données ont ensuite été acquises par le Dr Huguette Louis avec un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA) et analysées avec le logiciel Kalusa (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA).

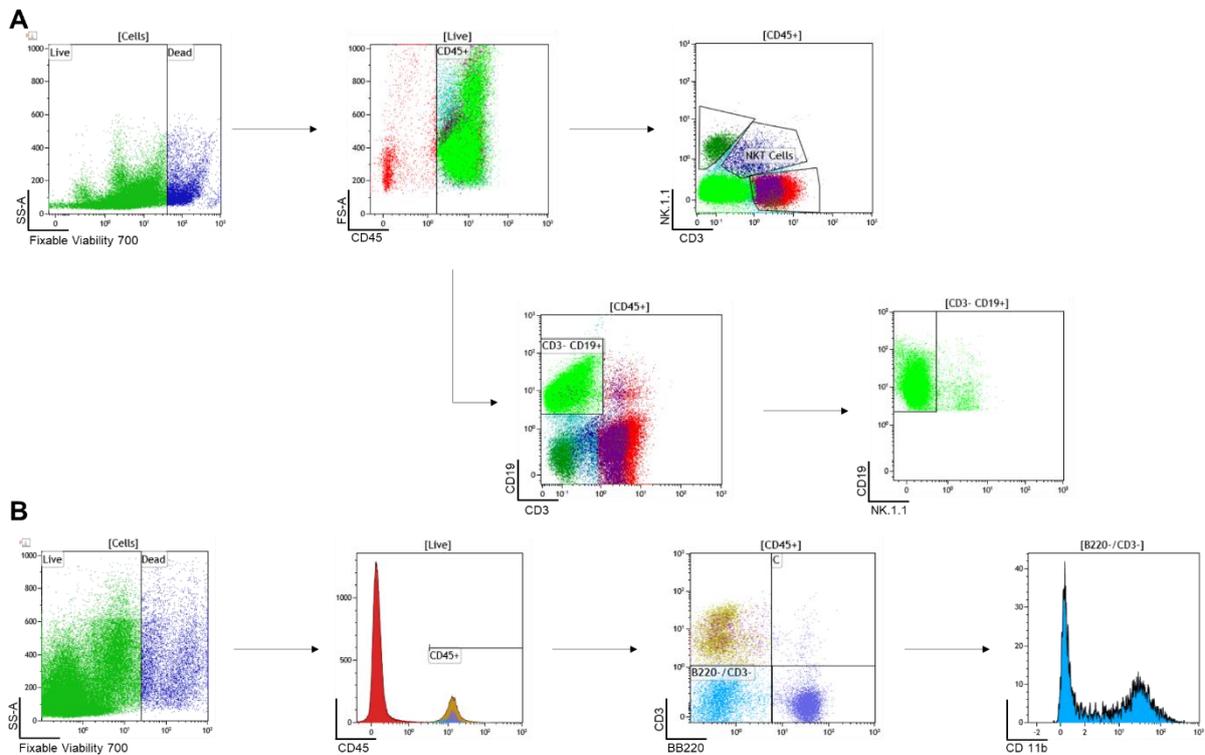


Figure 42 : Stratégie d'analyse des cellules immunitaires spléniques et coliques. Stratégie d'identification des cellules immunitaires spléniques (A) d'après Hoving *et al.*, 2018. Tout d'abord un marqueur de viabilité permet d'identifier les cellules vivantes. Puis, parmi ces dernières sont identifiées les cellules qui expriment la molécule CD45 correspondant aux cellules lymphoïdes et myéloïdes. Les cellules exprimant à la fois CD45 et CD3 correspondent aux lymphocytes T parmi lesquels les cellules exprimant CD45 et NK1.1 correspondent aux Lymphocytes T « Natural Killer » NKT. Enfin, les cellules exprimant CD45 et CD19 correspondent aux lymphocytes B. De la même façon, l'identification des cellules de la muqueuse intestinale (B) a été réalisée d'après Thaiss *et al.*, 2018.

5. Analyses par Western blot

5.1. Broyage des tissus et extraction des protéines

Le travail a été effectué sur glace tout au long du protocole afin de limiter la dégradation des protéines. Les échantillons ont été broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote liquide afin de ne pas décongeler l'échantillon biologique. Environ 50 mg de broyat sont prélevés et suspendus dans 550 μ L de tampon RIPA froid (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5 % deoxycholate de sodium, 0,1 % SDS, 1 % NP-40, PMSF Sigma® 10 μ L/mL, orthovanadate Na_3VO_4 10 μ L/mL et PIC Photostop Roche®) ou de tampon Gerdy froid (5 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,5 % SDS).

Pour les échantillons extraits au RIPA : après une incubation de 10 minutes sur glace, les échantillons ont été homogénéisés en réalisant plusieurs aspirations et refoulements à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 23G (0,6x16mm). Puis, trois cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (bain marie 37°C) ont été effectués pour une lyse complète des cellules avant une centrifugation à 18 000 xg pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et stocké à - 80°C. Concernant les échantillons extraits au Gerdy, ils ont été homogénéisés à température ambiante par aspirations-refoulement puis passés au sonicateur 3 fois 10 secondes.

Sur les protocoles suivants, nous avons optimisé le broyage afin de limiter la perte et la décongélation des échantillons : 25 mg de tissu congelé sont placés dans des tubes de lyse contenant des microbilles de céramique (Precellys Lysing Kit Soft Tissue homogenizing CK14 Bertin Technologies®, France) ainsi que 275 μ l de tampon RIPA. Les tubes sont ensuite placés dans l'homogénéisateur (Precellys Bertin Technologies®) préalablement refroidi, durant deux cycles de 10 secondes à 4000 xg .

5.2. Dosage des protéines

Les protéines de chaque échantillon sont ensuite dosées au BCA (kit BCAssay Protein quantification kit Interchim®). Le BCA est un réactif chromogène qui forme un complexe violet visible à 570 nm par réaction avec les ions cuivreux Cu^+ formés par la réduction des protéines en milieu alcalin. Ainsi, le kit permet de réaliser un dosage colorimétrique : la concentration en protéines est déterminée à partir d'une gamme étalon de BSA (*Bovin Serum Albumin*) de concentrations allant de 0 à 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.3. Électrophorèse et immunodétection

Chaque échantillon contenant 20 μg de protéines totales est chauffé 5 min à 100°C dans un tampon de dénaturation Laemmli 2X (Bio-Rad, USA, + 5 % β -Mercaptoéthanol), avant d'être déposé dans un gel d'acrylamide dont le pourcentage est adapté à la taille de la protéine d'intérêt (**Tableau XII**). Après migration (Tampon 25 mM Tris, 0.192 M Glycine M, 0.1 % SDS ; pH = 8,3), les protéines sont transférées sur membranes PVDF ou Nitrocellulose de 0,45 μm (Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences®) selon la protéine recherchée, par électrotransfert liquide (tampon Bjerrum Schafer-Nielsen : 48 mM Tris, 39 mM Glycine, 0,0375 % SDS ; pH = 9,2, 20 % éthanol).

La membrane est ensuite saturée avec une solution de lait ou BSA 5% diluée dans du tampon Tris-Buffered Saline-Tween 20 (1X TBST : 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 ; pH = 7,4) sous agitation. Les différentes concentrations d'anticorps primaires et secondaires et leurs références sont résumées dans le **Tableau XII** ci-dessous.

Les protéines sont ensuite détectées grâce au kit ECL PLUS (Bio-Rad Clarity™ Western ECL) et le signal est mesuré grâce à un système d'acquisition d'image Fusion Fx7 Thermofisher Scientific®. Enfin, une analyse densitométrique à l'aide du logiciel Icy v1.8.6.0 qui est une évolution d'ImageJ (Image Processing and Analysis Java NIH Image) a permis d'étudier de façon semi-quantitative les protéines dans chaque lysat protéique.

La quantité de chaque protéine d'intérêt a été normalisée par rapport à la quantité de β -actine utilisée comme protéine de référence.

Tableau XII : Anticorps et conditions utilisées en Western Blot. PM : poids moléculaire en kilo Dalton. PVDF : Polyvinylidene Fluoride. BSA : Bovine Serum Albumin.

	Protéines		Anticorps			Conditions expérimentales	
	Nom	PM (kDa)	Référence fournisseur	Dilution utilisée	Type de membrane	Solution de blocage	de et dilution
Anticorps primaires	IL-1 β	35	Abcam Ab9722	1/1000	Nitrocellulose 0,45 μ m	Lait 5 %	
	TNF α	25	Cell Signaling 3707s	1/700	Nitrocellulose 0,45 μ m	BSA 5 %	
	IL-6	23	Abcam Ab208113	1/1000	Nitrocellulose 0,45 μ m	BSA 5 %	
	IL-10	20	Abcam Ab9969	1/1000	PVDF 0,45 μ m	Lait 5 %	
	TGF β	45	Abcam abb66043	1/1000	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	ATG5	55	Cell Signaling 12994s	1/1000	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	LC3 I/II	14-16	Cell Signaling 12741s	1/1000	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	ATG13	45	Cell Signaling	1/1500	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	HSP90	90	Cell Signaling 4877	1/700	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	ULK1	130	Cell Signaling 8054s	1/500	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	ATG16L1	68	Cell Signaling 8089s	1/1000	PVDF 0,45 μ m	BSA 5 %	
	HSPA8	70-72	Cell Signaling 8444s	1/700	Nitrocellulose 0,45 μ m	Lait 5 %	
mTOR	240	Cell Signaling 2983s	1/1500	Nitrocellulose 0,45 μ m	Lait 5 %		
Anticorps couplé à la HRP	β -Actine	42	Abcam Ab185067	1/10000	Nitrocellulose ou PVDF	BSA ou Lait 5 %	
Anticorps Secondaire	Anti-lapin IgG couplé HRP	/	Jackson Immuno Research	1/1000	Nitrocellulose ou PVDF	BSA ou lait 5 %	

6. Analyses sanguines

Après la décapitation, le sang de chaque animal a été prélevé dans des tubes héparinés (BD Vacutainer® PST™). Après centrifugation des prélèvements pendant 10 minutes à 3000 *xg*, le plasma a été récupéré et conservé à -80°C jusqu'à analyse par un laboratoire de biologie médicale (appareil Cobas® 8000 Roche). Les mesures de la glycémie, de la lipémie, de la triglycéridémie, de la cholestérolémie, ainsi que de l'albuminémie, ont été comparées aux paramètres de référence biochimiques sanguins des souris C57BL/6 fournis par le laboratoire Janvier Labs (https://www.janvier-labs.com/fiche_produit/souris-c57bl-6jrj/).

Concernant le protocole MICICAL 2018, le sang a été prélevé sous anesthésie dans la veine sous-mandibulaire afin de limiter l'hémolyse liée à la décapitation (Golde *et al.*, 2005). Les tubes ont également été remplacés par des microtubes pédiatriques adaptés au volume de prélèvement (400 à 600 µL) héparinés avec gel séparateur de plasma et fluorure de sodium/EDTA Na₂ (Microtainer®, BD, USA). Le sang a été ensuite centrifugé et le plasma récupéré puis congelé à -80°C.

Les glycémies ont été mesurées par méthode enzymatique à la glucose-oxydase à l'aide du Kit Glucose GOD-PAP (Biolabo®, Maizy, France) sur une plaque 96 puits : 2 µL de plasma sont incubés avec 200 µL de réactif durant 20 minutes à température ambiante. Une gamme étalon est réalisée en parallèle et permet de déterminer la concentration en glucose après lecture de l'absorbance à 500 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Spectramax ID3, Molecular Devices, USA).

7. Dosage des cytokines

7.1. Préparation des échantillons de côlon

Les protéines ont été extraites des échantillons coliques par lyse du tissu avec le kit Bio-plex® cell lysis (Biorat #171304011 Biorad Laboratories Inc, USA). Pour chaque échantillon, un centimètre de tissu environ a été rincé avec la solution de lavage puis découpé en morceaux d'environ 3 millimètres puis placés dans des tubes de broyage (Precellys Lysing Kit Soft Tissue homogenizing CK14 Bertin Technologies®, France) avec 500 µL de solution de lyse préalablement préparée (80µL de facteur 1, 40µL de facteur 2, 19,8 mL de tampon de lyse). Les tubes sont ensuite placés dans l'homogénéisateur (Precellys Bertin Technologies®) préalablement refroidi, durant deux cycles de 10 secondes à 4000 *xg*.

Le tissu broyé est ensuite transféré dans un microtube propre puis congelé à -80°C . Après décongélation et sonication sur glace, les échantillons sont ensuite centrifugés 4 minutes à 4500 xg . Le surnageant est récupéré puis les protéines de chaque échantillon sont ensuite dosées au BCA (kit BCAssay Protein quantification kit Interchim®). Tous les échantillons ont ensuite été normalisés à l'aide du tampon d'analyse à $900 \mu\text{g/mL}$ puis conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

7.2. Immunoessai Bio-plex

Les quantités de cytokines dans les échantillons de plasma et de lysats coliques ont été mesurées à l'aide du kit cytokines 23-plex (Bio-Rad #M60009RDPD, Bio-Rad Laboratories Inc, USA). Brièvement, la technologie Multiplex (**Figure 43**) est similaire à l'ELISA mais fondée sur le principe de la cytométrie en flux en alliant des microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par des lasers permettant ainsi d'analyser simultanément jusqu'à 100 types de microbilles par puit, chacune des billes étant reconnaissable par un code couleur différent.

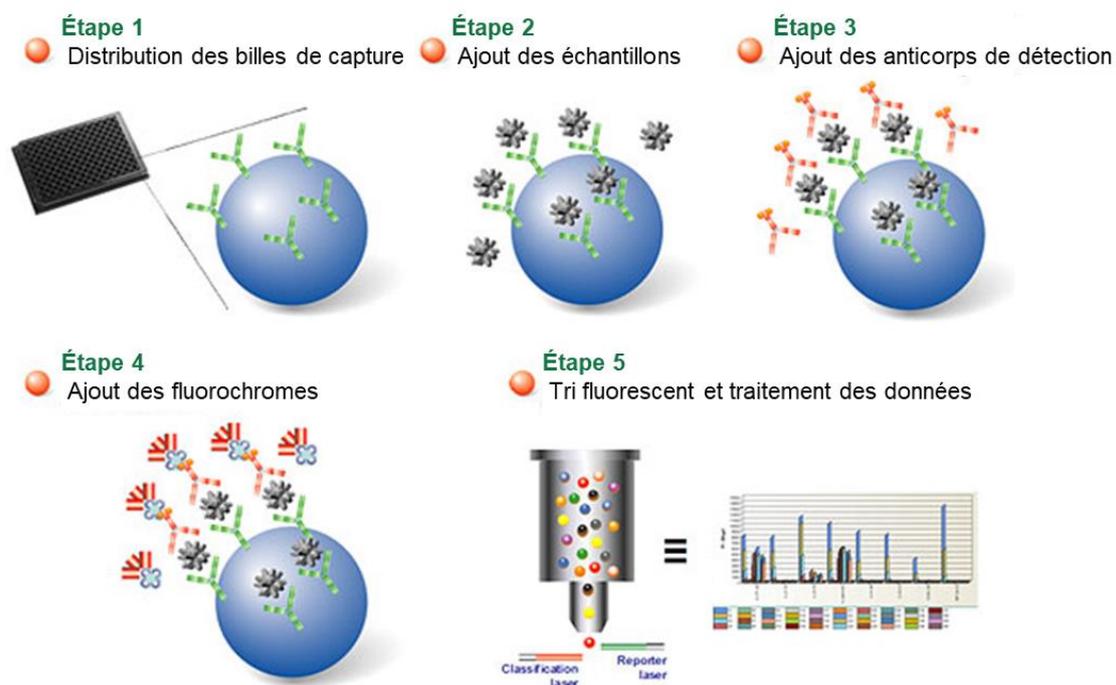


Figure 43 : Représentation schématique d'un immuno-essai Multiplex. Ces essais sont conçus selon le format de test ELISA sandwich. Les billes couplées à l'anticorps de capture sont d'abord incubées avec des standards d'antigène ou des échantillons. La plaque est ensuite lavée pour éliminer les éléments non liés, suivi d'une incubation avec les anticorps de détection biotinylés. Après lavage des anticorps biotinylés non liés, les billes sont incubées avec un conjugué streptavidine-phycoérythrine (SA-PE). Après élimination de l'excès de conjugué, les billes passent ensuite à travers le lecteur qui mesure la fluorescence.

Après avoir démarré et réchauffé le système Bio-Plex et les solutions, les échantillons ont été dilués à l'aide du diluant Bio-Plex (au $\frac{1}{4}$ pour les plasmas, au $\frac{1}{2}$ pour les lysats de côlons). Une série de dilution des standards est préparée après reconstitution de la solution. Les billes diluées (50 μ L) sont ajoutées dans chaque puit. La plaque est ensuite lavée (3 x 100 μ L de tampon de lavage) à l'aide d'un laveur de microplaque magnétique (Bio-Plex ProTM Wash Station, Bio-Rad Laboratories Inc, USA). Les échantillons, les standards et le blanc (50 μ L) sont ajoutés dans les puits, la plaque recouverte et incubée durant 30 minutes sur l'agitateur à 850 ± 50 tr/min. Après trois lavages, 25 μ L de la solution diluée d'anticorps de détection sont ajoutés et incubés durant 30 minutes. Après trois lavages, 50 μ L de conjugué SA-PE sont ajoutés et la plaque est incubée 10 minutes. Après lavage, les billes sont re-suspendues dans 125 μ L de tampon d'essai puis la plaque est agitée 30 secondes à 850 ± 50 rpm. Enfin, la lecture s'effectue grâce au système Bio-plex[®] MAGPIXTM.

8. Analyse transcriptomique

8.1. Extraction d'ARN

Environ 20 mg de côlon sont broyés dans 1mL de Trizol (InvitrogenTM, Carlsbad, USA) dans des tubes de lyse contenant des microbilles de céramique (Precellys Lysing Kit Soft Tissue homogenizing CK14 Bertin Technologies®, France). Les tubes sont ensuite placés dans l'homogénéisateur (Precellys Bertin Technologies®) durant deux cycles de 10 secondes à 4000 *xg*.

Le lysat est ensuite transféré dans des tubes Safe-Lock et incubés 5 à 10 minutes à température ambiante. Puis, 200 μ L de chloroforme sont ajoutés et le mélange homogénéisé au vortex. Après 15 minutes de centrifugation à 12 000 *xg*, la phase aqueuse (qui contient les ARNs) est récupérée et additionnée à 500 μ L d'isopropanol (v/v 1:1) afin de précipiter les ARN pendant 10 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés à nouveau 10 minutes à 12 000 *xg*. Le surnageant est retiré délicatement pour ne garder que le culot d'ARN qui est ensuite lavé à l'éthanol 70%.

Les culots sont ensuite suspendus dans une solution constituée de 15 μ L de tampon 10x + 1 μ L de TurboDNase (2 U/ μ L ; Ambion Inc, ThermoFischer Scientific) + 1 μ L de RNase OutTM (40 U/ μ L ; Invitrogen) + qsp 150 μ L d'eau Milli-Q. Après 30 minutes d'incubation sur bain sec à 37°C les ARN sont extraits avec 150 μ L de phénol-chloroforme. Après centrifugation 3 minutes à 10 000 *xg* à température ambiante la phase aqueuse est récupérée.

Les ARNs sont ensuite précipités en ajoutant 250 μL d'éthanol absolu et 10 μL d'acétate d'ammonium avant d'être congelés durant une heure à -80°C . Ils sont ensuite centrifugés 10 minutes à température ambiante et le culot est lavé à l'éthanol 70 %. Les ARNs sont enfin re-suspendus dans 20 μL d'eau.

Le dosage est ensuite réalisé en mesurant les densités optiques au spectrophotomètre (Multiskan GO, ThermoFischer Scientific) afin d'évaluer la qualité des échantillons. Seuls les échantillons dont les rapports $\text{DO}_{260\text{nm}} / \text{DO}_{280\text{nm}}$ et $\text{DO}_{230\text{nm}}$ sont supérieurs à 2 sont conservés pour analyse. Ils ont été aliquotés puis conservés à -80°C .

8.2. Puces à ADN

Les analyses ont été réalisées au Luxembourg Institute of Health où un contrôle qualité des aliquots a été fait en utilisant un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Seuls les échantillons d'ARN d'intégrité (RIN pour *RNA Integrity Number*) supérieure à 8 ont été sélectionnés. Ils ont été rétrotranscrits en cDNA, qui ont ensuite été biotinylés à l'aide du kit Affymetrix GeneChip® WT Plus puis hybridés sur la puce Affymetrix mouse Clariom S conformément aux instructions du fabricant. Après lavage, la puce est scannée selon le protocole GeneChip®. Les intensités de fluorescence sont lues puis transformées en valeurs d'expressions brutes qui sont stockées dans des fichiers CEL Affymetrix dédiés (un par échantillon).

8.3. Analyses transcriptomiques

L'analyse des données a été réalisée par l'ingénieur bioinformaticien du laboratoire Sébastien Hergalant. Brièvement, les données d'expression brutes pour chaque échantillon ont été extraites des fichiers CEL et manipulées sous R avec la librairie oligo (<https://bioconductor.org/>) à l'aide des annotations de plateforme correspondant à la puce utilisée (librairie `pd.clariom.s.mouse`).

Les sondes contrôles positives et négatives de la puce ont été retirées, et les données correspondant à 21 881 sondes, annotées de façon non ambiguë, chacune correspondant à un gène unique, ont ainsi pu être exploitées. Les effets non linéaires tels que le bruit de fond ou de saturation des intensités ont été corrigés par une normalisation de type Lowess (Yang *et al.*, 2002), par rapport à un profil médian de tous les échantillons (N=37).

Des corrections pour les effets batchs et variations techniques entre les puces ont été réalisées avec Combat (bibliothèque R *sva* de Bioconductor). Les statistiques (moyennes, écart-type, *fold-changes*) d'expression différentielles ont été générées pour chaque groupe d'échantillons. Parallèlement, les analyses supervisées ont été réalisées avec une modélisation linéaire versatile de type Bayes empirique. Les probabilités résultantes ont été calculées en appliquant un test de Student modéré (bidirectionnel), puis ajustées pour la FDR (*False Discovery Rate* ou correction des faux positifs) suivant la procédure de Benjamini-Hochberg. Les Volcano-plots ont été réalisés en utilisant la bibliothèque R *EnhancedVolcano*.

Les analyses non supervisées ont été réalisées en effectuant une classification hiérarchique avec *Cluster 3.0* (de Hoon *et al.*, 2004) sur les données centrées sur la médiane du gène, et avec une corrélation non centrée comme métrique de similarité.

Enfin, les annotations fonctionnelles ont été réalisées avec la plateforme *OpenTargets* (Carvalho-Silva *et al.*, 2019) pour les associations avec les maladies et les calculs d'enrichissements en catégories GO (*Gene Ontology* ou familles d'ontologie des gènes). La bibliothèque R *ReactomePA* (Yu et He, 2016) a été utilisée pour extraire les voies (fonctionnelles, métaboliques, de signalisation, de régulation) enrichies de la base de données *Reactome* chez la souris. Pour toutes les expériences ci-dessus, une statistique $p < 0,001$ ou $FDR < 0,05$ était considérée comme significative, en fonction de la disponibilité et/ou de la pertinence du test associé.

9. Étude du microbiote intestinal

9.1. Séquençage ARNr 16s

L'ADN a été extrait pour chaque échantillon fécal de chaque souris à des temps différents (J0, J5 et J7 ou J9 du traitement au DSS). Brièvement, l'ADN est isolé en utilisant le kit *DNeasy PowerSoil* (Qiagen, Hilden, Germany) conformément aux recommandations du fabricant.

Puis, une analyse par séquençage *MiSeq*, du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée avec la paire d'amorces *S-D-Bact* (plateforme *Genoscreen*, méthodologie *Métabiote®* Lille). L'analyse bio-informatique est ensuite réalisée par l'Institut Pasteur de Lille par le Dr Marie Vallier Unité INSERM 1019 & Unité CNRS 8204.

Brièvement, les amplicons individuels sont tagués avec des codes identificateur spécifiques (MID) et regroupés pour la construction de la librairie avant séquençage. La région variable V3-V4 du gène de l'ARNr 16S est amplifiée et séquencée sur un Illumina MiSeq avec 2x250 pb. Les séquences brutes ont d'abord été coupées et filtrées par taille en utilisant CUTADAPT v1.1.4 (Martin, 2011). Puis, USEARCH v10.0.240 (Edgar, 2016; Edgar et Flyvbjerg, 2015) a été utilisé pour fusionner et corriger les lectures.

Un script R (Team, 2019) a ensuite été utilisé pour transférer les séquences sur MOTHUR v1.39.5 (Schloss *et al.*, 2009) avec lequel un traitement supplémentaire a été effectué selon le MiSeq SOP (Kozich *et al.*, 2013). Les séquences sont alignées sur la base de données de référence SILVA v132 (Quast *et al.*, 2012), classées par rapport à la base de données RDP v11 (Cole *et al.*, 2014), regroupées en unités taxonomiques OTU au seuil d'identité 97% au niveau de l'espèce et raréfiées à 12 000 séquences par échantillon.

La table OTU obtenue de MOTHUR est ensuite importée dans R pour l'analyse statistique. Les indices d' α -diversité (Chao et Shannon Index) et de β -diversité (Jaccard et Bray-Curtis) ont été calculés avec le package vegan v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2019) utilisé également pour construire les analyses en composante principale (PCoA). Pour les corrélations entre les indices de diversités α ou les fold-change et les paramètres expérimentaux, un test signé des rangs de Wilcoxon a été utilisé. Pour les indices de β -diversité, les corrélations avec les paramètres expérimentaux ont été évaluées avec une analyse de variance multivariée (MANOVA) en utilisant le package pairwiseAdonis (Arbizu, 2020).

Des biomarqueurs ont été identifiés en corrélant les OTU individuelles avec les paramètres expérimentaux à l'aide de quatre tests complémentaires : le test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis a été effectué sur les abondances d'OTU et les fold-change (1) ou les abondances d'OTU non nulles (2); Le test du chi carré de Pearson a été réalisé sur la prévalence des OTU (3); L'analyse des espèces indicatrices (4) a été réalisée avec les indicateurs d'espèces du package (Cáceres et Legendre, 2009). Le cas échéant, les valeurs p ont été ajustées pour des tests multiples en utilisant la correction de type FDR.

9.2. Dosage des métabolites bactériens acides gras à chaînes courtes (AGCC)

Les selles et le contenu caecal des souris ont été prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les AGCC étant volatils, il est primordial de les conserver au froid.

Ces analyses ont été réalisées à l'institut Micalis (INRA Jouy-en-Josas) dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Muriel Thomas. Brièvement, les échantillons sont d'abord pesés (sur glace) puis suspendus dans l'eau milliQ à raison de 2mL pour 1 gramme de selles. Après agitation au vortex jusqu'à homogénéisation complète (environ 15 minutes), les échantillons sont incubés 2 heures à 4°C puis centrifugés 15 minutes à 15 000 xg à 4°C. Le surnageant est prélevé et transféré dans un tube propre.

Les échantillons sont ensuite déprotéinisés à l'acide phosphotungstique 10% durant une nuit à 4°C (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Après centrifugation 15 minutes à 12 000 xg et à 4°C le surnageant est récolté et pesé. Puis, 800 μ L de surnageant sont prélevés délicatement et placés dans une fiole adaptée au chromatographe. Enfin, 200 μ L de solution intestinale sont ajoutés dans chaque échantillon ainsi que dans les standards.

Les acides gras sont ensuite dosés par chromatographie en phase gazeuse. La quantification se fait pour chaque AGCC par rapport à l'étalon interne (EI), sachant que la surface des pics est proportionnelle à la quantité injectée et donc à la concentration de l'échantillon.

Avec le chromatogramme des standards on détermine le coefficient de réponse C_r de chaque AGCC par rapport à l'étalon interne : $C_r = \frac{S_{EI}/S_{AGCC}}{C_{AGCC}/C_{EI}}$ (S : surface des pics et C : concentration).

Avec le chromatogramme de l'échantillon, on détermine pour chaque AGCC : la concentration dans la fiole $C_{AGCC} = \frac{S_{AGCC}}{S_{EI}} \times C_{EI} \times C_r$. Puis la concentration dans l'échantillon est déterminée grâce au volume total de surnageant V et du poids de l'échantillon $C_{AGCC\text{ finale}} = C_{AGCC} \times 1,25 \times \frac{V}{P}$

Les résultats d'analyses obtenus sont ainsi rapportés à la masse et donc exprimés en $\mu\text{mol/g}$ fèces ou contenus digestif.

10. Modèle *ex vivo* d'épithélium intestinal

10.1. Culture cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC). Cette lignée cellulaire tumorale humaine isolée d'un adénocarcinome colique, peut selon les conditions de culture, former un épithélium mimant une barrière intestinale fonctionnelle. C'est un modèle ancien et largement utilisé pour évaluer l'absorption de médicaments ou autres xénobiotiques par voie orale (Cheng *et al.*, 2008; Hubatsch *et al.*, 2007).

Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) contenant de la glutamine et à faible teneur en glucose (1 g/L) complété avec 20 % de SVF (CVFSVF0001, lot : S52751-2262, Eurobio) 1% d'acides aminés non essentiels (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) et 1 % d'un mélange de pénicilline et streptomycine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ dans des flasques (Corning Falco, Dutscher) et le milieu de culture est remplacé tous les deux jours.

Afin de pouvoir exposer les cellules à différentes doses de sucre, un milieu sans glucose DMEM est préparé (DMEM Sigma Aldrich) avec 20% de SVF (CVFSVF0001, lot : S52751-2262, Eurobio) + L-Glutamine + 1% d'acides aminés non essentiels et 1 % d'un mélange de pénicilline et streptomycine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) auxquels sont ajoutés du glucose ou du fructose à différentes concentrations (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

10.2. Viabilité des cellules selon les conditions de culture

Afin de s'assurer de la tolérance des cellules face à une exposition à différentes doses de sucre, nous avons d'abord vérifié la viabilité cellulaire dans différentes conditions. Ainsi, les cellules ont été exposées à des doses croissantes (1, 4, 8 et 12 g/L) de glucose, de fructose ou d'un mélange glucose et fructose (puisque le saccharose alimentaire est composé d'une molécule de glucose et d'un fructose).

La toxicité potentielle de fortes doses de sucre a été évaluée par un test au Methylthiazoltétrazolium (MTT). Brièvement, le test MTT est basé sur l'activité mitochondriale, qui est constante pour les cellules viables. Cette dernière est évaluée en utilisant un sel de térazolium (MTT) qui est réduit en formazan par les enzymes cellulaires et dont la quantité est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

Ce composé insoluble de couleur violette est ensuite solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avant d'être dosé par spectrophotométrie.

Ainsi, les cellules ont été déposées dans une microplaque de 96 puits à une densité de 10^5 cellules/mL et incubées durant 24 heures à 37°C. Puis, le milieu est remplacé par un milieu sans rouge phénol, enrichi en glucose ou en fructose à différentes doses. Après 24 heures d'incubation, 50 μ L de MTT à 5 mg/mL dans une solution d'HBSS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) sont ajoutés dans chaque puit. Après 3 heures d'incubation, le milieu est retiré et les cristaux dissous avec 50 μ L de DMSO avant d'agiter la plaque 5 minutes à 500 rpm. L'absorbance est mesurée à 570 nm et 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Spectramax ID3, Molecular Devices, USA).

Parallèlement, le nombre de cellules a été mesuré à l'aide d'un Luna™ Automated Cell counter (Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, France) en mélangeant 10 μ L de suspension cellulaire à 10 μ L de bleu trypan. Le mélange est déposé dans une cellule de comptage avant d'être analysé. Aucune surmortalité cellulaire n'a été observée, même à très forte dose de sucre durant 24 à 72 heures, ce qui a permis de poursuivre les expérimentations.

10.3. Immunofluorescence

Pour les expériences, 70 000 cellules par puits ont étéensemencées sur des plaques 96 puits screenstar opaques adaptées à l'imagerie cellulaire (Greiner bio-one, Dutscher) ou dans des plaques préalablement coatées avec 25 μ g/mL de fibronectine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Après 48 heures, les cellules forment une monocouche confluente et sont alors exposées à différentes doses de glucose ou de fructose ou un mélange des deux durant 24 heures ou 48 heures.

Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution à 0,5 % de Triton 100x dans du paraformaldéhyde 3% durant 3 minutes avant d'être fixées dans du paraformaldéhyde durant 30 minutes à température ambiante. Après lavage au PBS, les cellules sont ensuite incubées une heure dans une solution de BSA 1% puis les protéines de jonction ZO-1 sont marquées grâce à l'anticorps primaire anti-ZO-1 (BD transduction Laboratories™, USA) à 1,25 μ g/mL durant une heure à température ambiante puis l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris Alexa Fluor 488 (Invitrogen™, Carlsbad, USA) à 10 μ g/mL durant une heure à température ambiante comme décrit précédemment (Thaiss *et al.*, 2018).

Les marquages sont ensuite observés par microscopie à épifluorescence (BX51WIF, Olympus) au grossissement 40x/1.3 UPlanFLN (Olympus, Tokyo, Japon) et/ou au microscope confocal (Nikon Instruments Ti) et les photos prises à l'aide d'une caméra digitale (MF ProgRes, Jenoptik) grâce au logiciel (Soft Imaging System, Olympus).

10.4. Étude de perméabilité

Dans certaines conditions, les cellules Caco-2 sont capables de se différencier en cellules intestinales polarisées pour former un épithélium mimant une véritable barrière intestinale (**Figure 44**). Ce modèle est largement utilisé comme modèle d'étude de la perméabilité épithéliale (Hidalgo *et al.*, 1989).

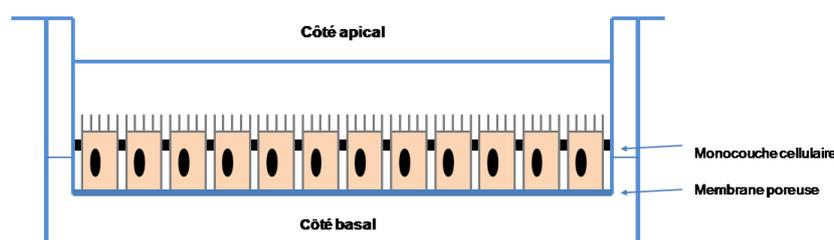


Figure 44 : Étude de l'absorption sur cellules Caco-2 cultivées en monocouche sur Transwell®.

Les cellules intestinales Caco-2 ont étéensemencées sur des plaques Transwell 12 puits (pores 0,4 μm , diamètre 12 mm, Corning® Costar Inc, NY, USA) à une densité de 10^5 cellules/puit et 0,5 mL de milieu dans le compartiment apical, le compartiment basolatéral est rempli avec 1,5 mL de milieu de culture. Ces milieux sont remplacés toutes les 48 heures la première semaine de culture puis tous les jours la 2^{ème} semaine. L'obtention d'une monocouche cellulaire confluente peut prendre 15 à 20 jours.

La résistance transmembranaire (TEER) est mesurée quotidiennement à l'aide d'un Ohmmètre (Millicell® ERS, Merck Millipore, MA, USA) afin de vérifier l'intégrité et la cohésion du tapis cellulaire. Lorsque la résistance est supérieure à 300 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ indiquant une monocouche confluente, le milieu est remplacé par un milieu à plus forte dose en sucre (glucose ou fructose) et la plaque incubée durant 24 heures.

Puis, une solution de FITC à 1 mg/mL est ajoutée dans le compartiment apical. Un prélèvement de 100 μL est effectué après 1, 12, 24 et 48 heures puis la fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Spectramax ID3, Molecular Devices, USA ; longueurs d'ondes excitation 485 nm émission 530 nm) et comparé à une courbe standard préparée dans du milieu DMEM sans rouge phénol.

11. Analyses statistiques

Pour chaque expérience, les résultats quantitatifs sont présentés sous forme graphique présentant la moyenne \pm erreur standard. Pour les comparaisons entre deux groupes, des t-test (pour les données paramétriques) ou U-test Mann-Whitney (pour les données non paramétriques) ont été effectués. Lorsque plus de deux groupes étaient comparés, des analyses de variance unidirectionnelle (ANOVA) et tests post-hoc de Tukey ou de Fisher (données paramétriques) ou un test de Kruskal-Wallis avec une correction de Dunn (données non paramétriques) ont été utilisés. Les détails statistiques et la valeur N des effectifs sont précisés dans chaque légende des figures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA).

Partie 4
RÉSULTATS

1. Protocole préliminaire effet différentiel des régimes hypercaloriques

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel de régimes enrichis en sucre (30 % de saccharose) ou en graisses (60% de lipides) consommés durant 8 semaines par des souris mâles et femelles comparativement à un régime contrôle qui correspond au régime d'entretien des souris.

1.1. Conséquences de la consommation des régimes hypercaloriques

- **Suivi de la consommation alimentaire**

Pour chacun des trois régimes alimentaires, la prise alimentaire des animaux a été suivie tout au long du protocole pour chaque cage, et une moyenne estimée par animal a été calculée (**Figure 45**). Avec le **régime contrôle**, la consommation moyenne de nourriture était **en accord avec les recommandations nutritionnelles** du fabricant chez les mâles et les femelles (4 grammes / jour ; recommandations Safe Diets). La consommation du régime hyperlipidique est apparue légèrement inférieure (3 g/j en moyenne) de façon non significative. En revanche, les souris semblent avoir une très **forte appétence pour le régime hyperglucidique**, puisque qu'une surconsommation alimentaire (allant jusqu'à 8 voire 10 g/j) est observable après 4 semaines chez les femelles, 6 semaines chez les mâles.

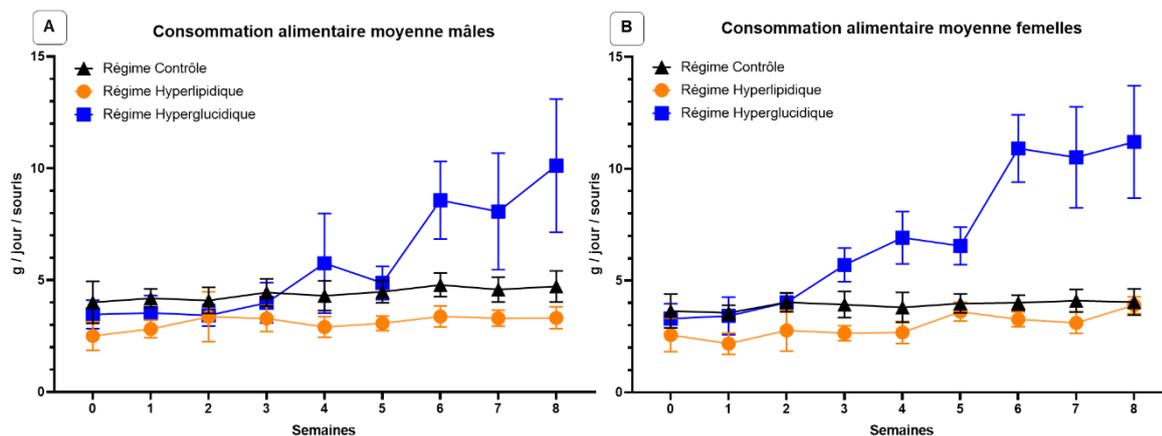


Figure 45 : Suivi de la prise alimentaire chez les mâles (A) et les femelles (B). La consommation alimentaire des animaux a été suivie chaque semaine au cours des 8 semaines de régime contrôle (—●—), hyperlipidique (—▲—) et hyperglucidique (—■—). Les résultats présentés correspondent à la moyenne estimée par jour par souris \pm erreur standard ($N = 8$ pour chacun des groupes). La significativité des différences observées entre le régime étudié et le régime contrôle a été établie par un test ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Suivi de la prise de poids**

L'étude des régimes alimentaires hypercaloriques a été initiée lorsque les souris étaient âgées de 8 à 9 semaines, soit juste après leur maturité sexuelle. Au début du protocole, les mâles pesaient 24 grammes en moyenne, les femelles 18 grammes. Pour chacun des régimes alimentaires, une prise de poids régulière a été observée tout au long des 8 semaines du protocole *in vivo* (Figure 46).

Avec le régime **contrôle**, le poids moyen des souris a augmenté de **façon similaire** aux précédents protocoles réalisés au laboratoire (+ 25 % chez les mâles et + 22% chez les femelles par rapport au poids initial). En revanche, la consommation des régimes **hypercaloriques** a provoqué **une prise de poids plus importante et significative chez les mâles** par rapport au régime contrôle. Ainsi, à la fin du protocole *in vivo*, la prise de poids moyenne des mâles était de + 56 % avec le régime hyperlipidique et de + 44 % avec le régime hyperglucidique. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux régimes hypercaloriques.

Contrairement aux souris mâles, la prise de poids liée à la consommation des régimes hypercaloriques **par les souris femelles ne diffère pas significativement** de celle observée avec le régime contrôle (+ 25 % pour le régime hyperlipidique et + 28 % pour le régime hyperglucidique).

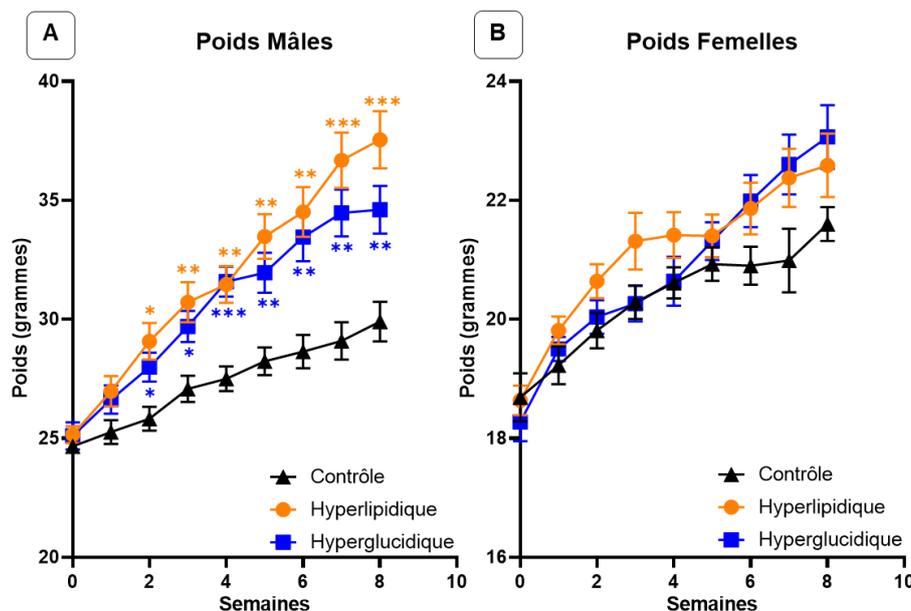


Figure 46 : Étude de la prise de poids chez les mâles (A) et les femelles (B). Le poids des animaux a été suivi chaque semaine au cours des 8 semaines de régime contrôle (—▲—), hyperlipidique (—●—) et hyperglucidique (—■—). Les résultats présentés correspondent au poids moyen \pm erreur standard ($N = 8$ pour chacun des groupes). La significativité des différences observées entre le régime étudié et le régime contrôle a été établie par ANOVA avec correction de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Analyse de marqueurs biochimique sanguins**

Un dosage des marqueurs biologiques sanguins a permis d'étudier les conséquences métaboliques des régimes alimentaires hypercaloriques (**Figure 47**). Ces analyses n'ont pu être effectuées que chez les souris mâles en raison du trop faible volume prélevé chez les femelles et une forte hémolyse liée aux conditions de prélèvement par décapitation.

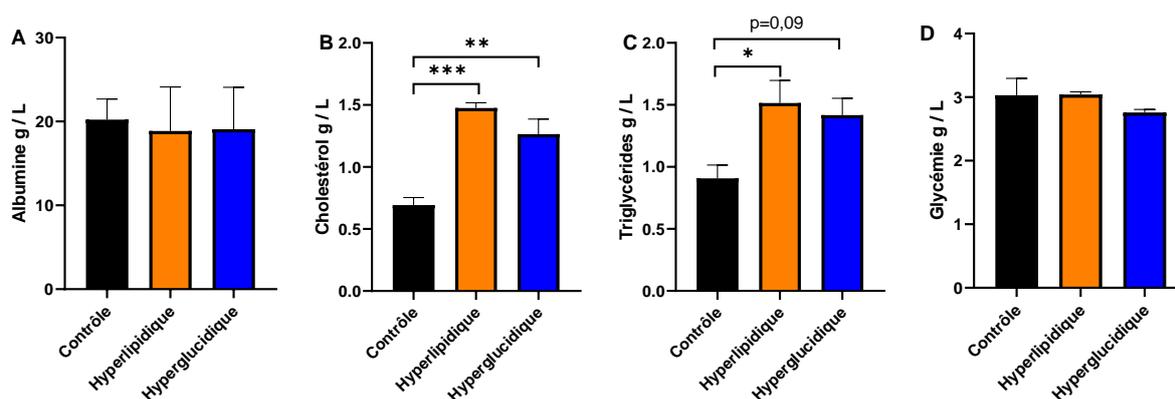


Figure 47 : Analyses sanguines des souris. Les résultats des analyses biochimiques sanguines en fonction des régimes alimentaires contrôle (■), hyperlipidique (■), et hyperglucidique (■) correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N = 4$). La significativité des différences observées a été établie par ANOVA ou un test de Kruskal-Wallis selon que les données étaient paramétriques ou non (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La consommation des régimes hyperglucidique et hyperlipidique n'a pas entraîné de modification de l'albuminémie, ni de la glycémie qui est restée conforme à la normale des souris ($3,3 \pm 0,7$ g/L à jeun ; Données Janviers Labs 2017).

En revanche, la consommation des deux types de régimes hypercaloriques a provoqué une **hausse significative du cholestérol** (normale $1,1 \pm 0,1$ g/L) et des **triglycérides** (normale $2,1 \pm 0,5$ g/L) dans le sang, suggérant ainsi l'effet des régimes hypercaloriques sur le métabolisme qui privilégie l'augmentation de la masse grasse.

1.2. Conséquences sur la colite chimio-induite

Pour chaque régime alimentaire étudié, 4 animaux ont été traités avec le DSS pour induire une colite et 4 animaux n'ont pas reçu le traitement. Les signes cliniques et endoscopiques ont été observés afin d'évaluer la sévérité de l'inflammation en fonction des régimes alimentaires consommés par les animaux.

- **Score clinique *Disease Activity Index (DAI)***

Les signes cliniques d'inflammation (perte de poids, aspects des selles et saignement) ont été analysés quotidiennement afin d'établir le score DAI évaluant la sévérité de la colite.

Comme attendu, aucune manifestation caractéristique d'une inflammation n'a été observée en l'absence de traitement colitogène. Le DSS a provoqué une perte de poids chez les mâles et les femelles nourris avec le régime contrôle à partir du 6^{ème} jour. La sévérité de la colite a augmenté significativement chez ces souris ($p = 0,02$) à J6, les mâles et femelles présentaient une perte de poids importante, des selles molles voire liquides et certains présentaient des rectorragies (**Figure 48**, le graphique ne présente pas les analyses statistiques entre les groupes DSS⁻ et DSS⁺).

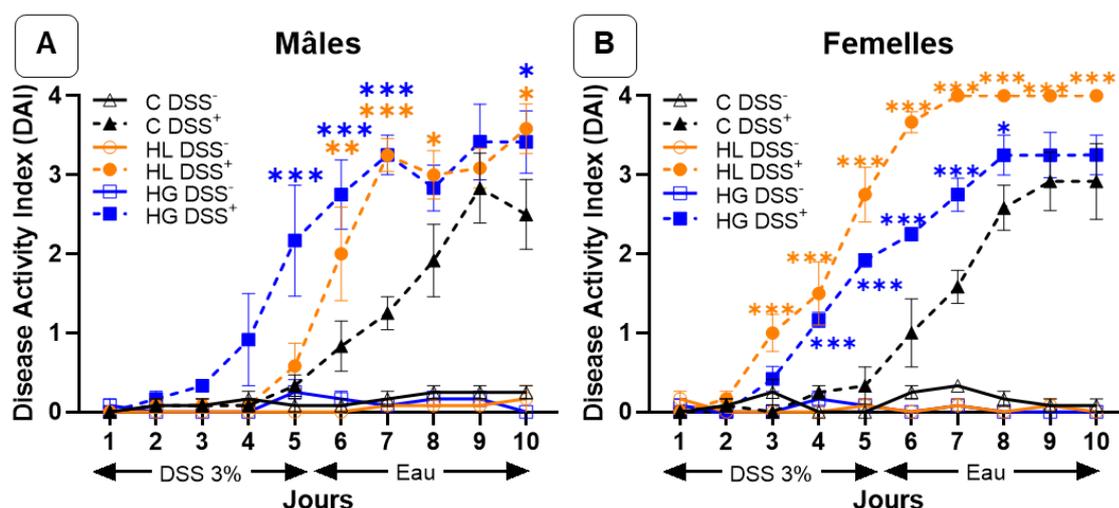


Figure 48 : Étude des signes cliniques de la colite expérimentale. La perte de poids, la consistance des selles et la présence de sang ont été suivies quotidiennement pour chaque souris en fonction des régimes contrôle C (—●—), hyperlipidique HL (—▲—) et hyperglucidique HG (—■—) et en présence ou non du traitement colitogène (en pointillés). Ces critères permettent de calculer le score DAI. Certains animaux ont dû être euthanasiés plus précocement, pour ceux-ci le dernier score connu a été gardé les jours suivants. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chaque groupe de souris ($N = 4$). La significativité des différences observées entre les groupes traités avec le DSS nourris avec les régimes hypercaloriques et le groupe nourri avec le régime contrôle a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

De façon remarquable, les **manifestations de la colite sont apparues plus tôt** (J3 chez les femelles J4 chez les mâles) et ont été plus sévères (DAI > 3 dès J7) chez les animaux mâles et femelles ayant consommé les régimes hypercaloriques que chez ceux ayant consommé le régime contrôle (DAI = 3 à J10) (*Figure 48*).

Ainsi, nous avons observé que chez les **mâles** (*Figure 48 A*), la consommation du régime **hyperglucidique** a provoqué une apparition **plus précoce** et une **aggravation de la colite** par rapport au régime contrôle et au régime hyperlipidique. Ainsi, au 5^{ème} jour le score est significativement plus élevé chez les mâles ayant consommé le régime hyperglucidique comparativement à ceux soumis au régime hyperlipidique ($p = 0,02$).

En revanche, chez les femelles (*Figure 48 B*), les **conséquences du régime hyperlipidique sur l'effet colitogène sont apparues plus graves que chez les mâles** : l'augmentation du DAI a été plus précoce (J3, $p = 0,01$) et le score de sévérité a atteint des niveaux supérieurs chez les femelles que chez les mâles.

1.3. Étude du score endoscopique

Un examen coloscopique a été réalisé à J10 pour chaque animal avant la mise à mort afin de scorer la sévérité de l'inflammation et confirmer le score clinique DAI.

Contrairement à ce que pouvait laisser penser le score clinique, l'étude endoscopique a révélée des lésions au niveau de la muqueuse intestinale des animaux ayant consommé les régimes hypercaloriques et **pourtant non soumis au traitement colitogène** (*Figure 49 A*). En effet, les images endoscopiques ont montré de très nombreux saignements diffus dans la lumière intestinale mais également des ulcérations creusantes (*Figure 49 A*).

L'examen coloscopique montre que les lésions sont d'autant plus prononcées et atypiques chez les souris mâles et femelles traitées avec le DSS (*Figure 49 A2, 4, 6, 8, 10 et 12*) lorsqu'elles ont consommé les régimes hypercaloriques et le **score endoscopique est significativement augmenté quel que soit le régime alimentaire consommé** (*Figure 49 B-C*). Ainsi, les images endoscopiques montraient de très nombreux dépôts de fibrine (*Figure 49 A4 et A6*), témoignant de la cicatrisation de lésions dans la muqueuse. De plus, des ulcérations particulièrement profondes ainsi que de nombreux saignements ont été observés.

Cela se traduit par une **hausse significative du score endoscopique pour les deux régimes hypercaloriques** par rapport au score observé avec le régime contrôle (qui est conforme à ce qui est observé en général dans ces conditions) (**Figure 49**). En revanche, contrairement à ce que pouvait laisser penser le DAI, il n'y a pas de différence significative entre les mâles et les femelles concernant le score endoscopique.

