



HAL
open science

Impact du microbiote intestinal dans la maladie alcoolique du foie

Frédéric Cailleux

► **To cite this version:**

Frédéric Cailleux. Impact du microbiote intestinal dans la maladie alcoolique du foie. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114806 . tel-01067652

HAL Id: tel-01067652

<https://theses.hal.science/tel-01067652>

Submitted on 23 Sep 2014

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.

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THERAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUE

POLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNEE 2014

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 07/04/2014

Par

Frédéric CAILLEUX

**Impact du microbiote intestinal dans la
maladie alcoolique du foie**

Composition du jury :

Président du jury : Pr. Jean-Charles DUCLOS-VALLEE

Rapporteurs : Dr. Catherine POSTIC

Dr. Philippe GERARD

Examineurs : Dr Fatima TEIXEIRA-CLERC

Dr. Chantal DESDOUETS

Directrice de thèse : Dr. Anne-Marie CASSARD-DOULCIER

**A mes parents,
A ma famille,
A ma Lucie.**

« La nuit, aussi bien que l'alcool, est un grand révélateur »

Françoise Sagan

REMERCIEMENTS

A la directrice de cette thèse,

Dr. Anne-Marie CASSARD-DOULCIER,

Pour son opiniâtreté, sa confiance en moi et ses conseils avisés,

Pendant ces trois années,

Sincères remerciements,

Au directeur d'équipe,

Pr. Gabriel PERLEMUTER,

Pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherches,

Sincères remerciements,

Aux rapporteurs de cette thèse,

Dr. Catherine POSTIC et Dr. Philippe GERARD,

Pour leurs remarques et leurs suggestions menant à la version finale de ce manuscrit,

Sincères remerciements,

Aux examinateurs de cette thèse,

Dr. Fatima TEIXEIRA-CLERC et Pr. Jean-Charles DUCLOS-VALLEE,

Qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail,

Sincères remerciements

Au Dr. Catherine POSTIC ,

Qui a jugé mon travail lors d'un comité de thèse et permis la réalisation de ce travail par
ses remarques pertinentes et ses critiques constructives,

Sincères remerciements,

Aux collaborateurs,

Dr. Laura WRZOSEK, Françoise GAUDIN, Mathieu HORCKMANS, Dr. Marta LLOPIS,

Dr. Patrice HEMON, Dr. Hélène GARY, Gladys FERRERE, Olivier ROBERT

Qui m'ont soutenu par leurs compétences et leur savoir-faire,

Mylène LEVANT et Didier ROBRIEUX,

Pour avoir bien pris soin de mes souris,

Odile BOULIN,

le pilier de l'unité U996, pour ta patience et ta diligence malgré les montagnes de
commandes,

Sincères remerciements,

A Floriane MEURIS, Pasquale CUTOLO, Joseph CALMETTE, Mathieu HORCKMANS,

Olivier ROBERT,

Pour leur soutien amical à toute épreuve pendant ces trois années,

Sincères remerciements

A l'unité INSERM U996,

Sincères remerciements.

RESUME

Mots clés : Maladie alcoolique du foie, régime Lieber DeCarli, Microbiote intestinal

La consommation excessive d'alcool est la première cause de cirrhose en France. L'atteinte hépatique débute par une stéatose (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes) qui peut évoluer vers un état inflammatoire (hépatite alcoolique) lors d'une consommation chronique d'alcool. La maladie peut ensuite évoluer vers la fibrose, la cirrhose et jusqu'à l'hépatocarcinome. La mortalité des formes aiguës de l'hépatite alcoolique sévère est comprise entre 50 et 75%. La corticothérapie est le seul traitement qui peut améliorer le pronostic à court terme. D'autres facteurs que la seule consommation excessive d'alcool interviennent dans la genèse des lésions hépatiques. Ainsi, parmi les sujets ayant une forte consommation d'alcool à long terme, la majorité des patients développent une stéatose mais seulement 10 à 35% développeront une hépatite et 8 à 20% évolueront vers la cirrhose. La recherche de facteurs qui relie la consommation d'alcool et la nature et progression des lésions hépatiques est donc essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge de ces formes graves.

Afin de rechercher quels sont ces facteurs, nous avons utilisé un modèle murin d'alcoolisation. Nous avons utilisé un régime Lieber de Carli (LDC) enrichi en graisses, additionné d'alcool ou non. Nous avons orienté notre projet vers un axe microbiote-inflammation hépatique en analysant l'évolution des populations bactériennes intestinales au cours de la surconsommation d'alcool chez la souris. Des résultats nous ont montré que les *Bacteroides* variaient grandement d'une animalerie à l'autre. L'objet de nos travaux était d'étudier l'effet de la modulation des *Bacteroides* sur l'apparition des lésions hépatiques lors de la maladie alcoolique du foie.

SUMMARY

Key words : Alcoholic liver disease, Lieber DeCarli diet, intestinal microbiota

Excessive alcohol consumption is the first cause of liver cirrhosis in France. Liver damages begin with steatosis (accumulation of fat in hepatocytes), which can progress to an inflammatory state (alcoholic hepatitis) during a long-term chronic alcohol consumption. Then, the disease can degenerate in liver fibrosis, cirrhosis and reach the hepatocarcinoma stage. The mortality rate of acute alcoholic hepatitis ranges from 50% to 75%. Treatment based on corticoids is the only available and efficient treatment to improve the short-term prognosis. Other factors than only excessive alcohol consumption play a role in the onset of hepatic damages. Among patients having a long-term alcohol excessive consumption, most of them will develop a steatosis, whereas only 10% to 35% will develop alcoholic hepatitis and only 8 to 20% a liver cirrhosis. Researching these factors linking alcohol consumption and the nature and onset of liver injuries is of the utmost importance in order to find new therapeutic targets improving the patient life expectancy.

In order to research these actors, we used a mice alcoholization model. We used a Lieber DeCarli diet, enriched in fat, added with ethanol or not. We studied the link between intestinal microbiota composition and the onset of liver injuries, by analyzing bacterial populations during an excessive alcohol consumption in mice. We discovered that one of the major bacterial population composing the intestinal microbiota, *Bacteroides*, underwent differential modifications from one animal housing facility to the other. The aim of our work was to modulate the *Bacteroides* population and study its effects on liver injuries.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
AVANT PROPOS	13
INTRODUCTION	17
1 LESIONS HEPATIQUES AU COURS DE LA MAF	18
1.1 Stéatose Hépatique	22
1.2 L'hépatite alcoolique	24
1.3 Fibrose hépatique	30
1.4 Cirrhose et carcinome hépatocellulaire	33
2 METABOLISME DE L'ETHANOL	34
2.1 Pharmacocinétique de l'éthanol	34
2.2 Enzymes du métabolisme de l'éthanol	36
2.3 Effet de premier passage	38
2.4 Elimination et toxicité de l'éthanol	39
3 MICROBIOTE INTESTINAL : SON ROLE DANS LA MAF	42
3.1 Microbiote intestinal : un organe à part entière	42
3.2 Interaction microbiote intestinal et hôte	44
3.3 Microbiote et MAF	48
4 MODELES MURINS D'ALCOOLISATION	51
4.1 Modèle de Tsukamoto-French : Gastrostomie et Lieber de Carli	52
4.2 Alcoolisation par un régime adapté : Lieber DeCarli	53
PRESENTATION DU PROJET DE THESE	56
RESULTATS	59
Partie I : Implication des dérégulations lymphocytaires dans la MAF	60
Partie II : Corriger la dysbiose intestinale chez les souris alcool permet d'inhiber la toxicité hépatique de l'éthanol	64
BIBLIOGRAPHIE	100