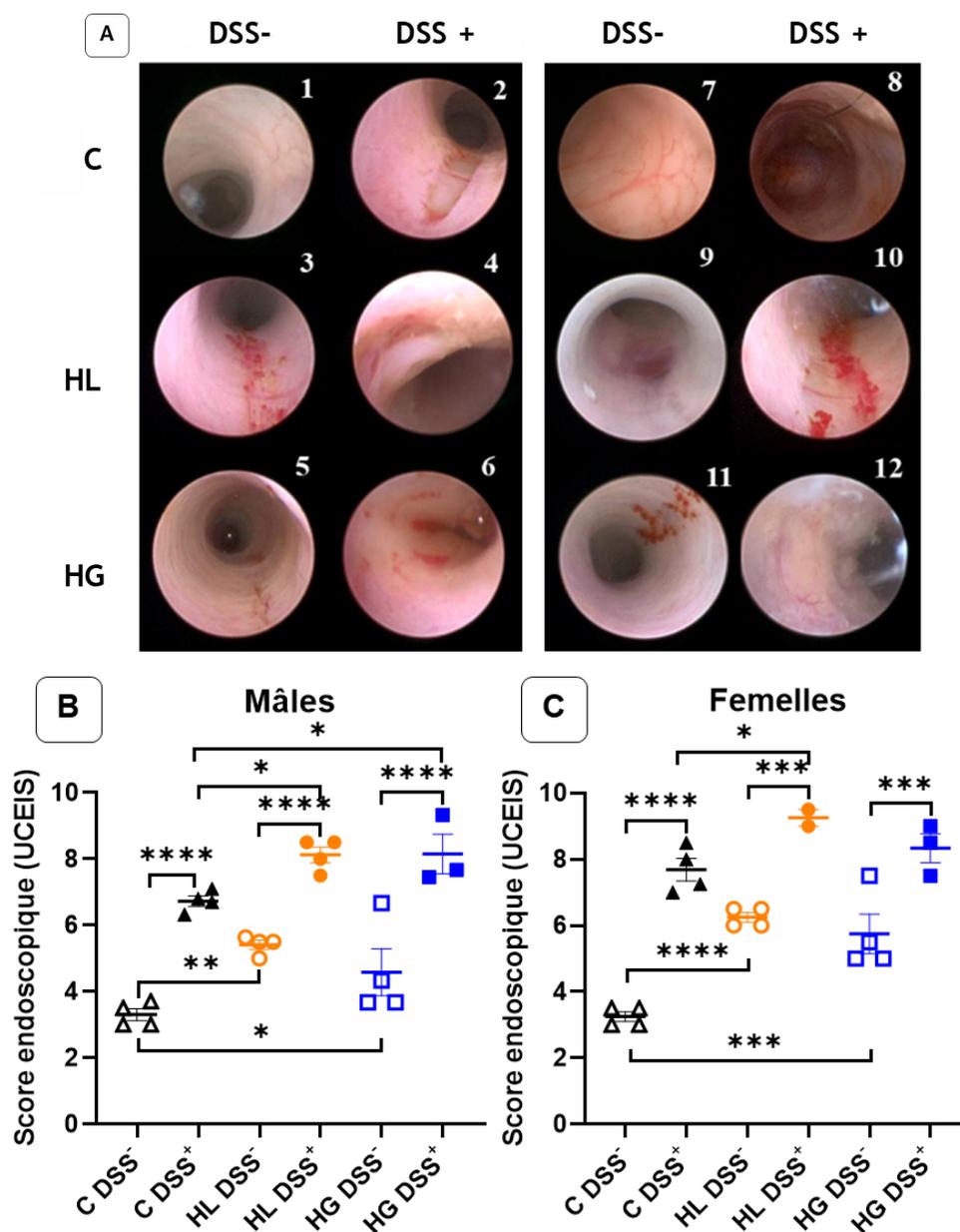


Figure 49 : Visualisation des images endoscopiques (A-B) et étude des scores endoscopiques de la colite chimio-induite (C-D). Le score établi s'appuie sur la vascularisation de la paroi, les saignements et la présence d'érosions ou d'ulcérations de la muqueuse. Il a été établi par deux expérimentateurs en double aveugle pour chaque souris en fonction des régimes alimentaires contrôle (C), hyperlipidique (HL) ou hyperglucidique (HG) traitée ou non au DSS. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes. La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA et un test de Fisher (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

1.4. Analyse protéique par Western-Blot dans la muqueuse colique

- **Étude des marqueurs de l'inflammation**

L'expression de marqueurs de l'inflammation a été étudiée dans la muqueuse colique de toutes les souris incluses dans le protocole *in vivo* afin d'évaluer l'activation du processus inflammatoire au niveau local.

Chez les mâles, en l'absence de traitement colitogène, aucune modification de la quantité des cytokines inflammatoires n'a été observée avec les régimes hypercaloriques. Chez ceux ayant consommé le régime hyperlipidique, l'expression de **TNF- α est augmenté d'un facteur 2** sous l'effet du DSS mais pas de manière significative (**Figure 50 C**). Curieusement, chez ceux ayant consommé le régime hyperglucidique, nous observons une légère diminution de la quantité de TNF- α dans le côlon après traitement au DSS par rapport aux souris non traitées nourries avec le régime hyperglucidique.

La quantification de l'**IL-1 β** dans la muqueuse colique des mâles traités avec le DSS a montré une **augmentation** par rapport à ceux non traités (**Figure 50 B**). L'expression de cette cytokine ne semble en revanche pas affectée par la consommation des régimes hypercaloriques.

Nous avons également étudié deux marqueurs anti-inflammatoires. L'expression de TGF- β ne semble pas modifiée dans aucun des groupes (**Figure 50 F**). En revanche, la quantité d'**IL-10 est nettement diminuée par le DSS** et d'autant plus chez les mâles ayant consommé le régime enrichi en sucre (**Figure 50 E**).

Chez les femelles, nous n'avons réalisé les analyses que dans les groupes contrôle et hyperglucidique car deux animaux sont décédés dans le groupe hyperlipidique. (**Figure 50 G**). En l'absence de DSS, on observe une hausse importante du niveau d'expression d'IL-10 chez les femelles ayant consommé le régime hyperglucidique. Après traitement par le DSS, la quantité d'**IL-10 semble diminuer lorsque les animaux ont consommé le régime enrichi en sucre**, toutefois cette baisse n'est pas vérifiée statistiquement ($p = 0,07$) (**Figure 50 I**). Concernant la quantité de TGF- β , elle semble augmenter dans la muqueuse des femelles ayant consommé le régime hyperglucidique, mais cette hausse n'est pas significative (**Figure 50 H**).

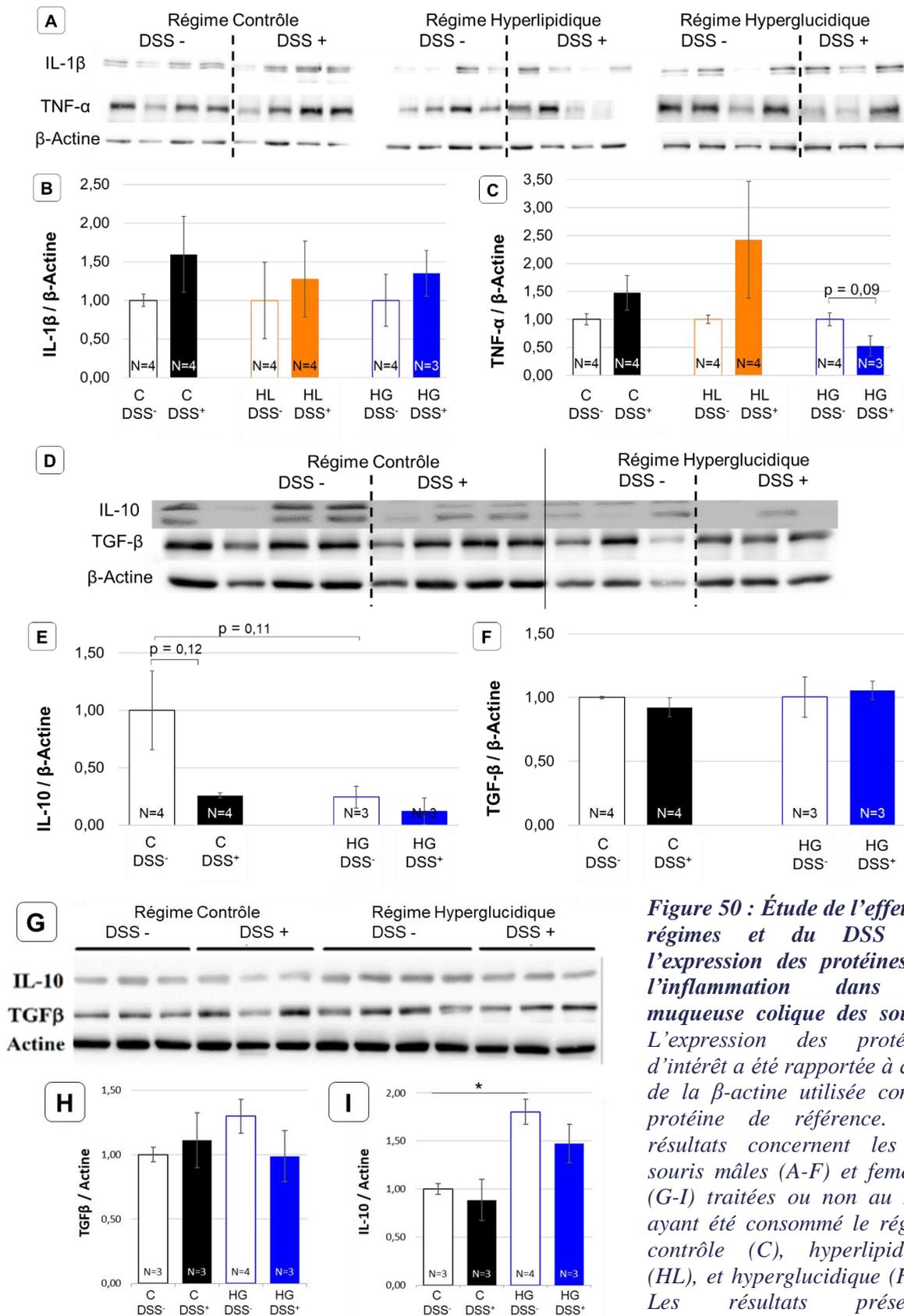


Figure 50 : Étude de l'effet des régimes et du DSS sur l'expression des protéines de l'inflammation dans la muqueuse colique des souris. L'expression des protéines d'intérêt a été rapportée à celle de la β -actine utilisée comme protéine de référence. Les résultats concernent les souris mâles (A-F) et femelles (G-I) traitées ou non au DSS ayant été consommé le régime contrôle (C), hyperlipidique (HL), et hyperglucidique (HG). Les résultats présentés correspondent aux moyennes

des mesures densitométriques normalisées \pm erreur standard. Pour chaque régime, la significativité des différences observées entre les animaux traités avec le DSS et les animaux non traités a été établie par un test t de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Étude de l'expression des marqueurs de l'autophagie**

L'expression de marqueurs de la macro-autophagie (ATG13, ATG5, LC3 II / LC3 I), de la CMA (HSPA8) et HSP 90 (impliqué dans les 2 voies considérées) a été étudiée dans les côlons de toutes les souris incluses dans le protocole *in vivo* afin de vérifier l'implication du processus autophagique dans la réponse au DSS et l'impact des régimes hypercaloriques sur ce mécanisme cellulaire.

En l'absence de traitement colitogène, aucune variation significative des marqueurs de la macro-autophagie n'a été mise en évidence en fonction des régimes alimentaires. De même, la consommation du régime hyperglucidique ne semble pas provoquer de changement dans l'expression des marqueurs de la CMA. En revanche, la consommation du **régime hyperlipidique entraîne une modification de la quantité de HSP90** (- 21 %) et de **HSPA8** (+ 42 % ; *Figure 51 B et C*).

Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas observé de modification significative de la quantité des marqueurs de l'autophagie pour les animaux ayant consommés le régime contrôle lorsqu'ils ont été traités avec le DSS (*Figure 51*). Le régime hyperlipidique ne modifie pas sensiblement l'effet du DSS observé avec le régime de référence sauf au niveau de l'expression du marqueur ATG13 (*Figure 51 E*). En revanche, la quantité de **HSP90, ATG5 et ATG13 est apparue comme étant diminuée chez les animaux traités avec le DSS qui ont consommé le régime hyperglucidique** par rapport aux animaux sains (*Figure 51 B, E, F*).

En raison d'un problème d'anticorps, les protéines ATG13 et HSP90 n'ont pas pu être répliqués. En revanche, concernant ATG5, HSPA8 et LC3 nous obtenons des résultats discordants : tout d'abord on observe une augmentation de la quantité d'ATG5 chez les animaux ayant consommé le régime normal et traités au DSS (*Figure 51 M*) que nous n'avions pas observé précédemment et nous ne retrouvons pas la diminution observée chez les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique. Concernant HSPA8 et LC3 (*Figure 51 K et L*), comme précédemment nous n'avons pas observé de modification significative. Deux autres marqueurs de l'autophagie ont été étudiés. La consommation des régimes ne semble pas modifier l'expression d'ULK1 (*Figure 51 J*), par contre nous observons une diminution d'ATG16L1 chez les animaux traités au DSS ayant consommé le régime hyperglucidique (*Figure 51 I*).

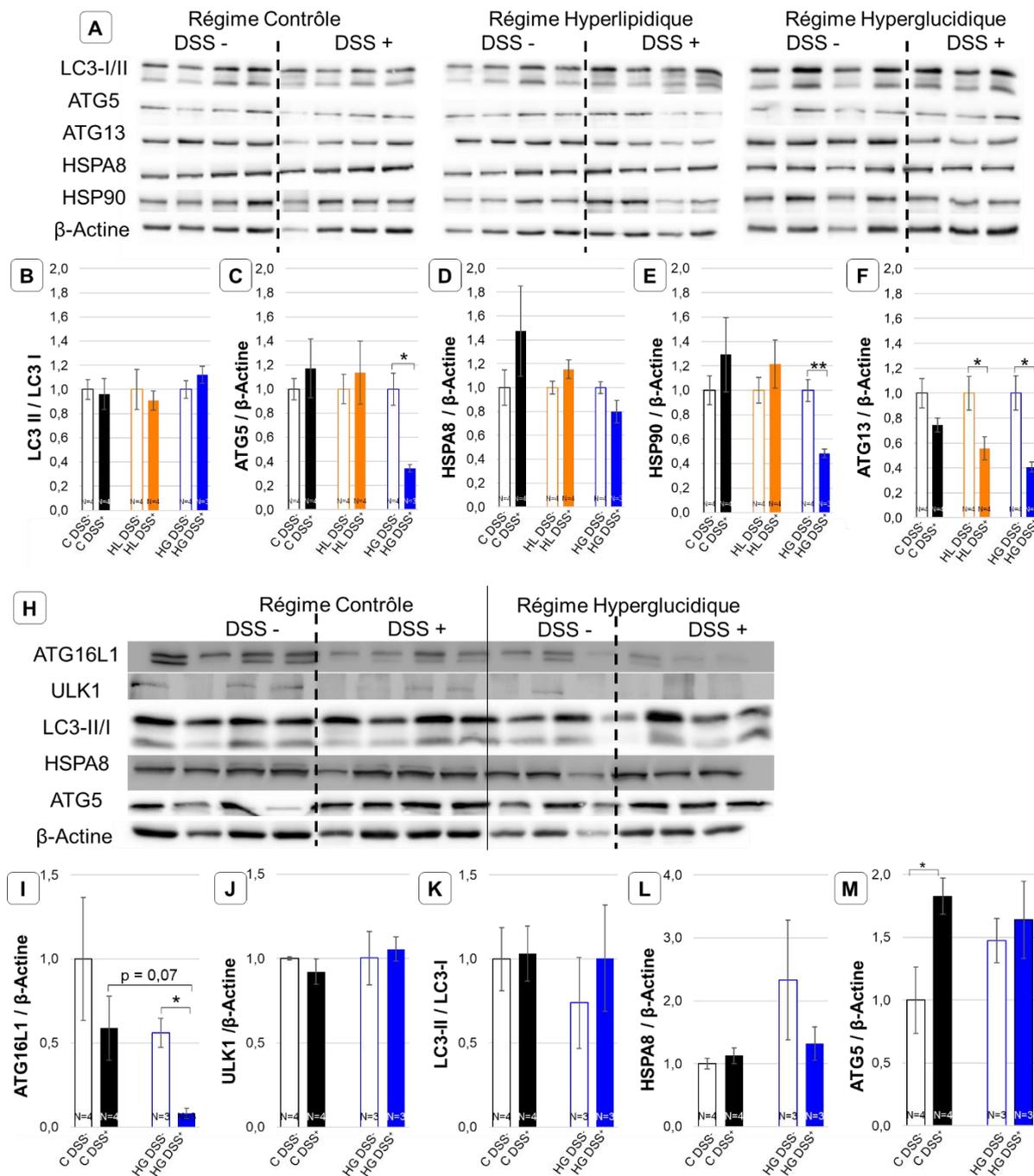


Figure 51 : Étude de l'effet des régimes et du DSS sur l'expression des protéines de l'autophagie dans la muqueuse colique des mâles. La quantité des protéines d'intérêt a été rapportée à celle de la β -actine utilisée comme protéine de référence. Les résultats concernent les mâles traités ou non au DSS ayant été soumis au régime normal (C), hyperlipidique (HL), et hyperglucidique (HG). Les résultats présentés correspondent aux moyennes des mesures densitométriques normalisées \pm erreur standard. Pour chaque régime, la significativité des différences observées entre les animaux traités avec le DSS et les animaux non traités a été établie par un test t de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Chez les femelles, aucun effet significatif n'a été observé quel que soit le marqueur étudié (Figure 52). Cependant les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois, des répliquas seront nécessaires pour confirmer ou non ces résultats.

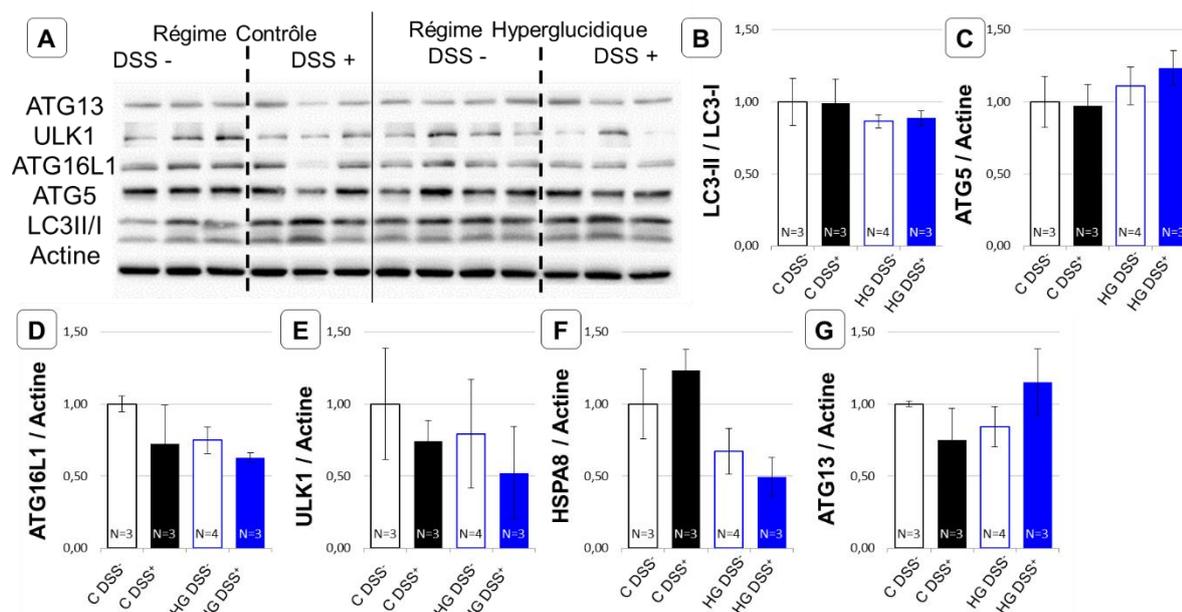


Figure 52 : Étude de l'effet des régimes et du DSS sur l'expression des protéines de l'autophagie dans la muqueuse colique des femelles. La quantité des protéines d'intérêt a été rapportée à celle de la β -actine utilisée comme protéine de référence. Les résultats concernent les femelles traitées ou non au DSS ayant été soumises au régime normal (C), hyperlipidique (HL), et hyperglucidique (HG). Les résultats présentés correspondent aux moyennes des mesures densitométriques normalisées \pm erreur standard. Pour chaque régime, la significativité des différences observées entre les animaux traités avec le DSS et les animaux non traités a été établie par un test *t* de Student.

1.5. Étude du microbiote fécal

En raison du coût des analyses, les analyses ont été effectuées sur les selles prélevées chez les mâles dans chaque groupe de régime à J0, J5 et J7 ou J9 du traitement colitogène (certains animaux n'avaient plus suffisamment de selles en fin de protocole c'est donc le dernier prélèvement qui a été analysé). Ces selles ont été prélevées chez l'ensemble des animaux du protocole, ayant reçus ou non le traitement colitogène.

• Alpha-diversité

L' α -diversité explore la **diversité taxonomique des communautés bactériennes** de chaque animal. Sur la **Figure 53**, différents indices sont utilisés : le nombre de **taxa**, l'indice de **Chao** (qui quantifie la biodiversité spécifique par échantillon), de **Shannon** (qui mesure la diversité spécifique) ou de **Simpson** (qui estime la diversité de l'abondance dans chaque échantillon).

Chez les souris non traitées au DSS (**Figure 53 A**), on observe une nette différence entre les animaux ayant consommé le régime contrôle et ceux ayant consommé les régimes hypercaloriques. Quel que soit l'indice utilisé, il y a une **diminution de la diversité microbienne** liée à la consommation des régimes hypercaloriques.

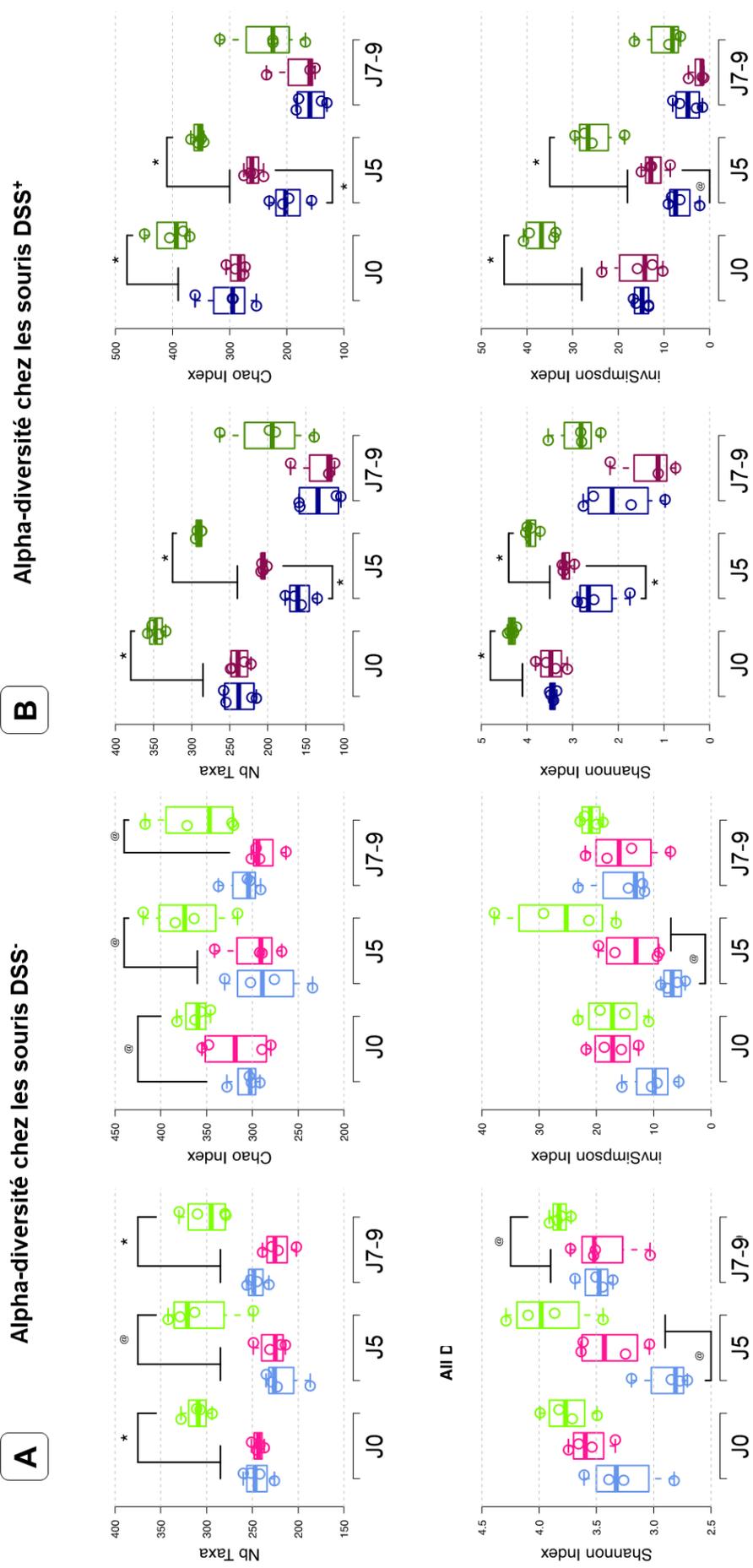


Figure 53 : Étude de l'alpha-diversité du microbiote sur les selles des souris mâles traitées ou non au DSS. Représentation de la diversité taxinomique des microbiotes des souris ayant consommé le régime contrôle (en vert), le régime hyperglucidique (en bleu) et le régime hyperlipidique (en rose) sans traitement avec le DSS (A) puis au cours du traitement colitogène (B). Les résultats présentés correspondent à la répartition par groupe (N = 4).

Comme attendu, le **traitement DSS** (*Figure 53 B*) **provoque une baisse** de la diversité microbienne chez les animaux ayant consommé le régime contrôle. Chez ceux ayant consommé les régimes hypercaloriques, la diversité est massivement réduite dès J5 pour se stabiliser jusqu'à J7.

- **Beta-diversité**

La β -diversité est une analyse en composante principale (PCA) qui explore **les différences de composition entre les microbiotes** de quatre échantillons distincts. La composition globale des communautés microbiennes est comparée ici en **tenant compte de l'abondance de chaque espèce bactérienne dans ces communautés**. Deux analyses sont effectuées : **Bray-Curtis** analyse le nombre d'espèces en tenant compte de l'aspect quantitatif et est donc plus influencé par les taxons les plus abondants et **Jaccard** ne prend plus en compte l'aspect quantitatif mais uniquement les données présence/absence et est donc plus influencé par les espèces rares (*Figure 54*).

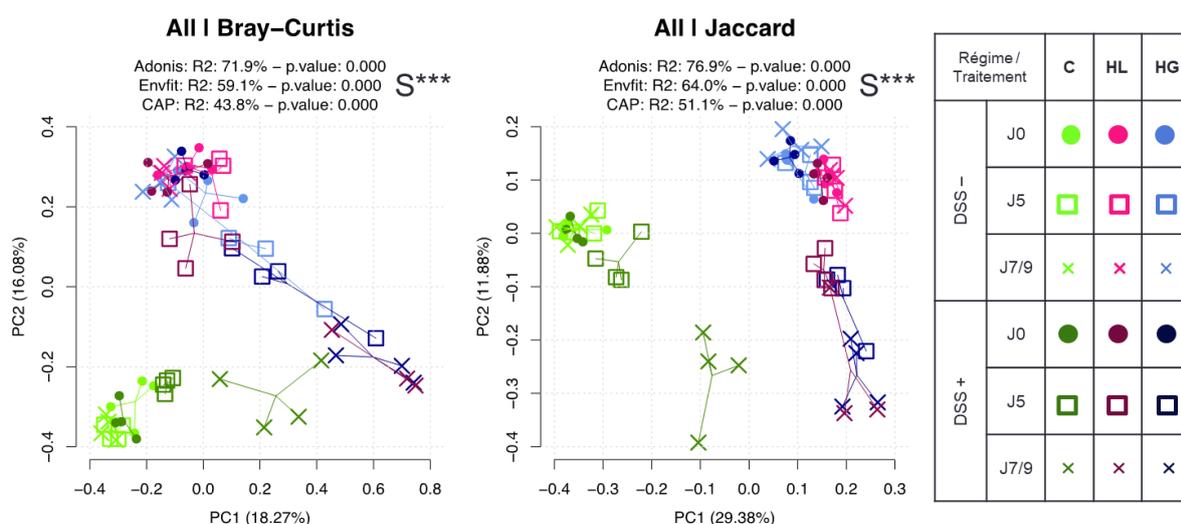


Figure 54 : Effet du temps, du traitement colitogène et des régimes alimentaires sur la Beta-diversité du microbiote fécal des souris mâles. Représentation des différences de composition des microbiotes des souris ayant consommé le régime contrôle (en vert), le régime hyperlipidique (en rose) le régime hyperglucidique (en bleu). Effet du temps et des régimes alimentaires chez les souris soumises ou non au traitement colitogène.

Avant traitement colitogène on observe des différences liées aux régimes hypercaloriques : à J0, quel que soit l'indice utilisé (*Figure 54*), les deux régimes (hyperglucidique et hyperlipidique) sont similaires entre eux mais se distinguent nettement du régime contrôle.

Puis après 5 jours de traitement, on constate toujours l'effet des régimes alimentaires et chez les animaux traités au DSS, **les deux groupes hypercaloriques se rapprochent d'avantage du régime contrôle**, ceci indique une baisse de la diversité microbienne au cours du traitement colitogène. La plus grande distance observée pour les régimes hypercaloriques entre J0 et J9 que celle observée pour le régime contrôle suggère que ces régimes amplifient plus rapidement l'effet appauvrissant du DSS.

Après stratification en fonction de la présence ou non de traitement avec le DSS, on observe tout d'abord qu'en l'absence de DSS (*Figure 55*) il y a une **forte influence du régime alimentaire sur la composition du microbiote** : le régime normal se distingue nettement des régimes hypercaloriques qui sont similaires avec l'indice de Bray-Curtis.

En revanche après traitement avec le DSS (*Figure 55*) le régime hyperglucidique devient complètement indiscernable de l'hyperlipidique : les échantillons à J7-9 sont quasi-superposés.

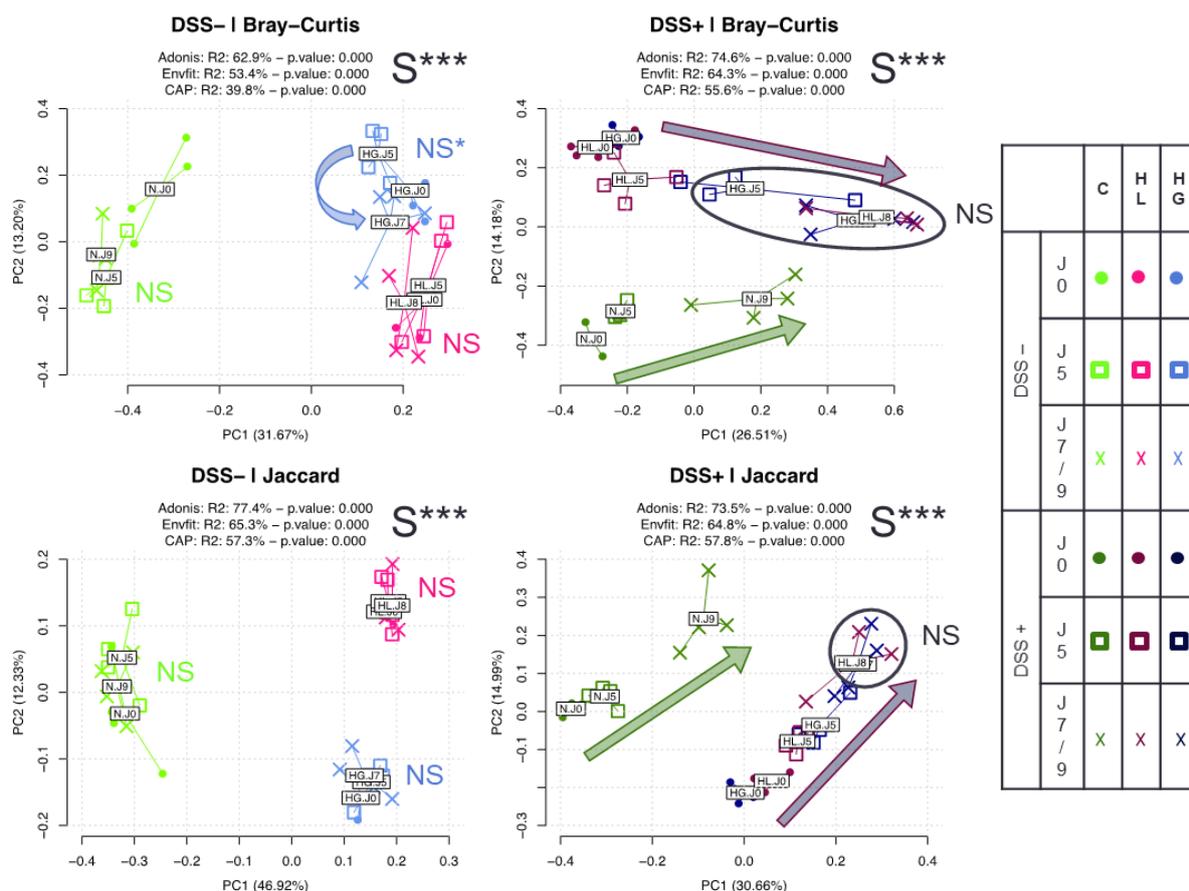


Figure 55 : Effet du temps et des régimes alimentaires sur la β -diversité du microbiote des souris. Représentation des différences de composition des microbiotes des souris ayant consommé le régime contrôle (en vert), le régime hyperlipidique (en rose) le régime hyperglucidique (en bleu).

2. Conséquences de la consommation du régime hyperglucidique

Dans un second temps, nous avons choisi de nous focaliser sur les conséquences du régime hyperglucidique chez les mâles. Ainsi, nous avons étudié l'influence de ce régime lorsqu'il était consommé à long terme (16 semaines) et comparé à une consommation plus courte (8 semaines) comme lors du protocole préliminaire.

2.1. Conséquences de la consommation d'un régime enrichi en sucre

La consommation alimentaire quotidienne pour les animaux soumis au régime contrôle était de 4,1 g/jour en moyenne, ce qui correspond aux recommandations de Safe Diets (2 à 4 g/jour). Comme lors du protocole préliminaire, **le régime hyperglucidique s'est avéré beaucoup plus appétant** d'où une augmentation de la consommation moyenne quotidienne (7,3 g/jour, *Figure 56 A*).

La consommation moyenne d'eau est classiquement de 3 à 4 mL/jour pour une souris de laboratoire. De manière globale la consommation de nos souris était légèrement plus élevée (en moyenne 5 mL/jour par souris). Cependant la consommation du régime hyperglucidique n'a pas modifié la prise hydrique de manière significative (*Figure 56 B*).

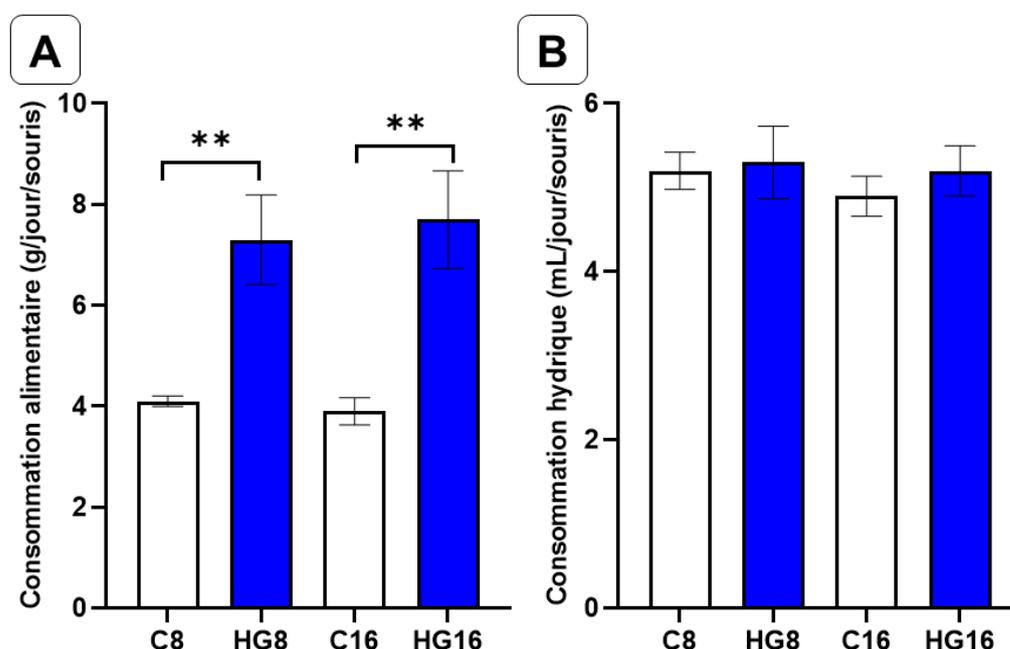


Figure 56 : Consommation alimentaire (A) et hydrique (B) des animaux au cours du protocole expérimental. Les résultats présentés correspondent à la moyenne estimée par cage ($N \geq 10$ dans chaque groupe) de régime contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommé durant 8 et 16 semaines. La significativité des différences observées entre le régime étudié et le régime contrôle a été établie par un test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).*

Au début du protocole, les souris étaient âgées de 8 semaines et pesaient 27 grammes en moyenne. Les animaux ont été pesés de façon hebdomadaire tout au long du protocole *in vivo*. Après 8 semaines de suivi, la prise de poids des animaux ayant consommé le régime contrôle a été en moyenne de 11 %. Les souris nourries avec le régime **hyperglucidique** ont eu une **prise de poids plus importante** (+20 % par rapport au poids initial, $p = 0,003$; *Figure 57*).

Après les 16 semaines de régime, le poids des animaux a augmenté de 20 % par rapport au poids initial après consommation du régime contrôle et de + 36 % après consommation du régime hyperglucidique, soit **une prise poids plus importante** avec le régime enrichi en sucre ($p = 0,0007$; *Figure 57*).

Ainsi, le régime enrichi en sucre provoque une prise de poids d'autant plus importante lorsqu'il est consommé sur le long terme.

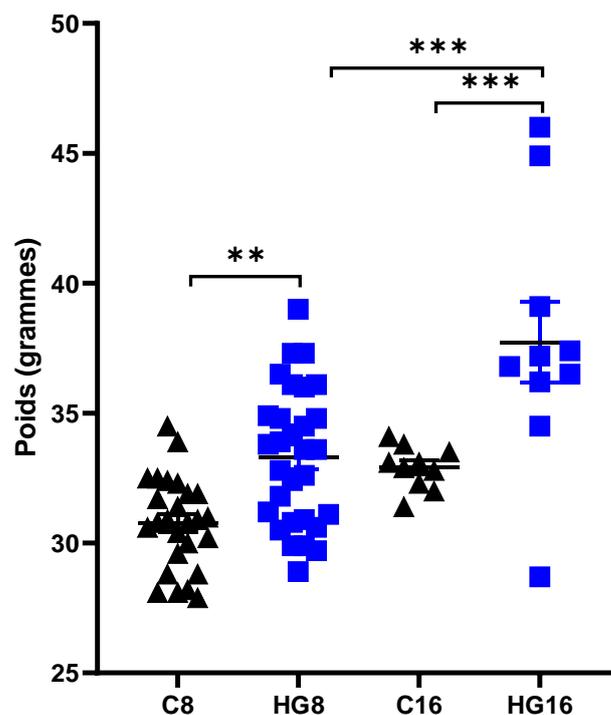


Figure 57 : Poids des souris au terme des 8 ou 16 semaines de régime alimentaire. Les résultats présentés correspondent au poids moyen +/- erreur standard ($N \geq 10$ dans chaque groupe) de régime contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommé durant 8 et 16 semaines. La significativité des différences observées a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).*

Le sang des souris a été prélevé dans la veine sous mandibulaire. Les paramètres biochimiques sanguins des souris à 10 semaines nous ont été fournis par le laboratoire Janvier-Labs pour cette souche C57BL-6J : la valeur normale du glucose sanguin est de $3,3 \pm 0,7$ g/L.

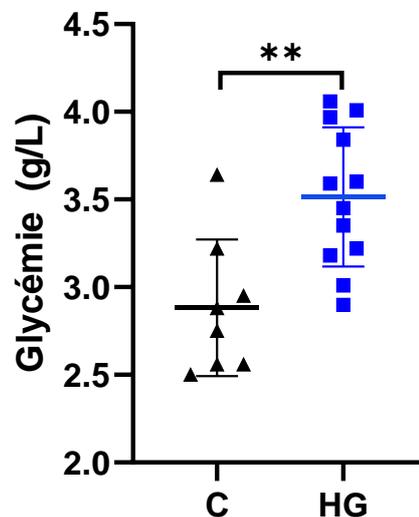


Figure 58 : Étude de la glycémie sanguine des animaux après 8 semaines de régime. Les résultats présentés correspondent à la glycémie mesurée dans le plasma des souris ($N \geq 8$ dans chaque groupe) après 8 semaines de consommation du régime contrôle (C) ou du régime hyperglucidique (HG). La significativité des différences observées entre le régime étudié et le régime normal a été par un test de Mann-Whitney ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).*

Malgré la consommation du régime hyperglucidique, nous n'avons **pas observé d'hyperglycémie** chez ces souris par rapport à la valeur de référence. Cependant leur taux de glucose sanguin était tout de même **significativement supérieur à celui des souris témoins** ($p = 0,004$; **Figure 58**). En effet, les souris soumises au régime hyperglucidique durant 8 semaines avaient une glycémie moyenne de 3,5 g/L tandis que les souris contrôles avaient une glycémie à 2,8 g/L.

2.2. Prédiposition et aggravation de la colite

• Score clinique

Quel que soit le régime alimentaire, les animaux n'ont présenté aucun signe clinique d'inflammation en l'absence de traitement colitogène. Comme attendu, le traitement avec le DSS augmente significativement le score DAI chez tous les groupes d'animaux. Conformément au protocole préliminaire, les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines et traités au DSS ont présenté des **signes d'inflammation plus précocement** (3^{ème} jour) par rapport à ceux ayant consommé le régime normal (5^{ème} jour ; *Figure 59 A*).

De même, après 16 semaines de régime, on retrouve une augmentation **plus précoce et plus rapide du DAI** (au 3^{ème} jour) chez les animaux soumis au régime hyperglucidique par rapport à ceux ayant reçu le régime contrôle. Toutefois, cet effet est moins marqué et ne diffère pas significativement de celui observé lorsque ces régimes sont consommés durant 8 semaines (*Figure 59 B*).

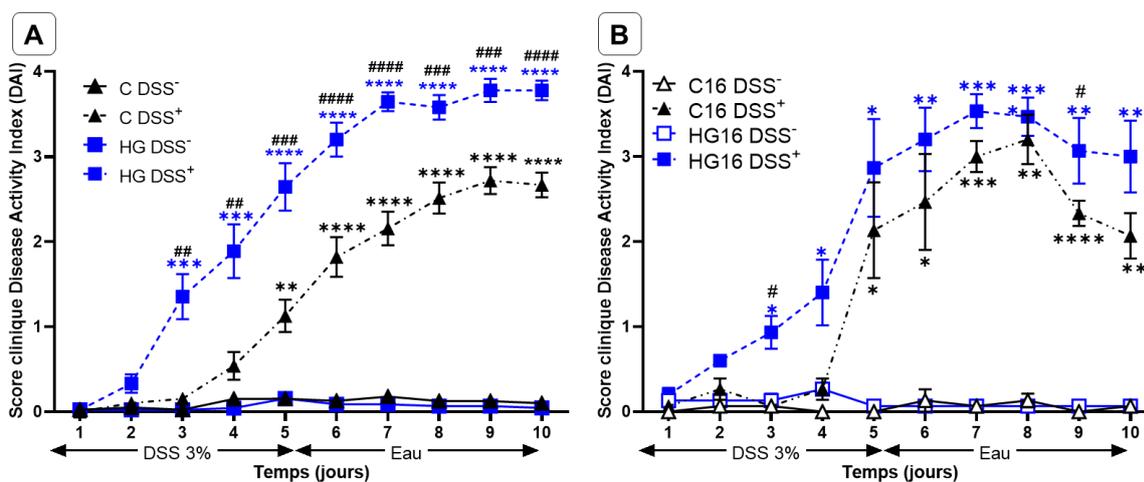


Figure 59 : Étude des signes cliniques de la colite expérimentale. La perte de poids, la consistance des selles et la présence de sang ont été suivis quotidiennement pour chaque souris en fonction des régimes contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 8 semaines (A) et 16 semaines (B) et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées a été établie par un test ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples entre les groupes DSS⁻ et DSS⁺ ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), et un test de Fisher entre le régime contrôle et le régime hyperglucidique (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).*

• **Score endoscopique**

Un examen coloscopique a été réalisé à J10 pour chaque animal avant la mise à mort afin d'évaluer la sévérité de l'inflammation et compléter le score clinique DAI.

Le traitement au DSS augmente le score endoscopique (**Figure 60 B-C**). Aussi, comme lors du protocole préliminaire, des lésions au niveau de la muqueuse intestinale des animaux ayant consommé le régime hyperglucidique et pourtant **non soumis au traitement colitogène** ont été observées (**Figure 60 A**) ce qui se traduit par une hausse significative du score endoscopique (+1,3 ; $p = 0,0089$; **Figure 60 B**) ce que nous avons qualifié d'état « pré-MICI ». En revanche cet effet s'est avéré plus discret lorsque le régime enrichi en sucre est consommé durant 16 semaines (**Figure 60 C**).

Qu'il soit consommé durant 8 ou 16 semaines, le régime enrichi en sucre provoque une aggravation de la colite, bien que la différence ne soit significative que lorsque le régime est consommé au long court (+2,5 ; $p = 0,0221$; **Figure 60 A et C**).

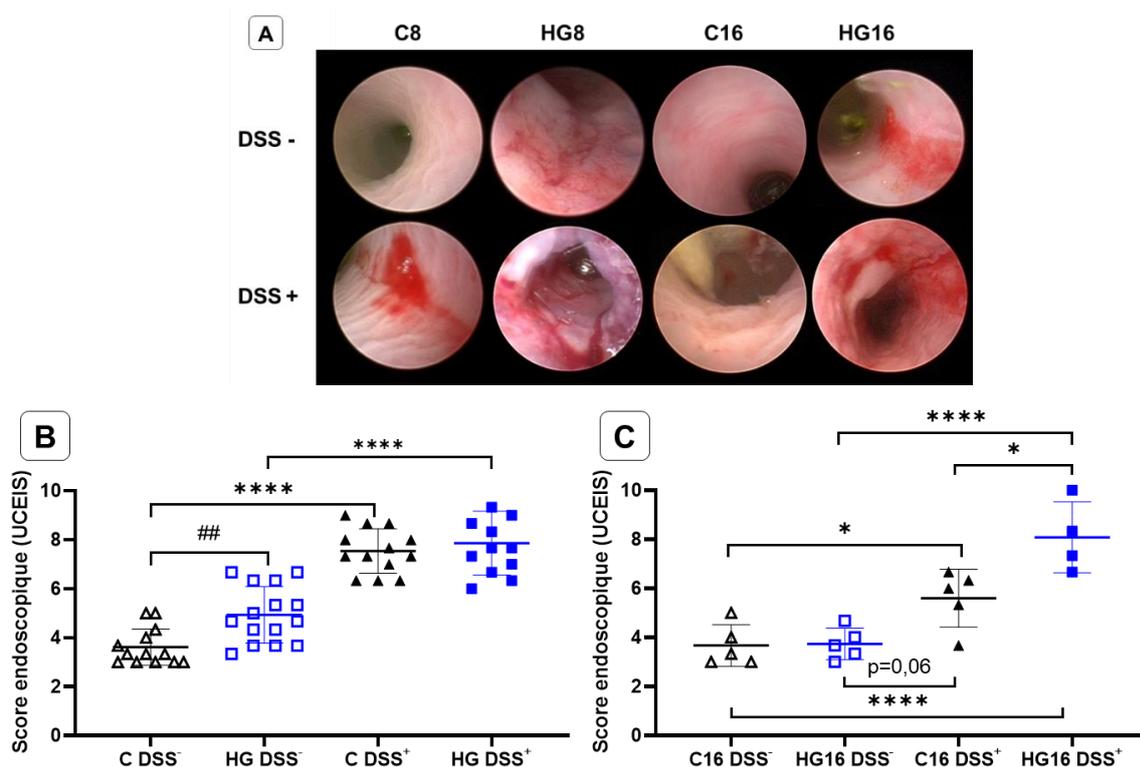


Figure 60 : Visualisation des images endoscopiques (A) et Score endoscopique (B-C). Le score établi par trois expérimentateurs en double aveugle pour chaque souris en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommé durant 8 et 16 semaines chez les souris soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA et avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Score histologique**

Après coloration HES (Hématoxyline Éosine Safran), les coupes de côlon ont été analysées par deux anatomopathologistes des CHU de Nancy et de Reims qui ont établi un score inflammatoire en aveugle.

Le score histologique apparaît légèrement plus élevé chez les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique sans être traités au DSS mais sans significativité statistique (**Figure 6I**). Les lésions sont plus discrètes et plus rares que celles observées à la coloscopie cependant la présence de signes d'inflammation chronique (**Tableau XIII**) confirme l'état prédisposant à la colite que nous avons qualifié de « pré-MICI » observé à l'endoscopie.

Tableau XIII : Sous-scores histologiques. Le score est établi selon l'échelle de Riley et al., 1991.

	C DSS ⁻ (N = 13)		HG DSS ⁻ (N = 13)		C DSS ⁺ (N = 13)		HG DSS ⁺ (N = 12)	
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM
Inflammation aiguë	0.0	0.0	0.0	0.0	1.000	0.277	1.833	0.207
Inflammation chronique	0.0	0.0	0.231	0.122	1.538	0.291	2.917	0.313
Abcès cryptique	0.0	0.0	0.0	0.0	0.154	0.104	0.000	0.000
Déplétion en mucines	0.0	0.0	0.0	0.0	1.308	0.263	1.333	0.225
Ulcération de l'épithélium	0.0	0.0	0.0	0.0	0.769	0.323	2.667	0.414
Distorsion cytoarchitecturale	0.0	0.0	0.0	0.0	1.154	0.249	2.000	0.213
TOTAL	0.0	0.0	0.231	0.122	5.923	1.118	9.833	0.976

En revanche, on observe que le score histologique est **significativement plus élevé chez les souris ayant consommé le régime hyperglucidique et traités au DSS** que chez les souris ayant consommé le régime témoin (9,8 vs 5,9 ; $p = 0,003$; **Figure 6I B**). L'anatomopathologiste a notamment observée des **dystrophies épithéliales sévères et des dysplasies** (anomalie de différenciation et multiplication cellulaire caractérisée par une modification architecturale de l'épithélium) chez la majorité des animaux ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines puis traités au DSS (**Figure 6I A**).

La **colite semble néanmoins plus discrète chez les souris contrôle** plus âgées puisque celles ayant consommé le régime de référence durant 16 semaines n'ont plus un score significativement élevé (+3,8 ; $p = 0,07$; **Figure 6I D**). De même, la différence entre les souris nourries avec le régime enrichi en sucre traitées au DSS et les souris contrôles traitées au DSS n'est plus significative lorsque ces régimes sont consommés au long court (+4,9 ; $p = 0,1$; **Figure 6I D**).

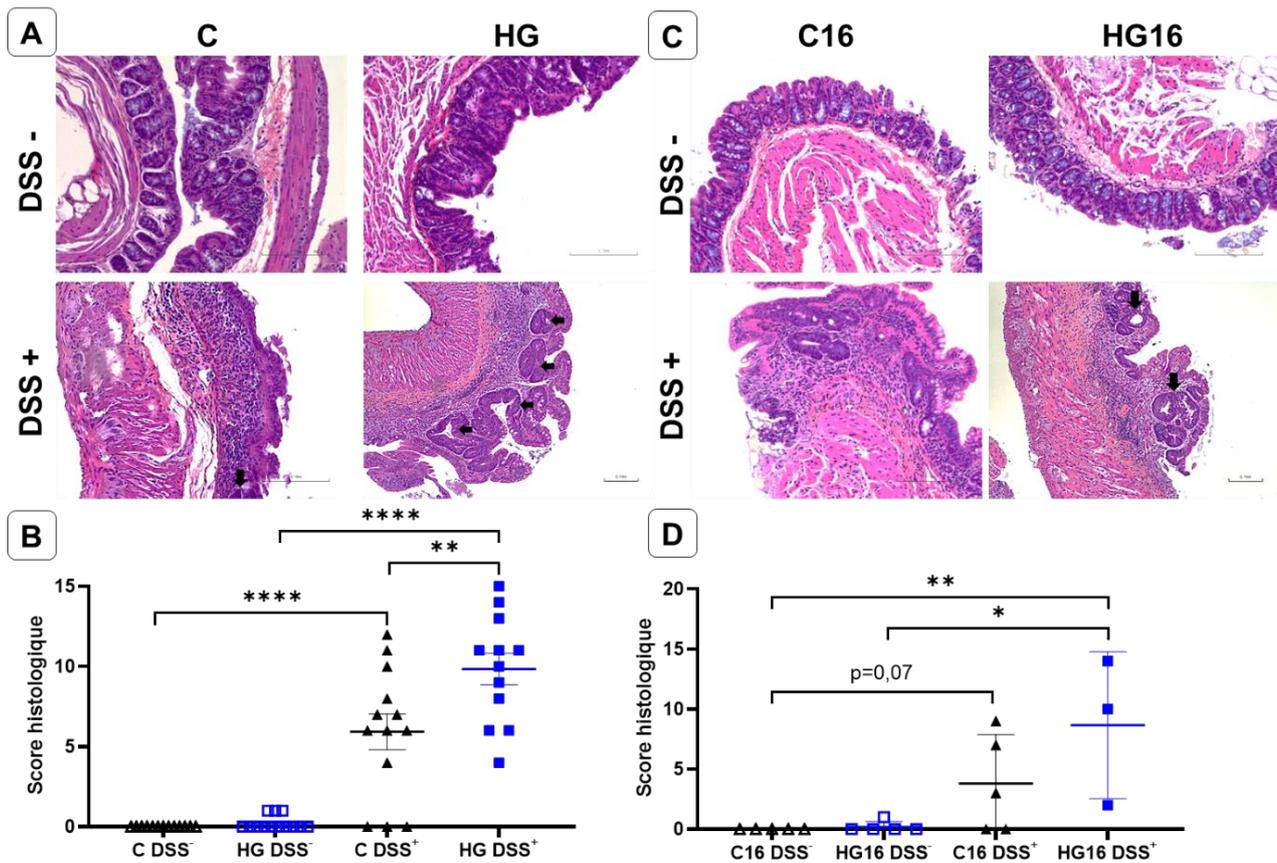


Figure 61 : Visualisation des coupes histologiques de côlon (A-C) et scores histologiques dans la muqueuse colique des souris (B-D). Les échantillons de côlons ont été inclus en paraffine puis les coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. Les flèches montrent les dystrophies épithéliales. Le score histologique selon l'échelle de Riley et al., par un anatomopathologiste pour chaque animal en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 8 et 16 semaines chez les souris soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent au score total moyen \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 3$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples ou un test de Kruskal-Wallis avec correction de Dunn selon que les données étaient paramétriques ou non (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Lipocaline fécale**

Afin d'objectiver les résultats observés à l'endoscopie nous avons souhaité évaluer la sévérité des lésions par un dosage de la lipocaline dans les selles des souris au 6^{ème} jour de traitement colitogène.

Comme attendu, la quantité de **lipocaline fécale est augmentée chez les souris traitées avec le DSS** quel que soit le régime alimentaire (**Figure 62**). En revanche, contrairement à ce que pouvait laisser penser les scores clinique, endoscopique et histologique les taux de lipocaline ne reflètent pas l'aggravation de la colite puisque la différence entre les deux groupes de souris traitées au DSS n'est pas significative (14,3 vs 16,3 pg/mg ; $p = 0,65$). De même, aucune différence significative n'a été observée en l'absence de DSS contrairement aux observations faites à l'endoscopie (5,7 vs 7,0 pg/mg ; $p = 0,70$).

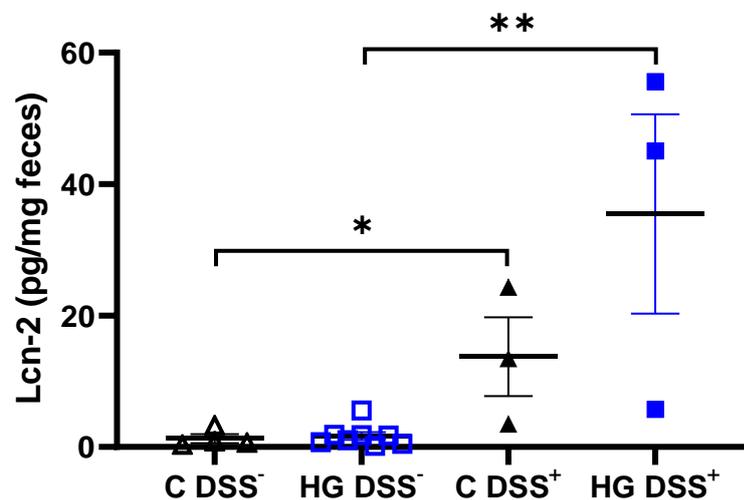


Figure 62 : Dosage de la lipocaline-2 sur selles de souris. Les selles des souris nourries 8 semaines avec les régimes contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) ont été prélevées au 6^{ème} jour du traitement colitogène chez les souris traitées (DSS⁺) ou non (DSS⁻) puis un dosage ELISA de la protéine Lcn-2 a été réalisé. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 3$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par un test de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

• **Longueur des côlons**

La sévérité de la colite peut également être appréciée par la mesure de la longueur du côlon. Au cours des prélèvements, tous les côlons ont été mesurés pour comparer leur longueur moyenne dans chacun des groupes d'animaux (**Figure 63 A-C**).

En l'absence de DSS, le côlon des animaux ayant consommé le régime hyperglucidique pendant 8 semaines est **raccourci** par rapport aux souris ayant consommé le régime contrôle (-10,97 mm ; $p = 0,012$) et ce **raccourcissement persiste après traitement colitogène** (- 9,17 mm ; $p = 0,06$; **Figure 63 A-B**).

De la même façon, après 16 semaines de régime, un raccourcissement similaire a été observé chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre comparativement au régime témoin, avec ou sans traitement colitogène (respectivement - 9,60 mm et - 10,35 mm ; $p < 0,003$; **Figure 63 C-D**).

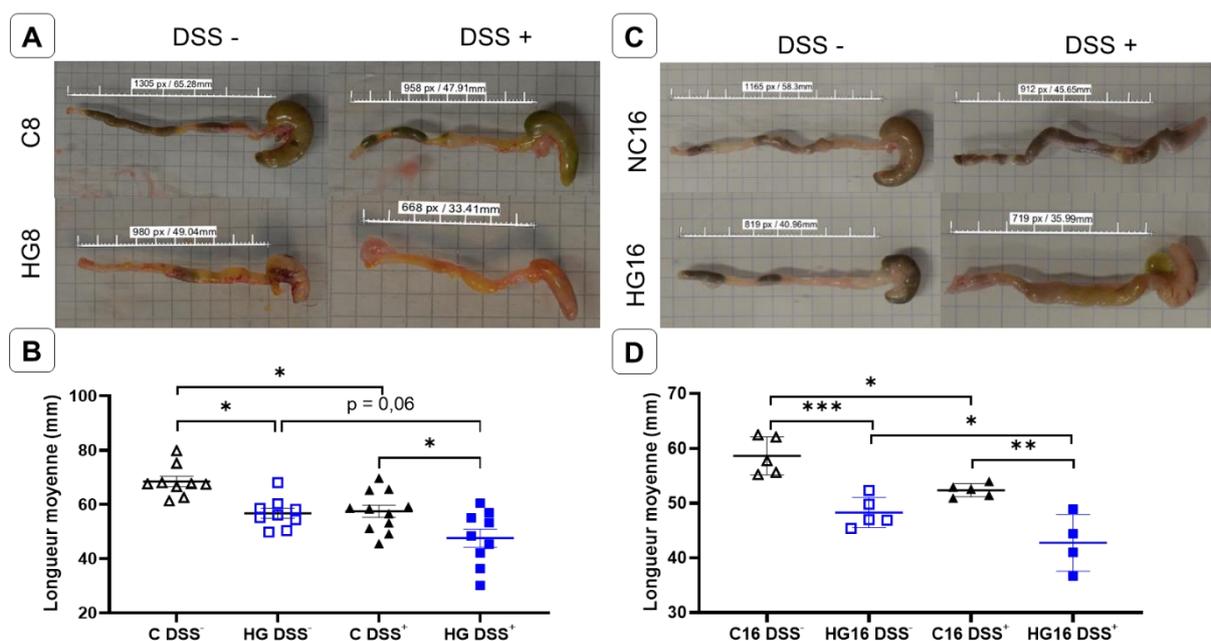


Figure 63 : Visualisation de l'aspect et de la taille des côlons (A-C). Longueur moyenne des côlons en fonction des régimes alimentaires (B-D). Mesure à l'aveugle pour chaque souris en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommé durant 8 et 16 semaines chez les souris soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Perméabilité intestinale**

La perméabilité intestinale a été évaluée par un test au FITC-Dextran au 5^{ème} jour du traitement colitogène afin de pouvoir prélever suffisamment de sang tout en évitant d'être trop invasif pour l'animal.

Seules les souris ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines avaient une **hyperperméabilité intestinale** comparativement aux souris ayant consommé le régime contrôle et traitées au DSS (0,7 vs 1,7 µg/mL ; $p = 0,016$; **Figure 64**). De façon surprenante, les souris nourries avec le régime hyperglucidique non traitées au DSS ne montrent pas d'hyperperméabilité (0,4 vs 0,6 µg/mL ; $p = 0,5$) contrairement à ce que pouvait laisser penser les expériences précédentes (**Figure 64**).

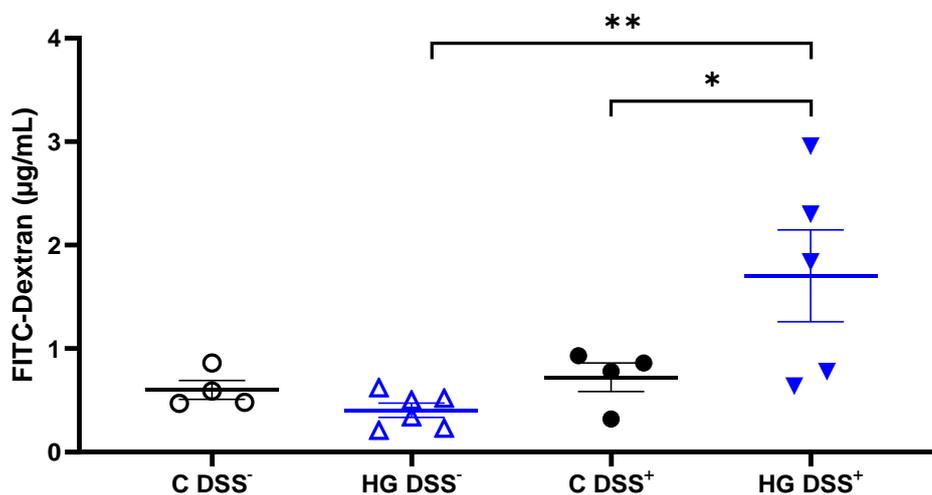


Figure 64 : Étude de la perméabilité intestinale in-vivo. La quantité de marqueur fluorescent a été dosée dans le plasma après gavage per os d'une solution de FITC-Dextran chez les souris soumises aux régimes alimentaires contrôle (C) et hyperglucidique (HG) durant 8 semaines, traitées ou non au DSS. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA et avec un test de Fisher (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.3. Transcriptome colique

Afin d’explorer les événements moléculaires modulés par la consommation du régime hyperglucidique durant la colite expérimentale nous avons étudié le transcriptome colique des souris. Dans un premier temps, en comparant les gènes dont l’expression est dérégulée par la colite dans chaque groupe de régime alimentaire (contrôle et HG) consommés durant 8 semaines. Nous avons pu observer que peu de gènes sont communs entre ces deux groupes, suggérant que la colite impacte ainsi les animaux de façon différente selon le régime alimentaire consommé (*Figure 65*).

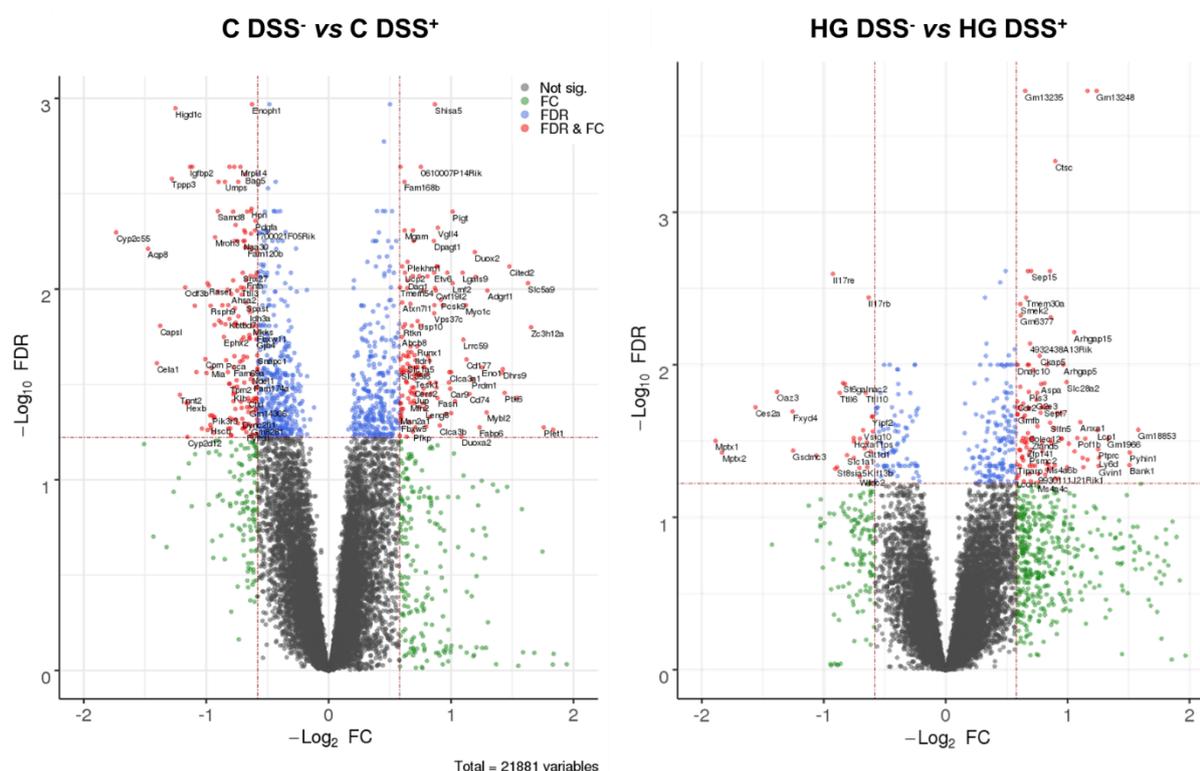


Figure 65 : Volcano plot représentant les gènes dérégulés au cours de la colite expérimentale. Les différences entre les souris soumises au régime hyperglucidique (HG, N = 10) ou contrôle (C, N = 9) traitées ou non au DSS ont d’abord été étudié séparément 177 gènes ont été identifiés chez les souris témoins et 106 chez les souris nourries avec le régime enrichis en sucre (seuil de FC ± 1,5 fois et FDR < 0,05).

Dans un second temps, nous avons comparé les groupes de régime au cours de la colite (HG DSS⁺ vs C DSS⁺) et avons pu observer que, de façon générale, beaucoup de gènes sont sous-exprimés chez les souris ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines par rapport au régime contrôle. Au total, nous avons sélectionné **44 gènes** (8 sur-exprimés et 36 sous-exprimés) qui étaient **différentiellement exprimés** de façon significative entre les souris nourries avec le régime enrichi en sucre et les souris contrôle (*Figure 66*).

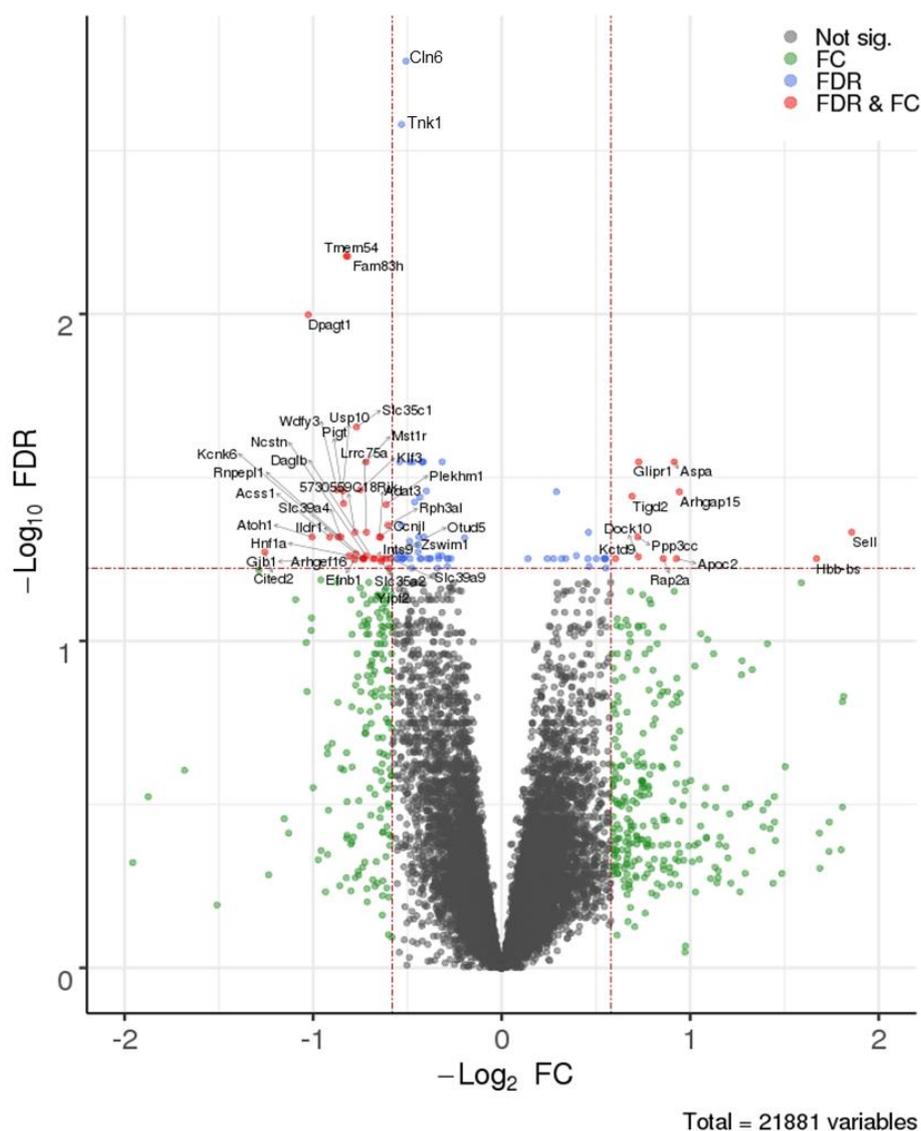


Figure 66 : Volcano plot représentant les gènes dérégulés chez les souris soumises au traitement colitogène après 8 semaines de régime hyperglucidique vs régime contrôle. Les différences entre les souris soumises au régime HG (N = 5) ou contrôle (N = 4) ont permis de mettre en évidence un total de 44 gènes les plus significativement dérégulés. Seuil de FC (Fold Change) $\pm 1,5$ fois et FDR : False Discovery Rate $< 0,05$.

Parmi ces gènes, les annotations fonctionnelles et calculs d'enrichissements en catégories GO (*Gene ontology*) et voies de la base de données Reactome ont permis de démontrer que le régime hyperglucidique perturbait les voies de **l'autophagie**, les **jonctions cellulaires** et la **communication intra-cellulaire** (*Figure 67*).

Puis, nous avons réalisé des annotations fonctionnelles avec la plateforme OpenTargets et nous avons pu observer que ces gènes étaient **associés aux MICI** (24 cibles), à la **RCH** (19 cibles) ou à la **MC** (16 cibles ; **Tableau XIV**). D'autres associations évoquaient des troubles du métabolisme glucidique, des maladies mitochondriales ou encore certaines maladies infectieuses (infections virales, bactériennes et parasitaires).

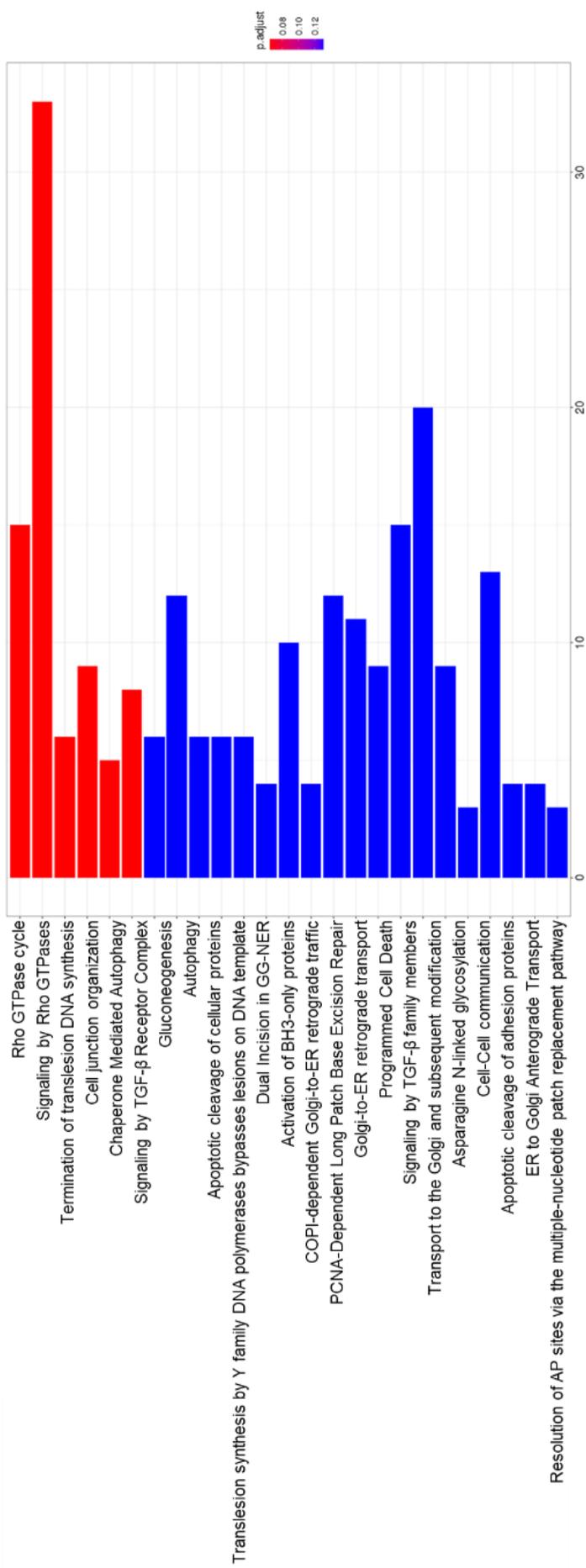


Figure 67 : Principales voies fonctionnelles impactées par le régime hyperglycémique chez les souris au cours de la colite expérimentale. Le graphique a été obtenu en calculant les enrichissements en voies Reactome des principaux gènes dérégulés ($FDR < 0,05$) chez les souris traitées au DSS et soumises au régime hyperglycémique ($N = 5$) par rapport à celles traitées au DSS et soumises au régime contrôle ($N = 4$). Puis les voies (fonctionnelles, métaboliques, de signalisation ou de régulation) et catégories GO ont été extraites à partir de la base de données Reactome chez la souris.

Tableau XIV : Annotations fonctionnelles des gènes dérégulés durant la colite expérimentale chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique vs régime contrôlé. Les associations ($p < 0,01$) avec les pathologies ont été obtenues à l'aide de la plateforme Open Targets. Ici, seules les pathologies dont le nombre de cibles est > 12 ont été retenues.

Disease full name	Relevance (p-value)	Nb of associated targets	Therapeutic Area	Highest associated targets (max 10)
immune system disease	0.0000	52	immune system disease	SLC35C1 ARHGAP15 GPR39 KLF3 KAT7 SELL MST1R ILDR1 ZFYVE26 CITED2
autoimmune disease	0.0000	38	immune system disease	SELL KLF3 ILDR1 ZFYVE26 MST1R RPH3AL ABCF1 ARHGEF16 ARHGAP15 STK24
inflammatory bowel disease	0.0000	24	immune system disease, gastrointestinal disease	SELL KLF3 MST1R STK24 ARHGAP15 ATOH1 SLC35C1 KCNK6 TECR GPR39
ulcerative colitis	0.0020	19	immune system disease, gastrointestinal disease	KLF3 MST1R SELL FKBP15 NCSTN CITED2 GPR39 KRT19 TECR LRRC75A
colitis	0.0004	17	immune system disease, gastrointestinal disease	KLF3 ATOH1 TECR MST1R SELL GPR39 KRT19 FKBP15 NCSTN CITED2
Crohn's disease	0.0100	16	immune system disease, gastrointestinal disease	KLF3 ASPA MST1R TMEM54 KRT19 SELL SLC39A4 GPR39 SPINT1 ILDR1
gastrointestinal disease	0.0000	48	gastrointestinal disease	SLC39A4 FAM83H AAAS MST1R ARHGAP15 ATOH1 KAT7 PPP3CC KLF3 PIGT
digestive system cancer	0.0000	44	gastrointestinal disease, cell proliferation disorder	KAT7 ATOH1 PIGT SCFD2 DPAGT1 TNK1 KRT19 MST1R ATG4A SLC39A4
colorectal cancer	0.0000	39	gastrointestinal disease, cell proliferation disorder	KAT7 ATOH1 SCFD2 DPAGT1 KRT19 TNK1 FAM83H SELL KLF3 RHBDD1
gastroenteritis	0.0001	20	gastrointestinal disease	ARHGAP15 KLF3 ATOH1 TECR MST1R SELL USP10 GPR39 KRT19 FKBP15
diabetes mellitus	0.0001	25	pancreas disease, nutritional or metabolic disease	CCNUL MST1R ZFYVE26 RPH3AL GPR39 PLEKHM1 KCNK6 FAM83H SELL CITED2
nutritional or metabolic disease	0.0000	42	nutritional or metabolic disease	CLN6 ASPA SLC35C1 MAN2B1 DPAGT1 PIGT SLC39A4 CCNUL MST1R SELL
glucose metabolism disease	0.0000	26	nutritional or metabolic disease	CCNUL MST1R ZFYVE26 RPH3AL ACSS1 GPR39 PLEKHM1 KCNK6 FAM83H SELL
obesity	0.0000	24	nutritional or metabolic disease	GPR39 KLF3 PLEKHM1 CLN6 FAM83H DAD1 LMTK2 ACSS1 KCNK6 ARHGAP15
carbohydrate metabolism disease	0.0000	18	nutritional or metabolic disease	MAN2B1 DPAGT1 SLC35C1 PIGT ASPA KLF3 ACSS1 CITED2 GPR39 PLEKHM1
disorder of glycosylation	0.0000	16	nutritional or metabolic disease	DPAGT1 SLC35C1 PIGT CITED2 PLEKHM1 KLF3 ASPA GPR39 FAM83H ACSS1
DNA repair deficiency	0.0000	17	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	SLC9A6 ASPA SELL ZFYVE26 CLN6 GPR39 SLC35C1 ARHGAP15 TMEM54 MST1R
Mitochondrial disease	0.0001	16	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	ASPA SLC9A6 ATOH1 PLEKHM1 KLF3 ZFYVE26 ACSS1 ILDR1 CITED2 MST1R
Lysosomal disease	0.0000	15	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	CLN6 MAN2B1 ATOH1 KLF3 CITED2 PLEKHM1 ASPA ARHGAP15 FAM83H DPAGT1
Abnormality of the nervous system inflammation	0.0000	32	phenotype	SLC9A6 ARHGAP15 STK24 PLEKHM1 ASPA ARHGEF16 LMTK2 GPR39 ADAT3 SELL
infectious disease	0.0000	24	phenotype	SELL LRRC75A MST1R SPINT1 TECR KLF3 KRT19 GPR39 KCNK6 TMBIM6
viral disease	0.0000	37	infectious disease	AAAS ABCF1 ASPA SLC9A6 SELL KRT19 FAM83H ARHGAP15 ZFYVE26 MST1R
bacterial disease	0.0030	25	infectious disease	AAAS ABCF1 ASPA SLC9A6 KRT19 FAM83H ZFYVE26 MST1R SELL TMBIM6
parasitic infection	0.0002	15	infectious disease	SELL TMBIM6 DPAGT1 KRT19 FAM168B TECR FAM83H KAT7 GPR39 ARHGEF16
		12	infectious disease	SELL DPAGT1 FAM168B STK24 KRT19 CITED2 TECR DAD1 ASPA ATOH1

Parmi les gènes surexprimés chez les souris traitées au DSS et nourries avec un régime enrichi en sucre nous avons notamment identifié le gène *Sell* qui code pour une molécule d'adhésion cellulaire retrouvée notamment à la surface des leucocytes (+3,6-x ; FDR = 0,046 ; **Figure 68**). De même pour le gène *Arhgap15* qui code pour la « Rho GTPase Activating protein » et dont la surexpression entraîne une augmentation de la contraction cellulaire par le biais des fibres d'actine. Enfin, le gène *Glpr1* impliqué dans la réponse immunitaire innée et dans la régulation du métabolisme des lipides par le récepteur PPAR- α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) est également augmenté chez les souris soumises au régime hyperglucidique durant la colite (**Figure 66** et **Figure 68 A**).

Parmi les gènes sous-exprimés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique on retrouve *Dpagt1*, qui code pour une enzyme qui catalyse la première étape de la biosynthèse des glycoprotéines (-2x; FDR = 0,01), le gène *Wdfy3* nécessaire au processus de la macroautophagie (-1,8x ; FDR = 0,03) tout comme le gène *Usp10* intervenant également dans la régulation du processus de l'autophagie (-1,8x ; FDR = 0,03 ; **Figure 66** et **Figure 68 B**).

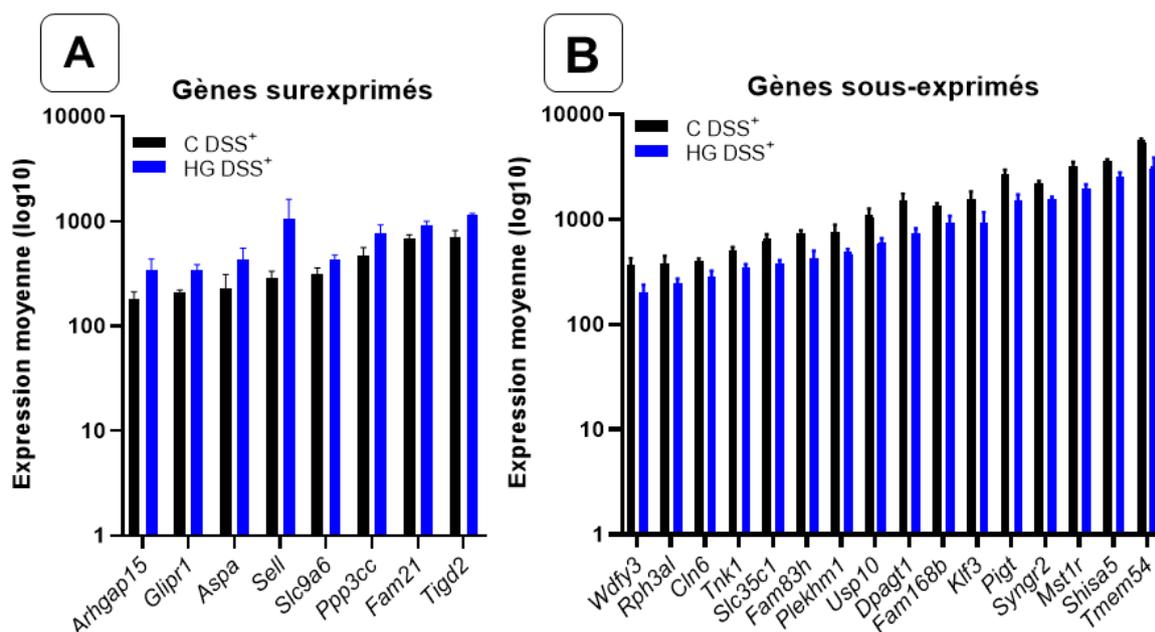


Figure 68 : Principaux gènes sur- ou sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris durant la colite. Les diagrammes en bâton montrent l'expression moyenne (\log_{10}) \pm déviation standard pour les gènes surexprimés (A) chez les souris traitées au DSS et nourries avec le régime hyperglucidique (HG, N = 5) ou avec le régime contrôle (C, N = 4). Toutes les expressions différentielles sont significatives FDR < 0,05.

Nous avons procédé aux mêmes analyses chez les souris en l'absence de traitement colitogène afin de mieux comprendre l'effet propre du régime hyperglucidique en dehors du contexte de la colite expérimentale.

Il est important de noter que dans un **contexte non pathologique**, le régime hyperglucidique provoque **sous-expression des gènes coliques**, plus profonde que celle observée précédemment chez les souris traitées au DSS. Ainsi, les analyses statistiques nous ont permis d'identifier **154 gènes différentiellement exprimés** parmi lesquels **132 étaient sous-exprimés** chez les souris soumises au régime enrichi en sucre comparativement aux souris contrôle (FDR < 0,05 ; FC \pm 1,5-fois ; *Figure 69*).

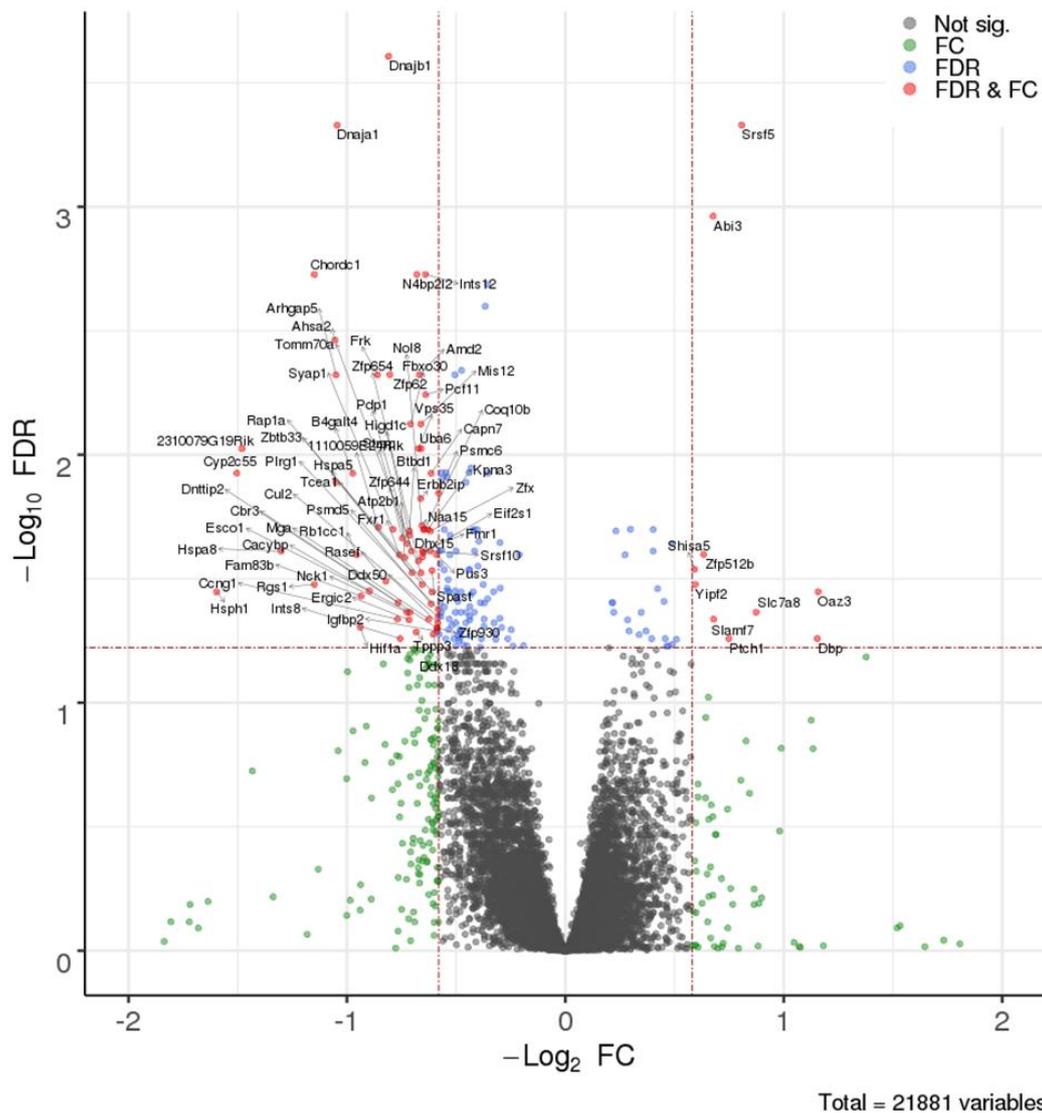


Figure 69 : Volcano plot représentant les gènes dérégulés chez les souris ayant consommé 8 semaines de régime hyperglucidique vs régime contrôle. Les différences entre les souris soumises au régime hyperglucidique (HG, N = 5) ou contrôle (C, N = 5) ont permis de mettre en évidence un total de 154 gènes les plus significativement dérégulés. Seuils de FC (Fold Change) \pm 1,5 fois et FDR : False Discovery Rate < 0,05.

Ces gènes sont principalement impliqués dans les **voies relatives au stress** dont le stress du réticulum endoplasmique (*unfolded protein stress*) et dans une moindre mesure dans la présentation antigénique et la régulation de la transcription (*Figure 70*).

Parmi les gènes surexprimés chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre, on observe les gènes *Shisa 5* qui code pour une protéine du réticulum endoplasmique impliquée dans l'apoptose (+1,5x ; FDR = 0,029) et *Slamf7*, qui code pour une glycoprotéine des cellules immunitaires (telles que les lymphocytes NK) (+1,6x ; FDR = 0,046 ; **Figure 71 A**).

À l'inverse, parmi les gènes sous-exprimés chez les souris ayant consommé le régime enrichi en sucre (**Figure 71 B**), on retrouve le gène *Rgs1* qui code pour une protéine inhibant le chimiotactisme des cellules immunitaires telles que les lymphocytes B et les macrophages (-2,22x ; FDR = 0,033).

De nombreux gènes relatifs au stress sont sous-exprimés chez ces souris, notamment plusieurs gènes codant pour des « *Heat Shock Protein* » HSP, impliqués notamment dans le processus de l'autophagie et le stress du réticulum endoplasmique comme *Hsp70* (-3x ; FDR = 0,036), *Hspa8* (-2,5x ; FDR = 0,024), *Hspa5* (-2,1x ; FDR = 0,013) ou encore *Rblcc* qui est indirectement impliqué dans l'autophagie de par ses interactions avec Atg16L1 (-1,9x ; FDR = 0,025 ; **Figure 71 B**).

De plus, les protéines chaperonnes associés à ces HSP ont également leur gènes sous-exprimés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique. C'est le cas de *Dnajb1* et *Dnaja1* (respectivement -1,8x et -2,1x ; FDR < 0,0005) qui codent pour des chaperonnes impliquées dans la régulation des HSP tout comme *Chordc1* et *Ahsa2* (-2,2x ; FDR = 0,003) qui codent pour des protéines co-chaperones de HSP90 (**Figure 71 B**).

Finalement, les annotations fonctionnelles avec OpenTargets ont confirmé une association entre les gènes différentiellement exprimés et les maladies nutritionnelles et métaboliques telles que le diabète (62 cibles), les anomalies du système immunitaire (75 cibles) et les maladies infectieuses (104 cibles). De façon intéressante, nous avons également mis en évidence une association avec la colite (37 cibles) et les MICI (47 cibles) malgré l'absence de traitement DSS, ce qui est cohérent avec l'état « pré-MICI » observé précédemment notamment à l'endoscopie (**Tableau XV**).

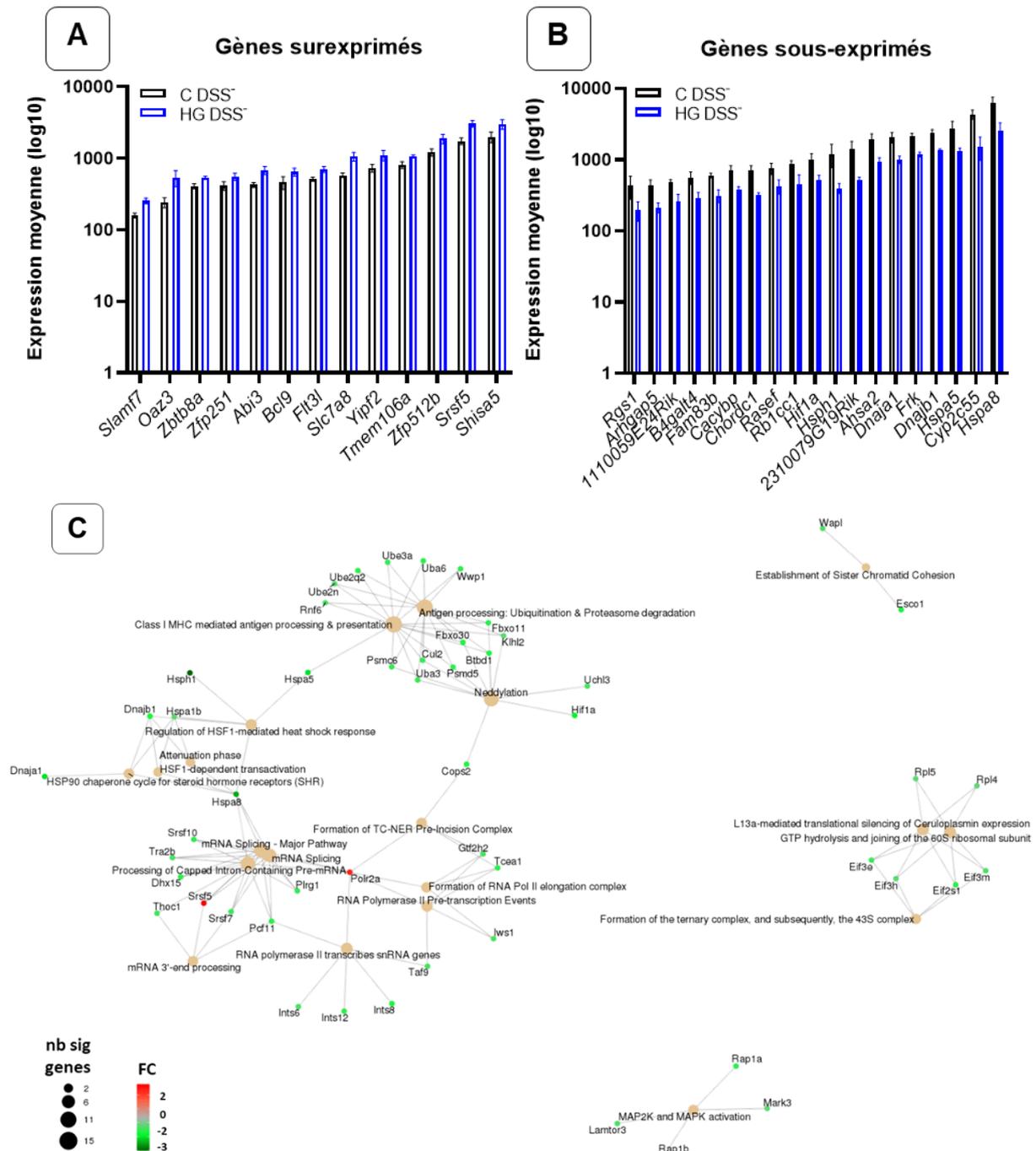


Figure 71 : Principaux gènes sur/sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris. Les diagrammes (A-B) montrent l'expression moyenne (log10) ± déviation standard pour les gènes surexprimés chez les souris non traitées au DSS et nourries avec le régime hyperglucidique (HG, N = 5) ou avec le régime contrôle (C, N = 5). Les annotations fonctionnelles des 20 principales voies sont représentées en (C) avec les gènes différemment exprimés ainsi que leurs interactions. Nb sig genes : Nombre de gènes significatifs dans chaque voie, FC : Fold Change. Toutes les différences sont significatives avec $FDR \leq 0,05$.

Tableau XV : Annotations fonctionnelles des gènes dérégulés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique vs régime contrôlé. Les associations avec les pathologies ($p < 0,01$) ont été obtenues à l'aide de la plateforme Open Targets. Filtre : nombre de cibles par association > 18.

Disease full name	Relevance (p-value)	Nb of associated targets	Therapeutic Area	Highest associated targets (max 10)
large intestine disease	0.0000	93	gastrointestinal disease	MSH6 BCL9 EIF3E HIF1A FRK EML4 EIF3H ARHGAP5 TCEA1 DNAJB1
gastroenteritis	0.0001	43	gastrointestinal disease	CUL2 MSH6 CAPN10 ZNF300 HIF1A EIF2S1 FLT3LG IGFBP2 DNAJB1 SLAMF7
diarrheal disease	0.0002	18	gastrointestinal disease	FERMT1 DBNDD2 ESCO1 USP15 PKN2 DNAJC3 CACYPB HPN CLOCK HSPA5
immune system disease	0.0000	134	immune system disease	MSH6 ARHGAP5 LRRFIP1 SLAMF7 RAP1A HIF1A MARK3 HSPA8 RGS1 BCL9
autoimmune disease	0.0000	80	immune system disease	RGS1 CUL2 HSPA8 NAB1 FERMT1 PPP4R3B SMYD3 CAPN10 MSH6 ZNF300
inflammatory bowel disease	0.0002	47	immune system disease, gastrointestinal disease	CUL2 FERMT1 CAPN10 MSH6 ZNF300 RAP1A POLB DNAJC3 HIF1A USP15
colitis	0.0005	37	immune system disease, gastrointestinal disease	CUL2 MSH6 CAPN10 ZNF300 HIF1A FLT3LG EIF2S1 DNAJB1 IGFBP2 SLAMF7
immune deficiency disease	0.0001	45	immune system disease, genetic, familial or congenital disease	MSH6 POLB FLT3LG FMR1 USP15 CLOCK CACYPB ESCO1 HSPA5 RAP1A
fibrosis	0.0002	37	cell proliferation disorder	NAB1 HIF1A HSPA5 IGFBP2 FRK KPNAB3 EIF2S1 FLT3LG MSH6 AMD1
precancerous condition	0.0000	31	cell proliferation disorder	MSH6 ATP2B1 INTS12 HIF1A IGFBP2 BCL9 PRKX POLB USP15 HSPA5
inherited digestive cancer-predisposing syndrome	0.0000	21	genetic, familial or congenital disease, cell proliferation disorder	MSH6 ATP2B1 INTS12 POLB HIF1A USP15 CAB39 TAOK1 ETF1 HSPA5
endocrine system disease	0.0000	128	endocrine system disease	FMR1 AAAS MSH6 MARK3 HIF1A RAP1A EML4 BCL9 DNAJB1 EIF3E
diabetes mellitus	0.0000	62	pancreas disease, nutritional or metabolic disease	CAPN10 HPN BCL9 SPATA5 ZNF251 HSPA8 DNAJC3 CLOCK PPP4R3B FMR1
type I diabetes mellitus	0.0000	36	pancreas disease, nutritional or metabolic disease, immune system disease, endocrine system disease	PPP4R3B CLOCK DNAJC3 HIF1A HSPH1 IGFBP2 HSPA1B HSPA5 NPB AMD1
metabolic disease	0.0000	117	nutritional or metabolic disease	FMR1 UMPS MRPS22 PDP1 ALG2 PIGY CAPN10 FASTKD2 HPN BCL9
glucose metabolism disease	0.0000	61	nutritional or metabolic disease	CAPN10 HPN BCL9 SPATA5 ZNF251 HSPA8 DNAJC3 CLOCK EIF2S1 PPP4R3B
Disorder of energy metabolism	0.0000	41	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	MRPS22 PDP1 FASTKD2 HSPA5 ATP2B1 CLOCK UBE3A MARK3 EIF2S1 DNAJC3
Disorder of lipid metabolism	0.0001	39	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	PIGY INABP2L2 HSPA5 POLB CLOCK TRA2B ERBIN UBE3A FERMT1 RNF139
Mitochondrial disease	0.0000	37	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	MRPS22 PDP1 FASTKD2 ATP2B1 HSPA5 UBE3A CLOCK RB1CC1 POLB MARK3
carbohydrate metabolism disease	0.0002	34	nutritional or metabolic disease	PDP1 ALG2 PIGY EIF2S1 DNAJC3 HSPA5 MARK3 ATP2B1 HIF1A CLOCK
DNA repair deficiency	0.0002	33	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	POLB ATP2B1 FLT3LG USP15 PKN2 DBNDD2 ESCO1 HSPA5 CHORDC1 RGS1
Mitochondrial oxidative phosphorylation disorder	0.0001	31	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	MRPS22 FASTKD2 HSPA5 ATP2B1 CLOCK UBE3A POLB RB1CC1 CHORDC1 MARK3
disorder of glycosylation	0.0010	26	nutritional or metabolic disease	ALG2 PIGY ESCO1 DBNDD2 HSPA5 HPN UBE3A USP15 PKN2 CAPN10
acquired metabolic disease	0.0010	24	nutritional or metabolic disease	FXR1 SLAMF7 CRY1 HIF1A HSPA5 ETF1 EIF2S1 POLB IGFBP2 HSPA8
Mitochondrial disorder due to a defect in mitochondrial protein synthesis	0.0010	18	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	MRPS22 ATP2B1 MARK3 ERBIN CHORDC1 RB1CC1 HIF1A GPBP1 CLOCK UBE3A
Disorder of protein N-glycosylation	0.0010	18	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	ALG2 ESCO1 DBNDD2 USP15 PKN2 CACYPB HIF1A RNF139 ERBIN HPN
Abnormality of the immune system inflammation	0.0000	75	phenotype	AAAS CD200R1L PKN2 HIF1A HSPA5 EIF3E FLT3LG IGFBP2 DNAJC3 RGS1
Abnormality of metabolism/homeostasis	0.0000	56	phenotype	HIF1A HSPA5 EIF3E FLT3LG DNAJC3 RGS1 CLOCK DNTTIP2 AMD1 EIF2S1
Abnormality of the digestive system	0.0000	54	phenotype	NABP2L2 CLOCK MGA FAM210A EIF2S1 MARK3 DNAJC3 CYP2C9 HIF1A HSPA5
Abnormality of the gastrointestinal tract	0.0000	47	phenotype	PKN2 HSPA5 ESCO1 USP15 DBNDD2 HPN CACYPB CLOCK CYP2C9 EIF3M
infectious disease	0.0010	21	phenotype	PKN2 UBA3 CYP2C9 ZNF512B HIF1A AMD1 FERMT1 HSPA5 IGFBP2 HPN
viral disease	0.0000	104	infectious disease	TCEA1 ELOA PSMC6 TAF9 AAAS PSMC5 HIF1A ATP2B1 DNAJC3 TRA2B
injury	0.0000	74	infectious disease	TCEA1 ELOA AAAS TAF9 PSMC6 HIF1A DNAJC3 ATP2B1 HSPA5
bacterial disease	0.0000	67	injury, poisoning or other complication	LURAP1L FAM210A HIF1A DNAJC3 CAPN10 FLT3LG IGFBP2 HSPA5 CYP2C9
complication	0.0000	43	infectious disease	HIF1A UMPS FLT3LG HSPA5 HSPA1B PDP1 CYP2C9 RB1CC1 EIF3M EFHB
digestive system infectious disease	0.0000	34	injury, poisoning or other complication	CYP2C9 FAM210A HPN CAPN10 HIF1A AMD1 HSPA1B IGFBP2 HSPA5 PDP1
	0.0001	32	infectious disease, gastrointestinal disease	HSPA5 HIF1A AMD1 EIF2S1 FLT3LG ETF1 PKN2 NPB UBE3A SMYD3

2.4. Altération de la réponse immunitaire

- **Cytokines circulantes**

En raison des expériences de Western-blot précédentes nous avons choisi d'étudier la quantité de cytokines circulantes et tissulaire par une technique plus sensible faisant appel à la technologie Bio-plex. Ces analyses ont été réalisés chez les animaux ayant consommé les régimes durant 8 semaines seulement.

Dans le plasma, les niveaux des principales **cytokines pro-inflammatoires sont augmentés chez les souris contrôle au cours de la colite (C DSS⁺)** comparativement aux souris témoins non traités au DSS (C DSS⁻). C'est le cas de l'IL-1 β (30,4 vs 5,0 pg/mL ; p = 0,0035), de l'IL-6 (79,2 vs 1,9 pg/mL ; p = 0,0005) et du TNF- α (139,9 vs 30,2 pg/mL ; p = 0,035) ce qui confirme la mise en place d'une inflammation durant la colite expérimentale chez les souris témoins (*Figure 72 B, G et N*).

En revanche et de façon surprenante, chez les souris nourries avec le **régime hyperglucidique**, la colite expérimentale n'augmente pas significativement le niveau de ces cytokines à l'exception de l'**IL-6** (HG DSS⁻ 2,4 vs HG DSS⁺ 77,96 pg/mL ; p = 0,002 ; *Figure 72 G*).

Cependant il est intéressant de noter que **dans un contexte de colite**, nous avons observé que la plupart des cytokines pro-inflammatoire ont le même **profil diminué** chez les souris **nourries avec le régime enrichi en sucre** (HG DSS⁺) comparativement aux souris contrôles (C DSS⁺). La différence n'est significative statistiquement que pour l'IL-1 β , l'IL-9, l'IL-13 et l'IL-17 (*Figure 72 B, H, J, M*) mais une différence numérique est tout de même observable pour le TNF- α , l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-12 (*Figure 72 N, E, F, H, I, K et L*).