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Consommation mondiale d'alcool en litres par personne -----	13
Figure 2: Les effets délétères de l'alcool sur la santé.-----	14
Figure 3 : Carte des alcools les plus consommés par pays -----	15
Figure 4 : Anatomie du foie -----	18
Figure 5 : Schéma du lobule hépatique -----	19
Figure 6 : Cellules immunitaires dans un foie sain -----	20
Figure 7: Evolution de la maladie alcoolique du foie -----	21
Figure 8 : Voies métaboliques conduisant à la stéatose-----	23
Figure 9: Stress oxydatif et dommages cellulaires-----	25
Figure 10: LPS et inflammation hépatique-----	26
Figure 11: Signalisation du LPS-----	27
Figure 12: Inflammasomes et cytokines pro-inflammatoires-----	29
Figure 13: Dérégulations du rétrocontrôle NK-CEF provoquant la fibrose hépatique -----	32
Figure 14: Evolution de l'éthanolémie plasmatique en fonction du temps-----	35
Figure 15: Métabolisme de l'éthanol -----	36
Figure 16: Dérégulations métaboliques liés à une surconsommation d'alcool -----	40
Figure 17: Microbiote intestinal et sa répartition dans le tractus digestif.-----	43
Figure 18: Dysbiose et pathologie hépatique -----	45

Figure 19: Interactions de différents TLR avec leurs PAMPs associés et déclenchement de la réponse immunitaire-----	47
Figure 20: Composition du régime standard Lieber DeCarli-----	53
Figure 21: Différents régimes LDC avec les observations histologiques associées -----	54
Figure 22: Atteintes cellulaires liées au régime LDC -----	55
Figure 23 : Atteinte hépatique lors de notre première alcoolisation par régime LDC. -----	60
Figure 24 : Infiltration lymphocytaire hépatique chez les souris alcool -----	61
Fugure 25 : Alcoolisation régime LDC testée dans notre laboratoire-----	62

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Alcool déshydrogénase
AGCM : Acides gras à chaînes moyennes
AIM2 : Absent in melanoma 2
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ASC : Apoptosis-associated speck-like protein
CB1 : Cannabinoid receptor 1
CD : Cluster of differentiation
CEF : Cellules étoilées du foie
CK : Cellules de Kupffer
ConA : Concavalin-A
CYP2E1 : Cytochrome P450
IFN : Interferon
IL : Interleukin
INR : International normalized ratio of prothrombin time
IRF : Interferon regulatory factor
LBP : LPS-binding protein
LDC : Régime Lieber DeCarli
LPS : Lypopolysaccharide
MAF : Maladie alcoolique du foie
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein 1
MELD : Model for end stage liver disease
MEOS : Microsomal ethanol oxidizing system
Myd88 : Myeloid differentiation factor 88
NAD : Nicotinamide adenine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adenine dinucléotide hydrogéné
NASH : Non-alcoholic steatohepatitis
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
NK : Lymphocytes natural killer
NKG2D : Natural killer Group 2D

NKT : Lymphocytes T natural killer
NLR : NOD-like receptor
NOD : Nucleotid-binding oligomerization domain
PAMP : Pathogen associated molecular pattern
PKA : Protéine kinase A
PRR : Pattern-recognition receptor
SREBP-1 : Sterol regulatory element binding protein-1
STAT-1 : Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
TG : Triglycérides
TGF : Transforming growth factor
TIR : Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP : TIR domain-containing adaptor protein
TLR : Toll-like receptor 4
TNF- α : Tumor necrosis factor
TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

AVANT PROPOS

Les effets de l'alcool sur la santé constituent aujourd'hui encore un lourd problème de santé publique. Le Comité français d'éducation pour la santé (CFES) estime à 5 millions le nombre de personnes ayant en France des problèmes médicaux, psychologiques ou sociaux en relation avec une consommation excessive d'alcool.

D'un point de vue médical, l'intoxication alcoolique chronique est responsable d'un excès de morbidité et de mortalité par cancer, hépatopathie, atteinte du système nerveux central ou périphérique, maladie cardiovasculaire ou anomalies du développement, chez l'enfant exposé *in utero*.

En France, l'alcoolisme est aussi responsable de 80 à 90% des pancréatites chroniques. C'est une affection caractérisée par une sclérose irrégulièrement répartie, entraînant une destruction progressive du parenchyme exocrine et endocrine, et des anomalies des canaux pancréatiques, remplis de bouchons protéiques calcifiés. Les conséquences de l'usage de boissons alcooliques sur la santé dépendent toutefois de la susceptibilité du consommateur et surtout de son niveau de consommation.

En France, le fait de consommer des boissons alcooliques (vin, bière, spiritueux) correspond pour une majorité d'hommes et de femmes à des habitudes alimentaires ou culturelles bien ancrées, la plupart des individus ne présentant pas de problème particulier lié à cet usage.

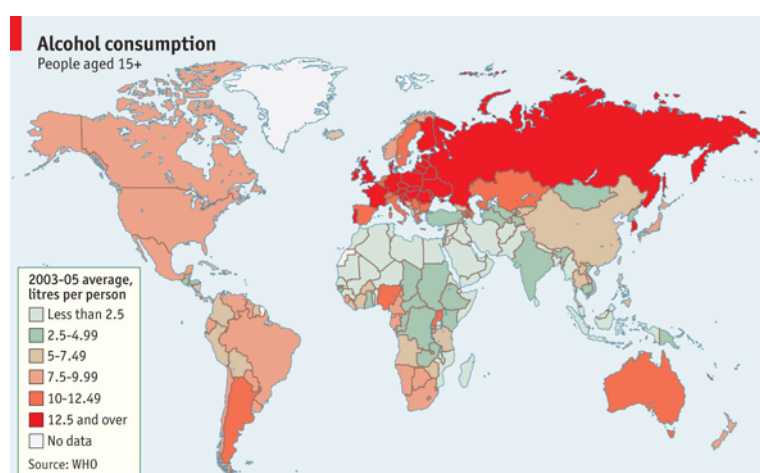


Figure 1: Consommation mondiale d'alcool en litres par personne (World Health Organisation).

Les données épidémiologiques récentes suggèrent même une relation entre une consommation modérée d'un alcool comme le vin rouge (2 verres par jour) et un risque moindre de mortalité. Les pathologies associées à l'alcool se développent principalement après l'âge de 50 ans, dans les pays industrialisés où l'incidence des maladies cardiovasculaires est élevée.

Le nombre de décès liés à la consommation d'alcool est édifiant puisque près de 50000 décès sont attribuables chaque année à l'alcool en France (Journal of Public Health, 2009). Ce chiffre rend aussi compte de 9% des décès attribuables à l'alcool en France en 2009 et de 2,5 millions de morts par an dans le monde (World Health Organisation, Février 2011).