Enfin, **en dehors du contexte de colite**, on observe une **diminution des cytokines** chez les souris ayant consommé le régime hyperglucidique (HG DSS⁻) et en particulier l'IL-9 qui est significativement plus basse comparativement aux souris contrôles (C DSS⁻ ; 10,75 vs 4,10 pg/mL ; p = 0,049 ; *Figure 72 H*).

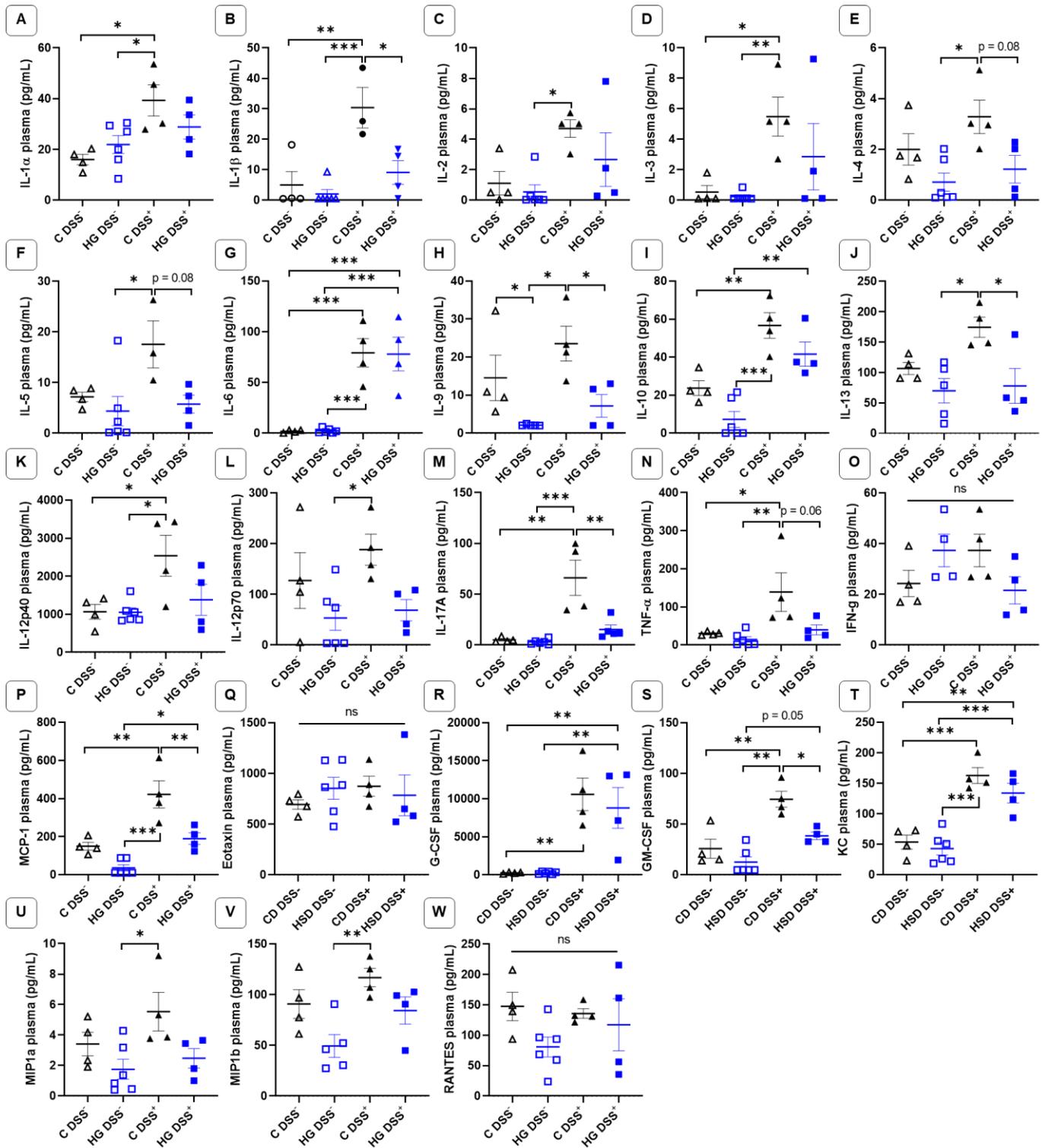


Figure 72 : Dosages des cytokines circulantes dans le plasma des souris. Les résultats présentés correspondent au taux moyen +/- erreur standard pour chaque groupe de souris ($N \geq 4$) en fonction du régime alimentaire hyperglucidique (HG) ou contrôle (C) chez les souris soumises (DSS^+) ou non (DSS^-) au traitement colitogène. La significativité des différences observées a été établie par ANOVA avec correction de Tukey ou un test de Kruskal-Wallis avec correction de Dunn selon que les données étaient paramétriques ou non (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les mêmes analyses ont été réalisées sur des extraits protéiques de côlon afin d'évaluer l'inflammation localement. De façon générale, le niveau de la plupart des cytokines n'est pas significativement différent dans la muqueuse colique des souris après traitement colitogène (**Figure 73**). Certaines cytokines comme l'IL-1 α , l'IL-17 et le TNF- α (**Figure 73 A, M et N**) suggèrent néanmoins une inflammation chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique au cours de la colite (HG DSS⁺) comparativement à celles non traitées au DSS (HG DSS⁻).

En revanche, les **chimiokines** telles que les éotaxines (CCL11, 24 et 26) et KC (CXCL1) montrent une **augmentation significative au cours de la colite** chez les souris soumises au régime contrôle (C DSS⁺) comparativement aux souris non traitées au DSS (C DSS⁻) confirmant l'effet de la colite chez les souris témoins (**Figure 73 Q et T**).

De même, chez les souris soumises au **régime hyperglucidique** (HG DSS⁺) on observe une **augmentation de KC**, RANTES (CCL5) ainsi que MIP1 α et MIP1 β (CCL3) comparativement aux souris non traitées au DSS (HG DSS⁻) (**Figure 73 T-W**). Il est intéressant de noter que dans le plasma de ces souris, la seule chimiokine significativement augmentée était KC.

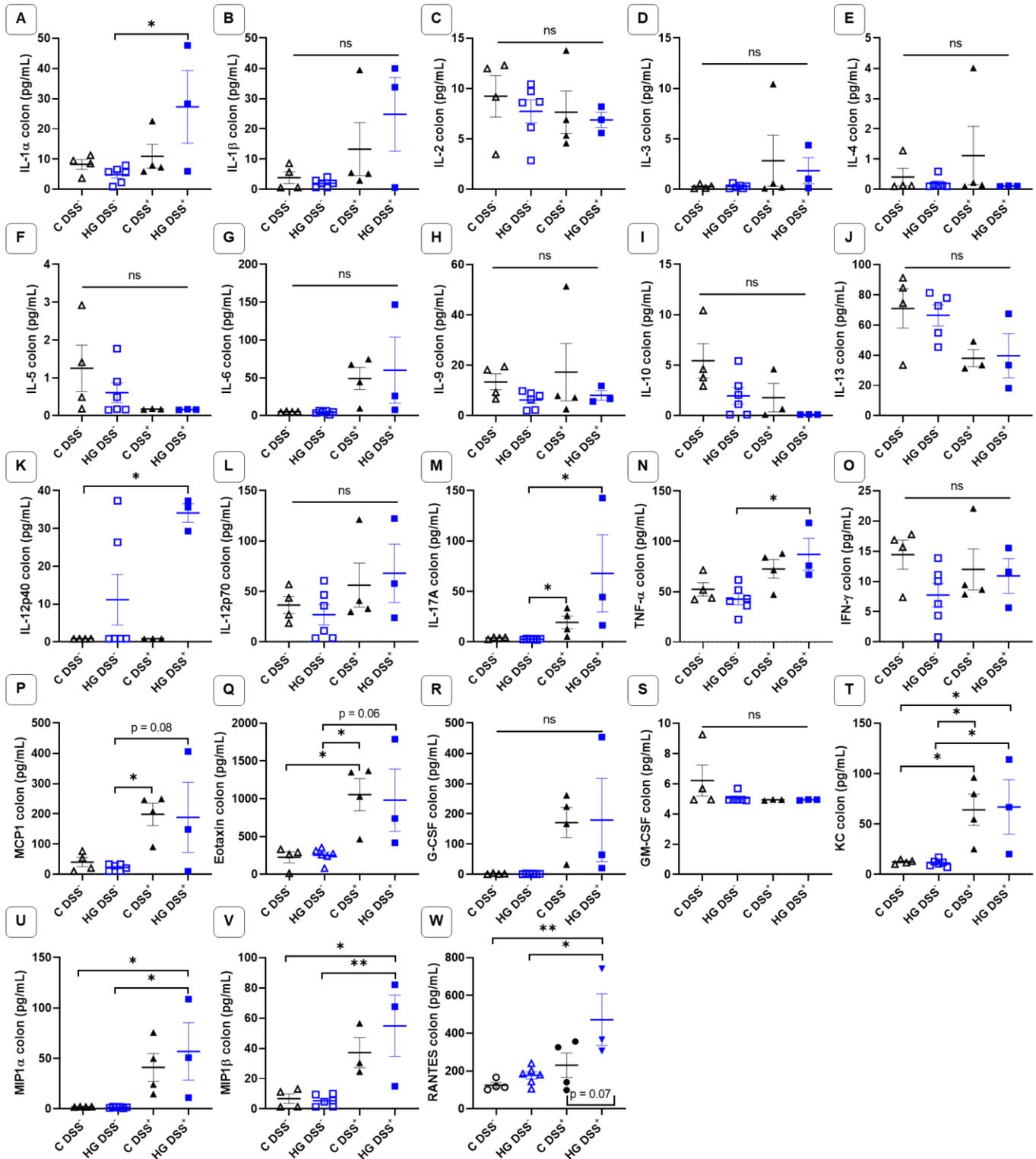


Figure 73 : Dosages des cytokines dans la muqueuse colique des souris. Les résultats présentés correspondent au taux moyen +/- erreur standard pour chaque groupe de souris ($N \geq 4$) en fonction du régime alimentaire hyperglucidique (HG) ou contrôle (C) chez les souris soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. La significativité des différences observées a été établie par ANOVA avec correction de Tukey ou un test de Kruskal-Wallis avec correction de Dunn selon que les données étaient paramétriques ou non (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Poids de la rate**

La rate est un organe appartenant au système immunitaire en produisant certaines cellules de l'immunité (globules blancs). En cas d'inflammation, on observe une **splénomégalie** (augmentation du volume de la rate) notamment en cas d'infection. Ainsi, dans le modèle de colite au DSS, certaines publications mettent en évidence une augmentation du volume de la rate (Chassaing *et al.*, 2014).

Ainsi, nous avons observé une **augmentation du poids de la rate au cours de la colite** dans chacun des groupes et de façon significative **uniquement chez les souris ayant consommé le régime hyperglucidique** durant 8 semaines (*Figure 74 B*).

Sans traitement colitogène, nous avons observé une augmentation significative de la rate chez les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique durant 16 semaines (*Figure 74 C*). En effet, en l'absence de traitement colitogène, les rates représentaient 0,5 % du poids des animaux (contre 0,3 % chez les témoins ayant reçu le régime normal) ce qui signifie qu'une légère splénomégalie est présente chez ces souris.

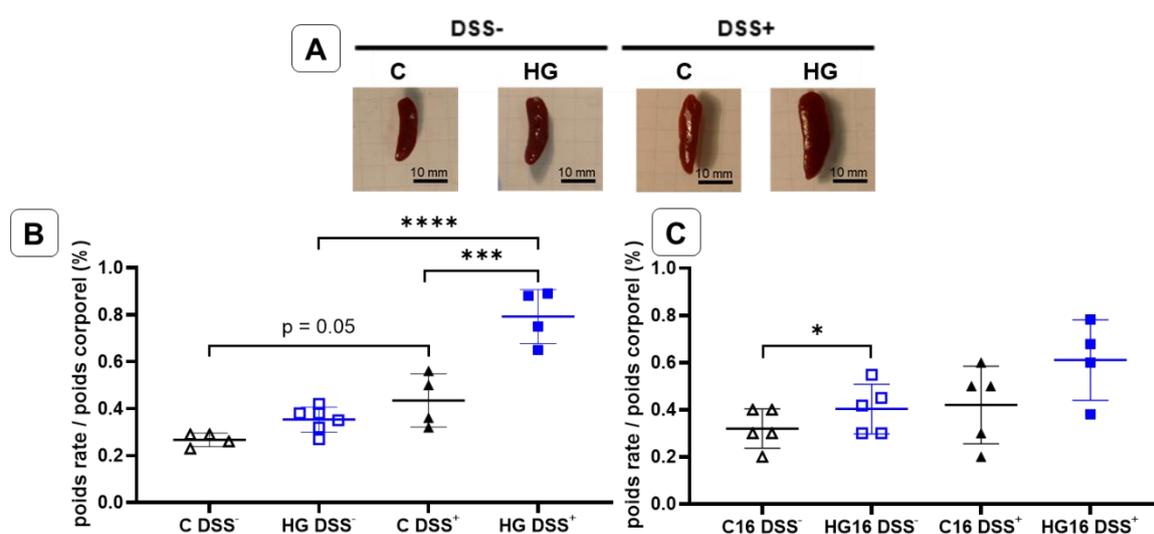


Figure 74 : Visualisation de la taille des rates (A) et étude du poids de la rate (B-C). Chaque rate a été prélevée et pesée puis rapportée au poids de chaque animal en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommé durant 8 et 16 semaines chez les souris soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. L'échelle sur les photographies représente 10 mm. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- **Population de cellules immunitaires**

Les cellules immunitaires ont été étudiées par cytométrie en flux dans la rate et dans la muqueuse colique de toutes les souris. Nous avons observé une **augmentation des cellules NK** (*Figure 75 A et D*) chez les souris nourries avec le **régime hyperglucidique** après traitement colitogène bien que la différence ne soit pas significative ($p = 0,07$) par rapport aux souris nourries avec le régime contrôle dans ce même contexte inflammatoire.

Concernant les cellules immunitaires dans le côlon (*Figure 75 G-H*), une augmentation numérique, mais non significative des lymphocytes B semble confirmer l'inflammation provoquée par le traitement colitogène chez les souris nourries avec les deux régimes (*Figure 75 I*). En revanche, la quantité de cellules dendritiques dans le côlon des souris traitées au DSS est significativement augmentée avec les deux régimes alimentaires (*Figure 75 J*).

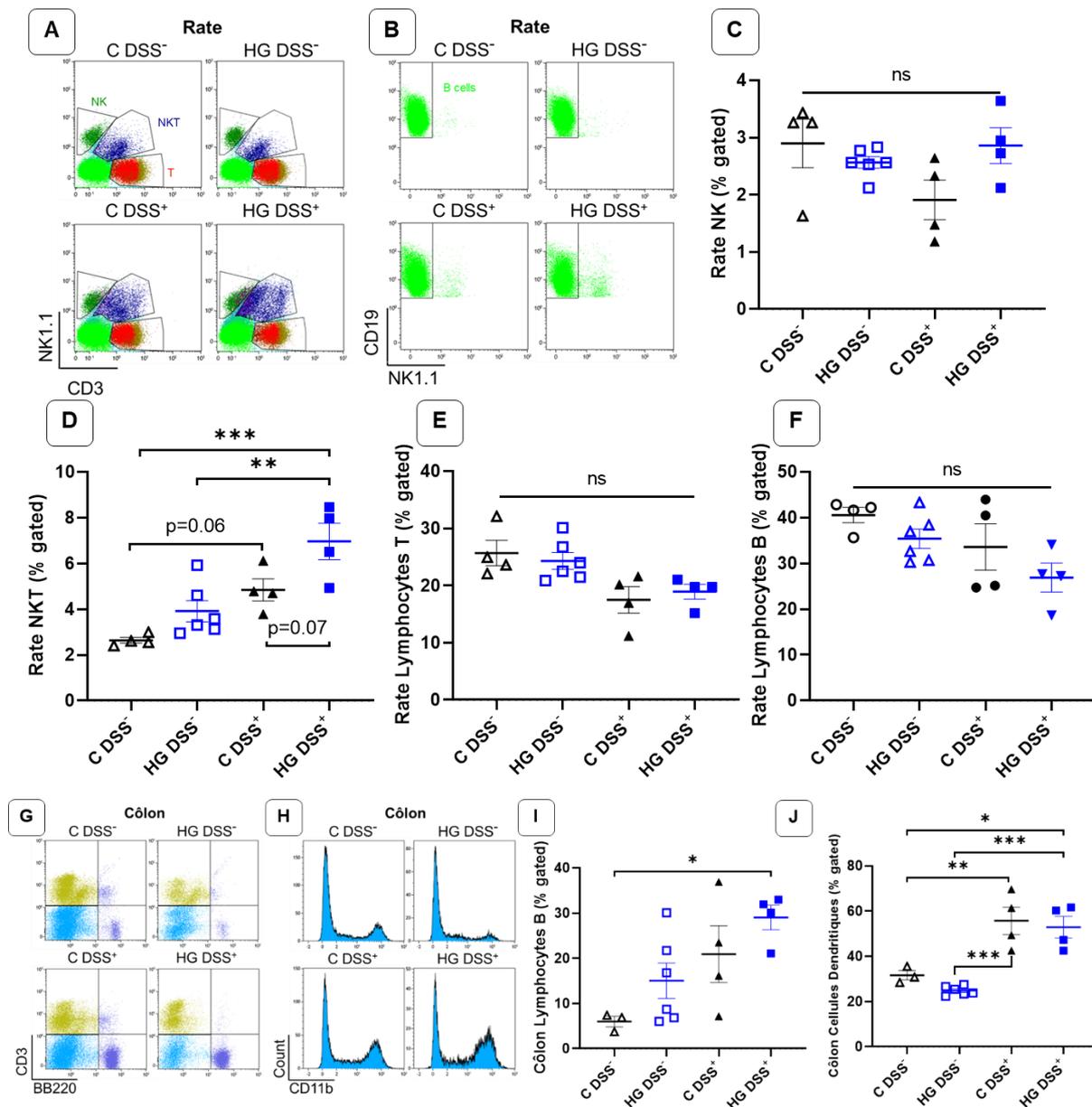


Figure 75 : Étude des cellules immunitaires dans la rate (A-F) et le côlon (G-I) des souris. Les quantités relatives des populations de cellules immunitaires indiquées (NKT, NK, dendritiques, lymphocytes T et B) ont été quantifiées par cytométrie en flux dans les échantillons de rate des souris nourries avec le régime hyperglucidique (HG) ou le régime contrôle (C) et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes (N \geq 4). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples ou un test de Kruskal-Wallis selon que les données étaient paramétriques ou non (*p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; ***p < 0,001).

2.5. Dysbiose du microbiote intestinal

- Effet de la colite expérimentale sur le microbiote intestinal

Afin d'étudier l'impact de la colite sur le microbiote intestinal, les selles des souris ont été analysées avant et après le traitement colitogène. Avant traitement colitogène (à J0) les souris nourries avec le régime hyperglucidique pendant 8 semaines avaient une **α -diversité significativement plus faible** que celle des souris nourries avec le régime contrôle à la fois pour les indices de Chao (**Figure 76 A**) et de Shannon (**Figure 76 C**). Cet effet persiste au 5^{ème} jour de traitement colitogène, cependant nous avons observé que pour les deux groupes de régime, les animaux traités au DSS présentaient une moindre diversité à J5 en termes de richesse spécifique (indice de Chao, **Figure 76 B**) mais pas en termes de régularité (indice de Shannon, **Figure 76 D**).

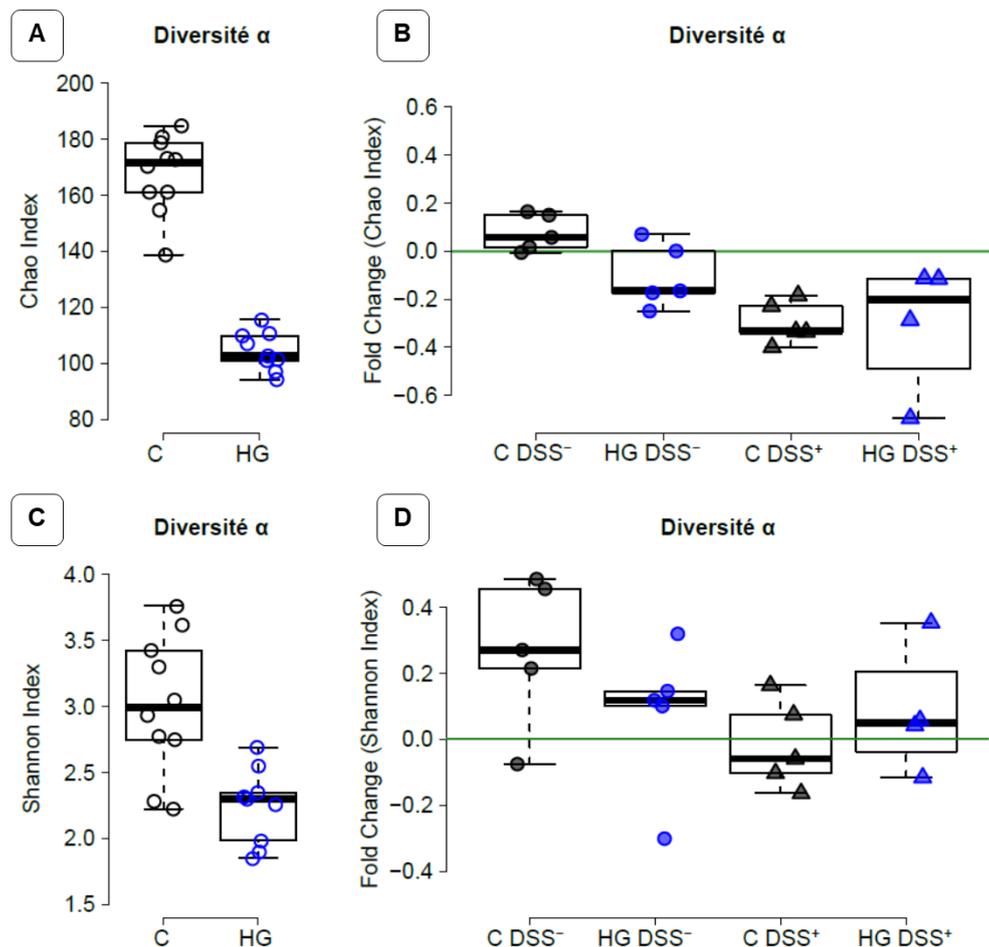


Figure 76 : Influence de la colite expérimentale sur l'alpha-diversité du microbiote fécal des souris. La diversité alpha mesurée par les indices de Chao (A) et de Shannon (C) chez les souris ayant consommé le régime contrôle (C, N = 10) ou le régime hyperglucidique (HG, N = 9) à J0. L'évolution de la richesse des espèces bactériennes (C et D) est mesurée par la variation (fold change) des indices à J5 par rapport à J0 pour les souris soumises (DSS⁺, N ≥ 4) ou non (DSS⁻, N = 5) au traitement colitogène. Les analyses statistiques sont résumées dans le Tableau XVI.

Ainsi, ces résultats indiquent que le **traitement par le DSS réduit la diversité α** et a un impact sur les espèces présentes en faible abondance sans perturber les bactéries les plus abondantes de la communauté microbienne.

Concernant la β -diversité, une forte différence de composition microbienne entre les groupes de régime a été observée à J0 et J5, avec une variance supérieure à 49 % pour l'indice de Jaccard (**Figure 77 A**) et à 46 % pour l'indice de Bray-Curtis (**Figure 77 B**). Pour les deux groupes de régime, **la communauté microbienne des animaux après traitement colitogène était plus éloignée de la même communauté à J0** (avant traitement au DSS).

Tout comme l' α -diversité, ces résultats révèlent que **le traitement au DSS a une forte influence sur la composition du microbiote intestinal** et que cet effet n'était pas conditionné par l'alimentation avant l'exposition au traitement au traitement colitogène.

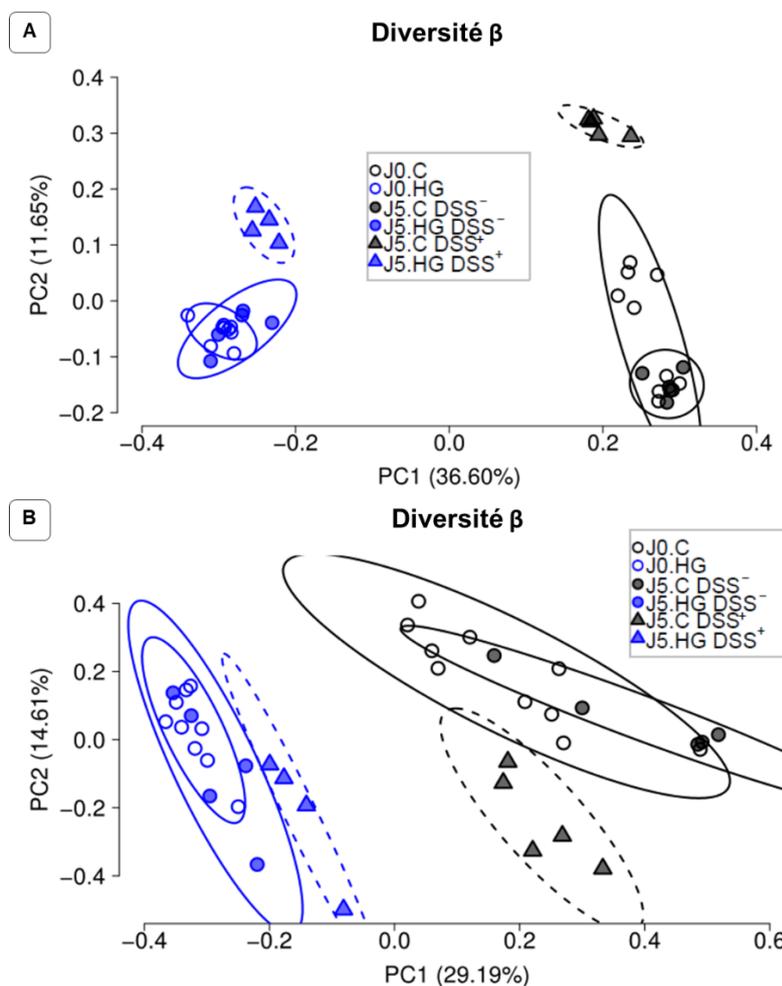


Figure 77 : Influence de la colite expérimentale sur la beta-diversité du microbiote fécal des souris. Analyse en composante principale représentant l'évolution des indices de Jaccard (A) et de Bray-Curtis (B) chez les souris ayant consommé le régime contrôle (C, N = 10) ou le régime hyperglucidique (HG, N = 9) à J0 et à J5 selon le traitement au DSS ou non. Les analyses statistiques sont résumées dans le Tableau XVI.

Tableau XVI : Dysbiose intestinale au cours de la colite expérimentale. Pour les corrélations entre les indices de diversité α (Chao et Shannon) et les paramètres expérimentaux, un test signé des rangs de Wilcoxon a été utilisé. Pour les indices de β -diversité (Bray-Curtis et Jaccard), les corrélations avec les paramètres expérimentaux ont été évaluées avec une analyse de variance multivariée (MANOVA).

α - diversité		p-value indice		p-value variation (fold-change)	
		Chao	Shannon	Chao	Shannon
C vs HG	J0	0,0042	0,0207	NA	NA
	J5 DSS-	0,0149	0,0397	0,1333	0,3889
	J5 DSS+	0,0210	0,0397	0,5556	0,7302
J0 vs J5	C DSS-	0,5812	0,5059	0,0603	0,1518
	HG DSS-	0,4959	0,7972	0,1817	0,1518
	C DSS+	0,0210	0,7823	0,0029	0,6233
	HG DSS+	0,0144	0,3902	0,0034	0,2183
β - diversité		p-value indice		Variance	
		Bray-Curtis	Jaccard	Bray-Curtis	Jaccard
C vs HG	J0	0,0001	0,0001	46,5%	49,7%
	J5 DSS-	0,0088	0,0099	61,3%	59,1%
	J5 DSS+	0,0077	0,0080	51,1%	56,0%
J0 vs J5	C DSS-	0,0458	0,0339	17,4%	12,3%
	HG DSS-	0,1165	0,3669	14,2%	8,2%
	C DSS+	0,0003	0,0003	38,8%	33,0%
	HG DSS+	0,0023	0,0015	37,6%	34,2%

Nous n'avons pas pu identifier d'indicateurs d'espèces (OTU pour unité taxonomique opérationnelle) qui soit spécifiquement conditionné par le régime alimentaire durant la colite expérimentale (défini par les OTU dont l'abondance ou la prévalence est associée de façon significative au régime et au traitement DSS à J5 mais pas à J0 et dont la variation entre J5 et J0 est associé significativement au régime alimentaire durant la colite) (**Figure 78**).

Indépendamment du régime alimentaire nous avons pu identifier 51 OTU impactés par le traitement colitogène (défini par les OTU significativement associés au traitement DSS à J5 mais pas à J0). Ces OTU appartiennent en majorité aux *Firmicutes* (~ 70%) et aux *Gammaproteobacteria* (~ 20%), alors que la communauté entière est composée de *Firmicutes* (~ 40%), *Bacteroidetes* (~ 20%) et *Gammaproteobacteria* (~ 40%), suggérant ainsi que **le traitement DSS n'affecte pas ces phylums de la même manière** (**Figure 78**).

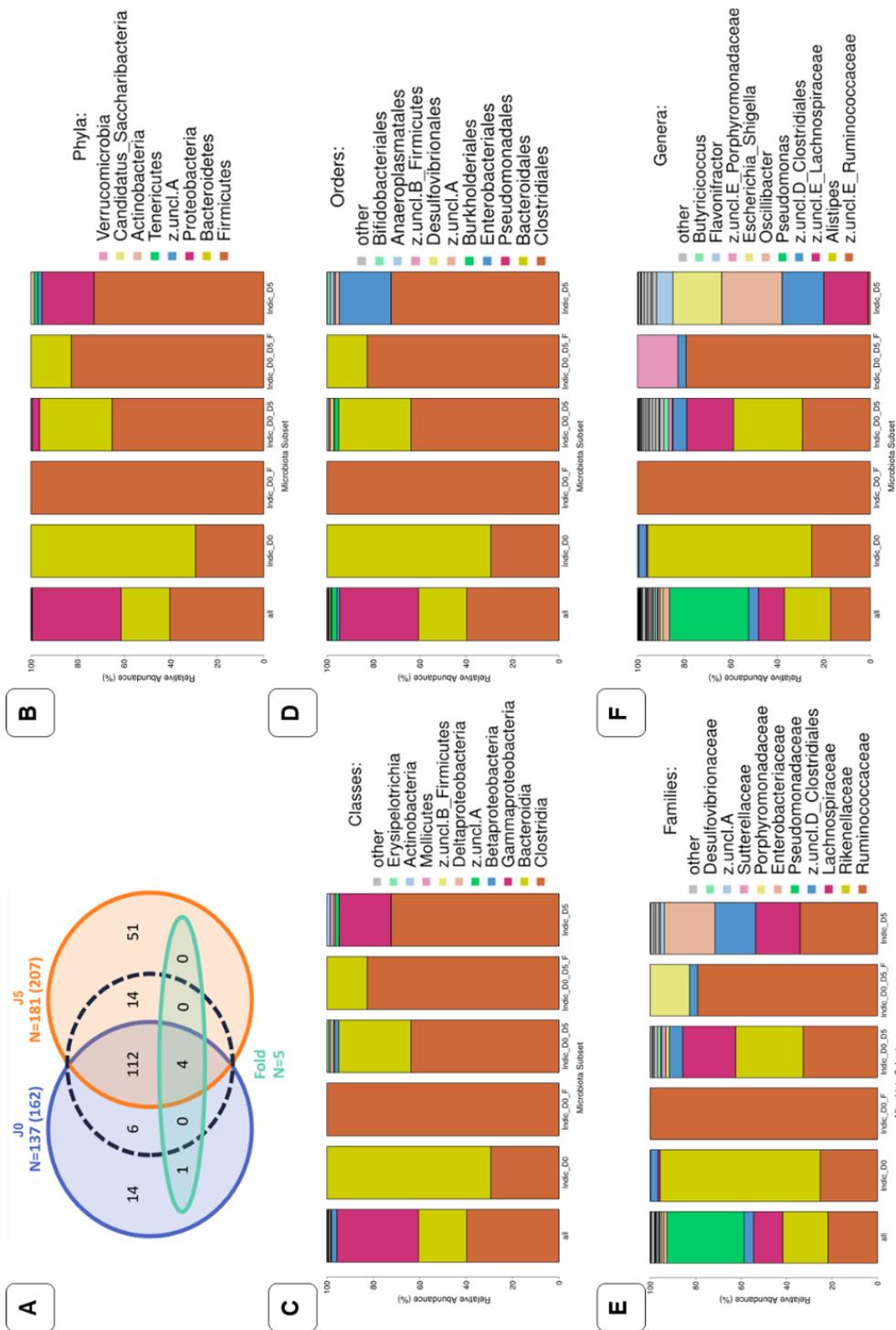


Figure 78 : Composition du microbiote intestinal au cours de la colite expérimentale. Biomarqueurs d'espèces (A) Diagramme de Venn des OTU identifiées comme indicateur spécifique du régime alimentaire et traitement au DSS à J0 et à J5 du traitement colitogène. Pour J0 et J5, le nombre se réfère aux OTU associées au régime avec une valeur p comprise entre] 0,05 et 0,10], elles sont indiquées dans le graphique par la ligne noire en pointillés. Comparaison de la composition microbienne (B) de l'ensemble de la communauté bactérienne (« all ») et des sous-ensembles classe, ordre, famille et genre (C-F).

- **Effet du régime alimentaire sur le microbiote intestinal**

Nous avons étudié l'effet d'une alimentation enrichie en sucre sur le microbiote intestinal en dehors du contexte de colite. Pour cela, nous avons analysé les selles des animaux avant l'induction des régime (microbiote de base noté B) et après 8 semaines de régime contrôle ou hyperglucidique (noté J0).

Nous avons observé que les souris du groupe hyperglucidique présentaient une α -diversité significativement plus faible au départ pour les indices de Chao et Shannon (*Figure 79 A et C*) alors que les animaux devraient être identiques à ce stade. Cela peut être expliqué par un « effet cage » lié au fait que les souris sont coprophages et ne présentent donc pas le même microbiote d'une cage à l'autre. Cet effet persistant à J0, pour évaluer l'impact du régime au-delà de la différence initiale, nous avons calculé la variation (fold change) des indices d' α -diversité à J0 par rapport au microbiote de base (*Figure 79 B et D*) mais nous n'avons pas observé de différence significative indiquant donc que **la consommation du régime hyperglucidique n'a pas influencé spécifiquement la diversité α du microbiote intestinal des souris.**

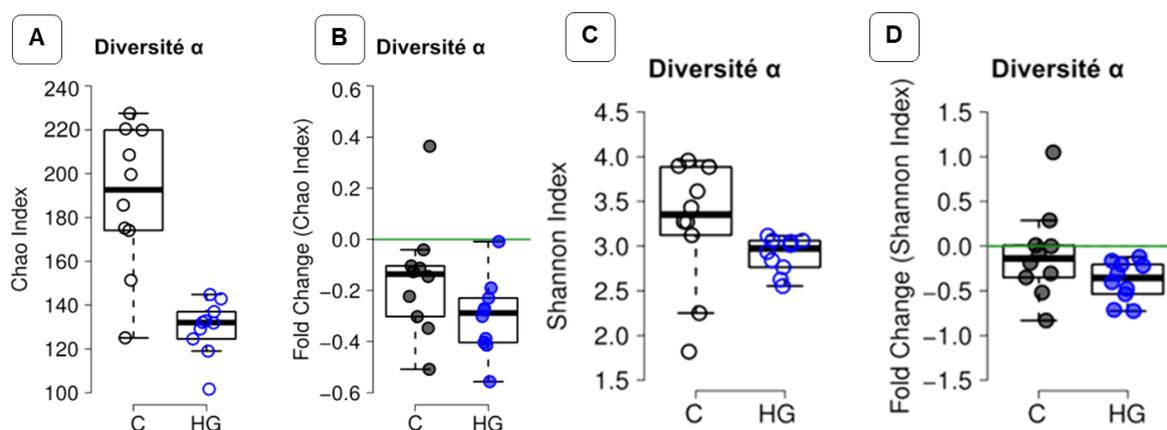


Figure 79 : Influence du régime alimentaire sur l'alpha-diversité du microbiote fécal des souris. La diversité alpha mesurée par les indices de Chao (A) et de Shannon (C) chez les souris non traitées au DSS dans les groupes régime contrôle (C, N = 10) ou régime hyperglucidique (HG N = 9) avant l'induction des régimes alimentaires (microbiote de base noté B). L'évolution de la richesse des espèces bactériennes (C et D) est mesurée par la variation (fold change) des indices à J0 (après 8 semaines de régimes) par rapport au microbiote de base. Les analyses statistiques sont résumées dans le Tableau XVII.

En revanche, concernant **la diversité β** , nous avons observé une **très forte corrélation avec le régime alimentaire** pour les indices de Jaccard et de Bray-Curtis avec une variance supérieure à 42 %. Au sein des groupes de régime, une différence significative entre les points dans le temps (B et J0) n'est observée que pour les souris nourries avec le régime hyperglucidique (*Figure 80 A-B*).

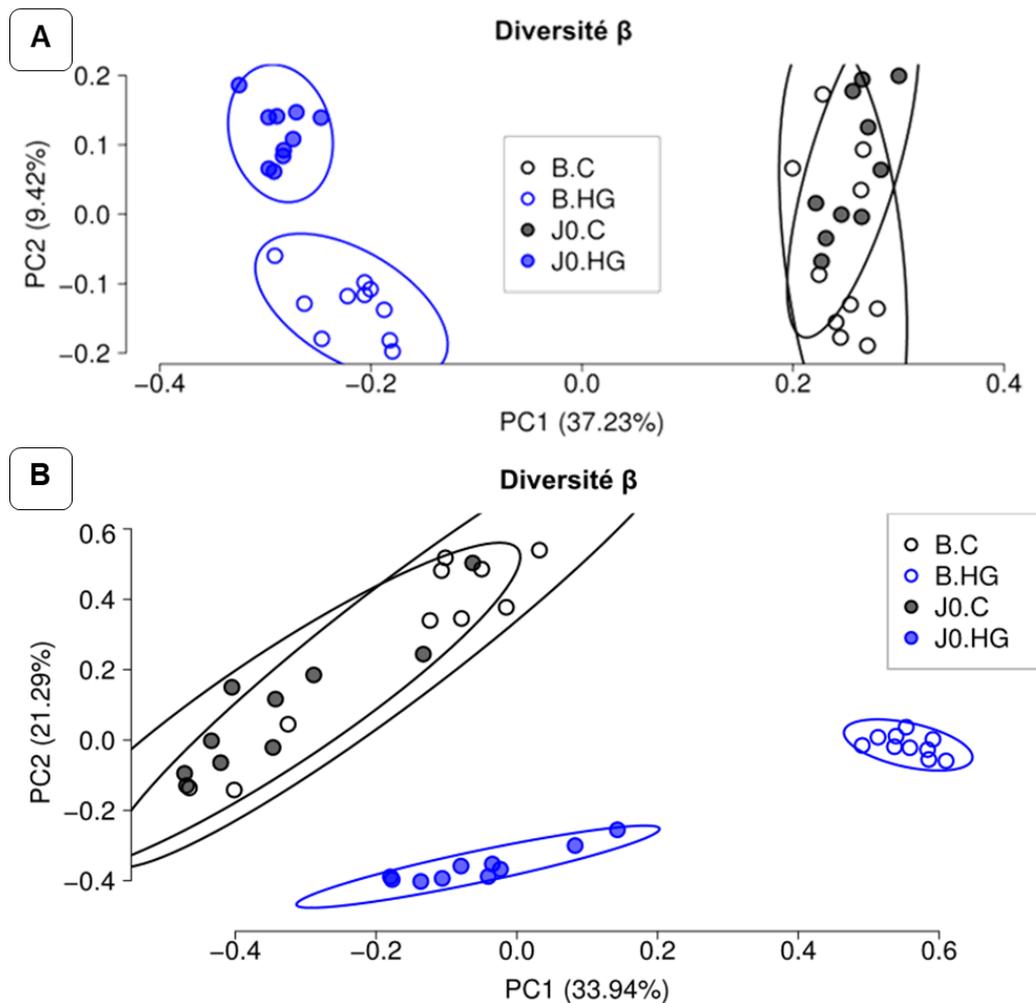


Figure 80 : Influence du régime alimentaire sur la beta-diversité du microbiote fécal des souris. Analyse en composante principale représentant l'évolution des indices de Jaccard (A) et de Bray-Curtis (B) chez les souris ayant consommé le régime contrôle (C, $N = 10$) ou le régime hyperglucidique (HG $N = 9$) avant et après la consommation des régimes alimentaires. Les analyses statistiques sont résumées dans le Tableau XVII.

Ces résultats indiquent que **malgré la différence initiale entre les animaux** issus des différents groupes, le **régime hyperglucidique modifie fortement la composition du microbiote intestinal** des souris et affecte **principalement les bactéries les plus abondantes du microbiote** et dans une moindre mesure la prévalence des espèces moins abondantes.

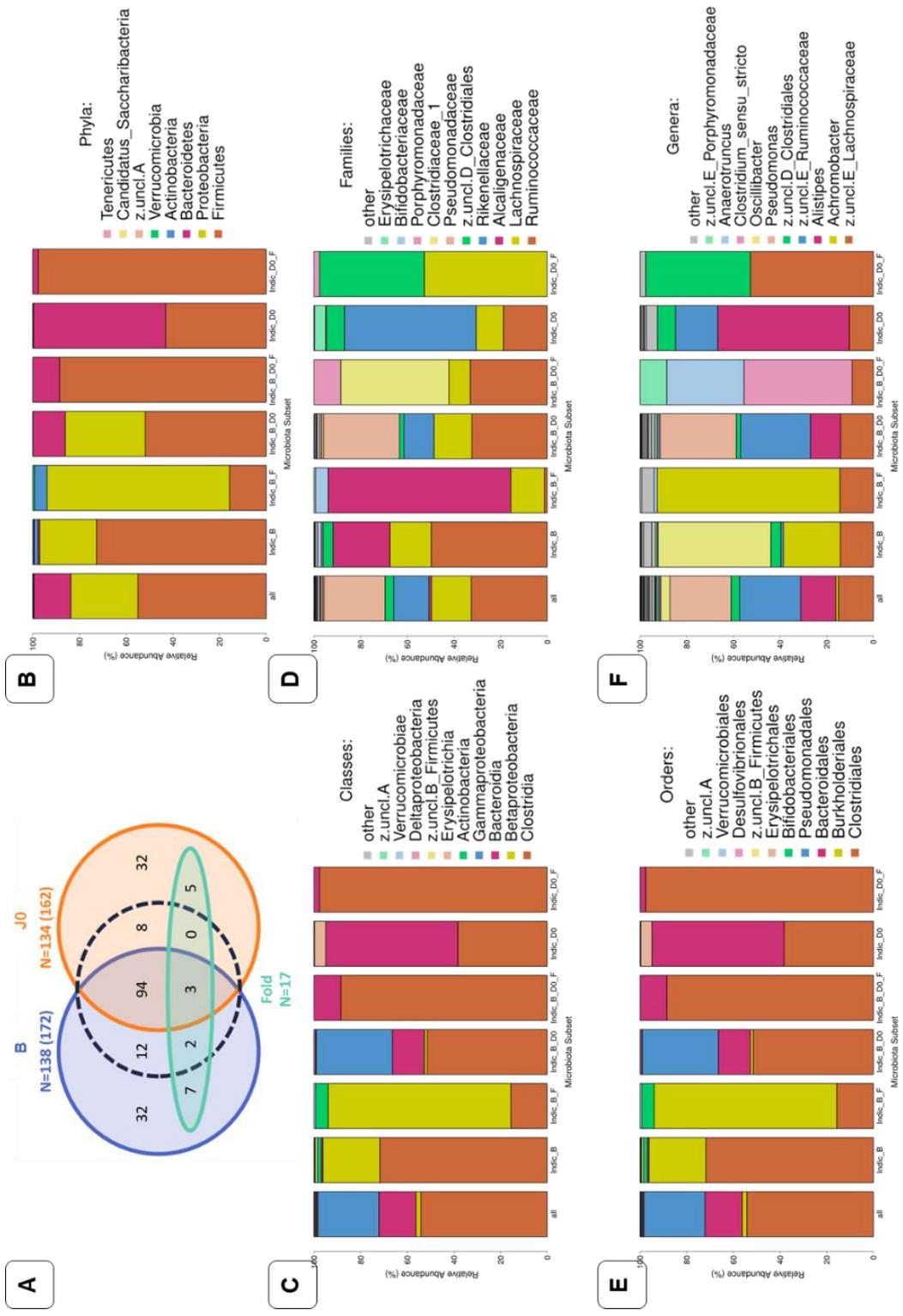


Figure 81 : Composition du microbiote intestinal selon le régime alimentaire. Biomarqueurs d'espèces (A) Diagramme de Venn des OTU identifiées comme associé significativement au régime alimentaire au départ, après consommation des régimes et variation (fold change). Pour JO et B, le nombre se réfère aux OTU associées au régime avec une valeur p comprise entre] 0,05 et 0,10], elles sont indiquées dans le graphique par la ligne noire en pointillés. Comparaison de la composition microbienne (B) de l'ensemble de la communauté bactérienne (« all ») et des sous-ensembles (C-F).

Tableau XVII : Dysbiose intestinale provoquée par le régime hyperglucidique. Pour les corrélations entre les indices de diversités α (Chao et Shannon) et les paramètres expérimentaux, un test des rangs signé de Wilcoxon a été utilisé. Pour les indices de β -diversité (Bray-Curtis et Jaccard), les corrélations avec les paramètres expérimentaux ont été évaluées avec une analyse de variance multivariée (MANOVA).

Diversité α		p-value indice		p-value variation (fold change)		
		Chao	Shannon	Chao	Shannon	
C vs HG	B	0,0006	0,0348	NA	NA	
	J0	0,0005	0,0063	0,1051	0,1153	
B vs J0	C	0,0639	0,2969	0,0018	0,1153	
	HG	0,0005	0,0003	0,0002	0,0002	
Diversité β		p,value indice		Variance		
		Bray-Curtis	Jaccard	Bray-Curtis	Jaccard	
C vs HG	B	0,0001	0,0001	52,5%	42,2%	
	J0	0,0001	0,0002	47,5%	49,0%	
B vs J0	C	0,0242	0,0056	14,2%	13,0%	
	HG	0,0001	0,0001	71,1%	25,8%	
Biomarqueurs		Otu036	Otu044	Otu052	Otu146	Otu194
Microbiote de base B	p-value test (1)	0,8404	0,3855	0,2918	0,2918	1,0000
	p-value test (2)	1,0000	1,0000	0,8412	0,8412	1,0000
	p-value test (3)	1,0000	1,0000	0,8592	0,8592	1,0000
	p-value test (4)	0,7545	0,4103	0,3363	0,3363	1,0000
	force corrélation test (1)	0,3%	4,9%	7,7%	7,7%	0,0%
	force corrélation test (2)	0,0%	0,0%	45,0%	45,0%	0,0%
	force corrélation test (3)	0,0%	0,0%	25,0%	25,0%	0,0%
	force corrélation test (4)	74,3%	80,6%	53,7%	50,5%	0,0%
	test (4) spécificité	55,2%	65,0%	96,3%	85,0%	0,0%
	test (4) sensibilité	100,0%	100,0%	30,0%	30,0%	0,0%
	test (4) groupe associé	C	HG	C	HG	
Après 8 semaines de régime J0	p-value test (1)	0,0015	0,0018	0,0015	0,0014	0,0010
	p-value test (2)	0,1021	0,1021	1,0000	0,2258	0,7482
	p-value test (3)	0,1255	0,4157	0,0031	0,0258	0,0031
	p-value test (4)	0,0008	0,0018	0,0028	0,0008	0,0008
	force corrélation test (1)	72,5%	66,2%	69,3%	74,6%	78,6%
	force corrélation test (2)	62,5%	61,3%	0,0%	49,6%	22,9%
	force corrélation test (3)	57,7%	42,0%	90,5%	73,4%	90,5%
	force corrélation test (4)	98,0%	94,1%	94,9%	98,3%	99,1%
	test (4) spécificité	96,0%	88,5%	100,0%	96,5%	98,2%
	test (4) sensibilité	100,0%	100,0%	90,0%	100,0%	100,0%
	test (4) groupe associé	C	C	HG	HG	C
Fold Change	p-value test (1)	0,0132	0,0426	0,0150	0,0426	0,0091
	force corrélation test (1)	68,6%	50,4%	65,9%	49,3%	78,6%
Taxonomie	Phylum	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Bacteroidetes
	Classe	Clostridia	Clostridia	Clostridia	Clostridia	Bacteroidia
	Ordre	Clostridiales	Clostridiales	Clostridiales	Clostridiales	Bacteroidales
	Famille	unclassified	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Porphyromonadaceae
	Genre	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	Barnesiella

Nous avons identifié 5 indicateurs d'espèces modulés par le régime alimentaire, définis statistiquement comme les OTU dont l'abondance et/ou la prévalence est significativement associée au régime après 8 semaines de consommation (à J0) mais pas dans le microbiote de base (B) et dont la variation entre J0 et B est significativement associée au régime alimentaire (*Figure 81 A et Figure 82*).

Précisément, deux OTUs appartenant à l'ordre des *Clostridiales* (**Otu036, Otu044**) **ont montrées une nette diminution de leur abondance relative chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique**, tout en restant à une abondance similaire chez les souris nourries avec le régime contrôle (*Figure 82*)

Deux OTUs appartenant à la famille des *Lachnospiracées* (**Otu052, Otu146**) **ont montré une forte augmentation de leur abondance relative et de leur prévalence chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre** (*Tableau XVII*).

De façon très intéressante, **une bactérie appartenant au genre *Barnesiella* (Otu194)** n'a pas été trouvée au départ, mais était omniprésente à J0 chez les souris contrôle, alors qu'elle n'était présente que chez un seul animal nourri avec le régime hyperglucidique, en plus faible abondance (*Figure 82*).

Ces résultats suggèrent que **le régime enrichi en sucre a un impact considérable sur certaines espèces bactériennes**, la plupart appartenant à des Firmicutes connus pour produire des acides gras à chaîne courte. En effet, les biomarqueurs correspondants représentent ensemble plus de 90% des OTU, tandis que les Firmicutes représentent ~ 50% de l'ensemble de la communauté, indiquant que les bactéries appartenant à ce phylum semblent être particulièrement impactées par le régime hyperglucidique (*Figure 81*).

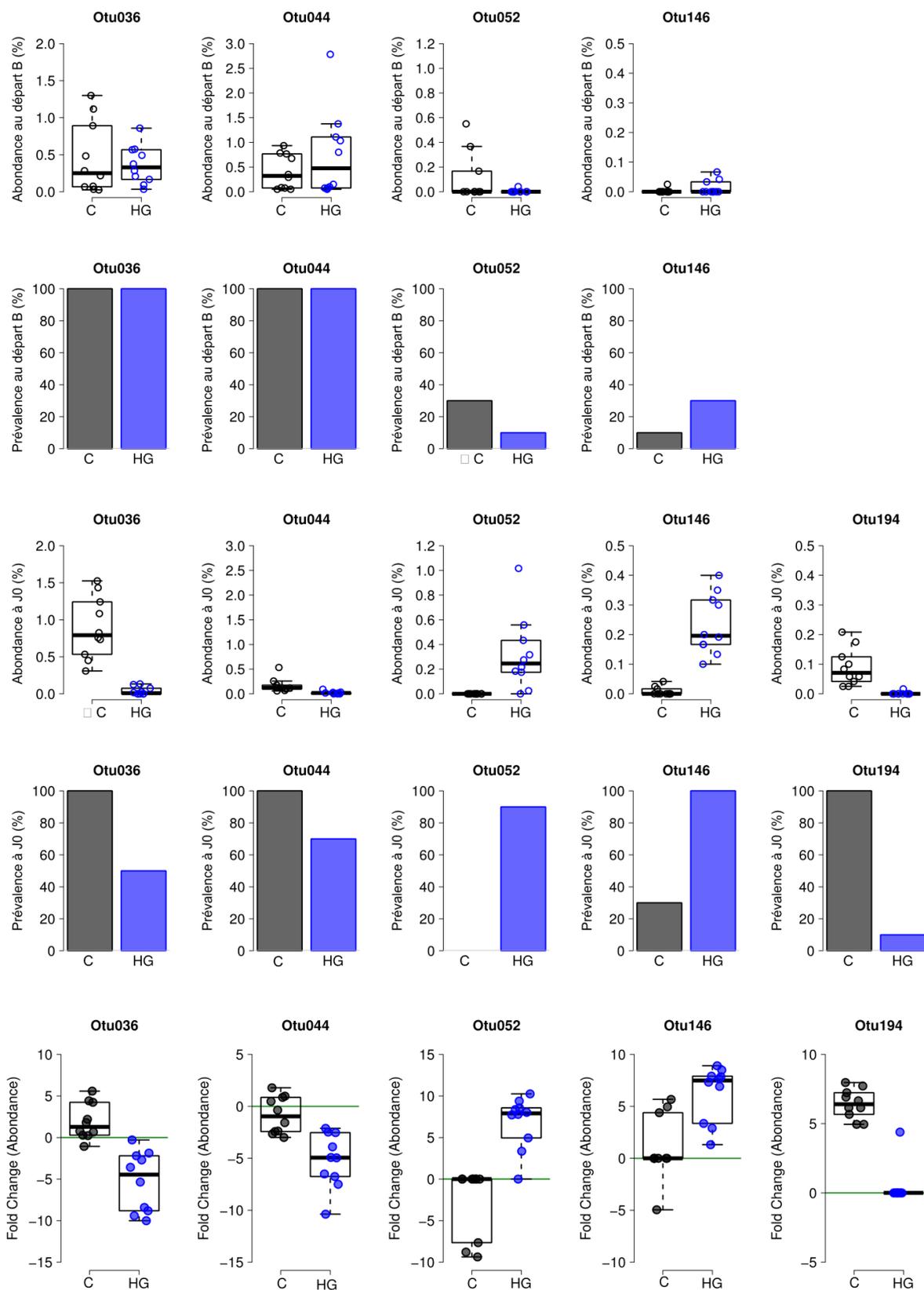


Figure 82 : Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) significativement modifiées par le régime alimentaire. Abondance, prévalence correspondante et variation de l'abondance des OTUs avant la consommation des régimes alimentaires (microbiote de base noté B) et après 8 semaines de régime alimentaire (à J0) chez les souris non traitées au DSS (N = 10 par groupe). Les analyses statistiques sont résumées dans le Tableau XVII.

- **Dosage des métabolites bactériens**

Certaines bactéries du microbiote intestinal produisent des métabolites aux propriétés anti-inflammatoires notamment les acides gras à chaînes courtes (AGCC) dont les proportions relatives dans les fèces ou contenus digestifs sont le reflet de l'activité enzymatique du microbiote et donc du statut bactérien de l'animal.

Ainsi, nous avons dosés ces AGCC dans les selles et le contenu caecal des souris nourries avec le régime hyperglucidique ou le régime contrôle durant 8 semaines et traitées ou non au DSS. Cette analyse a été réalisée au 10^{ème} jour du traitement colitogène sur le caecum et au 6^{ème} jour sur les selles car au-delà les selles n'étaient pas suffisantes chez les animaux souffrant de colite.

Ainsi, **en dehors du contexte de colite, la quantité d'acétate est significativement plus faible chez les animaux nourris avec le régime hyperglucidique** aussi bien dans les selles et dans le caecum (*Figure 83 A-B*) tandis que la quantité de butyrate ne varie que dans le contenu caecal (*Figure 83 A*). Ces acides gras sont encore plus fortement diminués après traitement au DSS dans le contenu caecal quel que soit le régime alimentaire consommé (*Figure 83 A-B*).

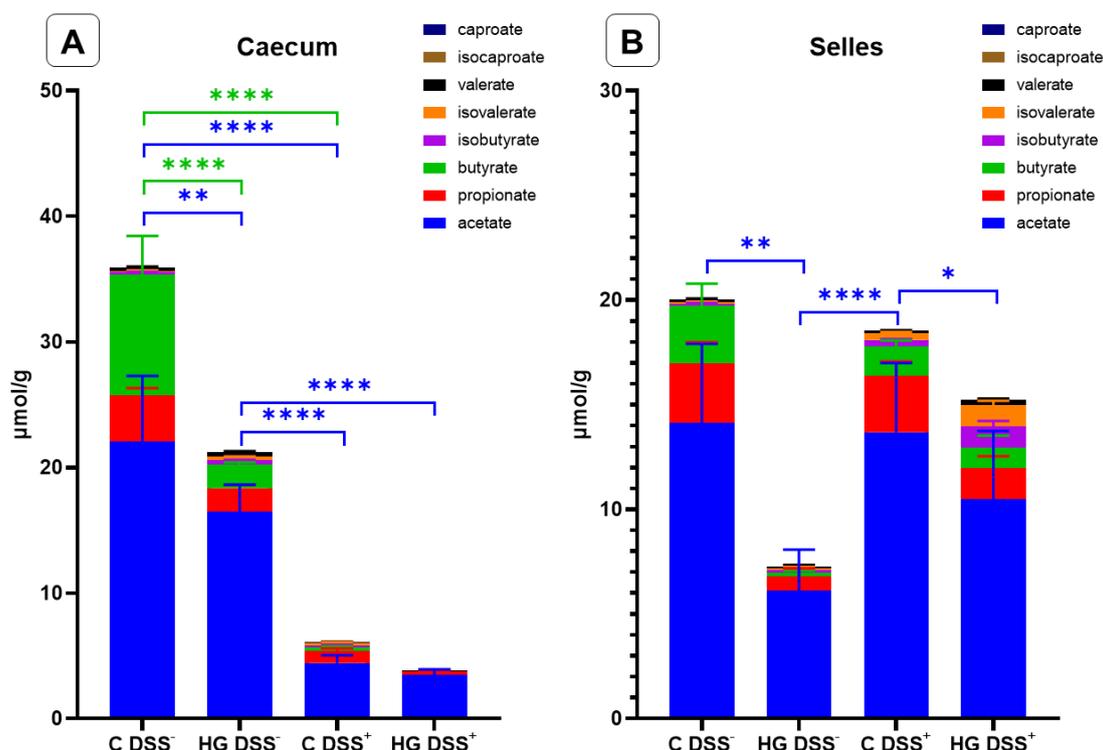


Figure 83 : Dosage des acides gras à chaînes courtes dans les selles et le contenu caecal des souris. Les résultats présentés correspondent à la quantité moyenne +/- erreur standard pour chaque groupe de souris (N ≥ 4) en fonction du régime alimentaire hyperglucidique (HG) ou contrôle (C) chez les souris soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. La significativité des différences observées a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).*

3. Réversibilité partielle des effets d'une surconsommation de sucre chez la souris

Nous avons ensuite souhaité vérifier si les changements provoqués par la consommation du régime hyperglucidique pouvaient être corrigés par un retour à un régime normal après 8 semaines de consommation du régime enrichi en sucre ou en alternant les régimes (hyperglucidique et contrôle) toutes les 4 semaines.

3.1. Conséquences de la consommation des régimes

- **Consommation alimentaire**

La consommation alimentaire quotidienne pour les animaux soumis au régime contrôle était de 4,1 g/jour en moyenne, ce qui correspond aux recommandations de Safe Diets (3 à 4 g/jour). Comme lors des protocoles précédents, le régime hyperglucidique s'est avéré beaucoup plus appétant d'où une augmentation de la consommation moyenne (7,3 g/jour, **Figure 84 A**).

La consommation moyenne d'eau est classiquement de 3 à 4 mL/jour pour une souris de laboratoire. De manière globale la consommation de nos souris était légèrement plus élevée (en moyenne 5 mL / jour par souris). Cependant la consommation du régime hyperglucidique n'a pas modifié la prise hydrique de façon significative (**Figure 84 B**).

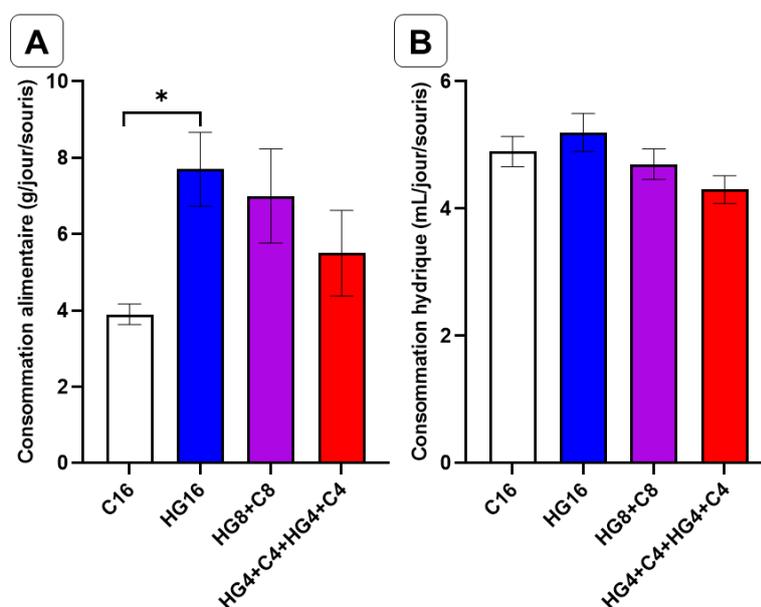


Figure 84 : Consommation alimentaire (A) et hydrique (B) des animaux au cours du protocole expérimental. Les résultats présentés correspondent à la moyenne estimée par cage (N ≥ 10 dans chaque groupe) de régime contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 16 semaines, ou de façon discontinue durant 8 semaines avant un retour au régime C, ou toutes les 4 semaines. La significativité des différences observées entre le régime étudié et le régime contrôle a été établie par un test de Kruskal-Wallis (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

- **Prise de poids**

Le poids des animaux a augmenté de 30 % chez les animaux qui ont consommé le régime enrichi en sucre durant 8 semaines avant de revenir à un régime normal alors que le poids n'a augmenté que de + 20 % chez ceux qui ont consommé le régime hyperglucidique de façon discontinue (deux fois 4 semaines). De façon surprenante, les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines ont vu leur poids augmenter plus rapidement alors que la prise de poids est moindre lorsqu'ils alternent les régimes toutes les 4 semaines (**Figure 85**).

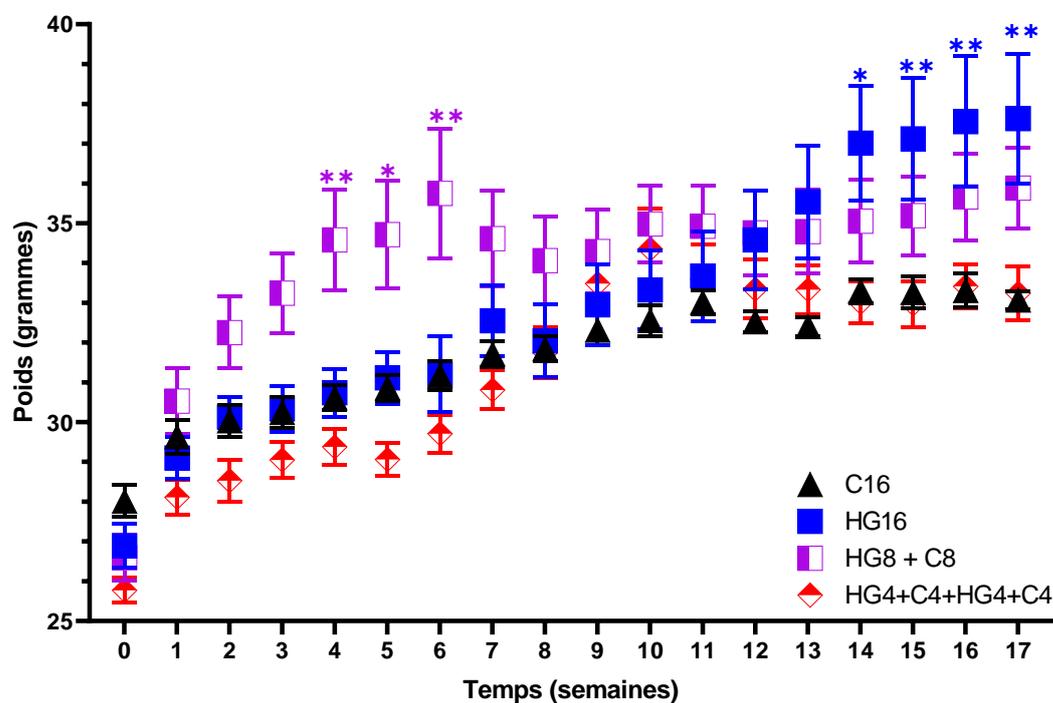


Figure 85 : Suivi de la prise de poids des souris au cours des 16 semaines de régime. Les résultats présentés correspondent au poids moyen +/- erreur standard ($N \geq 10$ dans chaque groupe) de régime contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommé de façon continue ou non durant 16 semaines. La significativité des différences observées a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2. Conséquences sur la colite expérimentale

- **Score clinique (DAI)**

Nous avons observé précédemment une aggravation de la colite expérimentale chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique. Il semble cependant que **le retour à un régime normal après consommation du régime enrichi en sucre durant 8 semaines** permette de **minimiser la sévérité de la colite** : ainsi, l'aggravation de la colite est plus lente et moins sévère que chez les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique en continu (**Figure 86**). Cet effet est significatif au 10^{ème} jour pour les souris ayant consommé 8 semaines de régime enrichi en sucre avant un retour au régime normal. Ces dernières souffrent d'une **colite moins sévère** que celles ayant consommé le régime hyperglucidique en continu ($p = 0,018$; **Figure 86**).

En revanche, les animaux qui ont consommé le régime hyperglucidique de façon alternée toutes les 4 semaines souffrent d'une colite proche de celles des témoins mais pas significativement moins importante que les souris ayant consommé le régime en continu.

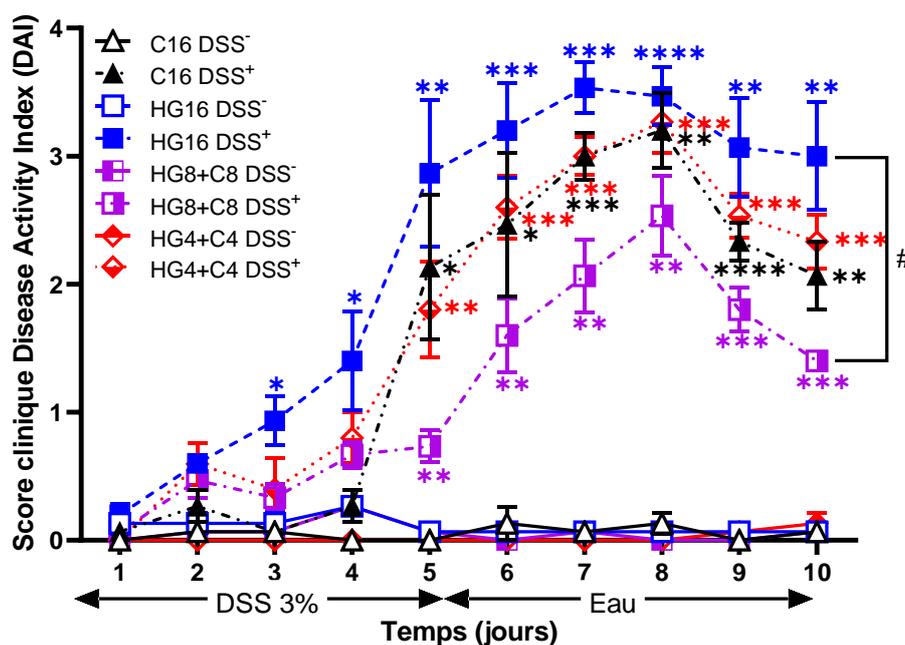


Figure 86 : Étude des signes cliniques de la colite expérimentale. La perte de poids, la consistance des selles et la présence de sang ont été suivis quotidiennement pour chaque souris en fonction des régimes contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 16 semaines de façon continue ou discontinue et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées a été établie par un test ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples entre les groupes DSS⁻ et DSS⁺ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), et un test de Fisher entre le régime contrôle et le régime hyperglucidique (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).

- **Score endoscopique (UCEIS)**

Concernant les lésions endoscopiques, les souris nourries avec le régime hyperglucidique de façon continue ou discontinue avaient montré des **lésions plus discrètes** que celles retrouvées chez les animaux soumis au régime durant 8 semaines (**Figure 87 A**). En conséquence, le score endoscopique n'est pas significativement plus élevé chez ces souris en l'absence de traitement colitogène (**Figure 87 B**).

L'**aggravation de la colite** en revanche avait été retrouvée chez les souris soumises au régime hyperglucidique durant 16 semaines. De façon intéressante, lorsque le régime enrichi en sucre est consommé de façon **discontinue**, le **score endoscopique est significativement abaissé** comparativement aux souris ayant consommé le régime hyperglucidique en continu durant 16 semaines (-3,4 ; $p = 0,006$; **Figure 87 B**). Ainsi, les observations endoscopiques confirment l'**effet réversible** du régime hyperglucidique lorsque les souris retournent à un régime normal après 8 semaines de consommation du régime enrichi en sucre, ce que nous avons précédemment observé avec le score DAI.

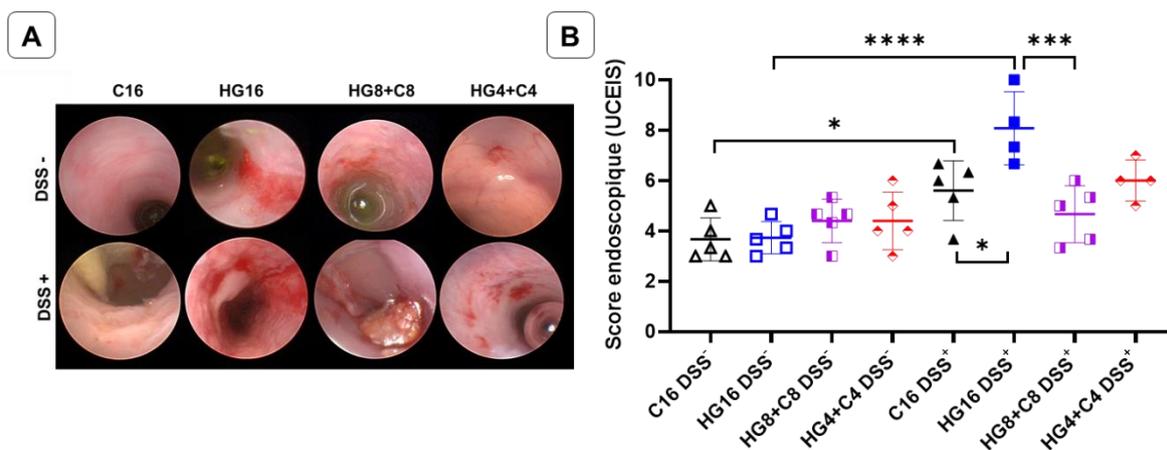


Figure 87 : Visualisation des images endoscopiques (A) et Score endoscopique moyen (B). Le score établi par trois expérimentateurs en double aveugle pour chaque souris en fonction des régimes contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 16 semaines de façon continue ou discontinue et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA et avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

• Score histologique

De la même façon, le score histologique confirme les observations cliniques et endoscopiques puisqu'il semble que la consommation discontinue du régime enrichi en sucre permette de corriger l'effet aggravant sur la colite. En effet, les souris ayant consommé les deux régimes ont un score histologique pratiquement nul pour celles nourries avec les deux régimes toutes les 4 semaines, et significativement inférieur à celui des souris ayant consommé le régime en continu (*Figure 88 B*).

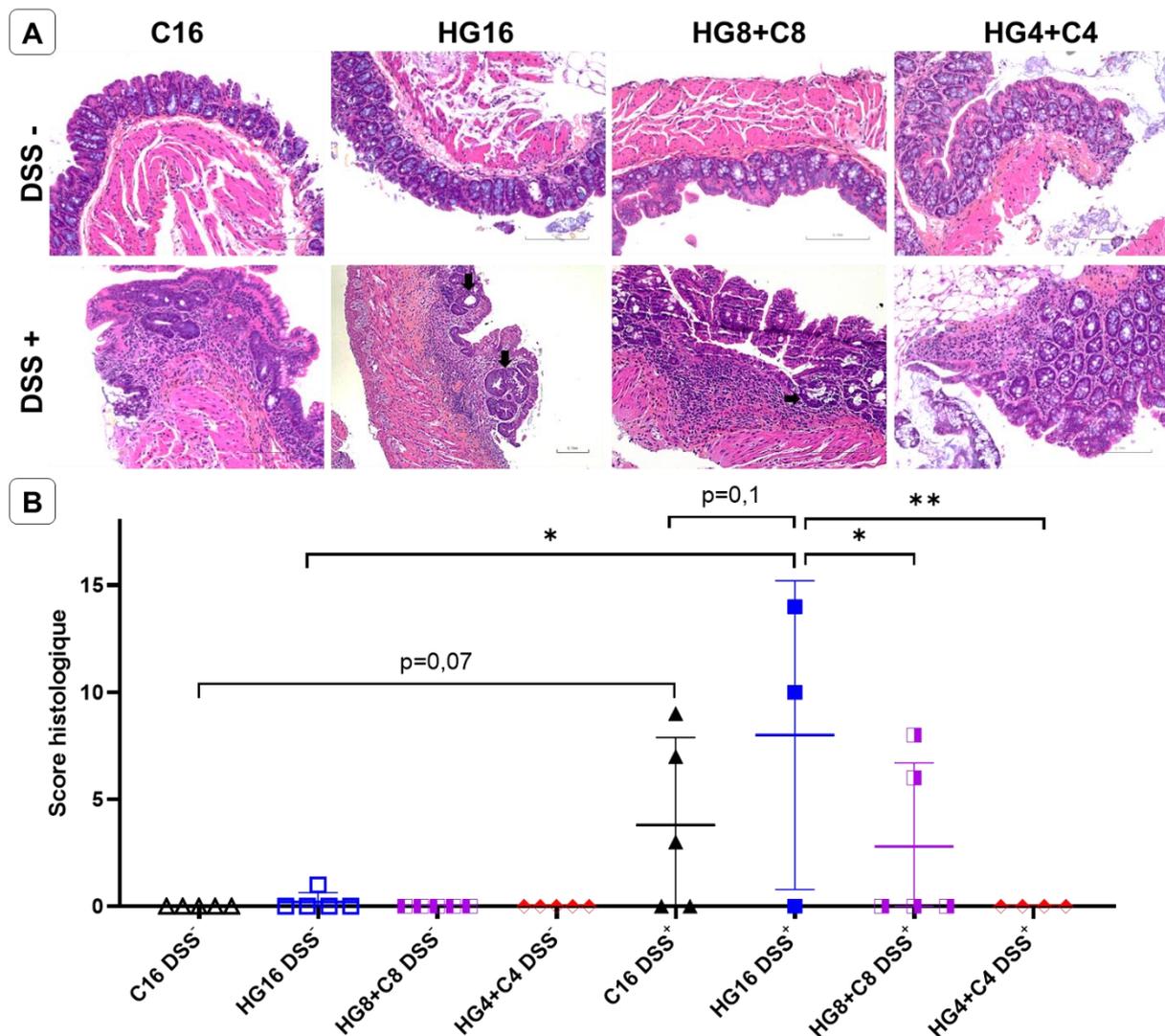


Figure 88 : Visualisation des coupes histologiques de côlon (A-C) et étude des scores histologiques dans la muqueuse colique des souris (B-D). Les échantillons de côlons ont été inclus en paraffine puis les coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. Les flèches montrent les dystrophies épithéliales. Le score histologique selon l'échelle de Riley et al., par un anatomopathologiste pour chaque animal en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 16 semaines de façon continue ou discontinue et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent au score total moyen \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 3$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par un test de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

• **Raccourcissement des côlons**

De la même façon, un raccourcissement du côlon avait été observé chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre sans traitement colitogène. Dans ce protocole, les animaux qui ont repris un régime normal après 8 semaines de consommation du régime hyperglucidique ont un côlon raccourci en l'absence de DSS (-11 % ; $p < 0,05$) alors que **les animaux ayant consommé ces régimes de façon alternée toutes les 4 semaines ne présentent pas de raccourcissement colique (Figure 89 B).**

De plus, après traitement colitogène, les animaux ayant **consommé le régime hyperglucidique de façon discontinue** ont un côlon **plus long** que ceux l'ayant consommé le en continu durant 16 semaines ce qui confirme les observations précédentes (+ 10 % ; $p < 0,01$; **Figure 89 A et B).**

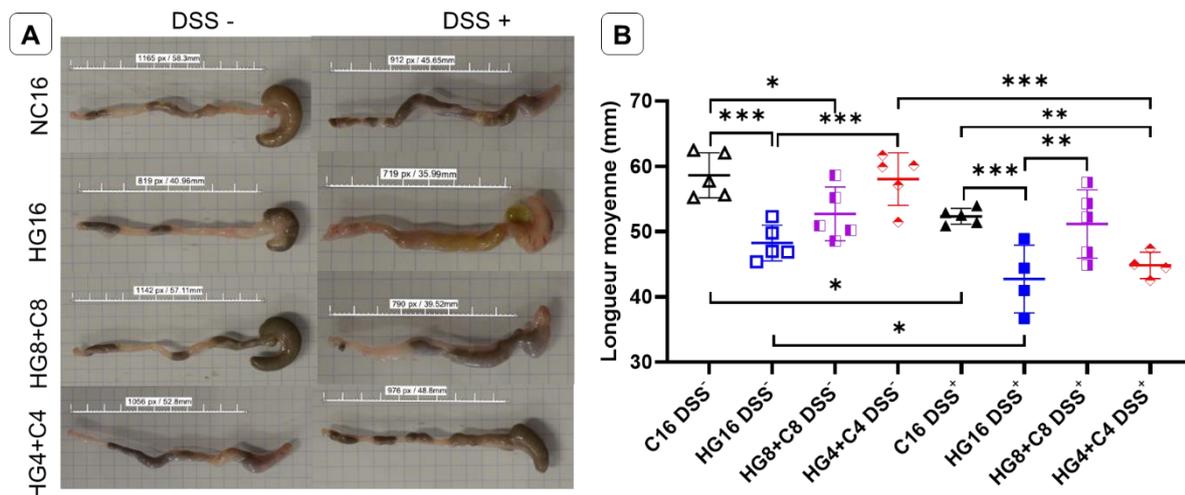


Figure 89 : Visualisation de l'aspect et de la taille des côlons (A-C). Longueur moyenne des côlons en fonction des régimes alimentaires (B-D). Mesure à l'aveugle pour chaque souris en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 16 semaines de façon continue ou discontinue et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- Splénomégalie

Chez les animaux ayant consommé le régime enrichi en sucre de façon discontinue durant 4 ou 8 semaines, les rates semblent moins impactées qu'après la consommation du régime en continu. Ainsi, la splénomégalie semble pouvoir être significativement corrigée lorsque les souris reprennent un régime normal après 8 semaines de consommation du régime hyperglucidique (-43% ; $p = 0,041$; **Figure 90**).

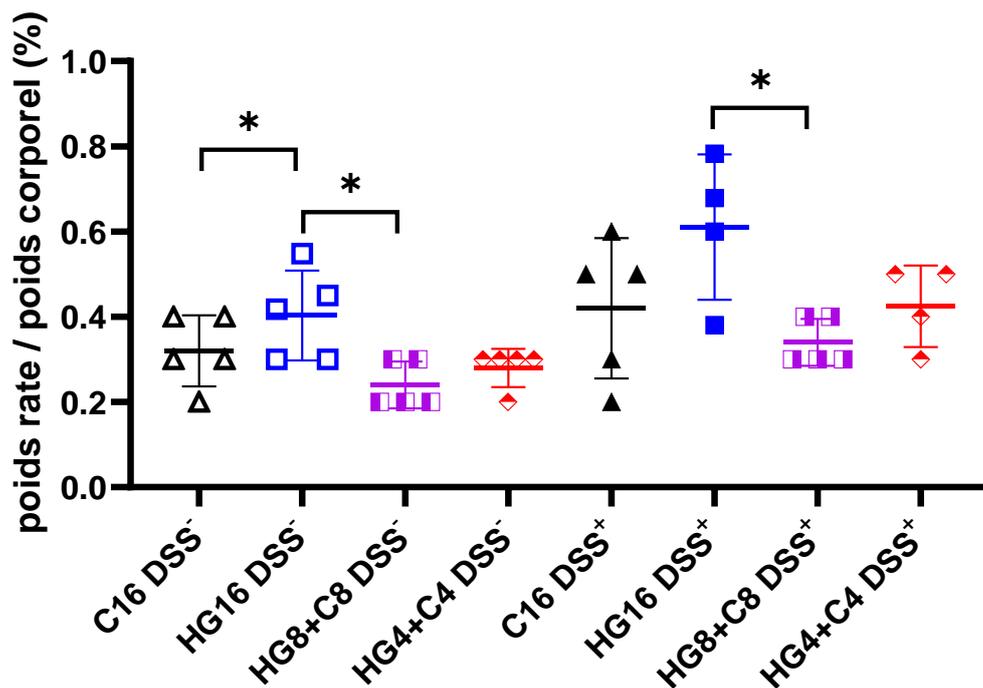


Figure 90 : Étude du poids de la rate au cours de la colite expérimentale. Chaque rate a été prélevée et pesée puis rapportée au poids de chaque animal en fonction des régimes alimentaires contrôle (C) ou hyperglucidique (HG) consommés durant 16 semaines de façon continue ou discontinue et soumises (DSS⁺) ou non (DSS⁻) au traitement colitogène. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées \pm erreur standard pour chacun des groupes ($N \geq 4$). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par un test de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.3. Transcriptome colique

Comme nous avons pu le constater précédemment, une reprogrammation du transcriptome colique a été observée chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique durant 8 ou 16 semaines. Ici, nous nous focalisons sur l'effet du régime en dehors du contexte de la colite expérimentale. De même, puisque l'effet semblait plus significatif au niveau clinique (score DAI et endoscopique) chez les souris ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines avant un retour à un régime normal, les souris ayant consommé les deux régimes toutes les 4 semaines n'ont pas été analysées.

Nous avons donc comparé les données des 3 groupes de régime (contrôle, hyperglucidique et hyperglucidique + contrôle) avec une analyse non supervisée, afin d'ouvrir le champ sur la découverte et l'exploration dans ce contexte bien particulier. Après extraction **d'un total de 426 gènes les plus variants** dans le jeu de données (gènes dont la variance inter-échantillons est > 10% de la variance maximale observée dans le transcriptome, après avoir exclu les valeurs aberrantes ou *outliers*), la première observation a été que ceux-ci étaient composés des principaux gènes dérégulés entre les souris HG vs C. Parmi ces 426 gènes, 349 gènes étaient sous-exprimés et 77 surexprimés.

Une classification hiérarchique avec ces 426 gènes et 15 échantillons a permis de séparer parfaitement les 3 groupes et d'identifier 6 signatures de gènes aux profils d'expression fortement corrélés, ou *clusters*, notés C[1-6], principalement impliqués dans les voies de la **réponse au stress du réticulum endoplasmique** (réponse UPR), **l'autophagie**, les **protéines HSP** et des **voies métaboliques comme la néoglucogénèse** (*Figure 91 et Tableau XVIII*).

Tableau XVIII : Principales voies des gènes dérégulés chez les souris nourries avec un régime hyperglucidique, contrôle ou après consommation des deux régimes. La base données Reactome a été utilisée pour extraire les voies (fonctionnelles, métaboliques, de signalisation, de régulation) enrichies chez l'homme, par orthologie avec les gènes de souris. Les annotations fonctionnelles sont compilées pour chaque cluster, de C1 à C6. Certains clusters contenant très peu de gènes, le seuil d'extraction des annotations a été rehaussé à $FDR < 0.25$.

	Pathway identifier	Pathway name	#Entities found	#Entities total	Entities ratio	Entities pValue	Entities FDR	#Reactions found	#Reactions total	Reactions ratio
Cluster 1	R-HSA-381038	XBP1(S) activates chaperone genes	2	95	0.007	0.00	0.082	1	47	0.004
	R-HSA-8986944	Transcriptional Regulation by MECP2	2	100	0.007	0.01	0.082	2	77	0.006
	R-HSA-381070	IRE1 alpha activates chaperones	2	101	0.007	0.01	0.082	1	53	0.004
	R-HSA-2672351	Stimuli-sensing channels	2	120	0.008	0.01	0.082	2	26	0.002
	R-HSA-5263617	Metabolism of ingested MeSeO2H into MeSeH	1	9	0.001	0.01	0.082	2	2	0.000
	R-HSA-3371599	Defective HLCS causes multiple carboxylase deficiency	1	10	0.001	0.01	0.082	1	4	0.000
	R-HSA-5336415	Uptake and function of diphtheria toxin	1	10	0.001	0.01	0.082	1	5	0.000
	R-HSA-381119	Unfolded Protein Response (UPR)	2	155	0.011	0.01	0.082	1	94	0.007
	R-HSA-3323169	Defects in biotin (Biot) metabolism	1	12	0.001	0.01	0.082	1	6	0.000
	R-HSA-8939243	RUNX1 interacts with co-factors whose precise effect on RUNX1 targets unknown	3	39	0.003	0.00	0.023	2	5	0.000
Cluster 2	R-HSA-8943724	Regulation of PTEN gene transcription	3	70	0.005	0.00	0.043	3	15	0.001
	R-HSA-4655427	SUMOylation of DNA methylation proteins	2	16	0.001	0.00	0.043	1	3	0.000
	R-HSA-3899300	SUMOylation of transcription cofactors	2	44	0.003	0.01	0.159	4	27	0.002
	R-HSA-4570464	SUMOylation of RNA binding proteins	2	51	0.004	0.01	0.159	1	4	0.000
	R-HSA-6807070	PTEN Regulation	3	171	0.012	0.01	0.159	3	56	0.004
	R-HSA-4551638	SUMOylation of chromatin organization proteins	2	62	0.004	0.01	0.159	2	15	0.001
	R-HSA-9636569	Suppression of autophagy	1	7	0.000	0.02	0.159	1	2	0.000
	R-HSA-69560	Transcriptional activation of p53 responsive genes	3	6	0.000	0.00	0.000	4	5	0.000
	R-HSA-69895	Transcriptional activation of cell cycle inhibitor p21	3	6	0.000	0.00	0.000	4	5	0.000
	R-HSA-6804116	TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest	3	20	0.001	0.00	0.007	6	17	0.001
Cluster 3	R-HSA-69563	p53-Dependent G1 DNA Damage Response	4	70	0.005	0.00	0.008	7	22	0.002
	R-HSA-69580	p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint	4	70	0.005	0.00	0.008	7	22	0.002
	R-HSA-9617828	FOXO-mediated transcription of cell cycle genes	3	27	0.002	0.00	0.008	5	22	0.002
	R-HSA-69615	G1/S DNA Damage Checkpoints	4	72	0.005	0.00	0.008	8	26	0.002
	R-HSA-8866911	TFAP2 (AP-2) family regulates transcription of cell cycle factors	2	6	0.000	0.00	0.010	3	4	0.000
	R-HSA-5635851	GLI proteins bind promoters of Hh responsive genes to promote transcription	2	8	0.001	0.00	0.015	4	4	0.000
	R-HSA-8941855	RUNX3 regulates CDKN1A transcription	2	8	0.001	0.00	0.015	3	6	0.000
	R-HSA-5610787	Hedgehog 'off' state	4	124	0.009	0.00	0.039	12	32	0.003
	R-HSA-6791312	TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes	3	65	0.004	0.00	0.053	6	42	0.003
	R-HSA-201722	Formation of the beta-catenin:TCF transactivating complex	3	67	0.005	0.00	0.054	4	13	0.001
R-HSA-259586	DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence	3	71	0.005	0.00	0.058	7	18	0.001	
R-HSA-5358351	Signaling by Hedgehog	4	168	0.012	0.00	0.084	27	82	0.006	
R-HSA-5632684	Hedgehog 'on' state	3	92	0.006	0.01	0.105	15	37	0.003	
R-HSA-8939236	RUNX1 regulates transcription of genes involved in differentiation of HSCs	3	106	0.007	0.01	0.136	7	15	0.001	
R-HSA-210745	Regulation of gene expression in beta cells	2	35	0.002	0.01	0.136	1	12	0.001	
R-HSA-162710	Synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)	2	36	0.002	0.01	0.136	1	11	0.001	
R-HSA-9614085	FOXO-mediated transcription	3	110	0.008	0.01	0.136	5	85	0.007	
R-HSA-201681	TCF dependent signaling in response to WNT	4	216	0.015	0.01	0.137	9	71	0.006	
R-HSA-8878159	Transcriptional regulation by RUNX3	3	118	0.008	0.01	0.154	4	47	0.004	
R-HSA-1368108	BMAL1:CLOCK:NPAS2 activates circadian gene expression	2	42	0.003	0.01	0.157	2	20	0.002	
R-HSA-212300	PRC2 methylates histones and DNA	2	44	0.003	0.01	0.159	4	4	0.000	
R-HSA-3769402	Deactivation of the beta-catenin transactivating complex	2	44	0.003	0.01	0.159	1	14	0.001	

Pathway identifier	Pathway name	#Entities found	#Entities total	Entities ratio	Entities pValue	Entities FDR	#Reactions found	#Reactions total	Reactions ratio
R-HSA-3371568	Attenuation phase	11	47	0.003	0.00	0.00	3	5	0.00
R-HSA-3371453	Regulation of HSF1-mediated heat shock response	15	113	0.008	0.00	0.00	8	14	0.00
R-HSA-3371571	HSF1-dependent transactivation	11	59	0.004	0.00	0.00	4	8	0.00
R-HSA-8953854	Metabolism of RNA	45	782	0.0054	0.00	0.00	61	187	0.01
R-HSA-3371556	Cellular response to heat stress	15	135	0.009	0.00	0.00	13	29	0.00
R-HSA-3371511	HSF1 activation	8	43	0.003	0.00	0.01	1	7	0.00
R-HSA-8951664	Neddylation	18	241	0.017	0.00	0.05	24	31	0.00
R-HSA-8948751	Regulation of PTEN stability and activity	9	74	0.005	0.00	0.05	6	13	0.00
R-HSA-2262752	Cellular responses to stress	36	690	0.048	0.00	0.07	67	227	0.02
R-HSA-186763	Downstream signal transduction	6	37	0.003	0.00	0.09	15	16	0.00
R-HSA-8953897	Cellular responses to external stimuli	36	708	0.049	0.00	0.09	67	258	0.02
R-HSA-68867	Assembly of the pre-replicative complex	8	68	0.005	0.00	0.09	7	12	0.00
R-HSA-983168	Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	20	315	0.022	0.00	0.09	7	9	0.00
R-HSA-68882	Mitotic Anaphase	17	248	0.017	0.00	0.09	16	32	0.00
R-HSA-2555396	Mitotic Metaphase and Anaphase	17	249	0.017	0.00	0.09	16	33	0.00
R-HSA-69002	DNA Replication Pre-Initiation	9	88	0.006	0.00	0.09	15	21	0.00
R-HSA-450408	AUF1 (hnRNP D0) binds and destabilizes mRNA	7	56	0.004	0.00	0.09	3	4	0.00
R-HSA-4641257	Degradation of AXIN	7	57	0.004	0.00	0.10	6	8	0.00
R-HSA-1632852	Macroautophagy	12	150	0.010	0.00	0.10	41	87	0.01
R-HSA-6807070	PTEN Regulation	13	171	0.012	0.00	0.10	17	56	0.00
R-HSA-68827	CDT1 association with the CDC6/ORC:origin complex	7	59	0.004	0.00	0.10	3	3	0.00
R-HSA-112382	Formation of RNA Pol II elongation complex	7	63	0.004	0.00	0.14	2	2	0.00
R-HSA-72702	Ribosomal scanning and start codon recognition	7	64	0.004	0.00	0.14	2	2	0.00
R-HSA-72163	mRNA Splicing - Major Pathway	13	185	0.013	0.00	0.15	9	9	0.00
R-HSA-75955	RNA Polymerase II Transcription Elongation	7	66	0.005	0.00	0.15	8	8	0.00
R-HSA-9612973	Autophagy	12	166	0.011	0.00	0.17	52	108	0.01
R-HSA-8873719	RAB geranylgeranylation	7	68	0.005	0.00	0.17	3	5	0.00
R-HSA-674695	RNA Polymerase II Pre-transcription Events	8	88	0.006	0.00	0.17	12	17	0.00
R-HSA-2467813	Separation of Sister Chromatids	13	194	0.013	0.01	0.17	4	8	0.00
R-HSA-5658442	Regulation of RAS by GAPs	7	71	0.005	0.01	0.17	4	5	0.00
R-HSA-72737	Cap-dependent Translation Initiation	10	130	0.009	0.01	0.17	14	18	0.00
R-HSA-72613	Eukaryotic Translation Initiation	10	130	0.009	0.01	0.17	16	21	0.00
R-HSA-72695	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	6	54	0.004	0.01	0.17	3	3	0.00
R-HSA-72172	mRNA Splicing	13	196	0.014	0.01	0.17	14	14	0.00
R-HSA-1234176	Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	7	72	0.005	0.01	0.17	10	12	0.00
R-HSA-68949	Orc1 removal from chromatin	7	73	0.005	0.01	0.17	2	4	0.00
R-HSA-6807505	RNA polymerase II transcribes snRNA genes	8	94	0.006	0.01	0.19	10	11	0.00
R-HSA-5689880	Ub-specific processing proteases	13	206	0.014	0.01	0.22	8	40	0.00
R-HSA-69620	Cell Cycle Checkpoints	16	279	0.019	0.01	0.22	16	56	0.00
R-HSA-72706	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	9	120	0.008	0.01	0.22	3	3	0.00
R-HSA-5607764	CLEC7A (Dectin-1) signaling	9	120	0.008	0.01	0.22	9	45	0.00
R-HSA-9639288	Amino acids regulate mTORC1	6	61	0.004	0.01	0.22	9	12	0.00
R-HSA-5676590	NIK-->noncanonical NF-kB signaling	6	61	0.004	0.01	0.22	2	9	0.00
R-HSA-983169	Class I MHC mediated antigen processing & presentation	23	465	0.032	0.01	0.22	19	48	0.00
R-HSA-72649	Translation initiation complex formation	6	62	0.004	0.01	0.22	2	2	0.00
R-HSA-9607240	FLT3 Signaling	17	311	0.021	0.01	0.22	29	61	0.00
R-HSA-162906	HIV Infection	15	262	0.018	0.01	0.22	51	158	0.01
R-HSA-9006925	Intracellular signaling by second messengers	19	363	0.025	0.01	0.22	21	114	0.01
R-HSA-5674135	MAP2K and MAPK activation	6	63	0.004	0.01	0.22	6	8	0.00

Cluster 4

Cluster 4	R-HSA-5688426	Deubiquitination	16	288	0,020	0,01	0,22	16	77	0,01
	R-HSA-73772	RNA Polymerase I Promoter Escape	6	64	0,004	0,01	0,22	2	2	0,00
	R-HSA-5673001	RAF/MAP kinase cascade	16	290	0,020	0,01	0,22	25	39	0,00
	R-HSA-1257604	PIP3 activates AKT signaling	17	316	0,022	0,01	0,22	19	86	0,01
	R-HSA-1234174	Cellular response to hypoxia	7	85	0,006	0,01	0,22	18	20	0,00
	R-HSA-4608870	Asymmetric localization of PCP proteins	6	66	0,005	0,01	0,22	4	7	0,00
	R-HSA-72662	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	6	66	0,005	0,01	0,22	2	6	0,00
	R-HSA-5607761	Dectin-1 mediated noncanonical NF-KB signaling	6	66	0,005	0,01	0,22	2	9	0,00
	R-HSA-453279	Mitotic G1 phase and G1/S transition	11	173	0,012	0,01	0,22	16	98	0,01
	R-HSA-186797	Signaling by PDGF	7	86	0,006	0,01	0,22	24	31	0,00
	R-HSA-5684996	MAPK1/MAPK3 signaling	16	297	0,020	0,01	0,22	25	46	0,00
	R-HSA-167200	Formation of HIV-1 elongation complex containing HIV-1 Tat	5	49	0,003	0,01	0,22	4	5	0,00
	R-HSA-73779	RNA Polymerase II Transcription Pre-Initiation And Promoter Opening	4	47	0,003	0,00	0,01	5	5	0,00
	R-HSA-167162	RNA Polymerase II HIV Promoter Escape	4	52	0,004	0,00	0,01	9	9	0,00
R-HSA-167161	HIV Transcription Initiation	4	52	0,004	0,00	0,01	4	4	0,00	
R-HSA-75953	RNA Polymerase II Transcription Initiation	4	52	0,004	0,00	0,01	3	3	0,00	
R-HSA-73776	RNA Polymerase II Promoter Escape	4	53	0,004	0,00	0,01	7	7	0,00	
R-HSA-76042	RNA Polymerase II Transcription Initiation And Promoter Clearance	4	55	0,004	0,00	0,01	11	11	0,00	
R-HSA-8953854	Metabolism of RNA	12	782	0,054	0,00	0,01	52	187	0,01	
R-HSA-6803529	FGFR2 alternative splicing	3	28	0,002	0,00	0,01	4	4	0,00	
R-HSA-167172	Transcription of the HIV genome	4	81	0,006	0,00	0,01	46	47	0,00	
R-HSA-70263	Gluconeogenesis	2	34	0,003	0,00	0,049	2	25	0,002	
R-HSA-3274531	Glycogen storage disease type Ia (G6PC)	1	1	0,000	0,00	0,049	1	1	0,000	
R-HSA-70326	Glucose metabolism	2	98	0,009	0,01	0,168	2	49	0,004	
Cluster 5	R-HSA-5688426	Deubiquitination	16	288	0,020	0,01	0,22	16	77	0,01
	R-HSA-73772	RNA Polymerase I Promoter Escape	6	64	0,004	0,01	0,22	2	2	0,00
	R-HSA-5673001	RAF/MAP kinase cascade	16	290	0,020	0,01	0,22	25	39	0,00
	R-HSA-1257604	PIP3 activates AKT signaling	17	316	0,022	0,01	0,22	19	86	0,01
	R-HSA-1234174	Cellular response to hypoxia	7	85	0,006	0,01	0,22	18	20	0,00
	R-HSA-4608870	Asymmetric localization of PCP proteins	6	66	0,005	0,01	0,22	4	7	0,00
	R-HSA-72662	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	6	66	0,005	0,01	0,22	2	6	0,00
	R-HSA-5607761	Dectin-1 mediated noncanonical NF-KB signaling	6	66	0,005	0,01	0,22	2	9	0,00
	R-HSA-453279	Mitotic G1 phase and G1/S transition	11	173	0,012	0,01	0,22	16	98	0,01
	R-HSA-186797	Signaling by PDGF	7	86	0,006	0,01	0,22	24	31	0,00
	R-HSA-5684996	MAPK1/MAPK3 signaling	16	297	0,020	0,01	0,22	25	46	0,00
	R-HSA-167200	Formation of HIV-1 elongation complex containing HIV-1 Tat	5	49	0,003	0,01	0,22	4	5	0,00
	R-HSA-73779	RNA Polymerase II Transcription Pre-Initiation And Promoter Opening	4	47	0,003	0,00	0,01	5	5	0,00
	R-HSA-167162	RNA Polymerase II HIV Promoter Escape	4	52	0,004	0,00	0,01	9	9	0,00
R-HSA-167161	HIV Transcription Initiation	4	52	0,004	0,00	0,01	4	4	0,00	
R-HSA-75953	RNA Polymerase II Transcription Initiation	4	52	0,004	0,00	0,01	3	3	0,00	
R-HSA-73776	RNA Polymerase II Promoter Escape	4	53	0,004	0,00	0,01	7	7	0,00	
R-HSA-76042	RNA Polymerase II Transcription Initiation And Promoter Clearance	4	55	0,004	0,00	0,01	11	11	0,00	
R-HSA-8953854	Metabolism of RNA	12	782	0,054	0,00	0,01	52	187	0,01	
R-HSA-6803529	FGFR2 alternative splicing	3	28	0,002	0,00	0,01	4	4	0,00	
R-HSA-167172	Transcription of the HIV genome	4	81	0,006	0,00	0,01	46	47	0,00	
R-HSA-70263	Gluconeogenesis	2	34	0,003	0,00	0,049	2	25	0,002	
R-HSA-3274531	Glycogen storage disease type Ia (G6PC)	1	1	0,000	0,00	0,049	1	1	0,000	
R-HSA-70326	Glucose metabolism	2	98	0,009	0,01	0,168	2	49	0,004	
G6	R-HSA-5688426	Deubiquitination	16	288	0,020	0,01	0,22	16	77	0,01
	R-HSA-73772	RNA Polymerase I Promoter Escape	6	64	0,004	0,01	0,22	2	2	0,00
	R-HSA-5673001	RAF/MAP kinase cascade	16	290	0,020	0,01	0,22	25	39	0,00
	R-HSA-1257604	PIP3 activates AKT signaling	17	316	0,022	0,01	0,22	19	86	0,01
	R-HSA-1234174	Cellular response to hypoxia	7	85	0,006	0,01	0,22	18	20	0,00
	R-HSA-4608870	Asymmetric localization of PCP proteins	6	66	0,005	0,01	0,22	4	7	0,00
	R-HSA-72662	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	6	66	0,005	0,01	0,22	2	6	0,00
	R-HSA-5607761	Dectin-1 mediated noncanonical NF-KB signaling	6	66	0,005	0,01	0,22	2	9	0,00
	R-HSA-453279	Mitotic G1 phase and G1/S transition	11	173	0,012	0,01	0,22	16	98	0,01
	R-HSA-186797	Signaling by PDGF	7	86	0,006	0,01	0,22	24	31	0,00
	R-HSA-5684996	MAPK1/MAPK3 signaling	16	297	0,020	0,01	0,22	25	46	0,00
	R-HSA-167200	Formation of HIV-1 elongation complex containing HIV-1 Tat	5	49	0,003	0,01	0,22	4	5	0,00
	R-HSA-73779	RNA Polymerase II Transcription Pre-Initiation And Promoter Opening	4	47	0,003	0,00	0,01	5	5	0,00
	R-HSA-167162	RNA Polymerase II HIV Promoter Escape	4	52	0,004	0,00	0,01	9	9	0,00
R-HSA-167161	HIV Transcription Initiation	4	52	0,004	0,00	0,01	4	4	0,00	
R-HSA-75953	RNA Polymerase II Transcription Initiation	4	52	0,004	0,00	0,01	3	3	0,00	
R-HSA-73776	RNA Polymerase II Promoter Escape	4	53	0,004	0,00	0,01	7	7	0,00	
R-HSA-76042	RNA Polymerase II Transcription Initiation And Promoter Clearance	4	55	0,004	0,00	0,01	11	11	0,00	
R-HSA-8953854	Metabolism of RNA	12	782	0,054	0,00	0,01	52	187	0,01	
R-HSA-6803529	FGFR2 alternative splicing	3	28	0,002	0,00	0,01	4	4	0,00	
R-HSA-167172	Transcription of the HIV genome	4	81	0,006	0,00	0,01	46	47	0,00	
R-HSA-70263	Gluconeogenesis	2	34	0,003	0,00	0,049	2	25	0,002	
R-HSA-3274531	Glycogen storage disease type Ia (G6PC)	1	1	0,000	0,00	0,049	1	1	0,000	
R-HSA-70326	Glucose metabolism	2	98	0,009	0,01	0,168	2	49	0,004	

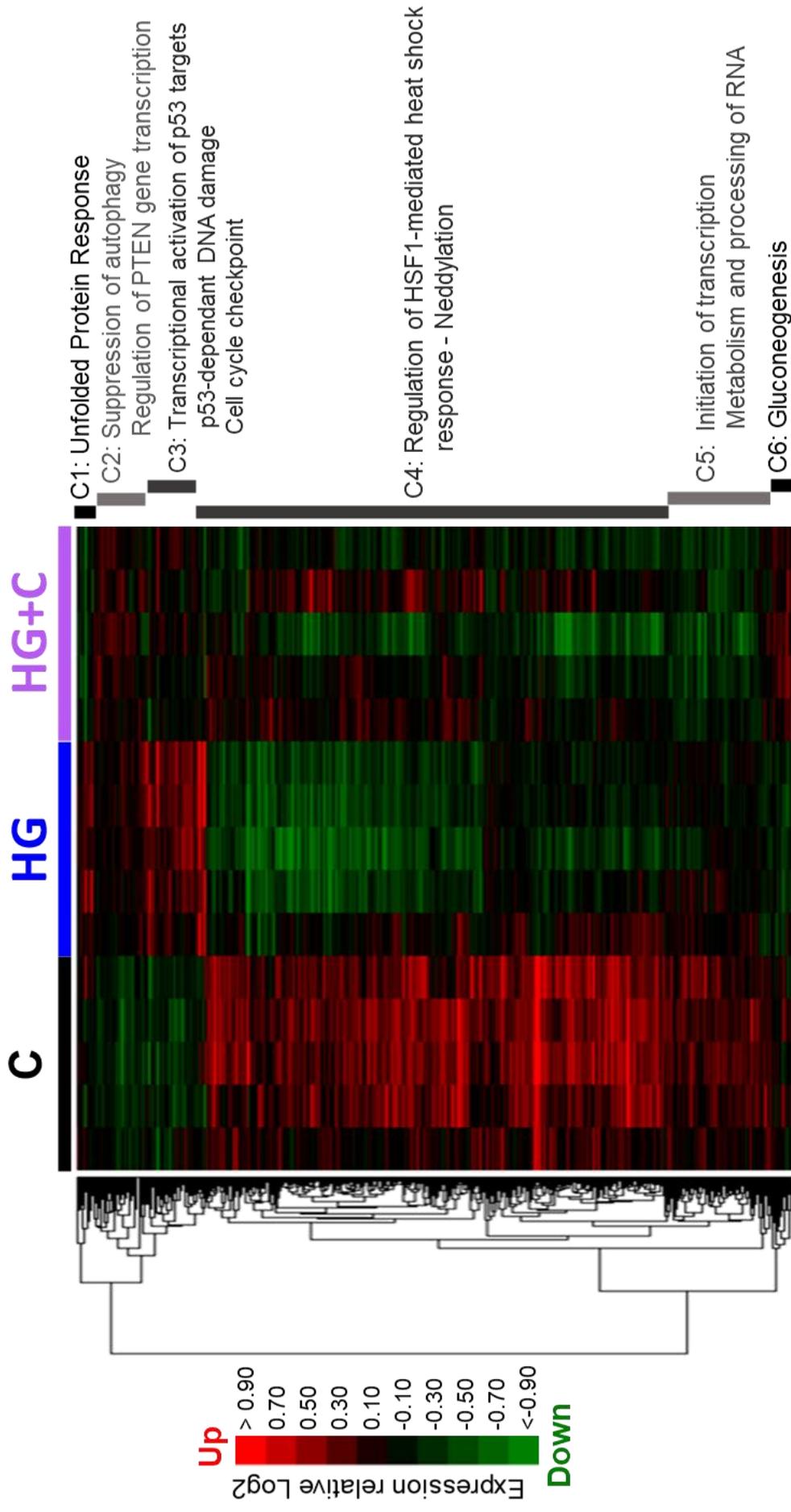


Figure 91 : Classification hiérarchique des gènes différenciellement exprimés dans le transcriptome colique des souris nourries avec le régime contrôle, hyperglucidique, et contrôle + hyperglucidique. Heat map représentant les gènes dans les groupes contrôle (C), hyperglucidique (HG) et HG+C (N = 5 dans chaque groupe). Les 6 clusters et les principales voies associées sont notés à droite.