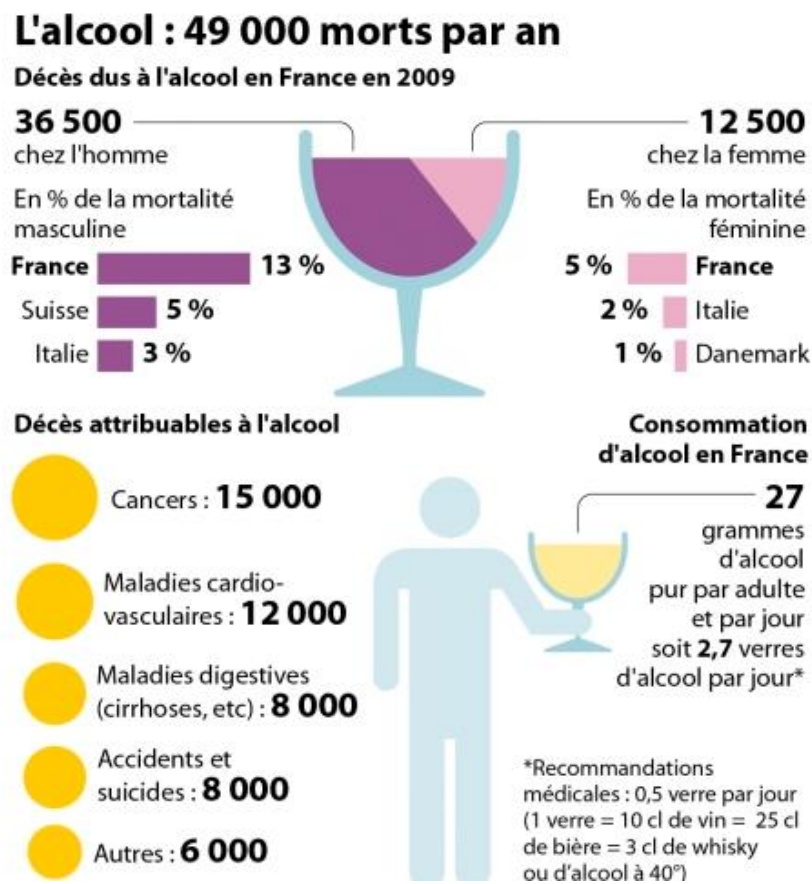


Figure 2: Les effets délétères de l'alcool sur la santé.

Nombres de décès selon le sexe, consommation moyenne en France et catégorisation des décès liés à l'alcool en fonction de leur maladie associée (European Journal of Public Health, 2009).

Les hommes et les femmes sont inégaux devant l'alcool et bien que consommant traditionnellement moins d'alcool que les hommes, les femmes présentent cependant une sensibilité accrue face à l'alcool. Ainsi, 80% des décès occasionnés par l'alcool en France concernent des hommes. Il est difficile pour une personne de savoir quand elle a franchi le seuil de consommation quotidienne modérée d'alcool pour tomber dans l'alcoolisme. Le seuil d'une consommation modérée est fixé à 3 verres d'alcool par jour maximum pour les hommes (soit 36g d'alcool pur), et 2 verres d'alcool par jour maximum pour les femmes (soit 24g d'alcool pur), en respectant au moins un jour d'abstinence par semaine. En sachant que pour une flûte de champagne, une chope de bière ou un verre de vin on consomme à peu près la même quantité d'alcool : 10 g par verre. Traditionnellement, un alcool est le reflet de la culture qui en a créé la recette, et les habitudes de consommation varient en fonction de nombreux paramètres sociaux inhérents à chaque pays.



Figure 3 : Carte des alcools les plus consommés par pays (Cocktails.com)

Les risques liés à l'alcool touchant aussi bien adolescents que des personnes d'un âge plus avancé, c'est un des problèmes de santé majeur de notre temps. Cependant, la recherche associée aux pathologies liées à l'alcool se heurte aux préjugés concernant n'importe quelle addiction puisque, à première vue, la guérison du patient ne dépend que de sa simple volonté et de son abstinence. Les raisons pour lesquelles une personne tombe dans l'alcoolisme sont pourtant bien diverses, et comme nous le verrons la pathologie alcoolique est parfois trop avancée pour que l'abstinence seule assure la survie à long terme du patient.

Dans le cadre de notre étude, nous avons axé nos recherches vers les mécanismes impliqués dans l'installation et le développement de la maladie alcoolique du foie (MAF), et en particulier un des cofacteurs qui font que pour une consommation chronique identique d'alcool des individus vont développer des lésions hépatiques alors que d'autres garderont un foie sain. Afin d'introduire ces résultats, je vais dans la partie introduction aborder les lésions hépatiques développées au cours de la MAF, le métabolisme de l'éthanol puis le microbiote intestinal et son rôle dans l'organisme, et je conclurai par une présentation des différents modèles murins d'alcoolisation disponibles à ce jour.

INTRODUCTION

1 LESIONS HEPATIQUES AU COURS DE LA MAF

Le foie est le plus volumineux organe du corps humain (2% du poids corporel soit une moyenne de 1,5kg).

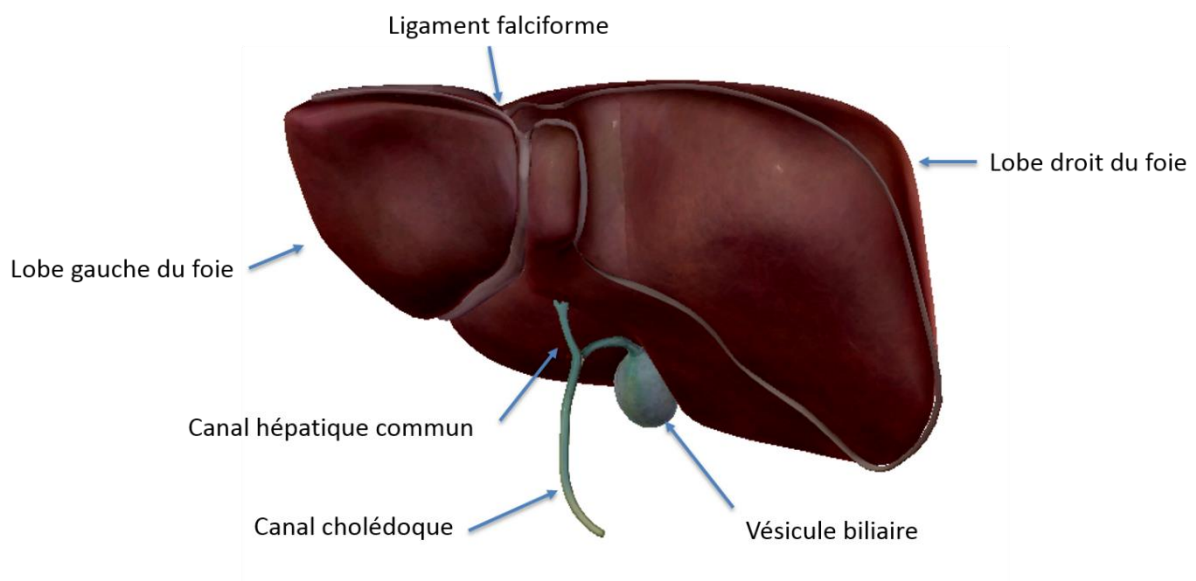


Figure 4 : Anatomie du foie.

Le foie est séparé en 2 lobes, droit et gauche, par le ligament falciforme

Le foie est divisé en deux lobes séparés par le ligament falciforme (ou ligament suspenseur), le lobe droit (deux tiers du volume du foie) et le lobe gauche (un tiers du volume). On peut également individualiser deux autres lobes mineurs en taille : le lobe caudé (ou lobe de Spiegel) et le lobe carré. Le foie est divisé en secteurs, eux-mêmes divisés en segments. Le sang oxygéné est acheminé vers le foie par l'artère hépatique, et par la veine porte qui achemine le sang riche en nutriments depuis le tube digestif après un repas. Le sang veineux est quant à lui pris en charge par la veine cave inférieure. Le foie reçoit environ 1,5 litres de sang par minute et intervient dans trois grandes fonctions vitales indispensables à notre organisme : l'épuration, la synthèse et le stockage. L'épuration, car il récupère

et transforme pour les rendre inoffensifs de nombreux produits toxiques, dont de nombreux médicaments, tout en maintenant l'homéostasie du sang par l'élimination des érythrocytes sénescents. La synthèse, car le foie intervient dans le métabolisme des glucides, des lipides (cholestérol, triglycérides) et des protéines (albumine). Il stocke ainsi l'énergie sous forme de glycogène et le met à la disposition de l'organisme en cas de besoin. Il emmagasine les vitamines liposolubles (A, D, K, E). Finalement, le foie est le lieu de production de nombreux facteurs de la coagulation, en particulier le fibrinogène et la prothrombine. La seule fonction exocrine du foie consiste en la sécrétion de bile, une sécrétion aqueuse contenant des électrolytes et des substances organiques : bilirubine, acides biliaires (sels biliaires), cholestérol et phospholipides.

Le lobule hépatique représente l'unité structurale et fonctionnelle du foie. Il est constitué de lames d'hépatocytes organisées en travées hépatocytaires et faisant dos à la veine hépatique centrolobulaire qui forme l'axe central du lobule. A la périphérie du lobule se trouvent des formations étoilées nommées espaces portes, constitués par des vaisseaux issus de la veine porte et de l'artère hépatique ainsi que par des canaux biliaires.

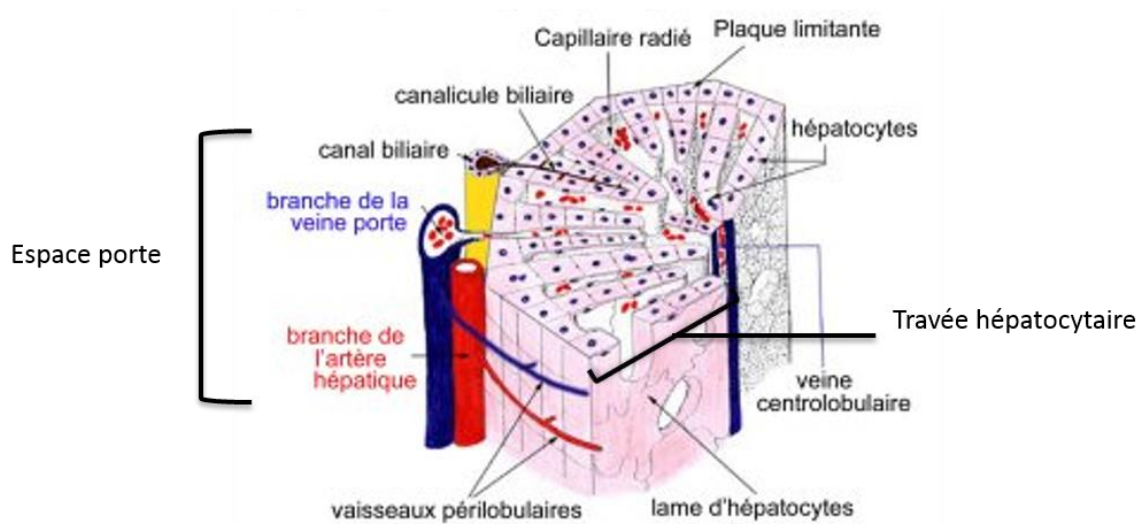


Figure 5 : Schéma du lobule hépatique (Transhepate).

Le foie est constitué de plusieurs types cellulaires : les cellules parenchymateuses (hépatocytes), constituant la population majoritaire de cellules hépatiques (80%), et des cellules non parenchymateuses telles que les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie), les cellules des canaux biliaires, les cellules stellaires (CEF), les cellules dendritiques et d'autres cellules de l'immunité telles que NK et NKT, présentes en moindre nombre. Ces cellules circulent dans les sinusoides hépatiques, en contact étroit avec les hépatocytes.

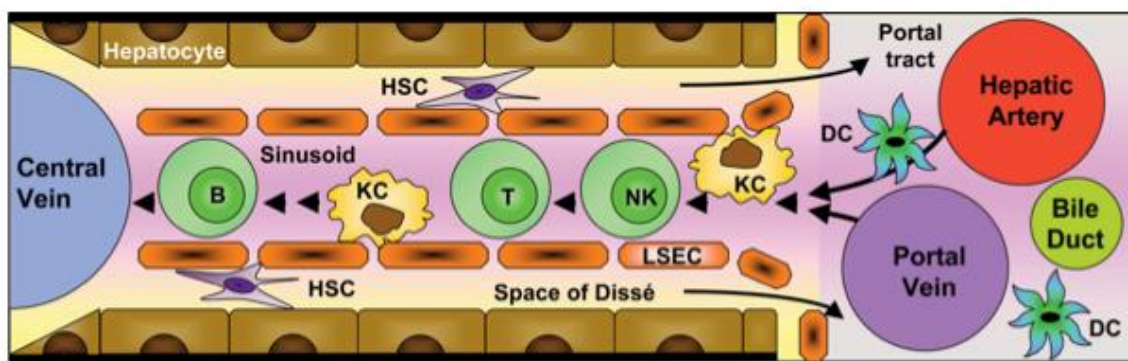


Figure 6 : Cellules immunitaires dans un foie sain (Racanelli et al,2006).

Les cellules de l'immunité (Cellules NK, KC, lymphocytes B et T, DC) sont en contact étroits avec les hépatocytes lors de leur circulation dans les sinusoides hépatiques depuis l'artère hépatique et la veine porte vers la veine centro-lobulaire.

Au cours de la MAF, la pathologie hépatique évolue selon plusieurs stades, caractérisant une atteinte hépatique croissante : la stéatose, la stéatohépatite, la fibrose et le stade final, la cirrhose, avec ou sans hépatocarcinome.