En particulier, lorsqu'on s'intéresse aux gènes impliqués dans la réponse UPR ou dans la néoglucogénèse (clusters C1 et C6), qui étaient respectivement surexprimés et sous-exprimés chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre, nous pouvons observer que ces gènes recouvrent leurs niveaux d'expression « normaux » (ceux des souris nourries avec le régime contrôle) chez les souris ayant consommé les deux régimes (**Figure 91**). Ainsi, il semble que le **retour à un régime normal après 8 semaines de consommation du régime enrichi en sucre** permette de **corriger les perturbations** transcriptomiques concernant ces deux ensembles.

À l'inverse, les gènes impliqués dans l'autophagie (cluster C2) restent surexprimés chez les souris ayant consommé les deux régimes, tout comme les gènes liés aux protéines HSP (cluster C4) qui étaient sous-exprimés chez les souris nourries avec le régime sucré et ne restaurent pas totalement leur expression basale (**Figure 91**). Il semble donc que le retour à un régime normal ne permette qu'une **correction partielle des effets du régime hyperglucidique** pour ces gènes.

Parmi les gènes surexprimés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique, on observe le gène *Sgk1*, qui code pour une protéine kinase impliqué dans la réponse au stress cellulaire, ou encore le gène *Txndr1*, qui joue un rôle clef dans l'homéostasie redox et qui est impliqué dans la régulation de la voie PPAR- α (**Figure 92**). Ces deux gènes qui étaient surexprimés chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre sont maintenant sous-exprimés, respectivement 2,4 fois et 1,5 fois chez les souris ayant consommé les deux régimes (groupe HG+C).

De nombreux **gènes impliqués dans l'apoptose**, comme *Shisa5* ou *Cdkn1a* récupèrent, chez les souris nourries avec les deux régimes, sensiblement le même niveau d'expression que les souris nourries avec le régime contrôle en continu, alors qu'ils étaient surexprimés dans le groupe hyperglucidique (**Figure 92**).

La plupart des gènes impliqués dans l'immunité comme le gène *Jchain*, codant pour un peptide permettant de lier les anticorps IgM ou IgA et qui était surexprimé dans le groupe hyperglucidique, ne restaure pas totalement leur niveau basal d'expression. C'est le cas également de *Slamf7*, codant pour une glycoprotéine exprimée par les lymphocytes NK, et du gène *Bcl9*, associé aux leucémies, ou encore le gène *Rgs1* impliqué dans l'inhibition du chimiotactisme des lymphocytes B.

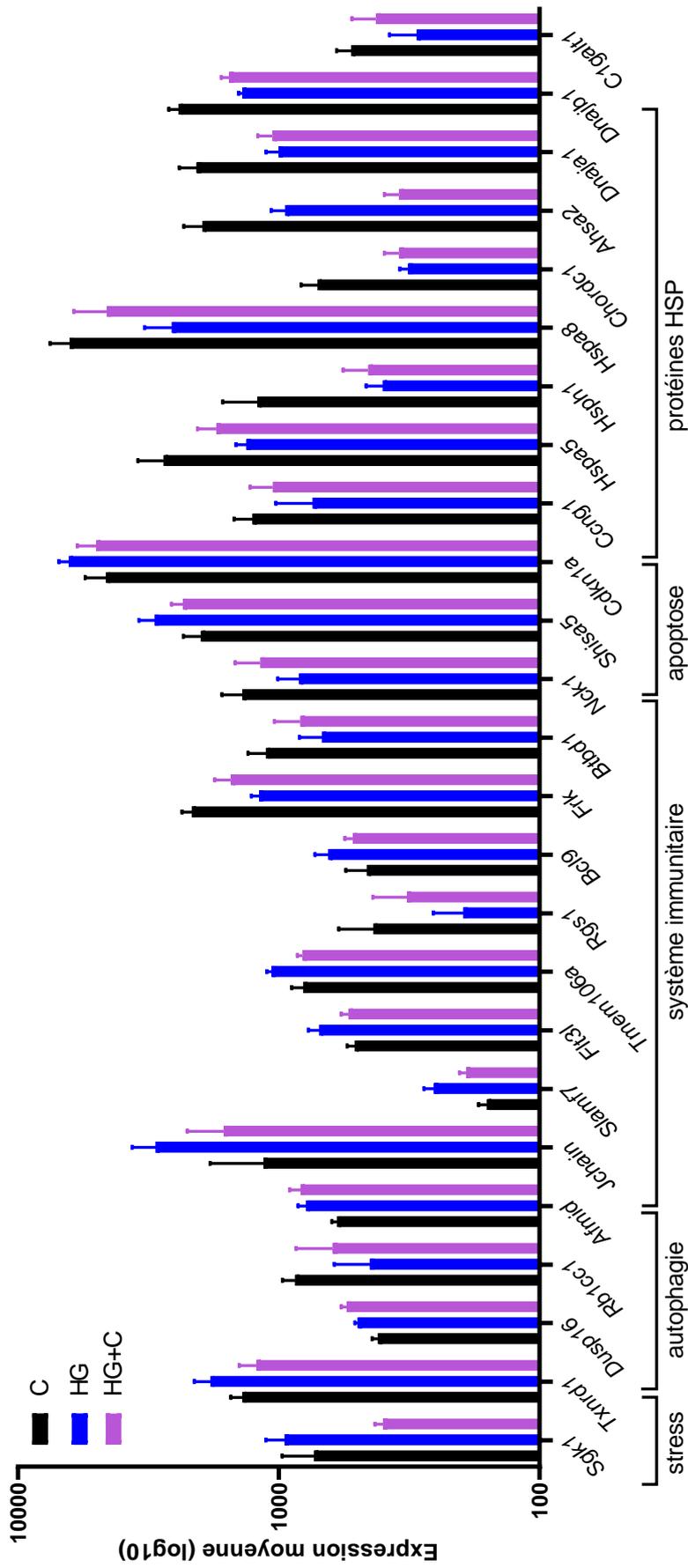


Figure 92 : Principaux gènes sur/sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris. Les diagrammes en bâtons montrent l'expression moyenne (\log_{10}) \pm déviation standard pour les gènes sur/sous-exprimés chez les souris soumises au régime contrôle (C, N = 5), hyperglycémique (HG, N = 5) ou les deux régimes (HG+C, N=5). Toutes les expressions différentielles sont significatives $FDR < 0,05$.

Aussi, nous avons précédemment observé de nombreux gènes liés aux protéines HSP, elles-mêmes impliquées dans les processus de réponse au stress et de l'autophagie. Ces gènes étaient sous-exprimés en cas de régime hyperglucidique, et visiblement ne recouvrent pas totalement leur niveau d'expression après un retour à un régime normal. C'est le cas entre autres des gènes *Hsph1*, *Hspa8*, *Hspa5*, *Chordc1* et *Ahsa2* (**Figure 92**).

Enfin, concernant le gène *Clgalt1* codant pour une enzyme appelée Core1 synthase et qui module la glycosylation de nombreuses protéines dont les mucines (MUC-1) ou le récepteur NOD2, son expression était diminuée pratiquement de moitié (1,8 fois) chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre. Après retour à un régime normal, l'expression de ce gène semble partiellement corrigée (**Figure 92**).

Concernant les annotations fonctionnelles obtenues avec OpenTargets, nous avons pu démontrer que les gènes des clusters 2 et 5 restaient **associés à des maladies immunitaires** (75 cibles) et **maladies gastro-intestinales** (60 cibles) où l'on retrouve notamment les MICI (27 cibles). Ces résultats suggèrent que les **effets délétères de la surconsommation en sucre peuvent être partiellement corrigés en réduisant l'apport** en saccharose mais certaines empreintes transcriptomiques persistent (**Tableau XIX**).

Tableau XIX : Annotations fonctionnelles des gènes dérégulés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique, contrôle ou les deux. Les associations avec les pathologies ($p < 0,01$) ont été obtenues à l'aide de la plateforme Open Targets (Filtre : nombre de cibles est > 10).

Disease full name	Relevance (p-value)	Nb of targets	Therapeutic Area	Highest associated targets (max 10)
immune system disease	0.0000	61	immune system disease	TAZ PTCH1 NDUFAF4 GATAD2B MED4 POLR2A OR2L13 PHC2 DUPD1 NUFIP1
autoimmune disease	0.0000	50	immune system disease	NDUFAF4 PTCH1 MED4 DUPD1 IQCH AFMID PKN3 LCE3C C10orf174 SIAH1
immune system cancer	0.0000	34	immune system disease, cell proliferation disorder	PTCH1 GATAD2B MTRR OCIAD1 C10orf174 TBCC WDR43 EXOSC3 PLCD1 BICRA
inflammatory bowel disease	0.0001	27	immune system disease, gastrointestinal disease	PTCH1 MED4 DUPD1 IQCH LCE3C SIAH1 TLL110 PHC2 WDR43 EXOC3
colitis	0.0002	22	immune system disease, gastrointestinal disease	PTCH1 IQCH LCE3C SIAH1 PHC2 TLL110 EXOC3 WDR43 UTP4 EXOSC3
systemic autoimmune disease	0.0004	20	immune system disease	NDUFAF4 IQCH SCAMP2 LCE3C DUSP16 TBCC TAZ RRP8 RUVBL1 POLR2C
ulcerative colitis	0.0200	20	immune system disease, gastrointestinal disease	PTCH1 IQCH LCE3C SIAH1 TLL110 EXOC3 WDR43 UTP4 EXOSC3 UBAC1
Crohn's disease	0.0900	15	immune system disease, gastrointestinal disease	IQCH MED4 LCE3C TLL110 MTRR MCRIP2 CCDC86 UBAC1 OCIAD1 TIMM10
gastrointestinal disease	0.0000	60	gastrointestinal disease	AAAS PTCH1 DUSP16 NDUFAF4 TIMM23 MED4 POLR2A TAZ PHC2 SRSF6
digestive system cancer	0.0000	49	gastrointestinal disease, cell proliferation disorder	PTCH1 DUSP16 NDUFAF4 TIMM23 TAZ SRSF6 IPO13 POLR2A GATAD2B UTP4
colorectal cancer	0.0000	41	gastrointestinal disease, cell proliferation disorder	PTCH1 DUSP16 NDUFAF4 ELP1 SIAH1 MTRR PLCD1 RUVBL1 SRSF6 POLR2A
gastroenteritis	0.0001	25	gastrointestinal disease	PTCH1 IQCH LCE3C POLR2A SIAH1 PHC2 TLL110 EXOC3 WDR43 UTP4
nutritional or metabolic disease	0.0000	54	nutritional or metabolic disease	PIGA TAZ MTRR NDUFAF4 SENP2 IP6K2 PTCH1 SMN1 PHC2 SOX5
diabetes mellitus	0.0000	37	pancreas disease, nutritional or metabolic disease	NDUFAF4 SENP2 AFMID PKN3 IQCH SMN1 PPL13 PBX4 HNRNPF CRY1
glucose metabolism disease	0.0000	36	nutritional or metabolic disease	NDUFAF4 SENP2 AFMID PKN3 IQCH SMN1 PPL13 PBX4 HNRNPF CRY1
type I diabetes mellitus	0.0000	25	pancreas disease, nutritional or metabolic disease, immune system disease, endocrine system disease	NDUFAF4 AFMID PKN3 IQCH MTRR TAZ RPP21 EXOSC3 HNRNPF SENP2
nutritional disorder	0.0030	23	nutritional or metabolic disease	MTRR NDUFAF4 PTCH1 SOX5 PPL13 SIAH1 TAZ SIAH1 IP6K2 PLCD1
overnutrition	0.0090	20	nutritional or metabolic disease	NDUFAF4 PTCH1 SOX5 PPL13 TAZ SIAH1 MTRR PLCD1 CRY1 TBCC
Disorder of lipid metabolism	0.0009	20	nutritional or metabolic disease	PIGA TAZ NDUFAF4 SOX5 PPL13 SENP2 NSUN5 SMN1 PTCH1 PLCD1
type II diabetes mellitus	0.0020	19	pancreas disease, nutritional or metabolic disease	NDUFAF4 SENP2 PBX4 MTRR PDF GF3C4 HNRNPF UBAC1 OR2L13 DUPD1
DNA repair deficiency	0.0020	17	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	NDUFAF4 PTCH1 IP6K2 PHC2 PPL13 RUVBL1 EXOSC3 MTRR TIMM23 SENP2
Disorder of energy metabolism	0.0200	15	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	TAZ NDUFAF4 SMN1 SOX5 AFMID SENP2 PPL13 ELP1 OCIAD1 NSUN5
carbohydrate metabolism disease	0.0200	14	nutritional or metabolic disease	PIGA PHC2 SOX5 ELP1 PPL13 SMN1 SENP2 AFMID NSUN5 SCAMP2
Mitochondrial disease	0.0200	14	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	TAZ NDUFAF4 SMN1 SOX5 AFMID SENP2 ELP1 NSUN5 OCIAD1 TBCC
disorder of glycosylation	0.0200	12	nutritional or metabolic disease	PIGA PHC2 SOX5 SMN1 ELP1 PPL13 NSUN5 SENP2 PTCH1 SCAMP2
Lyosomal disease	0.0050	12	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	SOX5 ELP1 NSUN5 SENP2 SMN1 SCAMP2 EXOSC3 CRY1 PTCH1 TBCC
Mitochondrial oxidative phosphorylation disorder	0.0500	11	nutritional or metabolic disease, genetic, familial or congenital disease	NDUFAF4 SMN1 SOX5 AFMID ELP1 SENP2 NSUN5 TBCC MTRR EXOSC3
cancer	0.0000	69	cell proliferation disorder	PTCH1 DUSP16 NDUFAF4 POLR2A CBX4 GATAD2B RUVBL1 POLR2C PHC2 PLCD1
carcinoma	0.0000	63	cell proliferation disorder	PTCH1 DUSP16 NDUFAF4 POLR2A CBX4 RUVBL1 POLR2C GATAD2B PHC2 HNRNPF
fibrosis	0.0080	17	cell proliferation disorder	PBX4 UTP4 SENP2 EXOSC3 PTCH1 HNRNPF TBCC MTRR PLCD1 LCE3C
infectious disease	0.0000	44	infectious disease	POLR2A DUSP16 AAAS POLR2D TAF12 POLR2C NDUFAF4 EXOSC3 SIAH1 NSUN5
viral disease	0.0002	29	infectious disease	POLR2A POLR2D AAAS NDUFAF4 POLR2C TAF12 TBCC EXOSC3 SIAH1 SENP2
bacterial disease	0.0100	17	infectious disease	DUSP16 MTRR EXOSC3 RRP8 PDF TBCC EXOC3 SMN1 PLCD1 TIMM23
digestive system infectious disease	0.0300	12	infectious disease, gastrointestinal disease	NDUFAF4 EXOSC3 SIAH1 TBCC SMN1 MTRR RPP21 CRY1 RRP8 DUPD1
injury	0.0000	35	injury, poisoning or other complication	NDUFAF4 OCIAD1 HNRNPF SIAH1 CRY1 EXOSC3 SOX5 PTCH1 PLCD1 AFMID
complication	0.0200	13	injury, poisoning or other complication	MTRR TBCC EXOSC3 PHC2 ELP1 SMN1 PIGA ATXN7L1 DUPD1 BICRA
Abnormality of the immune system	0.0001	32	phenotype	AAAS MED4 NDUFAF4 PKN3 IQCH EXOSC3 SNAPC1 MTRR TBCC DUSP16
Abnormality of metabolism/homeostasis	0.0000	31	phenotype	MTRR NDUFAF4 PHC2 EXOSC3 CRY1 TAZ EXOC3 PIGA PTCH1 AFMID
Abnormality of the digestive system	0.0020	21	phenotype	NDUFAF4 PPL13 SNAPC1 MTRR PTCH1 EXOSC3 TBCC SIAH1 RUVBL1 DUSP16
inflammation	0.0100	20	phenotype	EXOSC3 NDUFAF4 MTRR DUSP16 PTCH1 PPL13 TBCC CRY1 PLCD1 SOX5
Increased inflammatory response	0.0020	17	phenotype	NDUFAF4 PKN3 IQCH SNAPC1 ZMYND19 LCE3C TIMM23 TBCC EXOSC3 RUVBL1
Abnormality of body weight	0.0080	11	phenotype	NDUFAF4 EXOSC3 PLCD1 CBX4 PTCH1 TBCC MTRR ELP1 RPS19BP1 CRY1

3.4. Correction partielle de la dysbiose intestinale

Le microbiote fécal des souris a été analysé comme précédemment avant l'induction des régimes puis après 16 semaines de consommation des régimes. Au départ, nous avons observé que les souris contrôles avaient une plus grande diversité α que celles du groupe hyperglucidique ou du groupe des deux régimes. Ces différences se retrouvent en termes de richesse spécifique avec l'indice de Chao (**Figure 93 A**), mais pas dans l'uniformité des espèces avec l'indice de Shannon, (**Figure 93 C**) alors que les souris sont normalement identiques à ce stade, on retrouve cet effet « cage » comme précédemment.

En comparant la variation des indices entre J0 (après 16 semaines de régime) et le microbiote de départ (B), nous avons observé que les souris contrôles ne variaient pas en diversité, tandis que **les souris nourries avec le régime hyperglucidique avaient une diversité significativement plus faible** à J0 par rapport au microbiote de base (**Figure 93 B**). Quant aux souris nourries avec les deux régimes avaient une diversité plus élevée à J0 par rapport au microbiote de base pour l'indice de Chao (**Figure 93 A**), mais pas pour l'indice de Shannon (**Figure 93 B**).

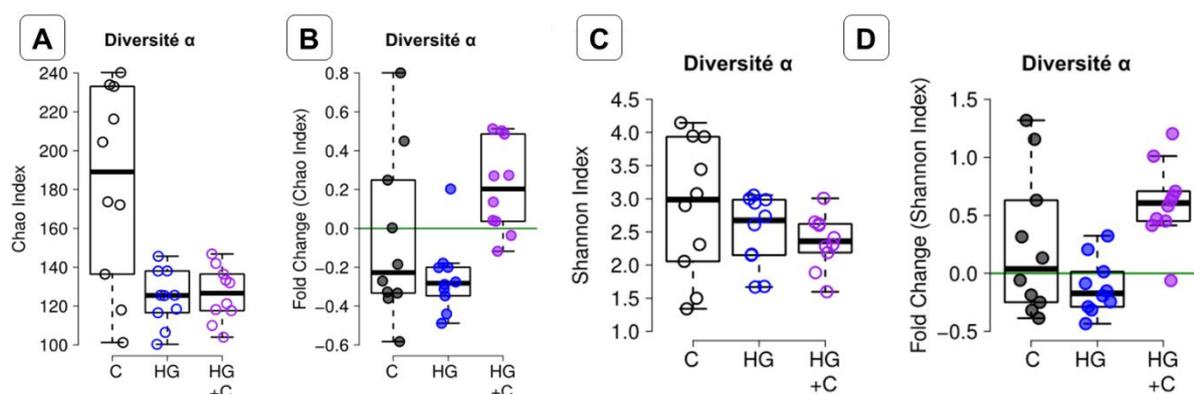


Figure 93 : Influence des régimes alimentaires sur l'alpha-diversité du microbiote fécal. La diversité alpha est mesurée par les indices de Chao (A) et de Shannon (C) chez les souris ayant consommé le régime contrôle (C, N = 10) ou le régime hyperglucidique (HG N = 10) ou les deux régimes (HG+CD, N=10) avant l'induction des régimes alimentaires (microbiote de base noté B). L'évolution de la richesse des espèces bactériennes (C et D) est mesurée par la variation (fold change) des indices à J0 (après 8 semaines de régimes) par rapport au microbiote de base. Les analyses statistiques sont présentées dans le Tableau XX.

De même, nous avons observé une forte corrélation entre le régime alimentaire et la β -diversité du microbiote de base (« effet cage »), les souris contrôles présentant des différences majeures par rapport aux deux autres groupes, avec une variance supérieure à 36% pour l'indice de Jaccard (**Figure 94 A**) et supérieure à 30% pour l'indice de Bray-Curtis (**Figure 94 B**).

Fait intéressant, à J0, les trois groupes étaient significativement différents les uns des autres, mais **les souris nourries avec le régime enrichi en sucre ont montré la distance la plus élevée par rapport aux deux autres**. De plus, au sein des groupes de régime, nous avons observé que les souris nourries avec les deux régimes avaient le changement le plus profond, avec une variance supérieure à 44%, tandis que pour les souris nourries uniquement avec le régime contrôle avaient une variance inférieure à 27%, et celles nourries avec le régime hyperglucidique inférieure à 23% (**Figure 94**).

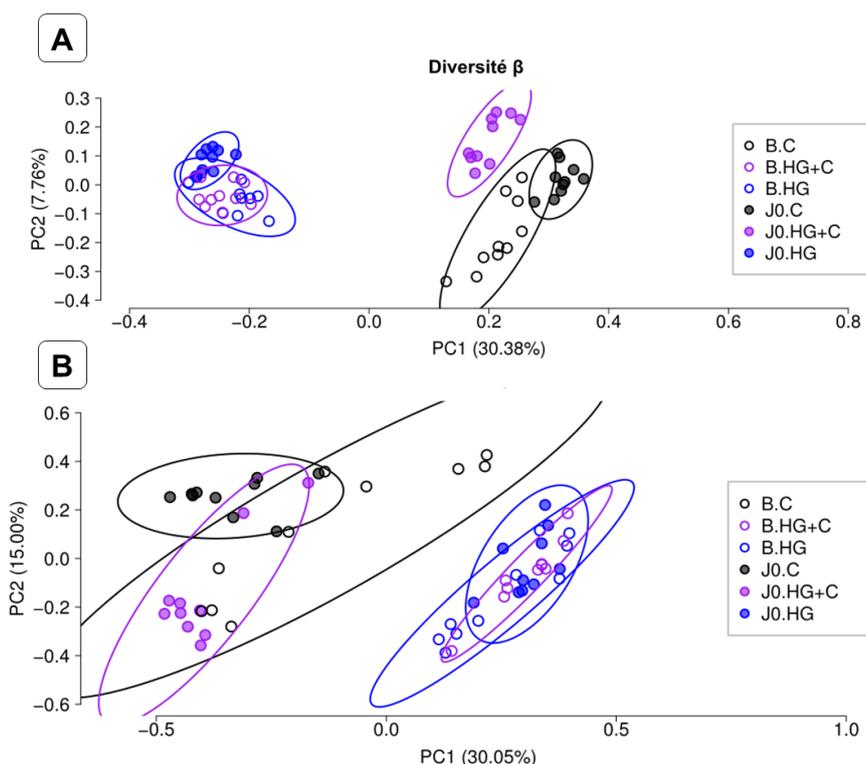


Figure 94 : Influence des régimes alimentaires sur la beta-diversité du microbiote fécal. Analyse en composante principale représentant l'évolution des indices de Jaccard (A) et de Bray-Curtis (B) chez les souris ayant consommé le régime contrôle (C, N = 10) ou le régime hyperglucidique (HG N = 10) ou les deux régimes (HG+CD, N=10) avant et après la consommation des régimes alimentaires. Les analyses statistiques sont présentées dans le Tableau XX.

Ces résultats indiquent que la consommation au long court (16 semaines) **réduit la biodiversité du microbiote intestinal** mais également que le **retour à un régime alimentaire normal après une exposition au sucre peut améliorer la diversité α et β** , proche de celles des souris nourries uniquement avec le régime contrôle.

De manière cohérente, nous avons pu identifier 35 indicateurs d'espèces, définis comme des OTUs dont l'abondance / prévalence était significativement associée au régime alimentaire à J0 mais pas au départ (B), et dont la variation (fold change) était également associée au régime de façon significative (**Figure 95 A**).

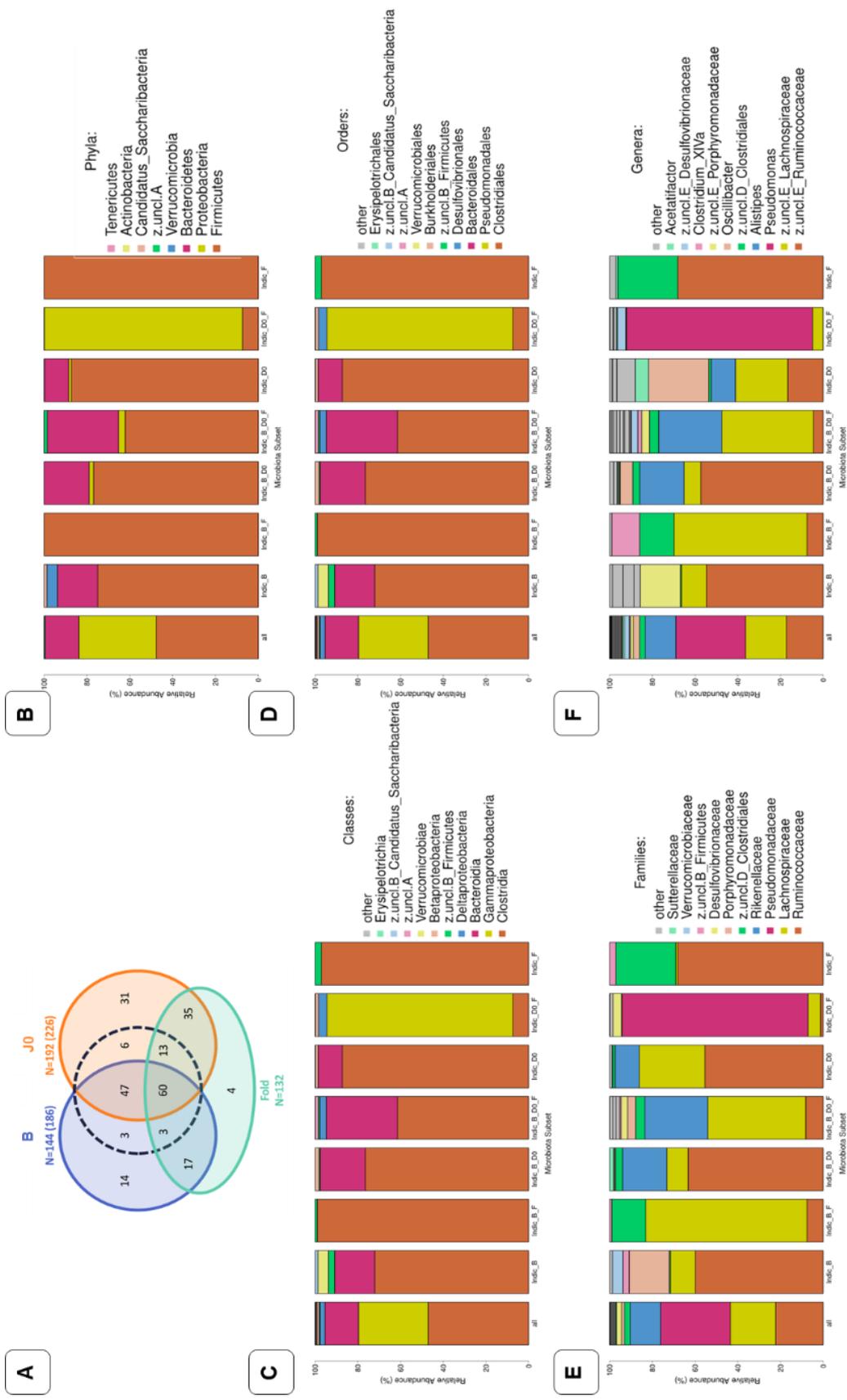


Figure 95 : Composition du microbiote intestinal selon le régime alimentaire consommé (hyperglucidique, contrôle ou les deux). Biomarqueurs d'espèces (A) Diagramme de Venn des OTU identifiés comme significativement associées au régime alimentaire dans le microbiote de base, après consommation des régimes et variation (fold change). Pour JO et B, le nombre se réfère aux OTU associées au régime avec une valeur p comprise entre [0,05 et 0,10], elles sont indiquées dans le graphique par la ligne noire en pointillés. Comparaison de la composition microbienne (B) de l'ensemble de la communauté bactérienne (« all ») et des sous-ensembles (C-F).

Tableau XX : Correction partielle de la dysbiose intestinale provoquée par le régime hyperglucidique. Pour les corrélations entre les indices de diversité α (Chao et Shannon) et les paramètres expérimentaux, un test des rangs signé de Wilcoxon a été utilisé. Pour les indices de β -diversité (Bray-Curtis et Jaccard), les corrélations avec les paramètres expérimentaux ont été évaluées avec une analyse de variance multivariée (MANOVA).

Diversité α		p-value indice		p-value of variation (fold change)		
		Chao	Shannon	Chao	Shannon	
C vs HG+C	B	0,0290	0,3374	NA	NA	
	J0	0,0010	0,0083	0,0786	0,1729	
C vs HG	B	0,0253	0,4913	NA	NA	
	J0	0,0000	0,0001	0,4429	0,4200	
HG+C vs HG	B	0,8534	0,6102	NA	NA	
	J0	0,0000	0,0001	0,0025	0,0009	
B vs J0	C	0,4670	0,7959	0,4429	1,0000	
	HG+C	0,0134	0,0001	0,0295	0,0043	
	HG	0,0028	0,3374	0,0043	0,1729	
Diversité β		p,value indice		Variance		
		Bray-Curtis	Jaccard	Bray-Curtis	Jaccard	
C vs HG+C	B	0,0001	0,0001	30,8%	38,4%	
	J0	0,0004	0,0001	37,9%	29,2%	
C vs HG	B	0,0003	0,0002	30,4%	36,0%	
	J0	0,0001	0,0002	69,4%	53,6%	
HG+C vs HG	B	0,3427	0,1889	5,4%	6,2%	
	J0	0,0001	0,0001	57,7%	47,3%	
B vs J0	C	0,0001	0,0002	26,8%	21,8%	
	HG+C	0,0001	0,0001	54,9%	44,5%	
	HG	0,0154	0,0001	17,9%	22,3%	
Biomarkers		Otu036	Otu044	Otu052	Otu146	Otu194
Microbiote de base B	p-value test (1)	0,2943	0,8073	0,0497	0,4579	0,0005
	p-value test (2)	0,8863	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	p-value test (3)	0,5009	0,5077	0,0446	0,4928	0,0003
	p-value test (4)	0,0764	1,0000	0,8742	0,6875	0,0011
	force corrélation test (1)	11,0%	2,0%	26,2%	7,4%	68,2%
	force corrélation test (2)	8,5%	2,9%	0,2%	15,0%	0,0%
	force corrélation test (3)	27,2%	26,3%	53,5%	27,7%	85,3%
	force corrélation test (4)	75,0%	59,6%	45,8%	38,4%	89,4%
	test (4) spécificité	56,2%	35,5%	35,0%	73,9%	100,0%
	test (4) sensibilité	100,0%	100,0%	60,0%	20,0%	80,0%
test (4) groupe associé	C	HG+C	HG+C	HG+C	C	
Après 8 semaines de régime J0	p-value test (1)	0,0001	0,0003	0,0001	0,1086	0,0005
	p-value test (2)	0,0205	0,0375	1,0000	0,2456	0,8265
	p-value test (3)	0,0002	0,0089	0,0000	0,1221	0,0001
	p-value test (4)	0,0006	0,0317	0,0006	0,1701	0,0039
	force corrélation test (1)	82,5%	66,8%	91,6%	17,7%	62,1%
	force corrélation test (2)	66,8%	49,5%	0,0%	51,0%	4,6%
	force corrélation test (3)	85,3%	63,2%	100,0%	42,6%	88,2%
	force corrélation test (4)	89,3%	75,1%	100,0%	59,6%	78,0%
	test (4) spécificité	79,8%	56,4%	100,0%	88,9%	60,9%
	test (4) sensibilité	100,0%	100,0%	100,0%	40,0%	100,0%
test (4) groupe associé	C	C	HG	HG	C	
Fold Change	p-value test (1)	0,0142	0,0031	0,0008	0,3545	0,0158
	force corrélation test (1)	39,4%	53,7%	69,8%	9,5%	37,6%
Taxonomie	Phylum	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Bacteroidetes
	Classe	Clostridia	Clostridia	Clostridia	Clostridia	Bacteroidia
	Ordre	Clostridiales	Clostridiales	Clostridiales	Clostridiales	Bacteroidales
	Famille	unclassified	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Porphyromonadaceae
	Genre	unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	Barnesiella

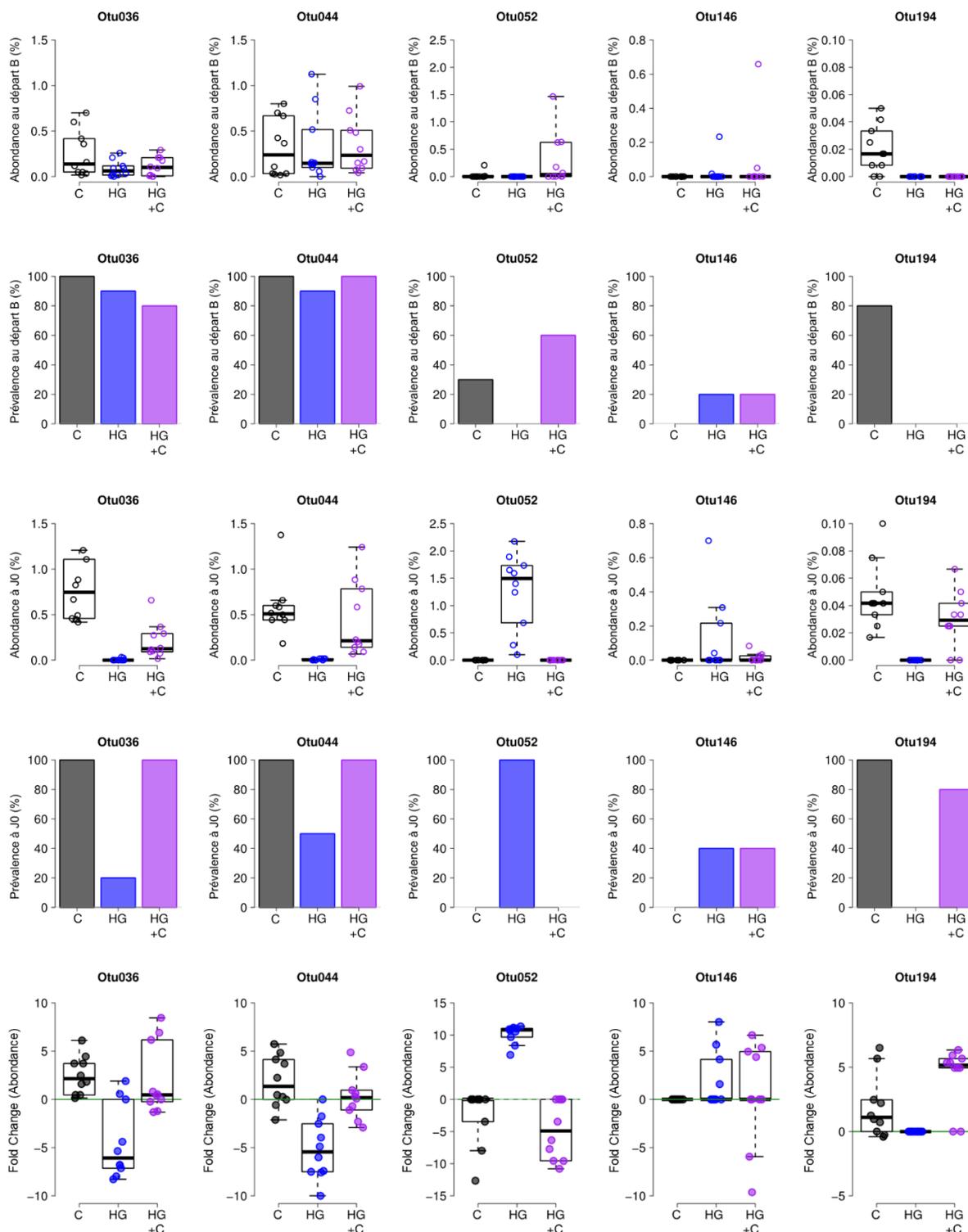


Figure 96 : Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) identifiées comme modifiées par le régime alimentaire. Abondance, prévalence correspondante et variation de l'abondance des OTUs avant la consommation des régimes alimentaires (microbiote de base noté B) et après 16 semaines de régime alimentaire (à J0) chez les souris nourries avec le régime contrôle (C, N = 10) ou le régime hyperglucidique (HG N = 10) ou les deux régimes (HG+CD, N=10).

Parmi ces 35 biomarqueurs, l'Otu044 avait été précédemment identifié comme fortement impacté après 8 semaines de consommation du régime hyperglucidique. Ce biomarqueur n'a pas montré de corrélation avec le régime au départ, alors que son abondance et sa prévalence ont significativement diminué à J0 chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique durant 16 semaines, et sont restées stables chez les souris qui ont consommés les deux régimes.

Lors du protocole précédent, les indicateurs Otu036, Otu052 et Otu194 ont montré un profil intéressant chez les souris ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 semaines avant de revenir à un régime normal : ils sont proches des souris témoins (et opposées aux souris ayant consommé uniquement le régime enrichi en sucre durant 16 semaines), malgré la différence initiale des groupes entre les différents régimes (**Figure 96**).

Ces résultats confirment tout d'abord que le régime hyperglucidique a bien un impact fort et constant sur le microbiote intestinal qu'il soit consommé durant 8 ou 16 semaines étant donné que 4 des 5 biomarqueurs ont un schéma similaire. De plus, le retour à un régime normal permet de restaurer partiellement la dysbiose intestinale provoquée par le régime hyperglucidique.

4. Effet différentiel du glucose et du fructose *in cellulo*

Nous avons étudié l'effet du sucre sur les cellules intestinales Caco-2 afin d'évaluer l'effet différentiel du glucose et du fructose, deux molécules composant le saccharose que l'on retrouve dans l'alimentation hyperglucidique des souris.

4.1. Architecture cellulaire

La protéine ZO-1 est l'une des nombreuses protéines des jonctions cellulaires liant les protéines transmembranaires (occludine et claudine) des cellules épithéliales et garantissant l'intégrité de la barrière intestinale. Nous avons ainsi pu observer que les jonctions étaient fortement altérées après 24 heures d'exposition à un milieu contenant 1 g/L de fructose (**Figure 97 B**). L'architecture cellulaire est perturbée et les cellules ont un aspect plus sinueux comparativement au témoin (glucose 1g/L correspondant aux conditions de culture classique des cellules ; **Figure 97 A**). Cet effet est moins visible lorsque les cellules sont exposées à un mélange équimolaire de glucose et de fructose (**Figure 97 C**).

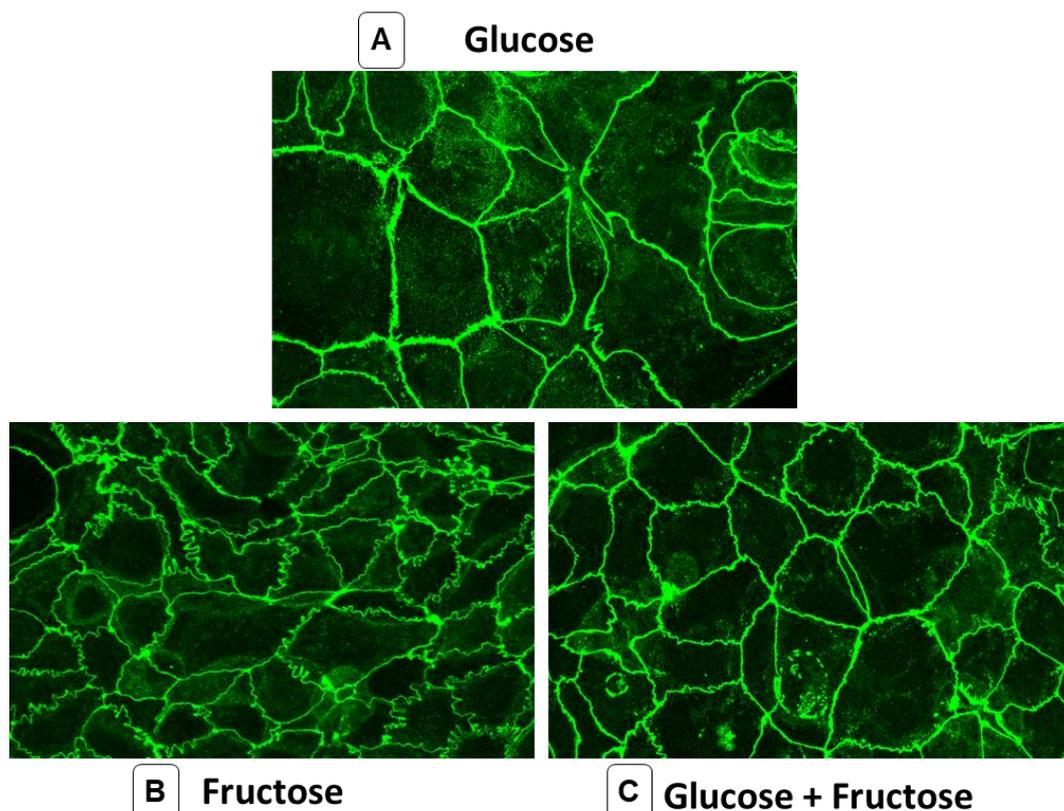


Figure 97 : Marquage de la protéine ZO-1 après exposition 24 heures à différents sucres. Les cellules ont été exposées durant 24 heures à un milieu contenant 1 g/L de glucose (condition normale de culture utilisée comme témoin), de fructose ou à un mélange des deux avant de réaliser un marquage immunofluorescent des protéines ZO-1 puis observées au microscope à confocal.

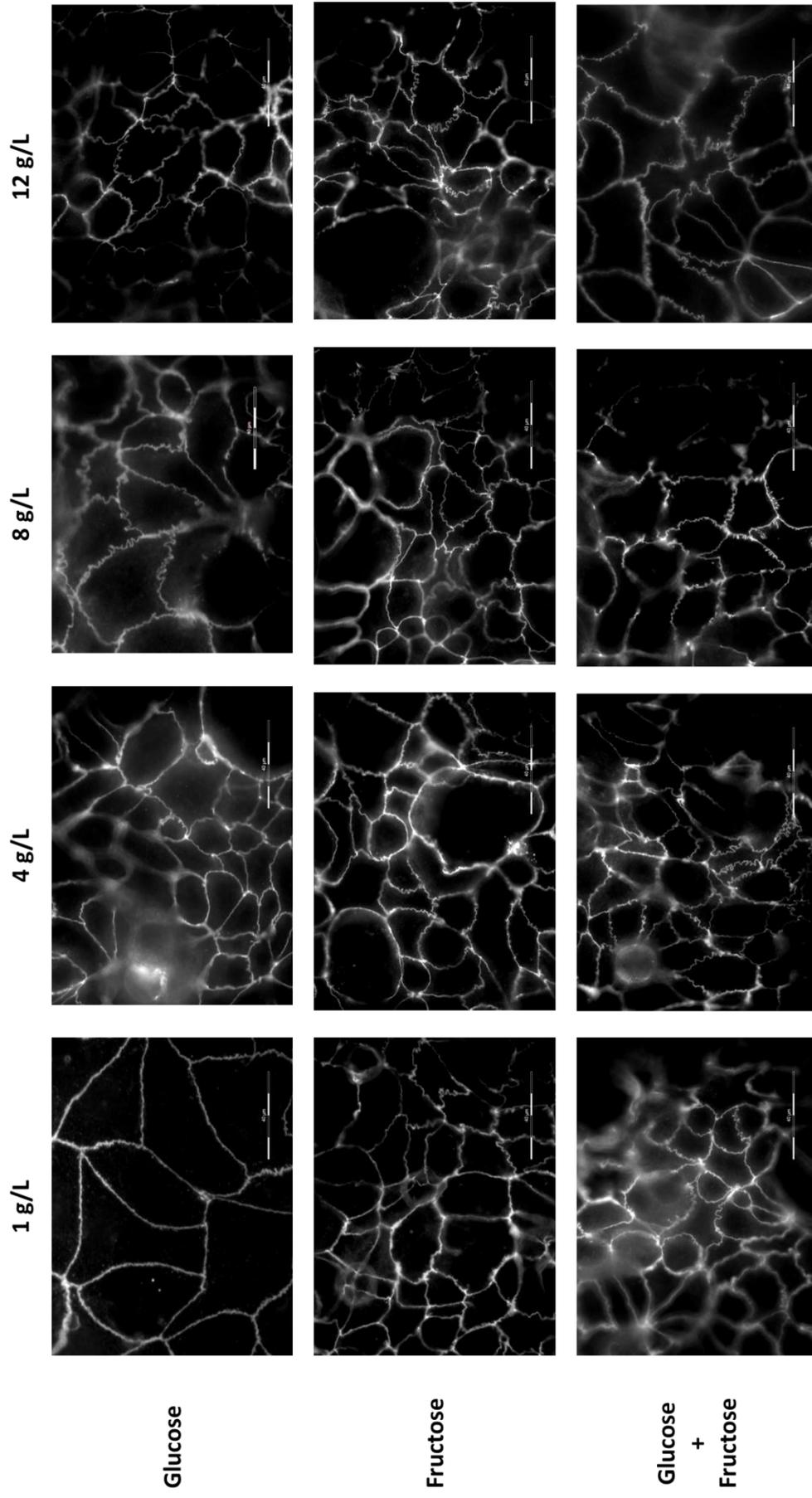


Figure 98 : Marquage de la protéine ZO-1 après exposition à des doses croissantes de glucose, fructose ou glucose + fructose. Les cellules ont été exposées 24 heures à différentes doses de sucre puis après marquage immunofluorescent, elles ont été observées au microscope à épifluorescence. Échelle 40 µm.

Puis, nous avons exposé les cellules à des doses croissantes (1, 4, 8 et 12 g/L) de glucose, fructose ou un mélange des deux. Conformément à la littérature, de fortes doses de glucose (8 g/L) provoquent des altérations importantes des jonctions cellulaires, reflétées par l'apparence tortueuse des cellules. De façon intéressante, de faibles doses de fructose sont nécessaires pour observer des altérations similaires (*Figure 98*).

4.2. Perméabilité

Nous avons ensuite étudié la perméabilité à l'aide de plaques transwell®. Après 24 heures, la quantité de FITC dans le compartiment basolatéral était significativement plus importante dans les puits où le milieu était enrichi en fructose (*Figure 99*). Ainsi, la perméabilité paracellulaire est augmentée après exposition à une forte dose de fructose confirmant l'altération de la barrière observée précédemment.

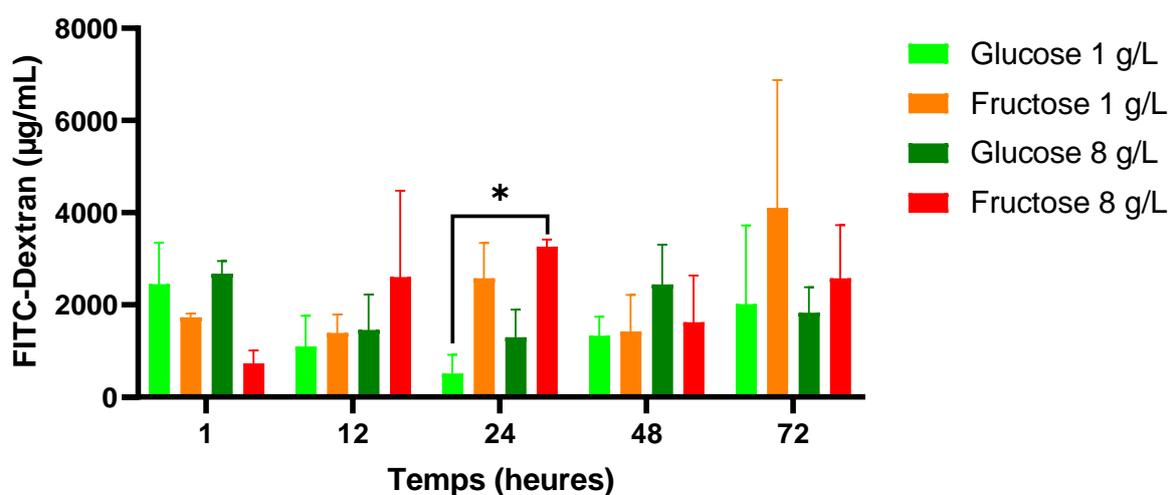


Figure 99 : Effet de la concentration en sucre (glucose ou fructose) sur la perméabilité du tapis cellulaire. Après avoir obtenu un tapis confluent (TEER > 300 Ω au 15^{ème} jour environ) les cellules sont exposées 24 heures à des milieux enrichis en glucose ou en fructose puis la perméabilité est mesurée à l'aide d'un marqueur fluorescent. Les résultats présentés correspondent aux moyennes calculées ± erreur standard pour chacun des groupes (N=3). La significativité des différences observées entre les groupes a été établie par ANOVA avec correction de Tukey pour les comparaisons multiples ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).*

Partie 5
DISCUSSION

Alors que l'alimentation joue un rôle important dans la pathogénie des MICI depuis plusieurs années, aucun facteur nutritionnel précis avec un rôle clairement établi n'a pu être identifié (Ananthakrishnan *et al.*, 2018; Racine *et al.*, 2016). Ainsi, l'ensemble des recommandations nationales et internationales n'ont pu identifier de régime d'exclusion spécifique (Hébuterne, 2019).

En 2019, la Haute Autorité de Santé stipulait que « l'alimentation n'influe pas sur le cours de la maladie, il n'est donc pas nécessaire d'imposer un régime particulier » (HAS, 2019). De même, le CREGG (Club de réflexion des cabinets et groupes d'hépto-gastroentérologie), la Société Européenne de Nutrition Clinique et Métabolisme (ESPEN), tout comme la Société Francophone de Nutrition Clinique et Métabolisme (SFNCM), rappellent qu'il n'existe pas de « régime MICI » et recommandent à ce jour de veiller à prendre en charge la dénutrition et les carences en micronutriments (Schneider, 2018).

Plus récemment encore, l'IOIBD (*International Organization for the study of Inflammatory Bowel Disease*) publiait des recommandations diététiques concernant la consommation de graisses, d'alcool, de viande ou de fruits et légumes mais soulignait le manque de preuves concernant les sucres raffinés en raison de l'absence d'essai contrôlé randomisé (Levine *et al.*, 2020).

La surconsommation de sucre dans l'alimentation occidentale est pourtant liée à une augmentation de nombreuses maladies non transmissibles (Cordain *et al.*, 2005; Evans, 2017; Geneva : World Health Organization, 2015; Lustig *et al.*, 2012). Malgré l'intérêt croissant de la communauté scientifique et médicale sur le sujet, les effets directs du sucre sur l'homéostasie intestinale restent peu décrits.

C'est la raison pour laquelle mon travail a été d'étudier les liens entre apport alimentaire excessif en sucre et inflammation intestinale. Les effets délétères du sucre tant sur le plan des pathologies humaines que son effet délétère sur l'intestin sain restant mal connu nous avons choisi un modèle murin et une lignée cellulaire humaine.

1. Effet sexe-dépendant de la consommation des régimes hypercaloriques

1.1. Effets différentiels des régimes hyperlipidique et hyperglucidique

Des souris mâles et femelles ont été soumises à deux types de régimes hypercaloriques (enrichi en graisse ou en sucre) durant 8 semaines.

La consommation du régime enrichi en sucre a été suivie chez les mâles d'une prise de poids plus rapide qu'avec le régime contrôle, ayant permis de constater visuellement le surpoids dès 5 semaines de régime. La mesure des paramètres biologiques sanguins a montré chez ces animaux une hyperlipémie (lipides totaux, cholestérol et triglycérides), confirmant l'impact métabolique de l'excès calorique. Cette hausse de la lipémie peut s'expliquer par une hausse de la quantité d'acétyl-coA produit par la glycolyse, l'activation de la lipogenèse produisant des triglycérides et de la voie du mévalonate et des dérivés isopréniques, précurseurs du cholestérol (Mahmood *et al.*, 2016).