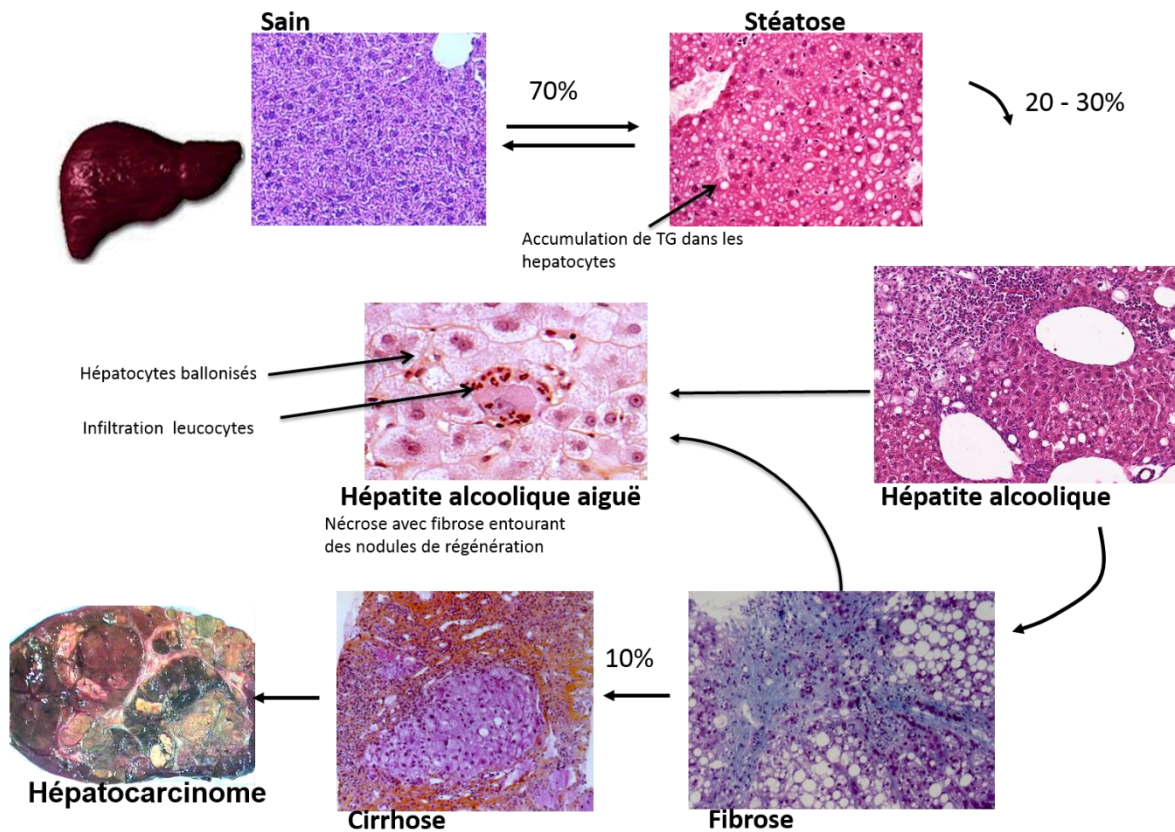


Figure 7: Evolution de la maladie alcoolique du foie.

70% des patients développent une stéatose lors d'une surconsommation d'alcool. Parmi eux, seulement 20-30% progresseront vers le stade hépatite alcoolique et fibrose, puis 10% vers les stades les plus graves de cirrhose et carcinome hépato-cellulaire. Aux stades hépatite alcoolique et fibrose, la MAF peut dégénérer directement en hépatite alcoolique aiguë.

1.1 Stéatose Hépatique

La stéatose hépatique consiste en une accumulation de triglycérides (TG) concentrés dans des gouttelettes lipidiques, dans le cytoplasme des hépatocytes. L'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase (ADH) produit de l'acétaldéhyde, qui est ensuite converti en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Les 2 réactions entraînent la réduction du nicotinamide adénine dinucleotide (NAD) vers sa forme réduite (NADH). L'excès de NADH cause un certain nombre de désordres métaboliques, incluant l'inhibition du cycle de Krebs et de l'oxydation des acides gras. L'inhibition de l'oxydation des acides gras favorise l'hyperlipidémie et l'apparition de la stéatose (Lieber, 2004). D'autres études ont démontré que l'éthanol augmentait l'expression de SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1), un facteur de transcription lié à la synthèse des acides gras (You et al., 2002), et que des souris déficientes pour ce facteur de transcription présentaient une inhibition de l'accumulation de triglycérides hépatiques lié à un la consommation d'alcool (Ji et al., 2006). Enfin, il a été montré que le système endocannabinoïde et ses récepteurs CB1 et CB2 participaient au développement de la stéatose au cours de la MAF. En effet, des co-cultures cellulaires entre hépatocytes et cellules stellaires provenant de souris soumises à un régime alcool ont permis de voir une inhibition de la stéatose dans les hépatocytes déficients pour le récepteur CB1 (Jeong et al., 2008a).

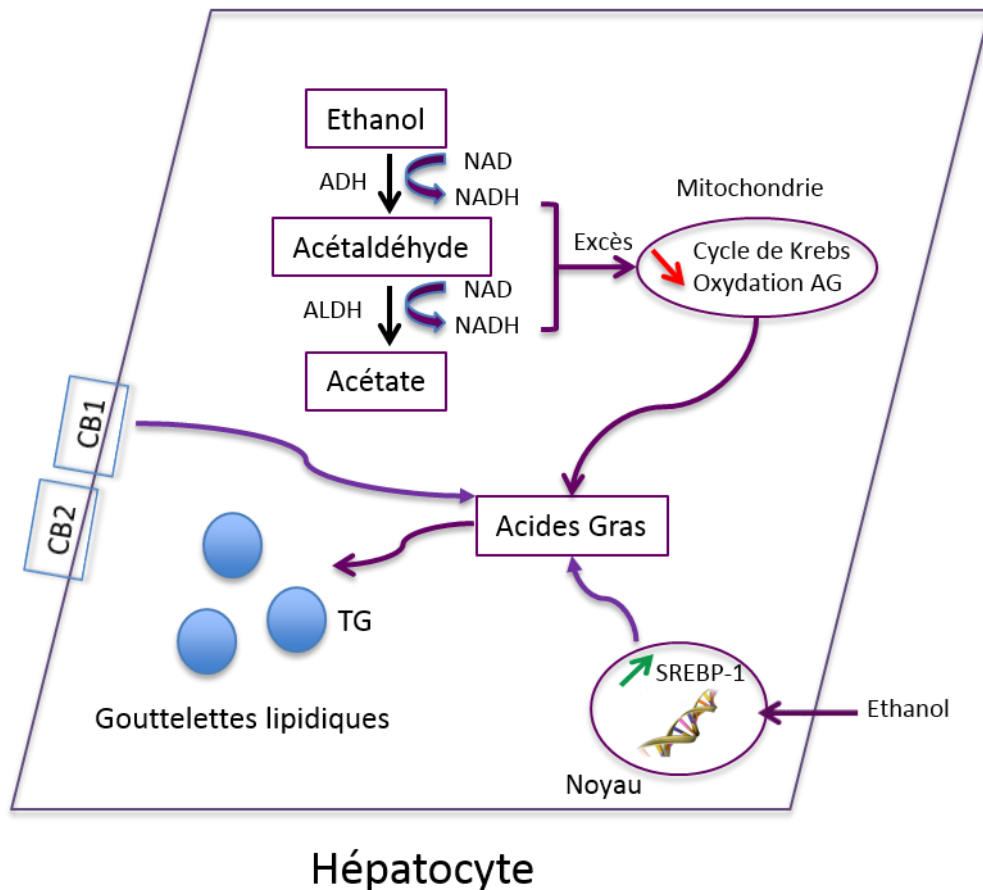


Figure 8 : Voies métaboliques conduisant à la stéatose.

L'excès de NADH, les CB1 et 2 et l'éthanol via l'induction de SREBP-1 participent à l'accumulation de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques des hépatocytes.

La stéatose, avec l'hépatite alcoolique, sont les seules étapes complètement réversibles de la maladie alcoolique du foie. La stéatose hépatique étant principalement asymptomatique, le patient ne ressent pas la nécessité de consulter un praticien. Elle constitue un terrain favorable à l'évolution vers des formes plus avancées de la maladie alcoolique du foie : l'hépatite alcoolique.

1.2 *L'hépatite alcoolique*

L'hépatite alcoolique correspond à un état d'inflammation chronique du foie caractérisé par une infiltration de cellules de l'inflammation, principalement des polynucléaires neutrophiles attirés sur le site de l'inflammation par des cytokines telles que l'IL-8, l'IL-1 et le TNF- α (Baggiolini et al., 1989). Plusieurs facteurs participent à l'installation d'une hépatite alcoolique. Un modèle généralement accepté pour la MAF implique 2 évènements entraînant l'aggravation de la pathologie : le premier est l'accumulation de triglycérides dans le foie, le second est la peroxydation de ces acides gras par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par différentes réactions, telles que l'induction de l'enzyme principale du métabolisme de l'alcool, CYP2E1 qui sera détaillée plus loin. Ce stress oxydatif entraîne des dommages cellulaires, conduisant à la peroxydation lipidique des membranes. Des études récentes ont démontré que les effets toxiques exercés par l'oxyde nitrique (NO) seraient plutôt attribués à la formation de peroxyde nitrique (ONOO⁻) lors de son interaction avec l'ion superoxyde (O₂⁻) (Pacher et al., 2007).

D'autre part, l'acétaldéhyde produit par l'oxydation de l'éthanol a des effets toxiques, en inhibant la réparation des protéines alkyles (Espina et al., 1988) en diminuant l'activité de ces enzymes clés, réduisant l'utilisation d'oxygène par les mitochondries endommagées par une consommation chronique d'alcool.

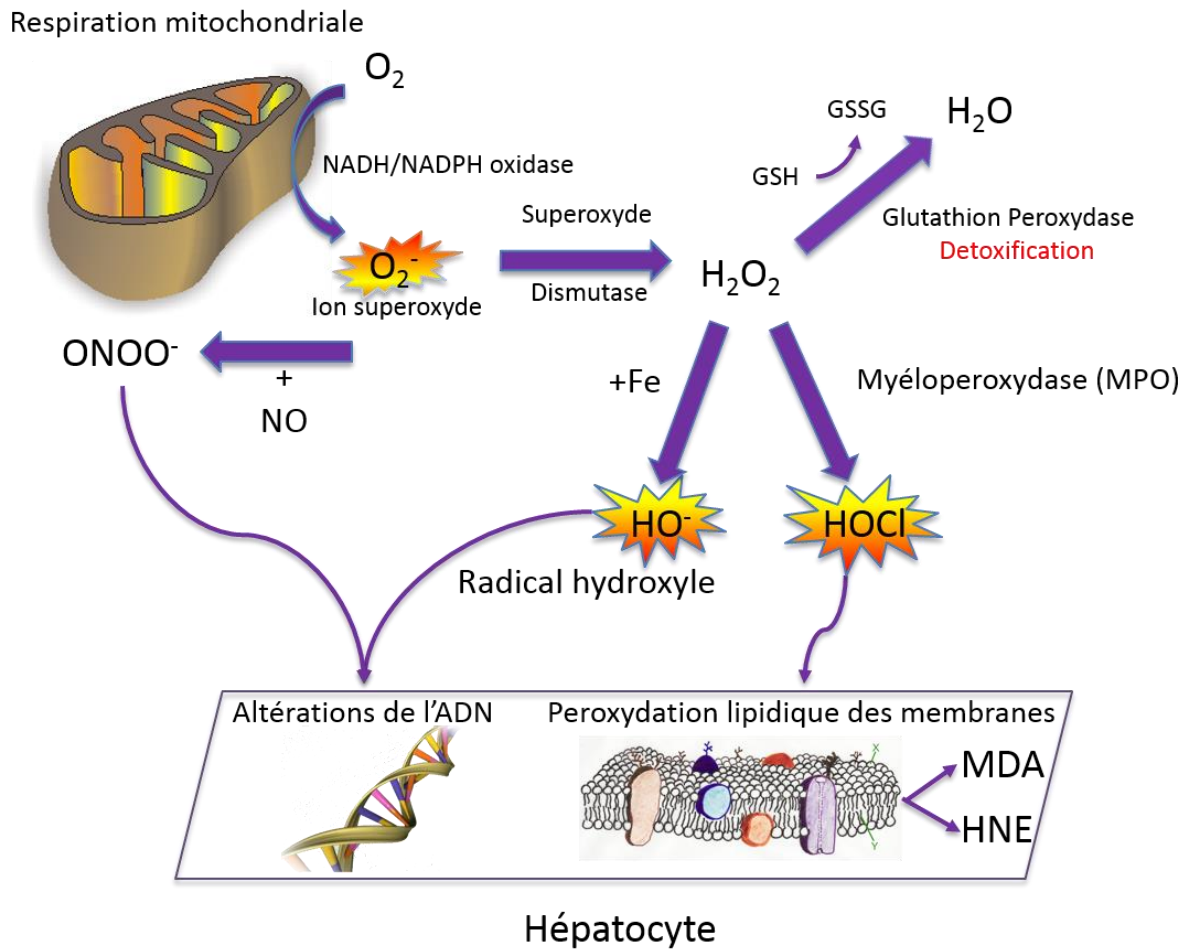


Figure 9: Stress oxydatif et dommages cellulaires.

La production de ROS entraîne des lésions cellulaires, membranaires et nucléaires au niveau des cellules parenchymales hépatiques. Dans des conditions physiopathologiques, la détoxification par la glutathion peroxydase ne suffit plus à compenser la production de ROS par la MPO et via la réaction de Fenton.

Le stress oxydatif favorise aussi l'inflammation, qui est aggravée par l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le $TNF-\alpha$ dans les cellules de Kupffer (CK). Un mécanisme reconnu de primo-activation des CK conduisant à l'hépatite alcoolique est leur activation par les lipopolysaccharides (LPS), un composant des parois des bactéries Gram- présentes dans le tube digestif (Parlesak et al., 2000).

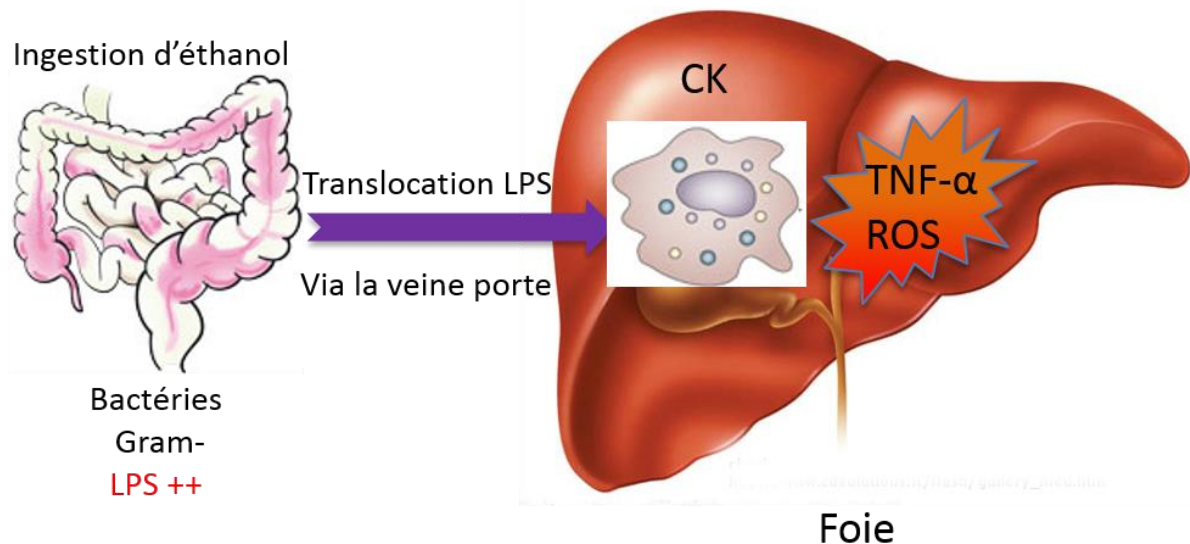


Figure 10: LPS et inflammation hépatique.

L'augmentation de la perméabilité intestinale entraîne la translocation de LPS dans la circulation portale, l'activation des CK par le TLR-4 et les dommages hépatiques.