En revanche, aucune modification de la glycémie n'a été mise en évidence chez ces animaux. Dans la littérature, les études *in vivo* décrivent généralement des hyperglycémies après 16 semaines de régimes (Williams *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2018). De plus, le prélèvement de sang n'a pas été réalisé sur un tube contenant un anti-glycolytique (fluorure de sodium ou monoiodoacétate de sodium) mais seulement sur tube hépariné. Or le délai entre le prélèvement et l'analyse aurait nécessité ces conservateurs (Foucher *et al.*, 2004). Nous expliquons cependant la possible constance de la glycémie dans nos modèles animaux par une durée de régime trop courte pour provoquer une incapacité de l'organisme à réguler la glycémie. Il serait par ailleurs intéressant de réaliser un test de résistance à l'insuline pour définir comment la sécrétion de cette hormone est impactée par nos régimes (Jørgensen *et al.*, 2017).

La consommation du régime enrichi en graisses est apparue inférieure à celle du régime de référence chez les mâles. L'apport excessif de lipides pourrait avoir un effet anorexigène et expliquer cette baisse de la prise alimentaire (Romano *et al.*, 2014). Une analyse des peptides tels que la cholécystokinine (CCK), le peptide YY (PYY) et/ou le glucagon like peptide-1 (GLP-1) serait intéressante pour évaluer les effets anorexigènes de ce régime. Quoi qu'il en soit, chez les mâles, ce régime a eu les mêmes effets que le régime hyperglucidique au niveau de la prise de poids, des modifications morphologiques et des marqueurs biologiques sanguins.

En revanche, la consommation par les femelles des régimes hypercaloriques n'a pas été suivie d'une prise de poids significative. Les paramètres biochimiques sanguins n'ont pas encore été quantifiés et leurs mesures pourraient apporter une explication à ce résultat. Toutefois, ces premiers résultats confortent les résultats de l'étude de Dobner *et al.* où les mâles ont été plus sensibles que les femelles aux effets délétères de régimes riches en graisses. De plus, le caractère juvénile des souris semble jouer un rôle dans la « protection » des femelles face à la prise de poids (Dobner *et al.*, 2017; Salinero *et al.*, 2018; Saqui-Salces *et al.*, 2017).

1.2. Effets différentiels des régimes sur la colite chimio-induite

Alors qu'en l'absence d'agent colitogène, la consommation des régimes hypercaloriques n'a pas entraîné de modification du score clinique d'inflammation (DAI), l'examen endoscopique a mis en évidence l'existence de lésions de la muqueuse intestinale des souris mâles et femelles quel que soit le régime hypercalorique. En revanche, la quantification des marqueurs pro-inflammatoires dans la muqueuse colique n'a pas permis de mettre en évidence d'augmentation significative chez les mâles. Ces cytokines inflammatoires étant destinées à la circulation générale, elles ne sont présentes qu'en petite quantité dans les tissus, le western blot n'est pas la méthode la plus sensible pour les étudier. Des études par immunodosage multiplex sur plasma et sur tissus seront réalisés sur le protocole suivant, cette méthode étant plus performante que le Western Blot pour l'analyse des cytokines (Erkens *et al.*, 2018).

Conformément à nos travaux antérieurs, l'administration de DSS aux souris ayant consommé le régime contrôle a conduit à une hausse du score inflammatoire à partir du 6^{ème} jour, cet effet a été confirmé à J10 par l'examen coloscopique et la hausse du score histologique, ce qui est conforme à la littérature (Chassaing *et al.*, 2014; Kökten *et al.*, 2018).

Chez les mâles comme les femelles, la consommation du régime hyperglucidique a permis l'observation de signes cliniques de la colite chimio-induite de façon plus précoce qu'avec le régime de référence, ce qui avait été décrit mais avec des régimes riches en graisses dont la teneur en saccharose est de l'ordre de 10 à 15% (Ma *et al.*, 2007).

En revanche, la consommation du régime hyperlipidique a eu des conséquences plus sévères chez les femelles que le régime hyperglucidique (apparition plus précoce des signes cliniques et sévérité de la colite plus importante) alors que nous avons observé l'inverse chez les mâles.

De même, alors qu'aucun marqueur inflammatoire n'a montré de différence significative chez les mâles, nous avons pu observer une augmentation de l'IL-10 chez les femelles après consommation du régime hyperglucidique.

Cette différence de réponse au traitement colitogène après consommation du régime enrichi en graisses entre mâles et femelles suggère que le mécanisme inflammatoire pourrait différer selon le sexe, d'autant que la prise de poids a été faible chez ces dernières après consommation des régimes hypercaloriques. Cela peut s'expliquer par l'effet anorexigène genre-dépendant des interleukines et des LPS (Señarís *et al.*, 2011).

Il est légitime également d'envisager un impact hormonal sur l'activation des mécanismes pro-inflammatoires distincts, d'autant qu'il est décrit que certains polyphénols, ayant des effets protecteurs vis-à-vis des MICI, ont un effet sexe-dépendant (Wagnerova *et al.*, 2017).

Finalement, ces travaux montrent clairement que nous ne pouvons pas étudier l'effet de l'apport alimentaire sans considérer séparément les mâles et les femelles. L'œstradiol est en effet décrit comme un facteur préventif de l'accumulation des graisses et retardant la résistance à la leptine chez les femelles (Litwak *et al.*, 2014). De même concernant le diabète de type 1, il existe un dimorphisme sexuel qui peut s'expliquer en partie par le microbiote intestinal : chez des souris prédisposées (modèle NOD diabétique non obèse) la fréquence du diabète est identique chez les mâles et les femelles lorsque les souris sont maintenues en conditions axéniques (exempt de tous germes) (Yurkovetskiy *et al.*, 2013).

1.3. Implication de l'autophagie

L'autophagie étant un mécanisme important dans le processus pathologique des MICI (Pott et Maloy, 2018; Wang *et al.*, 2018), nous avons étudié l'expression de marqueurs clefs dans la muqueuse colique des souris. L'impact des régimes hypercaloriques sur l'effet du DSS a été observé au niveau de plusieurs protéines de l'autophagie, suggérant que la macro-autophagie puisse être un élément important à prendre en considération. La baisse de l'activité autophagique (diminution de ATG5, ATG13 et ATG16L1) pourrait limiter l'élimination des épitopes microbiens et entretenir l'activation du mécanisme immunitaire. Une étude suggère par exemple le rôle protecteur de ATG16L1 (nécessaire à la formation de l'autophagosome) dans les cellules dendritiques dans un modèle de colite au DSS (Zhang *et al.*, 2017).

Cependant nos résultats sont discordants puisque nous avons observé une diminution des marqueurs ATG13 et ATG5 et HSP90 qui n'a pas pu être répliqué. Nous retrouvons ensuite une augmentation du marqueur ATG5 lorsque nous répliquons les expériences ce qui semble cohérent puisque l'augmentation d'expression de certaines protéines comme HSPA8 et ATG5 marquerait une hausse de l'activité autophagique qui pourrait conduire à une sur-représentation antigénique et exacerber l'inflammation (Pott et Maloy, 2018).

De même, chez les femelles, aucune différence significative n'a été observée mais les expériences n'ont pu être réalisées qu'une seule fois, et uniquement chez les animaux soumis au régime hyperglucidique et contrôle puisque deux animaux sont décédés avec le régime hyperlipidique. Nous avons choisi de poursuivre la suite des expériences chez les mâles étant donné le temps imparti mais nos conclusions seront vérifiées dans un second temps chez les femelles pour étudier plus précisément l'effet différentiel observé chez les mâles et les femelles.

1.4. Perte de diversité du microbiote intestinal

La dysbiose intestinale est l'un des facteurs clés de la pathogénie des MICI. Cette dernière a été très étudiée ces dernières années puisqu'elle est elle-même modulée par de nombreux facteurs environnementaux (Miyoshi et Chang, 2017; Miyoshi *et al.*, 2018; Nell *et al.*, 2010; Rajca *et al.*, 2014; Sokol *et al.*, 2006). Nous avons souhaité étudier l'influence du sucre et du gras séparément sur le microbiote intestinal. En effet, la plupart des études liant alimentation et le microbiote chez la souris étudient des régimes dits « *Western Diet* » riches en gras et en sucre mais sans connaître le rôle précis de chacun de ces nutriments (Statovci *et al.*, 2017).

Nous avons observé une baisse de la biodiversité du microbiote avec les différents régimes, conformément à la littérature, bien que la plupart des régimes utilisés chez la souris aient une teneur moindre en sucre (15 à 25%) mais ont démontré une diminution significative des métabolites microbiens comme le butyrate et le propionate (Liu *et al.*, 2017a).

Les selles des femelles n'ont pas encore été étudiées mais nous attendons également des différences par rapport aux mâles puisque des données suggèrent que des différences immunitaires contribuent à la sélection d'un microbiote intestinal spécifique genre-dépendante qui, à son tour provoque des différences de réponse immunitaire entre les sexes (Fransen *et al.*, 2017).

2. Effet du sucre sur l'inflammation intestinale

Le protocole préliminaire ayant montré un effet aggravant et précoce des régimes hypercaloriques (enrichis en sucre et en graisses), nous avons décidé de nous focaliser uniquement sur le régime hyperglucidique, afin de comprendre l'impact spécifique du sucre dans les régimes occidentaux. En effet, les études s'intéressant au rôle du sucre dans un contexte de MICI chez l'Homme sont peu nombreuses, anciennes (Järnerot *et al.*, 1983; Porro et Panza, 1985; Silkoff *et al.*, 1980) et avec des résultats contradictoires (Khalili *et al.*, 2019; Riordan *et al.*, 1998).

Chez la souris, les études sont plus nombreuses mais la teneur en sucre des régimes, le mode d'administration des sucres ou le modèle transgénique utilisé rends les conclusions délicates (**Tableau XXI**). Récemment, une étude a démontré que l'hyperglycémie chez la souris augmentait le risque d'infection en perturbant la barrière intestinale (Thaiss *et al.*, 2018) mais les auteurs ont travaillé sur des modèles de diabète en utilisant des souris transgéniques obèses ou *via* l'injection de streptozotocine provoquant des hyperglycémies très importantes. Les auteurs précisaient d'ailleurs en discussion que leurs résultats devaient être vérifiés dans un contexte d'hyperglycémie induite par l'alimentation en suggérant que des résultats similaires pourraient être observés.

Tableau XXI : Études liant le métabolisme glucidique à l'inflammation intestinale chez la souris

Étude	Modèle	Glycémie	Conclusions
(Thaiss <i>et al.</i> , 2018)	Diabète par injection de streptozotocine	6 g/L	Hyperglycémie altère la barrière intestinale et augmente le risque d'infection entérique
(Laffin <i>et al.</i> , 2019)	Régime 50 % de saccharose (15,5 % lipides) durant 2 jours	Non précisée	Surconsommation de sucre augmente très rapidement la susceptibilité à la colite <i>via</i> l'épuisement des AGCC
(Wang <i>et al.</i> , 2009a)	Modèle de cancérogénèse intestinale (souris APC) + régime 52 % de saccharose (15 % de lipides) durant 10 semaines	1,9 g/L	Favorise la cancérogénèse en augmentant les niveaux d'insuline
(Yassin <i>et al.</i> , 2018)	Développement de tumeur lié à la colite chez des souris dont le gène du récepteur à l'insuline a été inactivé (INSR ^{-/-})	Non précisée mais intolérance au glucose	Instillation rectale d'insuline inhibe l'inflammation
(Goncalves <i>et al.</i> , 2019)	Régime enrichi en sirop de glucose (45mg) et de fructose (55mg) dans différents modèles génétiquement modifiés de tumorigénèse intestinale	2 g/L	Augmentation de la croissance tumorale

Une autre étude très récente a démontré qu'un régime enrichi en saccharose augmentait la susceptibilité des souris à la colite expérimentale et ce après consommation d'un régime à 50% de saccharose consommé durant quelques jours seulement (Laffin *et al.*, 2019). De façon cohérente, de récents travaux ont permis de démontrer que l'instillation rectale d'insuline permettait de réduire la perte de poids et les scores endoscopiques induite par l'inflammation dans un modèle de cancer colorectal associé à la colite chimioinduite à l'azoxyméthane et au DSS (Yassin *et al.*, 2018).

Cependant l'impact d'un régime hyperglucidique à des doses physiologiques (30 % de saccharose) sur la colite expérimentale reste à déterminer ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents car malgré les très nombreuses études s'intéressant aux régimes alimentaires dans ce contexte de colite chez la souris il reste des questions à clarifier (Llewellyn *et al.*, 2018).

2.1. Surconsommation de sucre et état « pré-MICI »

Comme lors du protocole préliminaire, les animaux ayant consommé le régime hyperglucidique durant 8 ou 16 semaines ont vu leur poids augmenter et présentaient une glycémie augmentée par rapport aux souris témoins. Celle-ci reste cependant normale (3 g/L) malgré le prélèvement sur un tube au fluorure de sodium. Les souris n'ont pas montré de signes cliniques associés (polydipsie), même avec un régime plus long (16 semaines), ce qui est en accord avec la littérature (Sasso *et al.*, 2019). Il aurait été intéressant de faire un test de tolérance au glucose, bien que les résultats déjà publiés sur les souris C57Bl/6 soient après 20 semaines de régime riche en gras et en sucre (Saqui-Salces *et al.*, 2017).

Nous avons tout d'abord confirmé l'effet aggravant d'un régime enrichi en sucre sur la colite expérimentale (Laffin *et al.*, 2019). Le modèle de colite au DSS induit de profonds dommages intestinaux (Jones *et al.*, 2018) ce qui rend assez difficile l'observation des changements provoqués par le régime chez les animaux traités au DSS. C'est pourquoi nous nous sommes rapidement focalisés sur l'effet du régime chez les souris saines.

De façon très intéressante et inattendue, nous avons observé des lésions endoscopiques chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre sans traitement colitogène. Thaiss *et al.* ont démontré dans leur étude que le glucose provoquait des altérations de la barrière intestinale, se manifestant visuellement par une tortuosité accrue de l'architecture cellulaire *in cellulo* et confirmée *in vivo* par une perméabilité accrue chez les souris obèses diabétiques (modèles *db/db* ou injection de streptozotocine) (Thaiss *et al.*, 2018).

Dans notre modèle, nous pouvons expliquer l'absence d'impact du régime sur la perméabilité intestinale des souris (évaluée au FITC-Dextran) par une hyperglycémie modérée (3,5 g/L au maximum). Ceci est conforme à la glycémie observée chez cette souche de souris même en surpoids, alors que la glycémie des souris diabétiques dépasse largement 4,5 g/L (Surwit *et al.*, 1988).

D'autre part, le dosage de la lipocaline fécale et la perméabilité intestinale ont été évaluée aux 5^{ème} et 6^{ème} jour de traitement colitogène afin de pouvoir prélever suffisamment de selles et conserver les dernières selles pour l'analyse du microbiote intestinal et le dosage des métabolites microbiens ce qui peut expliquer le manque de significativité statistique concernant l'effet du DSS sur ces paramètres.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel du glucose et du fructose (composant le saccharose) sur les cellules intestinales Caco-2, un modèle cellulaire d'épithélium intestinal. Après avoir confirmé qu'une forte dose de glucose perturbait l'architecture cellulaire par un marquage de la protéine ZO-1 (conformément aux observations de Thaiss *et al.*) nous avons pu démontrer qu'une faible dose de fructose pouvait provoquer des altérations similaires. Cependant, nos analyses *in vitro* mériteraient d'être répliquées et un suivi de la résistance transépithéliale devrait confirmer cette hyperperméabilité provoquée par les sucres.

Il serait également intéressant de réaliser des co-cultures de cellules intestinales et immunitaires afin d'étudier l'impact des sucres sur un modèle d'inflammation intestinale. En effet, l'impact de différents composés alimentaires (anti-oxydants notamment) est fréquemment étudié dans un modèle d'absorption intestinale *in vitro* couplant cellules Caco-2 et cellules mononuclées du sang périphérique (PMBC) ou Caco-2 et macrophages (THP-1) (Kleiveland, 2015) permettant ainsi d'obtenir un modèle plus complet de barrière intestinale au cours d'une inflammation par stimulation au LPS.

Ainsi, l'effet délétère de sucre alimentaire (composé de glucose et de fructose) pourrait être principalement dû au fructose. L'effet délétère d'un excès de fructose a été démontré dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques comme la NASH ou le cancer colorectal (DiNicolantonio *et al.*, 2018; Goncalves *et al.*, 2019; Todoric *et al.*, 2020).

2.2. Surconsommation de sucre et immunodépression

Chez l'Homme, l'hyperglycémie associée au surpoids ou à l'obésité provoque une altération des défenses immunitaires comme l'illustre notamment la sensibilité aux infections des patients diabétiques de type 1 et 2 (Joshi *et al.*, 1999; Foss *et al.*, 2007).

Bien que le lien entre l'inflammation et l'hyperglycémie soit largement étudié (Hu *et al.*, 2018), les mécanismes qui conduisent à ces processus inflammatoires passent par des processus très différents parmi lesquels la formation de produits de glycations (AGEs) résultant à la fois de l'hyperglycémie mais pouvant être également apportés par l'alimentation (ExoAGEs ; Prasad *et al.*, 2017). Les récepteurs aux AGEs sont surexprimés dans l'épithélium intestinal et la *lamina propria* de patients souffrants de maladie de Crohn active (Ciccocioppo *et al.*, 2013).

Aussi, nous avons observé un profil de cytokines très largement diminué chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique, qui suggère une diminution des cellules immunitaires dans ce contexte et qui peut ainsi expliquer la sensibilité aux infections précédemment décrite (Martinez-Medina *et al.*, 2014; Thaïss *et al.*, 2018). En dehors du diabète, l'hyperglycémie peut à court terme provoquer une glycosylation directe des protéines et altérer ainsi la structure des protéines du complément conduisant à l'inhibition de l'opsonisation bactérienne médiée par l'immunoglobuline, diminuant la phagocytose (Jafar *et al.*, 2016). Étant donné que les défenses immunitaires sont altérées aussi bien en cas de diabète qu'en cas de MICI, cela renforce le lien entre inflammation intestinale et régime enrichi en sucre (Jurjus *et al.*, 2016).

Spécifiquement, l'IL-9, une cytokine produite par diverses cellules immunitaires du groupe Th2 et agissant comme un régulateur de nombreuses cellules hématopoïétiques (Hammad et Lambrecht, 2015) était totalement effondrée chez les souris nourries avec le régime enrichi en sucre et de façon similaire l'IL-4 et l'IL-5 également. Ces résultats suggèrent que l'excès de sucre provoque un déséquilibre de l'immunité Th2, conduisant à une altération de la fonction de barrière. Ainsi, au cours de la colite expérimentale, les souris nourries avec le régime hyperglucidique sont incapables de produire une réponse systémique à des stimuli tels que le DSS, tandis que le sucre aggrave localement la colite.

D'autre part, nous avons observé une sur-représentation des lymphocytes B dans le côlon des souris après consommation du régime sucré. Ces derniers sont connus pour favoriser la résistance à l'insuline chez la souris (Winer *et al.*, 2011). Il aurait été intéressant de réaliser un test de tolérance à l'insuline pour vérifier l'état de prédiabète puisque nos souris ne souffraient pas clairement d'hyperglycémie.

De plus, la répartition des cellules immunitaires dans l'intestin des souris est proportionnelle au contenu antigénique potentiel (**Figure 100**). Ainsi, il serait intéressant de cibler les analyses de cytométrie en flux sur les cellules que l'on retrouve le plus dans le côlon, ou d'étudier le jéjunum, plus riche en populations leucocytaires que le côlon.

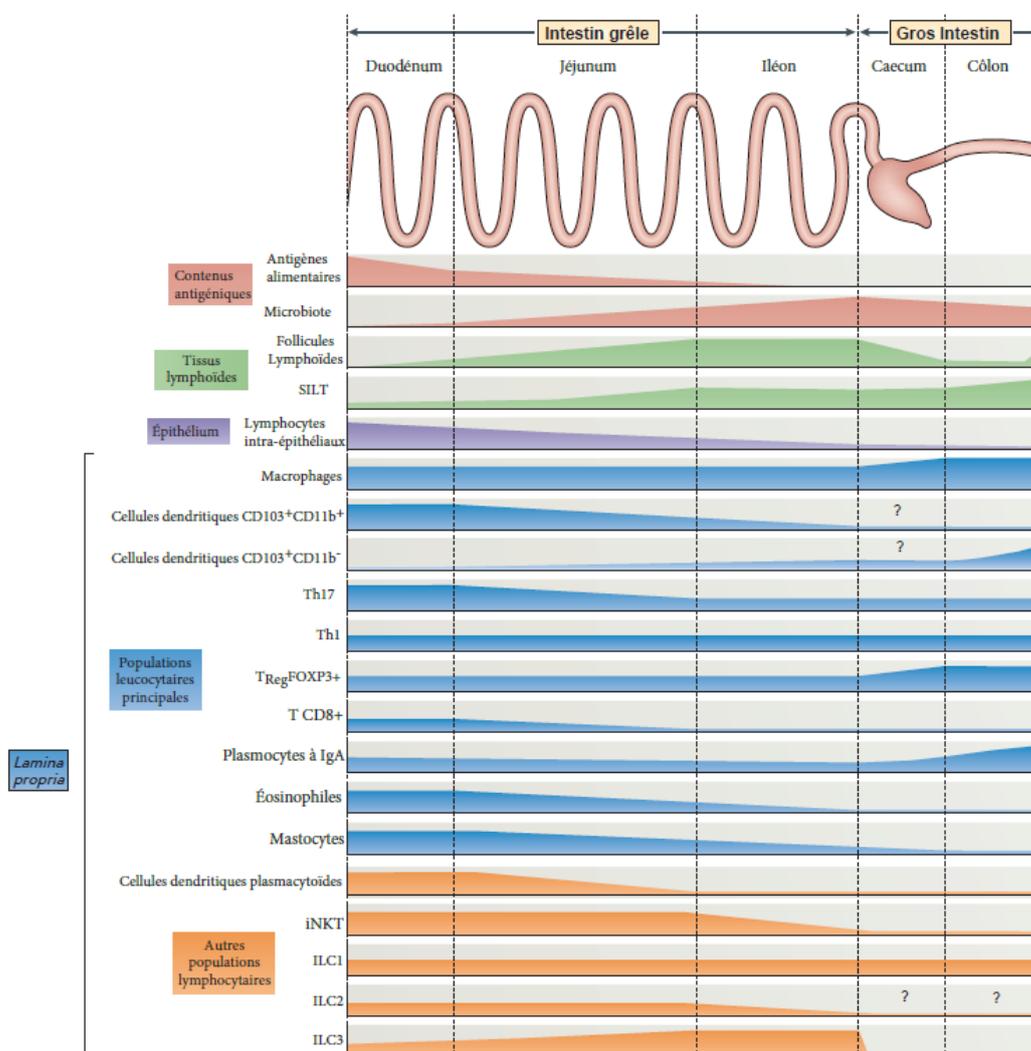


Figure 100 : Répartition intestinale des cellules immunitaires chez la souris (d'après Mowat et Agace, 2014). Les différents composants sont divisés en plusieurs groupes : contenus antigéniques (en rouge), tissus lymphoïdes (en vert), épithélium (en violet) et cellules immunitaires de la lamina propria (en bleu et orange). La répartition entre les différents segments montre la spécialisation en fonction du contenu antigénique potentiel. Les sous-ensembles de cellules immunitaires similaires sont observés chez l'Homme mais leurs proportions relatives dans les différents segments intestinaux sont moins bien documentées.

2.3. Altération du transcriptome colique

Les analyses transcriptomiques dans la muqueuse colique des souris ont révélés que la majorité des gènes différentiellement exprimés étaient sous-exprimés chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique par rapport aux souris témoins, ce qui est en accord avec l'étude de Wang *et al.*, dans laquelle la surconsommation de sucre dans un modèle de cancer est lié à une sous-expression de nombreux gènes dans l'intestin grêle des souris (Wang *et al.*, 2009b).

Cet effet était d'autant plus prononcé sans traitement colitogène. Fait important, les annotations fonctionnelles étaient significativement associées aux MICI (MC, RCH et « colite ») chez les souris pourtant non traitées au DSS confirmant donc nettement l'état « pré-MICI » que nous avons observé à l'endoscopie.

Notamment, de nombreux gènes relatifs aux protéines HSP étaient dérégulés chez nos souris or il existe un lien étroit entre la réponse immunitaire et les HSP (Van Eden *et al.*, 2007). La sous-expression des gènes relatifs aux HSP pourrait donc expliquer la défaillance immunitaire observée chez les souris nourries avec le régime hyperglucidique.

Les gènes *Hsph1*, *Hspa8* et *Hspa5* étaient fortement sous-exprimés dans la muqueuse colique des souris après surconsommation de sucre. Les protéines pour lesquelles codent ces gènes sont impliquées dans deux processus majeurs de la physiopathologie des MICI : l'autophagie et le stress du réticulum endoplasmique.

Le même constat a été fait pour les gènes codant pour les chaperonnes impliquées dans la régulation des HSP, tels que les gènes *Dnajb1*, *Chordc1* et *Ahsa2*. Ces protéines sont également impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire dans des conditions de stress (hydrolyse de l'ATP, repliement des protéines...). Cependant des analyses par Western Blot, ELISA ou RT-qPCR seront nécessaires pour vérifier que les protéines codées par ces gènes sont bien sous-exprimées.

Puis, nous avons exploré la réversibilité des effets délétères causés par le régime enrichi en sucre en ramenant les souris à un régime normal après 8 semaines de consommation du régime enrichi en sucre. La colite a été significativement moins sévère (score clinique, endoscopique et histologique) chez ces animaux que chez ceux nourris durant 16 semaines avec le régime sucré.

Nous avons observé qu'une partie seulement du transcriptome colique pouvait être corrigé, laissant une part importante de gènes dérégulés qui pourrait encore prédisposer la muqueuse intestinale à l'inflammation, puisque les annotations fonctionnelles montraient toujours une association avec les MICI et la colite chez ces souris. En outre, des petits clusters de gènes étaient enrichis avec des gènes cibles de C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins) un facteur de transcription de nombreuses protéines essentielles à la lipogénèse et à la gluconéogenèse hautement exprimée dans le tissu adipeux. Ces gènes régulent également les principales fonctions de la réponse inflammatoire, liant intrinsèquement la réponse au stress à l'homéostasie glucidique (Inoue *et al.*, 2004).

En effet, puisque la surconsommation de sucre diminue les besoins énergétiques, l'augmentation du stress endoplasmique pourrait être considérée comme « le prix à payer » qui contrebalance la diminution d'expression des facteurs de transcription liés aux HSP (Sharma *et al.*, 2015) contribuant ainsi à l'état « pré-MICI ».

2.4. Dysbiose intestinale

Enfin, compte tenu du nombre croissant d'études liant la dysbiose du microbiote intestinal à un certain nombre de pathologies humaines, nous avons étudié le microbiote intestinal des souris. Dans un premier temps, dans un contexte de colite, nous avons pu observer que le sucre provoquait une diminution de la biodiversité bactérienne en termes de richesse spécifique (indice de Chao) mais pas en termes d'uniformité (indice de Shannon) contrairement aux observations de Laffin *et al.* probablement en raison de la durée très courte (2 jours) de consommation de leur régime (Laffin *et al.*, 2019). Ceci suggère donc que la surconsommation de sucre à long terme ne conditionne pas les perturbations liées au DSS en termes de diversité α . Cependant, nous avons pu démontrer une forte différence dans la composition des communautés bactériennes entre les régimes alimentaires et qui était encore plus prononcée chez les animaux traités au DSS.

Comme prévu, le régime hyperglucidique a provoqué des changements majeurs dans la composition du microbiote des animaux en dehors de la colite (Di Rienzi et Britton, 2020). Ainsi, la surconsommation de sucre a perturbé le microbiote de façon quantitative et qualitative chez nos souris conformément aux précédentes études dans un contexte de *Western Diet* (Agus *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018b).

Cette perte de biodiversité est suivie, après l'induction de la colite, par un effondrement d'autant plus important de la diversité microbienne dans tous les groupes (contrôle et hyperglucidique), ce qui est également conforme à la littérature (Desai *et al.*, 2016; Llewellyn *et al.*, 2018).

De façon remarquable, l'indice de Jaccard, plus fortement influencé par les espèces rares du microbiote intestinal, a montré une nette différence entre les animaux soumis au régime hyperglucidique (qu'il soit consommé durant 8 ou 16 semaines) et les témoins. Ceci suggère, conformément à la littérature (Magnusson *et al.*, 2015; Rosas-Villegas *et al.*, 2017) que seules quelques bactéries, appartenant aux *Firmicutes* sont perturbées par la consommation du régime riche en sucre or les bactéries de ce phylum sont décrites pour produire des AGCC.

Le dosage de ces derniers a confirmé une diminution importante d'acétate chez les animaux nourris avec le régime hyperglucidique, et davantage encore après traitement colitogène. Ceci confirme les résultats de Laffin *et al.* qui avaient montré une déplétion des AGCC et en particulier de l'acétate après 2 jours de régime fortement enrichi en sucre (Laffin *et al.*, 2019). De plus, une très récente étude a démontré que ces AGCC induisait la production d'une cytokine anti-inflammatoire de la famille de l'IL-10 (l'IL-22) par les lymphocytes T, protégeant ainsi de l'inflammation intestinale (Yang *et al.*, 2020).

Aussi, ce phylum est composé de bactéries à Gram positif dont les bactéries commensales Clostridia qui jouent un rôle clef dans l'homéostasie intestinale (Lopetuso *et al.*, 2013). En effet, certaines bactéries de la famille des Clostridiales étaient présentes en plus faible abondance chez nos souris nourries avec le régime enrichi en sucre tandis que certaines espèces de Lachnospiraceae (phylum dont le rôle est encore controversé (Vacca *et al.*, 2020)) avaient une plus forte abondance. Ces changements n'avaient pas été observés avec une exposition à court terme à une plus forte dose de sucre (Laffin *et al.*, 2019).

Nous avons notamment observé qu'une bactérie appartenant au genre *Barnesiella* (Otu194) était totalement absente chez les souris après consommation de sucre, alors qu'elle était pratiquement omniprésente chez les animaux témoins. Ceci pourrait contribuer à la fois à l'état « pré-MICI » observé, ainsi qu'à l'aggravation de la colite. En effet, puisqu'il a été démontré qu'une augmentation de *Barnesiella spp.* induit par un traitement avec un oligosaccharide permettait de réduire la sensibilité à la colite au DSS chez la souris (Weiss *et al.*, 2014), la déplétion de cette bactérie par le régime enrichi en sucre peut expliquer l'aggravation de la colite chez les souris ayant consommé ce régime.

Enfin, nos résultats révèlent qu'aussi bien au niveau du transcriptome colique que du microbiote intestinal, la dysbiose n'a pas été totalement corrigée par l'arrêt du régime hyperglucidique. *Barnesiella* ainsi que l'augmentation des Lachnospiraceae ne semble que partiellement réversible. Ainsi, Laffin *et al.* ont démontré que la surconsommation de sucre induisait des changements très rapides dans la composition du microbiote intestinal, alors que nos résultats suggèrent que ces modifications sont persistantes et difficiles à corriger, même après un retour à une alimentation normale pendant plusieurs semaines (Laffin *et al.*, 2019).

Partie 6

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons étudié l'impact à long terme de la consommation d'un régime enrichi en sucre à une dose plus « physiologique » (30%) que les études précédentes. En résumé, nous avons pu démontrer que la surconsommation de sucre aggravait la colite en altérant l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et l'organisation des jonctions cellulaires, augmentant ainsi la perméabilité intestinale ce qui, conjointement à la dysbiose intestinale altère la réponse immunitaire (**Figure 101**).

Sur un intestin sain, la surconsommation de sucre provoque une prédisposition à l'inflammation que nous avons qualifié d'état « pré-MICI », associé à une immunodépression, une dérégulation du transcriptome colique et une dysbiose intestinale conduisant à des lésions endoscopiques spontanées. Ces altérations semblent partiellement réversibles lorsque la consommation en sucre est réduite.

Aussi, les expériences menées *in vitro* sur les cellules Caco-2 nous ont amenés à pousser nos expérimentations et un nouveau protocole animal a été mis en place en utilisant des régimes dont les teneurs en graisses et en sucre sont au plus proche de la réalité. En effet, comme la plupart des régimes enrichis en sucre utilisés en laboratoire (Agus *et al.*, 2016; Do *et al.*, 2018; Dunn et Das, 2017; Eudave *et al.*, 2018), notre régime enrichi en sucre contient également une part de graisses (25 %) dont nous aimerions vérifier l'impact.

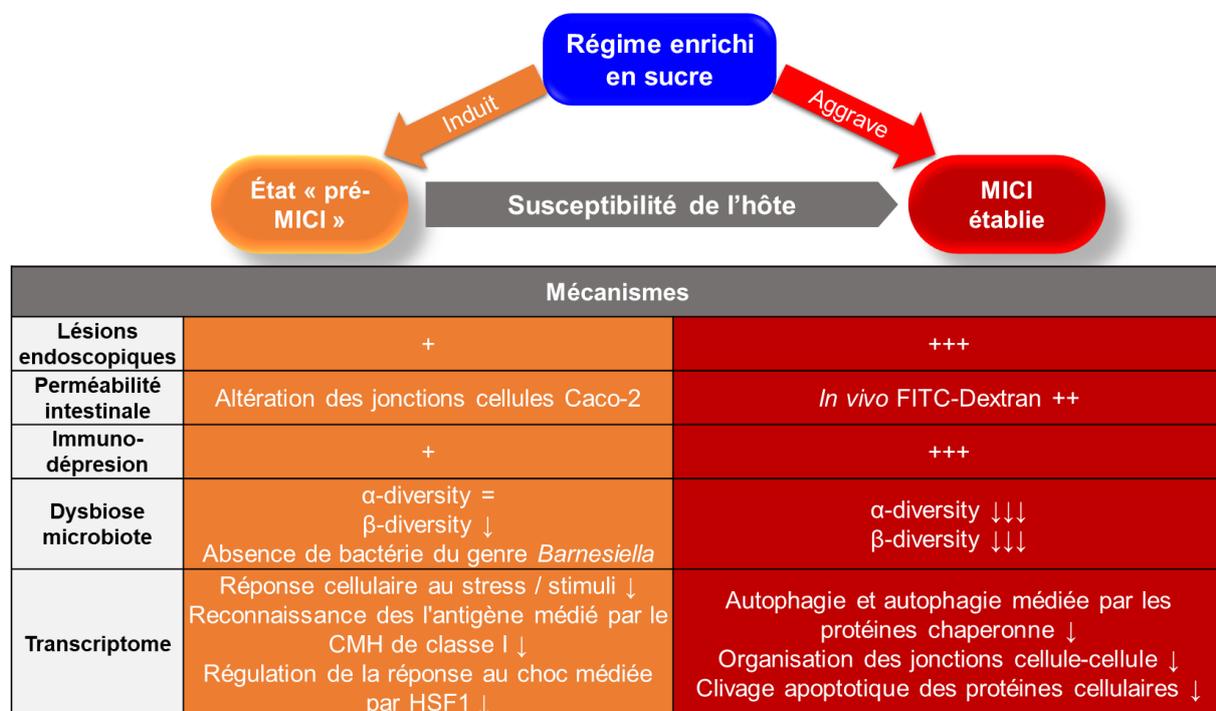


Figure 101 : Bilan des principales conclusions démontrées.

Toujours pour conforter nos observations sur cellules, des marquages immunofluorescents des protéines des jonctions cellulaires sur les coupes de côlon de souris seront réalisés et les expériences de perméabilité sur Transwell® seront répliquées avec des durées d'exposition aux différentes doses de sucre plus longues. De plus, nous étudierons le potentiel effet correcteur de l'acétate sur la perméabilité, puisque nous avons observé que ce métabolite bactérien était diminué après consommation de sucre par les souris.

Il a été mis en évidence qu'une O-glycosylation par un carbohydrate du récepteur NOD2 provoquait une instabilité de cette protéine (Hou *et al.*, 2015). Ce récepteur intracellulaire est exprimé dans les macrophages, les cellules dendritiques, épithéliales et les cellules de Paneth et capable de reconnaître les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) spécifiques du monde microbien et induit la production de cytokines et chimiokines (**Figure 102**). Nous souhaitons donc étudier l'effet du régime hyperglucidique dans un modèle de souris invalidées *NOD2*^{-/-} afin d'évaluer le rôle de ce gène dans le processus inflammatoire.

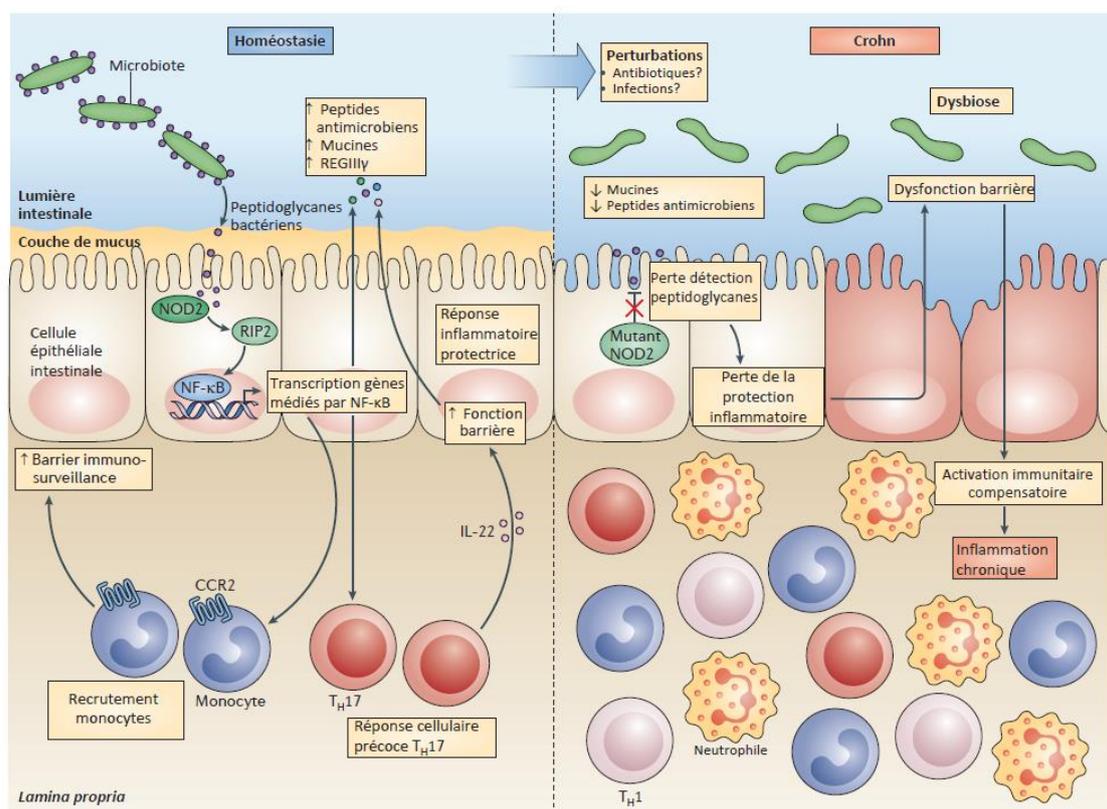


Figure 102 : Rôle de NOD2 dans l'homéostasie et la physiopathologie des MICI (Philpott *et al.*, 2014).

Afin d'affiner le mécanisme par lequel les cellules intestinales sont impactées par le sucre, nous étudierons le rôle de NOD2 en utilisant un agoniste de ce récepteur : Muramyl dipeptide (MDP) (ce peptidoglycane commun à toutes les bactéries, est reconnu de manière spécifique par le récepteur NOD2) sur les cellules Caco-2 après exposition au sucre.

Enfin, afin de confirmer le lien de causalité du microbiote intestinal, nous réaliserons des expériences de transfert de flore sur des souris axéniques (exemptes de tout microorganisme commensal ou pathogène). Notre hypothèse est que les régimes hypercaloriques favorisent la mise en place d'une flore délétère qui aggraverait donc la colite et à l'inverse que la flore des animaux soumis à un jeûne (autre protocole en cours au laboratoire) permettrait de réduire ou prévenir celle-ci (*Figure 103*).

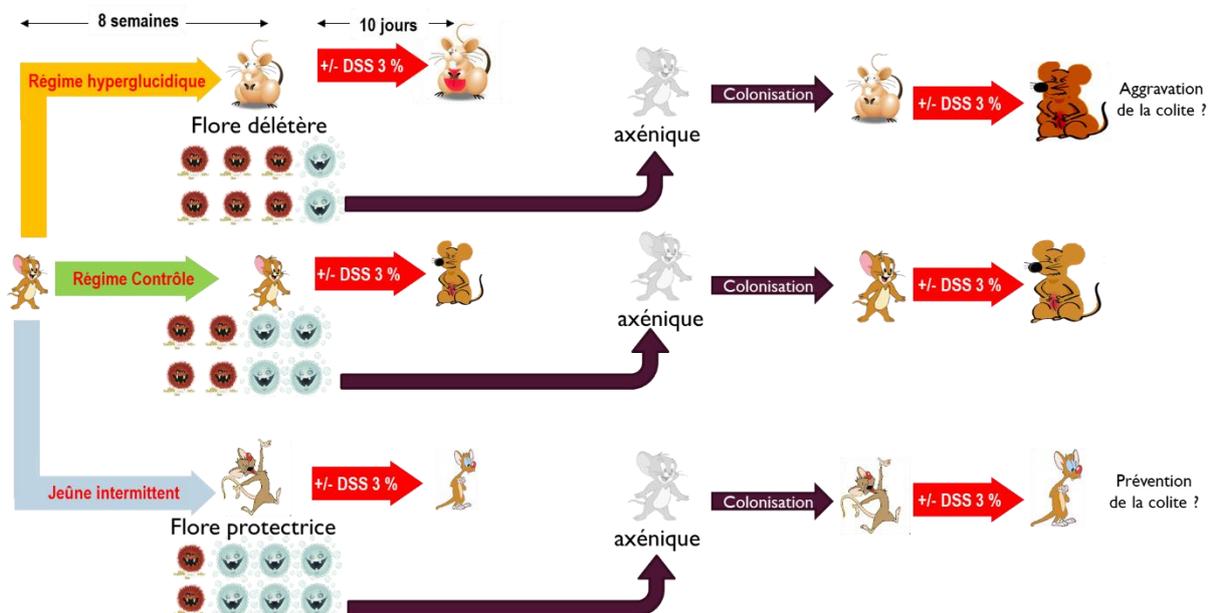


Figure 103 : Schéma expérimental du protocole de transfert de flore. Brièvement les selles prélevées seront congelées dans une solution de PBS stérile contenant 40% de glycérol et envoyées dans un laboratoire allemand avec lequel nous collaborons, disposant des autorisations pour l'utilisation de souris axéniques.

Dans l'ensemble, nos résultats soutiennent les données observées chez les patients atteints de MICI suggérant un effet bénéfique d'une consommation réduite de sucre, (Britto et Kellermayer, 2019; Chan *et al.*, 2014; Halmos et Gibson, 2015; Lee *et al.*, 2015) mais la seule façon de soutenir nos résultats avec des données humaines sera de procéder à des études cliniques interventionnelles qui nécessiteront quelques années pour être achevées. Mon intégration récente au sein de l'équipe du CHRU de Nancy sous la direction du Pr Peyrin-Biroulet, permettra d'explorer ces données, étant donné l'expertise clinique expérimentale et translationnelle de cette équipe.

En plus des dommages décrits dans cette étude, nous avons observé la dérégulation de gènes liés à la carcinogenèse dans la muqueuse colique des souris nourries avec le régime hyperglucidique. Cette observation concorde avec les preuves croissantes que le sucre est impliqué dans la carcinogenèse colorectale, à la fois chez la souris et chez l'Homme (Benninghoff *et al.*, 2020; Goncalves *et al.*, 2019; Jurjus *et al.*, 2016). Cependant, cela sort du cadre de notre étude et les liens entre sucre, colite et cancer colorectal nécessiteront une étude plus approfondie.

Enfin, le saccharose ne constitue pas la seule source de glucides dans l'alimentation humaine, et de nombreuses études ont démontré que les régimes sans glucides provoquaient une diminution des métabolites de type AGCC susceptibles de nuire à l'homéostasie intestinale (Dahl *et al.*, 2020; Russell *et al.*, 2011). À cet égard, il est préférable de réduire la consommation de produits transformés riches en sucres ajoutés, dont l'augmentation dans la population générale est alarmante (Louie et Tapsell, 2015) plutôt que de recourir aux régimes zéro sucres. Cependant, la régulation de la consommation de sucre ne sera pas facile malgré l'urgence de suivre les recommandations de l'OMS (Evans, 2017; Geneva : World Health Organization, 2015; Lustig *et al.*, 2012).

Nous espérons que ce travail contribuera à établir de véritables recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prise en charge des patients souffrant de MICI et pourquoi pas, réussir à développer un traitement personnalisé par transplantation fécale comme c'est d'ores et déjà le cas dans le cadre des infections à *Clostridium difficile* (Cammarota *et al.*, 2019).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci. Transl. Med.* *6*, 237ra65-237ra65.
- Abarca-Gómez, L., Abdeen, Z.A., Hamid, Z.A., Abu-Rmeileh, N.M., Acosta-Cazares, B., Acuin, C., Adams, R.J., Aekplakorn, W., Afsana, K., Aguilar-Salinas, C.A., et al. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet* *390*, 2627–2642.
- Afshin, A., Sur, P.J., Fay, K.A., Cornaby, L., Ferrara, G., Salama, J.S., Mullany, E.C., Abate, K.H., Abbafati, C., Abebe, Z., et al. (2019). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* *393*, 1958–1972.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., et al. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci. Rep.* *6*, 19032.
- Akirav, E.M., Henegariu, O., Preston-Hurlburt, P., Schmidt, A.M., Clynes, R., and Herold, K.C. (2014). The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Affects T Cell Differentiation in OVA Induced Asthma. *PLoS ONE* *9*, e95678.
- Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 205–217.
- Ananthakrishnan, A.N., Bernstein, C.N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M.F., Ali, R.A.R., Vavricka, S.R., and Fiocchi, C. (2018). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 39–49.
- Andersen, I.G., Holm, J.-C., and Homøe, P. (2019). Impact of weight-loss management on children and adolescents with obesity and obstructive sleep apnea. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* *123*, 57–62.
- ANSES (2009). Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) (Agence Française de sécurité sanitaire des aliments).
- Arbizu, P.M. (2020). pmartinezarbizu/pairwiseAdonis.
- Arner, E., Westermark, P.O., Spalding, K.L., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., Bernard, S., and Arner, P. (2010). Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* *59*, 105–109.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L.T., Amenyogbe, N., Brown, E.M., and Finlay, B. (2014). The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Front. Immunol.* *5*.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* *500*, 232–236.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 15718–15723.

- Barnich, N. (2017). Impact de la nutrition sur l'inflammation intestinale et la susceptibilité de l'hôte dans un contexte de maladie de Crohn. *Nutr. Clin. Métabolisme* 31, 224.
- Barrington, W.T., Wulfridge, P., Wells, A.E., Rojas, C.M., Howe, S.Y.F., Perry, A., Hua, K., Pellizzon, M.A., Hansen, K.D., Voy, B.H., et al. (2018). Improving Metabolic Health Through Precision Dietetics in Mice. *Genetics* 208, 399–417.
- Basdevant, A., and Guy-Grand, B. (2004). *Médecine de l'obésité* (Paris: Flammarion Médecine-Sciences).
- Bashiardes, S., Shapiro, H., Rozin, S., Shibolet, O., and Elinav, E. (2016). Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. *Mol. Metab.* 5, 782–794.
- Baskara, I., Anton, P.M., and Delayre-Orthez, C. (2019). AGEs exogènes, inflammation et allergie. *Médecine Mal. Métaboliques* 13, 607–611.
- Bates, J.H.T., Poynter, M.E., Frodella, C.M., Peters, U., Dixon, A.E., and Suratt, B.T. (2017). Pathophysiology to Phenotype in the Asthma of Obesity. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 14, S395–S398.
- Baudry, J., Lelong, H., Adriouch, S., Julia, C., Allès, B., Hercberg, S., Touvier, M., Lairon, D., Galan, P., and Kesse-Guyot, E. (2018). Association between organic food consumption and metabolic syndrome: cross-sectional results from the NutriNet-Santé study. *Eur. J. Nutr.* 57, 2477–2488.
- Benninghoff, A.D., Hintze, K.J., Monsanto, S.P., Rodriguez, D.M., Hunter, A.H., Phatak, S., Pestka, J.J., Van Wettere, A.J., and Ward, R.E. (2020). Consumption of the Total Western Diet Promotes Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients* 12.
- Bernalier-Donadille, A. (2010). Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, 17–23.
- Berrou, J., Fougeray, S., Venot, M., Chardiny, V., Gautier, J.-F., Dulphy, N., Toubert, A., and Peraldi, M.-N. (2013). Natural Killer Cell Function, an Important Target for Infection and Tumor Protection, Is Impaired in Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 8, e62418.
- Blackburn, G.L. (2001). Pasteur's Quadrant and malnutrition. *Nature* 409, 397–401.
- Blain, A., Cattan, S., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Gendre, J.P., and Cosnes, J. (2002). Crohn's disease clinical course and severity in obese patients. *Clin. Nutr.* 21, 51–57.
- Bohbot, J.M., and Cardot, J.M. (2012). Vaginal impact of the oral administration of total freeze-dried culture of LCR 35 in healthy women. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2012, 503648.
- Boirie, Y., Farigon, N., Miolanne, M., Montel, F., Lahaye, C., Guillet, C., and Walrand, S. (2016). L'obésité sarcopénique : causes et conséquences. *Cah. Nutr. Diététique* 51, 132–138.
- Bray, M.S., Loos, R.J.F., McCaffery, J.M., Ling, C., Franks, P.W., Weinstock, G.M., Snyder, M.P., Vassy, J.L., Agurs-Collins, T., and Conference Working Group (2016). NIH working group report-using genomic information to guide weight management: From universal to precision treatment. *Obes. Silver Spring Md* 24, 14–22.

- Breban, M., Tap, J., Leboime, A., Said-Nahal, R., Langella, P., Chiocchia, G., Furet, J.-P., and Sokol, H. (2017). Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1614–1622.
- Britto, S., and Kellermayer, R. (2019). Carbohydrate Monotony as Protection and Treatment for Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* *13*, 942–948.
- Buscail, C., Sabate, J.-M., Bouchoucha, M., Kesse-Guyot, E., Hercberg, S., Benamouzig, R., and Julia, C. (2017a). Western Dietary Pattern Is Associated with Irritable Bowel Syndrome in the French NutriNet Cohort. *Nutrients* *9*.
- Buscail, C., Sabate, J.-M., Bouchoucha, M., Torres, M.J., Allès, B., Hercberg, S., Benamouzig, R., and Julia, C. (2017b). Association between self-reported vegetarian diet and the irritable bowel syndrome in the French NutriNet cohort. *PLoS One* *12*, e0183039.
- Cáceres, M.D., and Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* *90*, 3566–3574.
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P.D., and Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* *22*, 658–668.
- Caillou, L., and Bourgaux, J.F. (2019). Chirurgie digestive chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sous biothérapies. *Anesth. Réanimation* *5*, 248–250.
- Cammarota, G., Gallo, A., and Bibbò, S. (2019). Fecal microbiota transplant for *C. difficile* infection: Just say yes. *Anaerobe* 102109.
- Cani, P.D. (2005). Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocrinol.* *185*, 457–465.
- Cani, P., and Delzenne, N. (2009). The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 1546–1558.
- Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Maton, N., and Delzenne, N.M. (2005). Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes. Res.* *13*, 1000–1007.
- Carlson, B.M. (2019). Chapter 12 - The Digestive System. In *The Human Body*, B.M. Carlson, ed. (Academic Press), pp. 321–355.
- Carvalho-Silva, D., Pierleoni, A., Pignatelli, M., Ong, C., Fumis, L., Karamanis, N., Carmona, M., Faulconbridge, A., Hercules, A., McAuley, E., et al. (2019). Open Targets Platform: new developments and updates two years on. *Nucleic Acids Res.* *47*, D1056–D1065.
- Cassard, A.-M., and Thomas, M. (2019). Les microbiotes humains : des alliés pour notre santé. *Encycl. Environ.*
- Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 735–744.