L'activation du récepteur spécifique du LPS sur les CK, le TLR-4, entraîne le déclenchement d'une cascade inflammatoire initiée par le TNF- α (Uesugi et al., 2001). La liaison du LPS sur le TLR-4 implique aussi la Lipopolysaccharides Binding Protein (LBP), une protéine navette soluble de 60 kDa, dite protéine de phase aigüe, produite principalement par les hépatocytes, qui catalyse la dissociation des agrégats de LPS en monomères, facilitant ainsi son interaction avec le récepteur membranaire CD14 présent à la surface des monocytes et des macrophages (Grube et al., 1994 ; Le Roy et al., 1999 ; Mathison et al., 1992) Le rôle clé du CD14 a été démontré en améliorant l'atteinte hépatique subie lors d'une perfusion chronique d'alcool par gastrostomie dans un modèle de souris déficient pour le CD-14 (Yin et al., 2001). La liaison du LPS sur le TLR-4 permet le recrutement de TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) et Myd88 (Myeloid Différentiation Factor 88) qui déclenchent l'activation précoce de NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1).

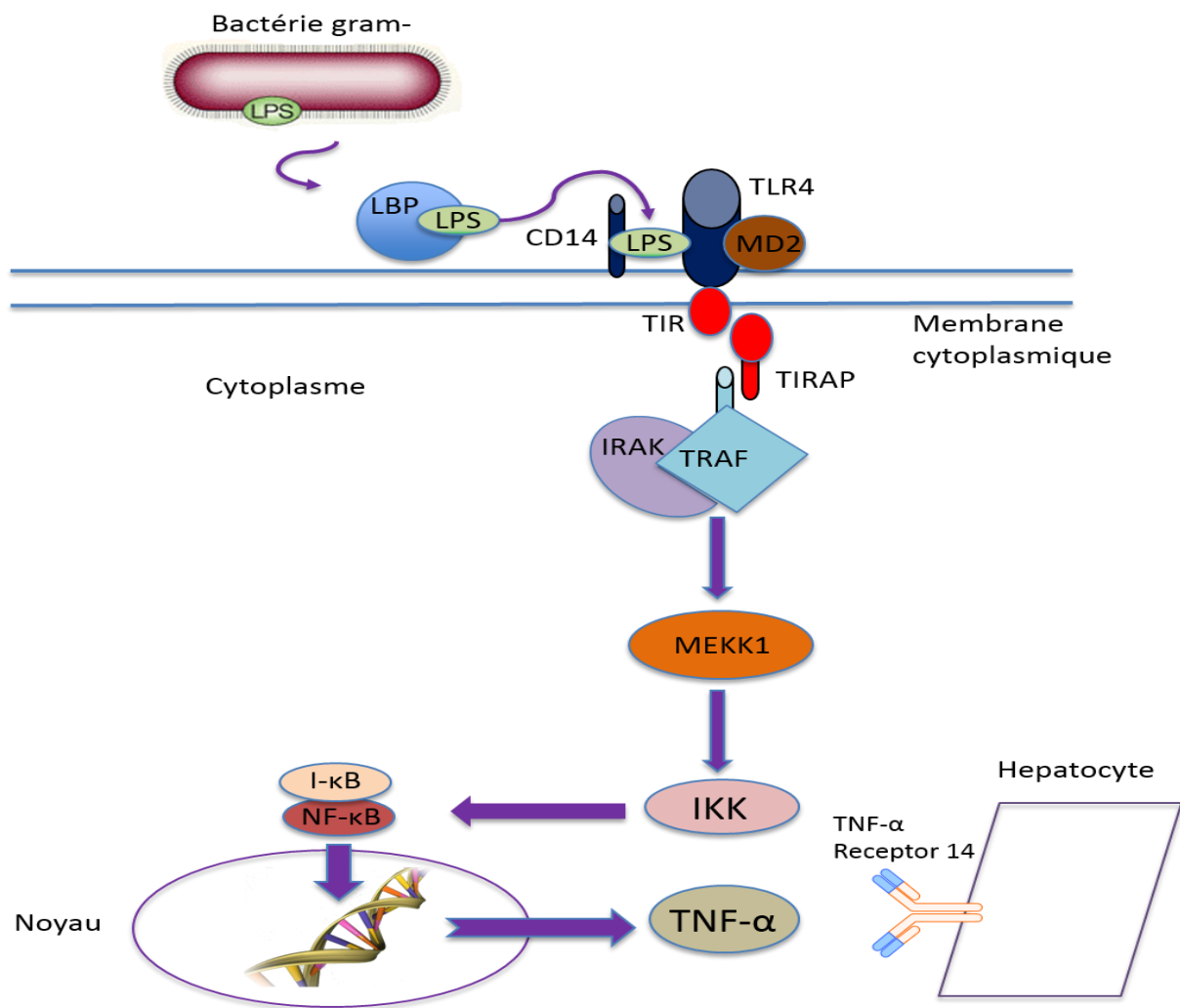


Figure 11: Signalisation du LPS.

La liaison du LPS bactérien sur le TLR-4 et son co-récepteur le CD14 entraîne le recrutement d'IRAK et TRAF, la libération en aval de la protéine inhibitrice de NF- κ B, I κ B, permettant sa translocation dans le noyau et l'activation de la transcription des gènes de l'inflammation.

D'autres cytokines telles que l'IL-8, l'IL-12 et des interférons sont produites consécutivement à l'initiation de la réaction inflammatoire, et contribuent au recrutement et à l'activation intra-hépatique des granulocytes caractéristiques des formes sévères de la MAF (Bautista, 2002). D'autres travaux ont démontré le rôle des NKT dans les lésions hépatiques liées à l'alcool. Dans un modèle de perfusion intragastrique d'alcool chez la souris, il a été démontré qu'il y'avait une augmentation du nombre de NKT hépatiques, et que l'activation de ces NKT par le ligand α -galactosylceramide provoquait des lésions hépatiques mortelles. Ainsi, l'alcoolisation de souris *Ja281*^{-/-} présentant une déficience en

NKT a permis de constater un retard dans l'apparition des lésions hépatiques (reflétée par l'augmentation des transaminases) liées à la MAF (Minagawa et al., 2004).

Outre le LPS et le TLR4, il existe toute une famille de récepteurs capables de reconnaître des motifs microbiens. Ces motifs ou pathogen-associated molecular pattern (PAMP) sont reconnus par les TLR (que nous détaillerons dans la partie « Interaction microbiote intestinal et hôte) et par les NLR.

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques cytoplasmiques composés d'une protéine « détectrice » de la famille des récepteurs de type NLR (NOD-like receptor), une protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated speck-like protein), et leur effecteur en aval la caspase-1 (Henao-Mejia et al., 2012). Différentes protéines NLR forment des inflammasomes après stimulation par divers types de composants microbiens telles que NRP1, NRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7. L'assemblage de l'inflammasome entraîne le clivage autocatalytique de la caspase-1 et permet la maturation et l'activation des protéines pro-IL-1 β et pro-IL-8 (Strowig et al., 2012).

Les composants de l'inflammasome sont exprimés par différents types cellulaires et il a été décrit récemment qu'ils jouent un rôle critique dans la genèse des maladies du foie. A l'état basal, NLRP1, NLRP3 et AIM2 (Absent in melanoma 2, protéine impliquée dans la défense contre les composants bactériens et viraux) sont principalement exprimées dans les cellules de Kupffer, et quasiment inexistantes dans les hépatocytes. A l'inverse, suite à une stimulation par du LPS, les hépatocytes surexpriment NLRP3 de manière temps et concentration dépendante (Boaru et al., 2012). A titre d'exemple, une déficience en NLRP3 chez la souris a permis d'observer une diminution de la production de cytokines inflammatoires et de l'activité de NF- κ B dans un modèle d'ischémie-reperfusion (Zhu et al., 2011).