- Chan, S.S.M., Luben, R., van Schaik, F., Oldenburg, B., Bueno-de-Mesquita, H.B., Hallmans, G., Karling, P., Lindgren, S., Grip, O., Key, T., et al. (2014). Carbohydrate Intake in the Etiology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2013–2021.
- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., Gewirtz, A.T., and Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 7, e44328.
- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice: DSS-Induced Colitis in Mice. In *Current Protocols in Immunology*, J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. 15.25.1-15.25.14.
- Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 738–749.
- Chelakkot, C., Ghim, J., and Ryu, S.H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp. Mol. Med.* 50.
- Cheng, K.-C., Li, C., and Uss, A.S. (2008). Prediction of oral drug absorption in humans – from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 581–590.
- Ciccocioppo, R., Vanoli, A., Klersy, C., Imbesi, V., Boccaccio, V., Manca, R., Betti, E., Cangemi, G.C., Strada, E., Besio, R., et al. (2013). Role of the advanced glycation end products receptor in Crohn's disease inflammation. *World J. Gastroenterol.* WJG 19, 8269–8281.
- Cohen, S.A., Gold, B.D., Oliva, S., Lewis, J., Stallworth, A., Koch, B., Eshee, L., and Mason, D. (2014). Clinical and mucosal improvement with specific carbohydrate diet in pediatric Crohn disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59, 516–521.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., and Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, D633–D642.
- Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie, L., and Sokol, H. (2014). *Les fondamentaux de la pathologie digestive: enseignement intégré, appareil digestif* (Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson).
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., and Sedergran, D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 69, 238–249.
- Cordain, L., Miller, J.B., Eaton, S.B., Mann, N., Holt, S.H., and Speth, J.D. (2000). Plant-animal subsistence ratios and macronutrient energy estimations in worldwide hunter-gatherer diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 682–692.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O'Keefe, J.H., and Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 341–354.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 140, 1785-1794.e4.

- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* *500*, 585–588.
- CREGG (2019). Fiches de recommandations – Alimentation et MICI.
- Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy: Dice’s “wild” idea about lysosomal selectivity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 535–541.
- Cummings, J.H., and Stephen, A.M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *Eur. J. Clin. Nutr.* *61*, S5–S18.
- Dahl, W.J., Rivero Mendoza, D., and Lambert, J.M. (2020). Diet, nutrients and the microbiome. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *171*, 237–263.
- Dalibon, P. (2015). Accompagnement des maladies inflammatoires chroniques de l’intestin. *Actual. Pharm.* *54*, 35–36.
- Dalmas, E., Rouault, C., Abdennour, M., Rovere, C., Rizkalla, S., Bar-Hen, A., Nahon, J.-L., Bouillot, J.-L., Guerre-Millo, M., Clément, K., et al. (2011). Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am. J. Clin. Nutr.* *94*, 450–458.
- Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisniewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., Kayser, B.D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., et al. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* *65*, 426–436.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* *127*, 412–421.
- Delisle, H. (2017). 32. L’obésité est un problème de riches dans les pays en développement. In *Des Idées Reçues En Santé Mondiale*, (Montréal: Presses de l’Université de Montréal), pp. 165–168.
- Delzenne, N.M., and Cani, P.D. (2008). Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *médecine/sciences* *24*, 505–510.
- Delzenne, N.M., Cani, P.D., and Neyrinck, A.M. (2007). Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.* *137*, 2547S-2551S.
- Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., et al. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* *167*, 1339-1353.e21.
- Diallo, A., Deschasaux, M., Latino-Martel, P., Herberg, S., Galan, P., Fassier, P., Allès, B., Guéraud, F., Pierre, F.H., and Touvier, M. (2018). Red and processed meat intake and cancer risk: Results from the prospective NutriNet-Santé cohort study. *Int. J. Cancer* *142*, 230–237.

- DiGiulio, D.B. (2012). Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* *17*, 2–11.
- DiNicolantonio, J.J., Mehta, V., Onkaramurthy, N., and O’Keefe, J.H. (2018). Fructose-induced inflammation and increased cortisol: A new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *61*, 3–9.
- Di Rienzi, S.C., and Britton, R.A. (2020). Adaptation of the Gut Microbiota to Modern Dietary Sugars and Sweeteners. *Adv. Nutr.* *11*, 616–629.
- Do, M.H., Lee, E., Oh, M.-J., Kim, Y., and Park, H.-Y. (2018). High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients* *10*.
- Dobner, J., Ress, C., Rufinatscha, K., Salzmann, K., Salvenmoser, W., Folie, S., Wieser, V., Moser, P., Weiss, G., Goebel, G., et al. (2017). Fat-enriched rather than high-fructose diets promote whitening of adipose tissue in a sex-dependent manner. *J. Nutr. Biochem.* *49*, 22–29.
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T.M., Bunger, M.K., and Bultman, S.J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* *13*, 517–526.
- Doré, J., Multon, M.-C., Béhier, J.-M., Affagard, H., Andremont, A., Barthélémy, P., Batista, R., Bonneville, M., Bonny, C., Boyaval, G., et al. (2017). Microbiote intestinale : qu’en attendre au plan physiologique et thérapeutique ? *Thérapie* *72*, 1–19.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 11–22.
- Dunn, S.M., and Das, K.C. (2017). Decreased EDHF-mediated relaxation is a major mechanism in endothelial dysfunction in resistance arteries in aged mice on prolonged high-fat sucrose diet. *Physiol. Rep.* *5*.
- Edgar, R.C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*.
- Edgar, R.C., and Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* *31*, 3476–3482.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Raoult, D., and Henrissat, B. (2014). Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *médecine/sciences* *30*, 259–265.
- Elisha, B., Lavoie, M., Laville, M., Bastard, J., and Rabasa-Lhoret, R. (2013). Physiopathologie des obésités. *EMC - Endocrinol.-Nutr.* *14*.
- Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G., and Weaver, C.T. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol. Rev.* *206*, 260–276.
- Erkens, T., Goeminne, N., Kegels, A., Byloos, M., and Vinken, P. (2018). Analytical performance of a commercial multiplex Luminex-based cytokine panel in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *91*, 43–49.

- Etievant, P., Bellisle, F., Dallongeville, J., and Etilé, F. (2010). Comportements alimentaires. 66.
- Eudave, D.M., BeLow, M.N., and Flandreau, E.I. (2018). Effects of high fat or high sucrose diet on behavioral-response to social defeat stress in mice. *Neurobiol. Stress* 9, 1–8.
- Evans, C.E.L. (2017). Sugars and health: a review of current evidence and future policy. *Proc. Nutr. Soc.* 76, 400–407.
- Everard, A., and Cani, P.D. (2014). Gut microbiota and GLP-1. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15, 189–196.
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G.G., Muccioli, G.M., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Van Holle, A., François, P., et al. (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60, 2775–2786.
- FAO (2014). Food Outlook: BIENNIAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS, May 2014.
- Farah, Z., Lucas-Martini, L., and Basdevant, A. (2012). Épidémiologie et physiopathologie de l'obésité. Mises À Jour En Gynécologie Médicale - Trente-Six. *Journ. Natl. CNGOF* 17–22.
- Fardet, A., Rock, E., Bassama, J., Bohuon, P., Prabhasankar, P., Monteiro, C., Moubarac, J.-C., and Achir, N. (2015). Current Food Classifications in Epidemiological Studies Do Not Enable Solid Nutritional Recommendations for Preventing Diet-Related Chronic Diseases: The Impact of Food Processing. *Adv. Nutr.* 6, 629–638.
- Flores, R., Shi, J., Fuhrman, B., Xu, X., Veenstra, T.D., Gail, M.H., Gajer, P., Ravel, J., and Goedert, J.J. (2012). Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *J. Transl. Med.* 10, 253.
- Foss, N.T., Foss-Freitas, M.C., Ferreira, M. a. N., Cardili, R.N., Barbosa, C.M.C., and Foss, M.C. (2007). Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 33, 439–443.
- Foster, A., and Jacobson, K. (2013). Changing Incidence of Inflammatory Bowel Disease: Environmental Influences and Lessons Learnt from the South Asian Population. *Front. Pediatr.* 1.
- Foucher, B., Pina, G., Desjeux, G., Cheminel, V., and Prevosto, J.-M. (2004). Stabilité de la glycémie avant centrifugation avec ou sans antiglycolytique. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 62, 601–604.
- Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13780–13785.
- Fransen, F., van Beek, A.A., Borghuis, T., Meijer, B., Hugenholtz, F., van der Gaast-de Jongh, C., Savelkoul, H.F., de Jonge, M.I., Faas, M.M., Boekschoten, M.V., et al. (2017). The Impact of Gut Microbiota on Gender-Specific Differences in Immunity. *Front. Immunol.* 8.

- Gaboriau-Routhiau, V., and Cerf-Bensussan, N. (2016). Microbiote intestinale et développement du système immunitaire. *médecine/sciences* 32, 961–967.
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., and Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58, 1509–1517.
- Garrett, W.S., Lord, G.M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S.K., Ito, S., Glickman, J.N., and Glimcher, L.H. (2007). Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 131, 33–45.
- Gatta-Cherifi, B. (2016). Obésités : quoi de neuf en 2016 ? *Ann. Endocrinol.* 77, S29–S35.
- Gauguet, S., D’Ortona, S., Ahnger-Pier, K., Duan, B., Surana, N.K., Lu, R., Cywes-Bentley, C., Gadjeva, M., Shan, Q., Priebe, G.P., et al. (2015). Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infect. Immun.* 83, 4003–4014.
- Geneva : World Health Organization (2015). Guideline : Sugars intake for adults and children (Geneva: World Health Organization).
- Golde, W.T., Gollobin, P., and Rodriguez, L.L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim.* 34, 39–43.
- Goncalves, M.D., Lu, C., Tutnauer, J., Hartman, T.E., Hwang, S.-K., Murphy, C.J., Pauli, C., Morris, R., Taylor, S., Bosch, K., et al. (2019). High-fructose corn syrup enhances intestinal tumor growth in mice. *Science* 363, 1345–1349.
- Goodyear, A.W., Kumar, A., Dow, S., and Ryan, E.P. (2014). Optimization of murine small intestine leukocyte isolation for global immune phenotype analysis. *J. Immunol. Methods* 405, 97–108.
- Gordon, H.A., Bruckner-Kardoss, E., Staley, T.E., Wagner, M., and Wostmann, B.S. (1966). CHARACTERISTICS OF THE GERM-FREE RAT. *Cells Tissues Organs* 64, 367–389.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.
- Grigg, D. (1999). The Changing Geography of World Food Consumption in the Second Half of the Twentieth Century. *Geogr. J.* 165, 1–11.
- Gruber, L., Kisling, S., Lichti, P., Martin, F.-P., May, S., Klingenspor, M., Lichtenegger, M., Rychlik, M., and Haller, D. (2013). High Fat Diet Accelerates Pathogenesis of Murine Crohn’s Disease-Like Ileitis Independently of Obesity. *PLoS ONE* 8.
- Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C.L., and Anis, A.H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 9, 88.
- Gunter, C., and Dhand, R. (2002). Human biology by proxy. *Nature* 420, 509–509.
- Halmos, E.P., and Gibson, P.R. (2015). Dietary management of IBD—insights and advice. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 133–146.

- Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., et al. (2002). Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. *J. Immunol.* *168*, 57–64.
- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* *43*, 29–40.
- Hand, W.L., Hand, D.L., and Vasquez, Y. (2007). Increased polymorphonuclear leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *76*, 44–50.
- Haro, C., Garcia-Carpintero, S., Alcalá-Díaz, J.F., Gomez-Delgado, F., Delgado-Lista, J., Perez-Martinez, P., Rangel Zuñiga, O.A., Quintana-Navarro, G.M., Landa, B.B., Clemente, J.C., et al. (2016a). The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *J. Nutr. Biochem.* *27*, 27–31.
- Haro, C., Montes-Borrego, M., Rangel-Zuñiga, O.A., Alcalá-Díaz, J.F., Gómez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P., Delgado-Lista, J., Quintana-Navarro, G.M., Tinahones, F.J., Landa, B.B., et al. (2016b). Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 233–242.
- Harper, J.W., and Zisman, T.L. (2016). Interaction of obesity and inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *22*, 7868.
- Harpsøe, M.C., Basit, S., Andersson, M., Nielsen, N.M., Frisch, M., Wohlfahrt, J., Nohr, E.A., Linneberg, A., and Jess, T. (2014). Body mass index and risk of autoimmune diseases: a study within the Danish National Birth Cohort. *Int. J. Epidemiol.* *43*, 843–855.
- HAS (2008). Haute Autorité de Santé - Guide ALD n°24 - Rectocolite hémorragique (Collège de la Haute Autorité de Santé).
- HAS (2011). Recomandation de bonnes pratiques - Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours (Collège de la Haute Autorité de Santé).
- HAS (2019). Haute Autorité de Santé - Guide ALD n° 24 - Maladie de Crohn (Collège de la Haute Autorité de Santé).
- Hass, D., Brensinger, C., Lewis, J., and Lichtenstein, G. (2006). The Impact of Increased Body Mass Index on the Clinical Course of Crohn's Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 482–488.
- Hawkins, K., Pernarelli, J., Ozminkowski, R.J., Bai, M., Gaston, S.J., Hommer, C., Migliori, R.J., and Yeh, C.S. (2011). The prevalence of urinary incontinence and its burden on the quality of life among older adults with medicare supplement insurance. *Qual. Life Res. Int. J. Qual. Life Asp. Treat. Care Rehabil.* *20*, 723–732.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., and Benno, Y. (2002). Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol. Immunol.* *46*, 819–831.
- Hébuterne, X. (2019). Nutrition anti-inflammatoire et MICI : que dire à nos patients ? *Nutr. Clin. Métabolisme* *33*, 126–130.

- Henriksen, M., Jahnsen, J., Lygren, I., Sauar, J., Schulz, T., Stray, N., Vatn, M.H., Moum, B., and The Ibsen Study Group (2006). Change of diagnosis during the first five years after onset of inflammatory bowel disease: Results of a prospective follow-up study (the IBSEN Study). *Scand. J. Gastroenterol.* *41*, 1037–1043.
- Heymsfield, S.B., and Wadden, T.A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N. Engl. J. Med.* *376*, 254–266.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* *96*, 736–749.
- Homayouni, A., Bastani, P., Ziyadi, S., Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S., Ghalibaf, M., Mortazavian, A.M., and Mehrabany, E.V. (2014). Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review. *J. Low. Genit. Tract Dis.* *18*, 79–86.
- de Hoon, M.J.L., Imoto, S., Nolan, J., and Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *20*, 1453–1454.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* *444*, 860–867.
- Hou, C.-W., Mohanan, V., Zachara, N.E., and Grimes, C.L. (2015). Identification and biological consequences of the *O*-GlcNAc modification of the human innate immune receptor, Nod2. *Glycobiology* *cwv076*.
- Hou, J.K., Abraham, B., and El-Serag, H. (2011). Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 563–573.
- Hoving, L.R., van der Zande, H.J.P., Pronk, A., Guigas, B., Willems van Dijk, K., and van Harmelen, V. (2018). Dietary yeast-derived mannan oligosaccharides have immunomodulatory properties but do not improve high fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *PLOS ONE* *13*, e0196165.
- Hruby, A., and Hu, F.B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* *33*, 673–689.
- Hsieh, S.D., Yoshinaga, H., Muto, T., Sakurai, Y., and Kosaka, K. (2000). Health risks among Japanese men with moderate body mass index. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *24*, 358–362.
- Hu, R., Xia, C.-Q., Butfiloski, E., and Clare-Salzler, M. (2018). Effect of high glucose on cytokine production by human peripheral blood immune cells and type I interferon signaling in monocytes: Implications for the role of hyperglycemia in the diabetes inflammatory process and host defense against infection. *Clin. Immunol.* *195*, 139–148.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G.E., and Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.* *2*, 2111–2119.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., and Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5354–5359.

- Inan, M.S., Rasoulpour, R.J., Yin, L., Hubbard, A.K., Rosenberg, D.W., and Giardina, C. (2000). The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* *118*, 724–734.
- Inoue, Y., Inoue, J., Lambert, G., Yim, S.H., and Gonzalez, F.J. (2004). Disruption of hepatic C/EBPalpha results in impaired glucose tolerance and age-dependent hepatosteatosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 44740–44748.
- Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (France) (2008). Nutrition et obésité : Nouvelles mesures pour 2008 & Évaluation des messages accompagnant les publicités de l'industrie agro-alimentaire. 19.
- Jafar, N., Edriss, H., and Nugent, K. (2016). The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. *Am. J. Med. Sci.* *351*, 201–211.
- Jaisson, S., and Gillery, P. (2018). Les produits de glycation avancée des protéines. *Rev. Francoph. Lab.* *2018*, 48–55.
- JanvierLabs C57BL/6JRj - JANVIER LABS.
- Järnerot, G., Järnmark, I., and Nilsson, K. (1983). Consumption of Refined Sugar by Patients with Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, or Irritable Bowel Syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* *18*, 999–1002.
- Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., and Zhao, B. (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *58*, 1–15.
- JO n°0019 du 24 mai 2016 Arrêté du 9 mai 2016 portant application de la loi n° 2013-453 du 3 juin 2013 visant à garantir la qualité de l'offre alimentaire en outre-mer - Légifrance.
- Johansson, M.E.V. (2012). Fast Renewal of the Distal Colonic Mucus Layers by the Surface Goblet Cells as Measured by In Vivo Labeling of Mucin Glycoproteins. *PLoS ONE* *7*, e41009.
- Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 639–649.
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., and Hansson, G.C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 4659–4665.
- Jones, G.-R., Bain, C.C., Fenton, T.M., Kelly, A., Brown, S.L., Ivens, A.C., Travis, M.A., Cook, P.C., and MacDonald, A.S. (2018). Dynamics of Colon Monocyte and Macrophage Activation During Colitis. *Front. Immunol.* *9*, 2764.
- Jørgensen, M.S., Tornqvist, K.S., and Hvid, H. (2017). Calculation of Glucose Dose for Intraperitoneal Glucose Tolerance Tests in Lean and Obese Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* *56*, 95–97.
- Joshi, N., Caputo, G.M., Weitekamp, M.R., and Karchmer, A.W. (1999). Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* *341*, 1906–1912.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Philip Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* *491*, 119–124.

- Julia, C., Martinez, L., Allès, B., Touvier, M., Hercberg, S., Méjean, C., and Kesse-Guyot, E. (2018). Contribution of ultra-processed foods in the diet of adults from the French NutriNet-Santé study. *Public Health Nutr.* *21*, 27–37.
- Jurjus, A., Eid, A., Al Kattar, S., Zeenny, M.N., Gerges-Geagea, A., Haydar, H., Hilal, A., Oueidat, D., Matar, M., Tawilah, J., et al. (2016). Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA Clin.* *5*, 16–24.
- Kamada, N., Kim, Y.-G., Sham, H.P., Vallance, B.A., Puente, J.L., Martens, E.C., and Nunez, G. (2012). Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota. *Science* *336*, 1325–1329.
- Kaplan, G.G. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 720–727.
- Kaplan, G.G., and Ng, S.C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* *152*, 313-321.e2.
- Keku, T.O., Dulal, S., Deveaux, A., Jovov, B., and Han, X. (2015). The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *308*, G351-363.
- Khalili, H., Chan, S.S.M., Lochhead, P., Ananthakrishnan, A.N., Hart, A.R., and Chan, A.T. (2018). The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 525–535.
- Khalili, H., Hakansson, N., Chan, S.S., Ludvigsson, J.F., Olen, O., Chan, A.T., Hart, A.R., and Wolk, A. (2019). No Association Between Consumption of Sweetened Beverages and Risk of Later-Onset Crohn’s Disease or Ulcerative Colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *17*, 123–129.
- Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* *474*, 307–317.
- Kim, K.-A., Gu, W., Lee, I.-A., Joh, E.-H., and Kim, D.-H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One* *7*, e47713.
- Kiple, K.F., and Ornelas, K.C. (2000). *The Cambridge world history of food* (Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press).
- Kleiveland, C.R. (2015). Co-culture Caco-2/Immune Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, eds. (Cham (CH): Springer), p.
- Koboziev, I., Reinoso Webb, C., Furr, K.L., and Grisham, M.B. (2014). Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* *68*, 122–133.
- Kökten, T., Hansmannel, F., Melhem, H., and Peyrin-Biroulet, L. (2016). *Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI)*. HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale.

- Kökten, T., Gibot, S., Lepage, P., D'Alessio, S., Hablot, J., Ndiaye, N.-C., Busby-Venner, H., Monot, C., Garnier, B., Moulin, D., et al. (2018). TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice. *J. Crohns Colitis* *12*, 230–244.
- Konkel, L. (2013). The Environment Within: Exploring the Role of the Gut Microbiome in Health and Disease. *Environ. Health Perspect.* *121*.
- Koren, O., Goodrich, J.K., Cullender, T.C., Spor, A., Laitinen, K., Kling Bäckhed, H., Gonzalez, A., Werner, J.J., Angenent, L.T., Knight, R., et al. (2012). Host Remodeling of the Gut Microbiome and Metabolic Changes during Pregnancy. *Cell* *150*, 470–480.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 5112–5120.
- Lackey, D.E., and Olefsky, J.M. (2016). Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 15–28.
- Laffin, M., Fedorak, R., Zalasky, A., Park, H., Gill, A., Agrawal, A., Keshteli, A., Hotte, N., and Madsen, K.L. (2019). A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice. *Sci. Rep.* *9*.
- Landman, C., and Quévrain, E. (2016). Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *Rev. Médecine Interne* *37*, 418–423.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* *500*, 541–546.
- Lee, D., Albenberg, L., Compher, C., Baldassano, R., Piccoli, D., Lewis, J.D., and Wu, G.D. (2015). Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *148*, 1087–1106.
- Lelong, H., Blacher, J., Baudry, J., Adriouch, S., Galan, P., Fezeu, L., Hercberg, S., and Kesse-Guyot, E. (2017). Individual and Combined Effects of Dietary Factors on Risk of Incident Hypertension: Prospective Analysis From the NutriNet-Santé Cohort. *Hypertens. Dallas Tex* *1979* *70*, 712–720.
- Levine, A., Rhodes, J.M., Lindsay, J.O., Abreu, M.T., Kamm, M.A., Gibson, P.R., Gasche, C., Silverberg, M.S., Mahadevan, U., Boneh, R.S., et al. (2020). Dietary Guidance From the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *18*, 1381–1392.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* *444*, 1022–1023.
- Li, B., Zhang, C., and Zhan, Y.-T. (2018a). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* *2018*, 1–8.
- Li, M., Wu, Y., Hu, Y., Zhao, L., and Zhang, C. (2018b). Initial gut microbiota structure affects sensitivity to DSS-induced colitis in a mouse model. *Sci. China Life Sci.* *61*, 762–769.

- Linden, S.K., Sutton, P., Karlsson, N.G., Korolik, V., and McGuckin, M.A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 1, 183–197.
- Litwak, S.A., Wilson, J.L., Chen, W., Garcia-Rudaz, C., Khaksari, M., Cowley, M.A., and Enriori, P.J. (2014). Estradiol Prevents Fat Accumulation and Overcomes Leptin Resistance in Female High-Fat Diet Mice. *Endocrinology* 155, 4447–4460.
- Liu, F., Wang, X., Shi, H., Wang, Y., Xue, C., and Tang, Q.-J. (2017a). Polymannuronic acid ameliorated obesity and inflammation associated with a high-fat and high-sucrose diet by modulating the gut microbiome in a murine model. *Br. J. Nutr.* 117, 1332–1342.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017b). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2.
- Liu, X., Zeng, B., Zhang, J., Li, W., Mou, F., Wang, H., Zou, Q., Zhong, B., Wu, L., Wei, H., et al. (2016). Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci. Rep.* 6.
- Liubakka, A., and Vaughn, B.P. (2016). Clostridium difficile Infection and Fecal Microbiota Transplant. *AACN Adv. Crit. Care* 27, 324–337.
- Llewellyn, S.R., Britton, G.J., Contijoch, E.J., Vennaro, O.H., Mortha, A., Colombel, J.-F., Grinspan, A., Clemente, J.C., Merad, M., and Faith, J.J. (2018). Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. *Gastroenterology* 154, 1037-1046.e2.
- Lluch, A., Maillot, M., Gazan, R., Vieux, F., Delaere, F., Vaudaine, S., and Darmon, N. (2017). Individual Diet Modeling Shows How to Balance the Diet of French Adults with or without Excessive Free Sugar Intakes. *Nutrients* 9, 162.
- Lopetuso, L.R., Scaldaferri, F., Petito, V., and Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* 5, 23.
- Losurdo, G., Principi, M., Iannone, A., Ierardi, E., and Di Leo, A. (2016). The Interaction Between Celiac Disease and Intestinal Microbiota. *J. Clin. Gastroenterol.* 50 Suppl 2, *Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics&New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015*, S145–S147.
- Louie, J.C.Y., and Tapsell, L.C. (2015). Association between intake of total vs added sugar on diet quality: a systematic review. *Nutr. Rev.* 73, 837–857.
- Louis, É., and Marteau, P. (2019). 50 questions sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Doin).
- Lumeng, C.N., and Saltiel, A.R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 121, 2111–2117.
- Lustig, R.H., Schmidt, L.A., and Brindis, C.D. (2012). Public health: The toxic truth about sugar. *Nature* 482, 27–29.
- Lv, F., Chen, S., Wang, L., Jiang, R., Tian, H., Li, J., Yao, Y., and Zhuo, C. (2017). The role of microbiota in the pathogenesis of schizophrenia and major depressive disorder and the possibility of targeting microbiota as a treatment option. *Oncotarget* 8, 100899–100907.

- Lynch, L.A., O'Connell, J.M., Kwasnik, A.K., Cawood, T.J., O'Farrelly, C., and O'Shea, D.B. (2009). Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obes. Silver Spring Md* *17*, 601–605.
- Ma, X., Torbenson, M., Hamad, A.R.A., Soloski, M.J., and Li, Z. (2007). High-fat diet modulates non-CD1d-restricted natural killer T cells and regulatory T cells in mouse colon and exacerbates experimental colitis: High-fat diet and colonic inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* *151*, 130–138.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., and Girardin, S.E. (2007). The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* *19*, 106–115.
- Magnusson, K.R., Hauck, L., Jeffrey, B.M., Elias, V., Humphrey, A., Nath, R., Perrone, A., and Bermudez, L.E. (2015). Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility. *Neuroscience* *300*, 128–140.
- Mahmood, S., Birkaya, B., Rideout, T.C., and Patel, M.S. (2016). Lack of mitochondria-generated acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase complex downregulates gene expression in the hepatic de novo lipogenic pathway. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *311*, E117–E127.
- Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagioli, S., Gasbarrini, G., and Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J. Gastroenterol.* *22*, 361–368.
- Manichanh, C. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* *55*, 205–211.
- Marchesi, J.R., Holmes, E., Khan, F., Kochhar, S., Scanlan, P., Shanahan, F., Wilson, I.D., and Wang, Y. (2007). Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J. Proteome Res.* *6*, 546–551.
- Marteau, P., and Doré, J. (2017). *Le microbiote intestinal: un organe à part entière* (Montrouge: John Libbey eurotext).
- Marteau, P., Beaugerie, L., Schénowitz, G., and Tucat, G. (2003). *Prise en charge des MICI* (Montrouge: J. Libbey Eurotext).
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* *17*, 3.
- Martínez Steele, E., Baraldi, L.G., Louzada, M.L. da C., Moubarac, J.-C., Mozaffarian, D., and Monteiro, C.A. (2016). Ultra-processed foods and added sugars in the US diet: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ Open* *6*, e009892.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* *63*, 116–124.
- Matta, J., Zins, M., Feral-Pierssens, A.L., Ozguler, A., Goldberg, M., and Czernichow, S. (2016). Prévalence du surpoids et de l'obésité et des facteurs de risque cardio-métaboliques dans la cohorte constances. *Bull. Epidémiol. Hebd.* *640*.
- McDermott, A.J., and Huffnagle, G.B. (2014). The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* *142*, 24–31.

- McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H.J., and Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases: *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 100–113.
- McNelis, J.C., and Olefsky, J.M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* *41*, 36–48.
- Mendall, M., Harpsøe, M.C., Kumar, D., Andersson, M., and Jess, T. (2018). Relation of body mass index to risk of developing inflammatory bowel disease amongst women in the Danish National Birth Cohort. *PLOS ONE* *13*, e0190600.
- Mendall, M.A., Viran Gunasekera, A., Joseph John, B., and Kumar, D. (2011). Is Obesity a Risk Factor for Crohn's Disease? *Dig. Dis. Sci.* *56*, 837–844.
- Merlotti, C., Morabito, A., Ceriani, V., and Pontiroli, A.E. (2014). Prevention of type 2 diabetes in obese at-risk subjects: a systematic review and meta-analysis. *Acta Diabetol.* *51*, 853–863.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *81*.
- Mills, J.L., Troendle, J., Conley, M.R., Carter, T., and Druschel, C.M. (2010). Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. *Am. J. Clin. Nutr.* *91*, 1543–1549.
- Miyoshi, J., and Chang, E.B. (2017). The gut microbiota and inflammatory bowel diseases. *Transl. Res.* *179*, 38–48.
- Miyoshi, J., Qiao, Y., and Chang, E.B. (2018). The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Semin. Colon Rectal Surg.* *29*, 21–27.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., et al. (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* *142*, 46-54.e42.
- Morson, B.C., Shepherd, N.A., and Dawson, I. (2013). *Morson and Dawson's gastrointestinal pathology* (Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell).
- Mowat, A.McI. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 331–341.
- Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 667–685.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., et al. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 1027–1033.
- Murthy, S.N.S., Cooper, H.S., Shim, H., Shah, R.S., Ibrahim, S.A., and Sedergran, D.J. (1993). Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig. Dis. Sci.* *38*, 1722–1734.

- Myles, I.A. (2014). Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr. J.* 13.
- Nadaletto, B.F., Herbella, F.A.M., and Patti, M.G. (2016). Gastroesophageal reflux disease in the obese: Pathophysiology and treatment. *Surgery* 159, 475–486.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D.W., Kushugulova, A., Marotta, F., and Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr. Healthy Aging* 4, 267–285.
- Nam, Y.-D., Jung, M.-J., Roh, S.W., Kim, M.-S., and Bae, J.-W. (2011). Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS One* 6, e22109.
- Nancey, S., Hacini, F., Durand, P.-Y., Milhau, N., Kaiserlian, D., and Flourié, B. (2017). Apport des modèles animaux d'inflammation intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *15*, 9.
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK) (2004). *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems* (London (UK): RCOG Press).
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Washington (DC): National Academies Press (US)).
- Natividad, J.M.M., Petit, V., Huang, X., de Palma, G., Jury, J., Sanz, Y., Philpott, D., Garcia Rodenas, C.L., McCoy, K.D., and Verdu, E.F. (2012). Commensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in Nod1^{-/-}; Nod2^{-/-} mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1434–1446.
- Nell, S., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2010). The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 564–577.
- Newens, K.J., and Walton, J. (2016). A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* 29, 225–240.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E.C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S.F., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 384, 766–781.
- Nys, K., Agostinis, P., and Vermeire, S. (2013). Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 395–401.
- Okamoto, R., and Watanabe, M. (2004). Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J. Gastroenterol.* 39, 1–6.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., et al. (2019). *vegan: Community Ecology Package*.
- Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246.

- OMS (2003). Obésité: prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale ; rapport d'une consultation de l'OMS ; [Consultation OMS sur l'Obésité, Genève, 3 - 5 juin 1997].
- Paik, J., Fierce, Y., Treuting, P.M., Brabb, T., and Maggio-Price, L. (2013). High-Fat Diet-Induced Obesity Exacerbates Inflammatory Bowel Disease in Genetically Susceptible *Mdr1a*^{-/-} Male Mice. *J. Nutr.* *143*, 1240–1247.
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S.C., and Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* *67*, 574–587.
- Parker, A., Lawson, M.A.E., Vaux, L., and Pin, C. (2018). Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Environ. Microbiol.* *20*, 2337–2353.
- Patel, K.K., and Stappenbeck, T.S. (2013). Autophagy and Intestinal Homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* *75*, 241–262.
- Peterson, R.A. (2012). Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicol. Pathol.* *40*, 186–204.
- Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R., and Gordon, J.I. (2008). Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* *3*, 417–427.
- Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., and Girardin, S.E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 9–23.
- Pierre, J.F., Hinterleitner, R., Bouziat, R., Hubert, N.A., Leone, V., Miyoshi, J., Jabri, B., and Chang, E.B. (2018). Dietary antioxidant micronutrients alter mucosal inflammatory risk in a murine model of genetic and microbial susceptibility. *J. Nutr. Biochem.* *54*, 95–104.
- Pietrucci, D., Cerroni, R., Unida, V., Farcomeni, A., Pierantozzi, M., Mercuri, N.B., Biocca, S., Stefani, A., and Desideri, A. (2019). Dysbiosis of gut microbiota in a selected population of Parkinson's patients. *Parkinsonism Relat. Disord.*
- Pigeyre, M., Yazdi, F.T., Kaur, Y., and Meyre, D. (2016). Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *130*, 943–986.
- Piper, H.G. (2018). Intestinal microbiota in short bowel syndrome. *Semin. Pediatr. Surg.* *27*, 223–228.
- Plamondon, L., and Paquette, M.-C. (2017). La consommation de sucre et la santé. *Inst. Natl. Santé Publique Qué.* *23*.
- Porro, G.B., and Panza, E. (1985). Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* *291*, 971–972.
- Pott, J., and Maloy, K.J. (2018). Epithelial autophagy controls chronic colitis by reducing TNF-induced apoptosis. *Autophagy* *14*, 1460–1461.
- Prasad, C., Davis, K.E., Imrhan, V., Juma, S., and Vijayagopal, P. (2017). Advanced Glycation End Products and Risks for Chronic Diseases: Intervening Through Lifestyle Modification. *Am. J. Lifestyle Med.* *13*, 384–404.

- Qin, J., Li, R., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* *464*, 59–65.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* *41*, D590–D596.
- Racine, A., Bijon, A., Jantchou, P., Boutron-Ruault, M.-C., and Carbonnel, F. (2014). JFHOD | SNFGE.org - Société savante médicale française d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive. p.
- Racine, A., Carbonnel, F., Chan, S.S.M., Hart, A.R., Bueno-de-Mesquita, H.B., Oldenburg, B., van Schaik, F.D.M., Tjønneland, A., Olsen, A., Dahm, C.C., et al. (2016). Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study. *Inflamm. Bowel Dis.* *22*, 345–354.
- Rajca, S., Grondin, V., Louis, E., Vernier-Massouille, G., Grimaud, J.-C., Bouhnik, Y., Laharie, D., Dupas, J.-L., Pillant, H., Picon, L., et al. (2014). Alterations in the Intestinal Microbiome (Dysbiosis) as a Predictor of Relapse After Infliximab Withdrawal in Crohn's Disease: *Inflamm. Bowel Dis.* *1*.
- Rajilić-Stojanović, M. (2013). Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *27*, 5–16.
- Randolph, G.J., Ivanov, S., Zinselmeyer, B.H., and Scallan, J.P. (2017). The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *35*, 31–52.
- Reeves, A.E., Koenigsnecht, M.J., Bergin, I.L., and Young, V.B. (2012). Suppression of *Clostridium difficile* in the Gastrointestinal Tracts of Germfree Mice Inoculated with a Murine Isolate from the Family Lachnospiraceae. *Infect. Immun.* *80*, 3786–3794.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., et al. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* *341*, 1241214–1241214.
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* *47*, 241–259.
- Riley, S.A., Mani, V., Goodman, M.J., Dutt, S., and Herd, M.E. (1991). Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* *32*, 174–178.
- Riordan, A., Ruxton, C., and Hunter, J. (1998). A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur. J. Clin. Nutr.* *52*, 229–238.
- Rippe, J., and Angelopoulos, T. (2016a). Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. *Nutrients* *8*, 697.
- Rippe, J.M., and Angelopoulos, T.J. (2016b). Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease. *Int. J. Obes.* *2005* *40 Suppl 1*, S22-27.
- Rocha, D.M., Caldas, A.P., Oliveira, L.L., Bressan, J., and Hermsdorff, H.H. (2016). Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis* *244*, 211–215.

- Roda, G. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4264.
- Rogler, G. (2013). The History and Philosophy of Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis.* *31*, 270–277.
- Romano, A., Karimian Azari, E., Tempesta, B., Mansouri, A., Micioni Di Bonaventura, M.V., Ramachandran, D., Lutz, T.A., Bedse, G., Langhans, W., and Gaetani, S. (2014). High dietary fat intake influences the activation of specific hindbrain and hypothalamic nuclei by the satiety factor oleoylethanolamide. *Physiol. Behav.* *136*, 55–62.
- Ronto, R., Wu, J.H., and Singh, G.M. (2018). The global nutrition transition: trends, disease burdens and policy interventions. *Public Health Nutr.* *21*, 2267–2270.
- Rosas-Villegas, A., Sánchez-Tapia, M., Avila-Nava, A., Ramírez, V., Tovar, A., and Torres, N. (2017). Differential Effect of Sucrose and Fructose in Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress. *Nutrients* *9*, 393.
- Russell, S.L., Gold, M.J., Hartmann, M., Willing, B.P., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M.-R., Mohn, W.W., McNagny, K.M., et al. (2012). Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* *13*, 440–447.
- Russell, W.R., Gratz, S.W., Duncan, S.H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Wallace, R.J., et al. (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* *93*, 1062–1072.
- Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., and Tao, F. (2016). The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* *16*, 86.
- Sakamoto, N., Kono, S., Wakai, K., Fukuda, Y., Satomi, M., Shimoyama, T., Inaba, Y., Miyake, Y., Sasaki, S., Okamoto, K., et al. (2005). Dietary Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease: A Multicenter Case-Control Study in Japan. *Inflamm. Bowel Dis.* *11*, 154–163.
- Salinero, A.E., Anderson, B.M., and Zuloaga, K.L. (2018). Sex differences in the metabolic effects of diet-induced obesity vary by age of onset. *Int. J. Obes.* *42*, 1088–1091.
- Saqui-Salces, M., Tsao, A.C., Gilliland, M.G., and Merchant, J.L. (2017). Weight gain in mice on a high caloric diet and chronically treated with omeprazole depends on sex and genetic background. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *312*, G15–G23.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *134*, 577–594.
- Sasso, S., Sampaio e Souza, P.C., Santana, L.F., Cardoso, C.A.L., Alves, F.M., Portugal, L.C., de Faria, B.B., da Silva, A.F., Motta-Castro, A.R.C., Soares, L.S., et al. (2019). Use of an Extract of *Annona muricata* Linn to Prevent High-Fat Diet Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice. *Nutrients* *11*, 1509.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: Open-

- Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 7537–7541.
- Schneider, S.M. (2018). Nutrition et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : recommandations ESPEN. *Post'U* 6.
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., and Cerf-Bensussan, N. (2013). Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: an unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system. *Semin. Immunol.* *25*, 342–351.
- Schönherr-Hellec, S., Butel, M.J., and Aires, J. (2017). Dysbiose et microbiote intestinal du nouveau-né prématuré : l'entérocologie ulcéro-nécrosante. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* *20*, 188–195.
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., and Duncan, S.H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* *69*, 52–60.
- Sen, T., Cawthon, C.R., Ihde, B.T., Hajnal, A., DiLorenzo, P.M., de La Serre, C.B., and Czaja, K. (2017). Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. *Physiol. Behav.* *173*, 305–317.
- Señarís, R.M., Trujillo, M.L., Navia, B., Comes, G., Ferrer, B., Giralt, M., and Hidalgo, J. (2011). Interleukin-6 regulates the expression of hypothalamic neuropeptides involved in body weight in a gender-dependent way. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 675–686.
- Sharma, R.B., O'Donnell, A.C., Stamateris, R.E., Ha, B., McCloskey, K.M., Reynolds, P.R., Arvan, P., and Alonso, L.C. (2015). Insulin demand regulates β cell number via the unfolded protein response. *J. Clin. Invest.* *125*, 3831–3846.
- SIGN, S.I.G.N. (2010). Management of obesity: a national clinical guideline (Edinburgh: Scottish Intercollegiate Guidelines Network).
- Silkoff, K., Hallak, A., Yegena, L., Rozen, P., Mayberry, J.F., Rhodes, J., and Newcombe, R.G. (1980). Consumption of refined carbohydrate by patients with Crohn's disease in Tel-Aviv-Yafo. *Postgrad. Med. J.* *56*, 842–846.
- Singh, S., Dulai, P.S., Zarrinpar, A., Ramamoorthy, S., and Sandborn, W.J. (2017). Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 110–121.
- Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., and Doré, J. (2006). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 106–111.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., and Tannock, G.W. (2008). Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: What has it revealed?: *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 858–867.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Doré, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 1183–1189.

- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* *66*, 1039–1048.
- Sommer, F., Rühlemann, M.C., Bang, C., Höppner, M., Rehman, A., Kaleta, C., Schmitt-Kopplin, P., Dempfle, A., Weidinger, S., Ellinghaus, E., et al. (2017). Microbiomarkers in inflammatory bowel diseases: caveats come with caviar. *Gut* *66*, 1734–1738.
- Statovci, D., Aguilera, M., MacSharry, J., and Melgar, S. (2017). The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front. Immunol.* *8*.
- Stefka, A.T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S.K., Tjota, M.Y., Seo, G.-Y., Cao, S., Theriault, B.R., et al. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 13145–13150.
- Surwit, R.S., Kuhn, C.M., Cochrane, C., McCubbin, J.A., and Feinglos, M.N. (1988). Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes* *37*, 1163–1167.
- Sutaria, S., Devakumar, D., Yasuda, S.S., Das, S., and Saxena, S. (2019). Is obesity associated with depression in children? Systematic review and meta-analysis. *Arch. Dis. Child.* *104*, 64–74.
- Tan, L., Zhao, S., Zhu, W., Wu, L., Li, J., Shen, M., Lei, L., Chen, X., and Peng, C. (2018). The *Akkermansia muciniphila* is a gut microbiota signature in psoriasis. *Exp. Dermatol.* *27*, 144–149.
- Tang, W.H.W., Kitai, T., and Hazen, S.L. (2017). Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ. Res.* *120*, 1183–1196.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D.L.E., Nalin, R., et al. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* *11*, 2574–2584.
- Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol. Rev.* *93*, 359–404.
- Team, R.C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Tennant, P.W.G., Rankin, J., and Bell, R. (2011). Maternal body mass index and the risk of fetal and infant death: a cohort study from the North of England. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *26*, 1501–1511.
- Thaiss, C.A., Levy, M., Grosheva, I., Zheng, D., Soffer, E., Blacher, E., Braverman, S., Tengeler, A.C., Barak, O., Elazar, M., et al. (2018). Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science* *359*, 1376–1383.
- Todoric, J., Di Caro, G., Reibe, S., Henstridge, D.C., Green, C.R., Vrbanac, A., Ceteci, F., Conche, C., McNulty, R., Shalapour, S., et al. (2020). Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nat. Metab.* 1–12.

- Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M.G., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., Gueimonde, M., and Ruas-Madiedo, P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 15163–15176.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet* 389, 1741–1755.
- Travis, S.P.L., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M.T., Altman, D.G., Colombel, J.-F., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lémann, M., Lichtenstein, G.R., et al. (2012). Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 61, 535–542.
- Treuting, P.M., Arends, M.J., and Dintzis, S.M. (2018). Upper Gastrointestinal Tract. In *Comparative Anatomy and Histology*, (Elsevier), pp. 191–211.
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., and Gordon, J.I. (2008). Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809.
- Tyakht, A.V., Kostryukova, E.S., Popenko, A.S., Belenikin, M.S., Pavlenko, A.V., Larin, A.K., Karpova, I.Y., Selezneva, O.V., Semashko, T.A., Ospanova, E.A., et al. (2013). Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat. Commun.* 4, 2469.
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P.B., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet* 389, 1756–1770.
- Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F.M., Portincasa, P., Gobetti, M., and De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* 8.
- Vaiserman, A.M., Koliada, A.K., and Marotta, F. (2017). Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res. Rev.* 35, 36–45.
- Van Dijk, S.J., Tellam, R.L., Morrison, J.L., Muhlhausler, B.S., and Molloy, P.L. (2015). Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin. Epigenetics* 7.
- Van Eden, W., Wick, G., Albani, S., and Cohen, I. (2007). Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113, 217–237.
- Vanhoutvin, S.A.L.W., Troost, F.J., Hamer, H.M., Lindsey, P.J., Koek, G.H., Jonkers, D.M.A.E., Kodde, A., Venema, K., and Brummer, R.J.M. (2009). Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PloS One* 4, e6759.
- Verdot, C., Torres, M., Salanave, B., and Deschamps, V. (2017). Children and adults body mass index in france in 2015. Results of the Esteban study and trends since 2006. *Bull. Epidémiol. Hebd.* 234–241.

- Voora, V., Bermúdez, S., and Larrea, C. (2019). Global Market Report: Sugar. *Int. Inst. Sustain. Dev.* 12.
- Waetjen, L.E., Liao, S., Johnson, W.O., Sampsel, C.M., Sternfield, B., Harlow, S.D., and Gold, E.B. (2007). Factors associated with prevalent and incident urinary incontinence in a cohort of midlife women: a longitudinal analysis of data: study of women's health across the nation. *Am. J. Epidemiol.* 165, 309–318.
- Wagnerova, A., Babickova, J., Liptak, R., Vlkova, B., Celec, P., and Gardlik, R. (2017). Sex Differences in the Effect of Resveratrol on DSS-Induced Colitis in Mice. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2017, 8051870.
- Wang, F., and Muller, S. (2015). Manipulating Autophagic Processes in Autoimmune Diseases: A Special Focus on Modulating Chaperone-Mediated Autophagy, an Emerging Therapeutic Target. *Front. Immunol.* 6.
- Wang, B., Bobe, G., LaPres, J.J., and Bourquin, L.D. (2009a). High sucrose diets promote intestinal epithelial cell proliferation and tumorigenesis in APC(Min) mice by increasing insulin and IGF-I levels. *Nutr. Cancer* 61, 81–93.
- Wang, B., Bobe, G., LaPres, J., and Bourquin, L. (2009b). Dietary Carbohydrate Source Alters Gene Expression Profile of Intestinal Epithelium in Mice. *Nutr. Cancer* 61, 146–155.
- Wang, S.-L., Shao, B.-Z., Zhao, S.-B., Fang, J., Gu, L., Miao, C.-Y., Li, Z.-S., and Bai, Y. (2018). Impact of Paneth Cell Autophagy on Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 9.
- Wang, Y., Chen, X., Song, Y., Caballero, B., and Cheskin, L.J. (2008). Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* 73, 19–33.
- Wędrychowicz, A., Zajac, A., and Tomasik, P. (2016). Advances in nutritional therapy in inflammatory bowel diseases: Review. *World J. Gastroenterol.* 22, 1045–1066.
- Weiss, G.A., Chassard, C., and Hennet, T. (2014). Selective proliferation of intestinal *Barnesiella* under fucosyllactose supplementation in mice. *Br. J. Nutr.* 111, 1602–1610.
- Williams, L.M., Campbell, F.M., Drew, J.E., Koch, C., Hoggard, N., Rees, W.D., Kamolrat, T., Thi Ngo, H., Steffensen, I.-L., Gray, S.R., et al. (2014). The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases. *PLoS ONE* 9.
- Wilson, R.A., Deasy, W., Stathis, C.G., Hayes, A., and Cooke, M.B. (2018). Intermittent Fasting with or without Exercise Prevents Weight Gain and Improves Lipids in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients* 10.
- Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B Lymphocytes Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production of Pathogenic IgG Antibody. *Nat. Med.* 17, 610–617.
- Winpenney, E.M., Penney, T.L., Corder, K., White, M., and van Sluijs, E.M.F. (2017). Changes in consumption of added sugars from age 13 to 30 years: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies: Change in sugar intake from age 13 to 30. *Obes. Rev.* 18, 1336–1349.

- Wiseman, M. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc. Nutr. Soc.* *67*, 253–256.
- Woodmansey, E.J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 1178–1186.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* *334*, 105–108.
- Yang, W., Yu, T., Huang, X., Bilotta, A.J., Xu, L., Lu, Y., Sun, J., Pan, F., Zhou, J., Zhang, W., et al. (2020). Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat. Commun.* *11*.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* *30*, e15.
- Yang, Z., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2015). Autophagy in autoimmune disease. *J. Mol. Med.* *93*, 707–717.
- Yassin, M., Sadowska, Z., Tritsarlis, K., Kissow, H., Hansen, C.H.F., Forman, J.L., Rogler, G., Troelsen, J.T., Pedersen, A.E., and Olsen, J. (2018). Rectal Insulin Instillation Inhibits Inflammation and Tumor Development in Chemically Induced Colitis. *J. Crohns Colitis*.
- Yatsunenkov, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* *486*, 222–227.
- Yu, G., and He, Q.-Y. (2016). ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol. Biosyst.* *12*, 477–479.
- Yurkovetskiy, L., Burrows, M., Khan, A.A., Graham, L., Volchkov, P., Becker, L., Antonopoulos, D., Umesaki, Y., and Chervonsky, A.V. (2013). Gender Bias in Autoimmunity Is Influenced by Microbiota. *Immunity* *39*, 400–412.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* *454*, 455–462.
- Zhang, H., DiBaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M.D., Wing, R., Rittmann, B.E., et al. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2365–2370.
- Zhang, H., Zheng, L., Chen, J., Fukata, M., Ichikawa, R., Shih, D.Q., and Zhang, X. (2017). The protection role of Atg1611 in CD11c+ dendritic cells in murine colitis. *Immunobiology* *222*, 831–841.
- Zhuang, X., Xiong, L., Li, L., Li, M., and Chen, M. (2017). Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *32*, 28–38.

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J.-S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., and Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 53–60.

(1998). Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Rome, 14-18 April 1997 (Rome: World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Résumé : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation de la muqueuse liée à une altération du microbiote intestinal et une hyperactivité du système immunitaire. La prévalence de ces pathologies ne cesse d'augmenter dans les pays occidentaux où le régime « Western Diet » est mis en cause dans de nombreuses pathologies telles que l'obésité, le diabète ou certains cancers. La nutrition est un facteur environnement important impliqué dans les MICI par le biais de mécanismes biologiques encore mal compris. Nous nous sommes intéressés à la consommation en sucre (saccharose) car ce dernier représente jusqu'à 25 % de l'apport énergétique total dans les pays industrialisés alors que l'OMS recommande de le réduire à moins de 5 %. Nous avons étudié les effets d'un régime enrichi en saccharose sur l'homéostasie intestinale et sur la colite expérimentale chez la souris. Chez les sujets sains, ce régime a provoqué des lésions endoscopiques prédisposant ainsi les animaux à la colite. L'aggravation de la colite était précédée d'une dysbiose du microbiote intestinal, avec une déplétion totale de bactéries appartenant au genre *Barnesiella* et une reprogrammation transcriptionnelle des gènes coliques, associés aux MICI selon les annotations fonctionnelles. *In cellulo*, une faible dose de fructose a provoqué une altération des jonctions cellulaires tandis qu'une forte dose de glucose a été nécessaire pour induire des dommages similaires. Après traitement colitogène, le régime hypersucré aggrave la sévérité des signes cliniques, endoscopiques et histologiques en perturbant l'organisation des jonctions cellulaires et le processus d'autophagie dans les cellules intestinales. Les effets *in vivo* sur le microbiome et le transcriptome des souris se sont avérés partiellement réversibles après retour des animaux au régime contrôle. Finalement, la surconsommation de sucre a provoqué un état « pré-MICI » caractérisé par une régulation à la baisse du transcriptome colique des souris ainsi qu'une immunodépression, des altérations importantes de l'architecture cellulaire et une dysbiose du microbiote intestinal. Ainsi, nos travaux soutiennent les recommandations internationales concernant la réduction de la consommation de sucre, ce qui pourrait limiter le risque de développer et/ou d'aggraver l'inflammation intestinale.

Mots clefs : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), régime occidental, nutrition, sucre, colite expérimentale, microbiote intestinal, transcriptome, perméabilité intestinale, Caco-2

Summary: Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases characterized by inflammation of the mucosa associated with gut microbiota dysbiosis and overreaction of the immune system. IBD prevalence is increasing in industrialized countries where the western dietary pattern is involved in many pathologies such as obesity, diabetes, and cancers. Nutrition appears to be an important environmental factor involved in IBD onset through poorly understood biological mechanisms. Here we focused on the early consequences of a diet enriched in sugar (sucrose) because it represents up to 25% of total energy intake within industrialized countries, while the WHO recommends reducing it to less than 5%. We studied the effects of high sucrose diet on intestinal homeostasis and experimental colitis in mice. In healthy subjects, this diet caused endoscopic lesions, thus predisposing to colitis. The worsening of colitis was preceded by gut microbiota dysbiosis with complete depletion of bacteria belonging to *Barnesiella* and transcriptional reprogramming of colonic genes, associated with IBD according to functional annotations. *In cellulo*, a low dose of fructose induced cell junctions' alterations, while a high dose of glucose was needed to induce similar damage. After colitogenic treatment, the high sugar diet worsens the severity of clinical and endoscopic signs by disrupting the organization of cell-cell junctions and the autophagy process in intestinal cells. Such *in-vivo* effects on mice microbiome and transcriptome were partially reversible upon mice return to control diet. Finally, sugar overconsumption induces a "pre-IBD" state characterized by an overall downregulation of the colonic transcriptome in mice together with immunodepression, significant alterations in cellular architecture, and gut microbiota dysbiosis. Our findings support international recommendations about reducing sugar consumption to reduce the risk of developing or worsening intestinal inflammation.

Key words: Inflammatory Bowel Disease, Western Diet, nutrition, sugar, colitis, gut microbiota, transcriptome, animal model, mouse, gut permeability, Caco-2.