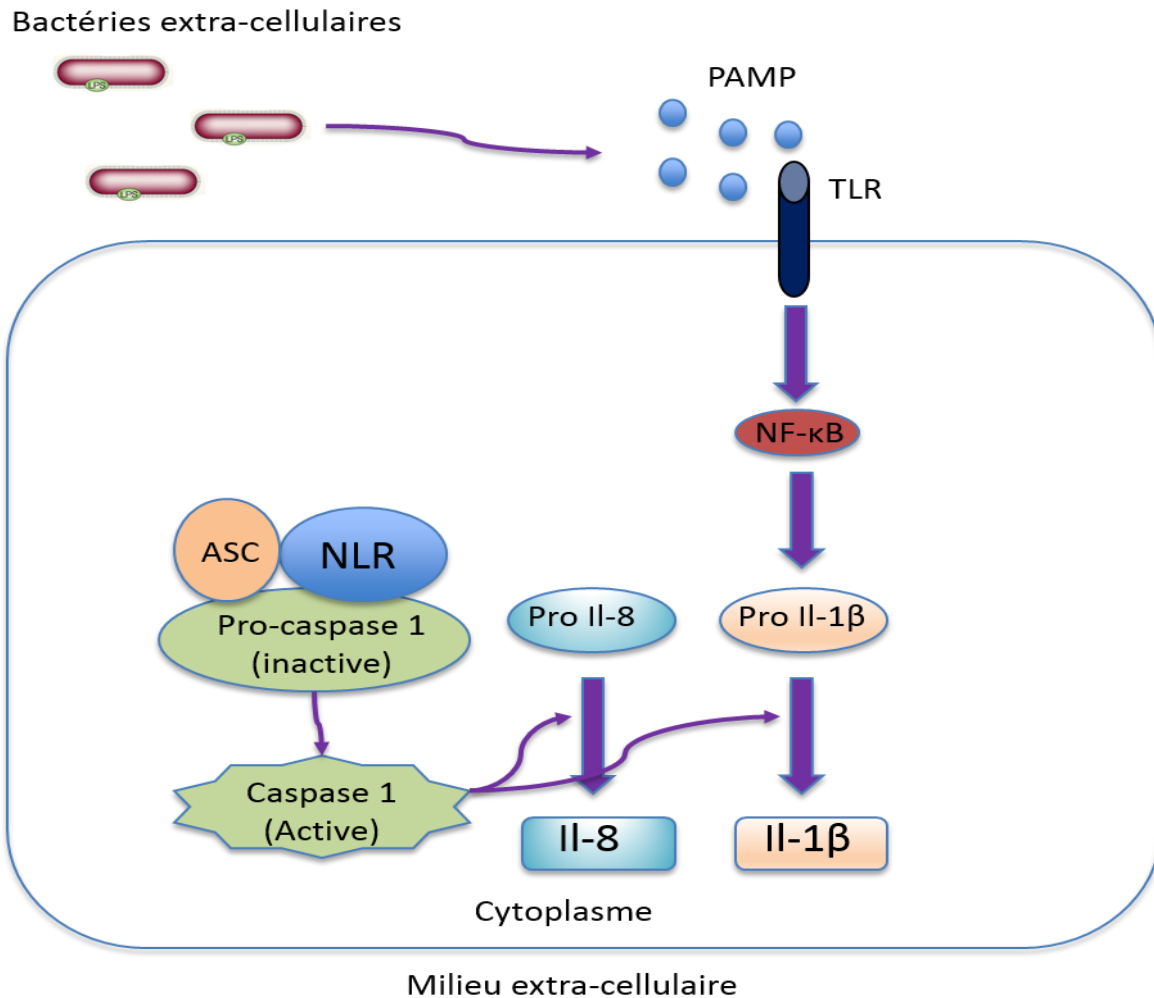


Figure 12: Inflammasomes et cytokines pro-inflammatoires.

La liaison des PAMP sur leur TLR associé entraîne la formation d'inflammasomes permettant l'activation de la Caspase 1, qui va tronquer les protéines inactives pro IL-8 et pro IL-1β en leur forme actives.

La gravité de l'hépatite alcoolique aiguë est variable, et dépend notamment de l'atteinte consécutive d'autres organes vitaux. Cette maladie est caractérisée par un ictère (jaunisse intense) et une défaillance hépatique pouvant conduire à une encéphalopathie hépatique voire un coma. Les traitements étiologiques existants dans ce cas sont limités, et s'appuient principalement sur les corticoïdes, bien que certains patients soient insensibles au traitement. D'autres traitements à base de N-acétylcystéine, précurseur du glutathion et de la cystéine fortement déplétés, notamment sous l'effet du paracétamol, exercent un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydatif au niveau de la CK et des

polynucléaires neutrophiles, principales sources de radicaux libres et de médiateurs toxiques (Nakano et al., 1995; Vale and Proudfoot, 1995). La pentoxyfilline, un inhibiteur compétitif des phosphodiesterases, augmentant l'AMPc intracellulaire, l'activité de la PKA et ainsi l'inhibition de la synthèse de TNF- α et d'autres cytokines de l'inflammation, a aussi démontré son rôle dans l'amélioration de la survie des patients atteints d'HAA (Akriviadis et al., 2000). Cette forme aiguë est donc de mauvais pronostic avec un taux de survie des patients ne dépassant pas 50% dans le mois qui suit leur hospitalisation.

L'hépatite alcoolique, avec la stéatose, fait partie des seuls stades complètement réversibles de la maladie. Dans le cas de l'hépatite alcoolique, la guérison complète du patient dépend cependant de la gravité de l'atteinte, et plus particulièrement de la présence d'un début de fibrose hépatique, qui est lui non réversible. L'atteinte inflammatoire chronique va engendrer des lésions cellulaires qui vont faire apparaître du tissu cicatriciel et faire évoluer la pathologie vers le stade supérieur, la fibrose hépatique.

1.3 Fibrose hépatique

La fibrose hépatique est une condition pathologique du foie caractérisée par une surproduction de constituants de la matrice extracellulaire, notamment le collagène, formant un tissu cicatriciel non fonctionnel. Les cellules responsables de la surproduction du collagène provoquant la fibrose hépatique sont les cellules stellaires ou Hepatic Stellate Cells (CEF). Ces cellules sont situées dans les espaces de Disse en état quiescent dans un foie sain. Dans leur état quiescent, les CEF ont pour fonction de stocker la vitamine A. Une atteinte hépatique telle que la stéatohépatite entraîne l'activation de ces CEF et leur différenciation en myofibroblastes, caractérisées par la perte de leur vitamine A, et la surproduction de matrice extracellulaire principalement composée de fibres de collagène.

Plusieurs mécanismes sont décrits comme participant à l'apparition d'une fibrose hépatique. Directement en lien avec le stress oxydant responsable de l'hépatite alcoolique, certains produits de la peroxydation lipidique des membranes tel que le 4-hydroxynonanal stimule les mécanismes fibrosants

(Hartley and Petersen, 1997). La fibrose est encore favorisée par la diminution du rétrocontrôle de la synthèse de collagène causé par la formation d'adduits entre l'acétaldéhyde produit lors de l'oxydation de l'éthanol et le propeptide carboxyl-terminal du procollagène (Ma et al., 1997). La surconsommation d'éthanol induit une augmentation de la production de TGF- β par les hépatocytes et les cellules de Kupffer (Kato et al., 2003), un régulateur clé de l'activation et de la différenciation des CEF. D'autres études ont démontré un rôle important des cellules NK ayant une fonction anti-fibrotique par plusieurs mécanismes. Premièrement, les cellules NK impliquées dans l'immunité innée, reconnaissent les CEF activées comme des cellules modifiées car elles produisent RAE-1 (Retinol Acid Early inducible gene 1), un ligand activateur des cellules NK, et présentent une expression moindre du MHC-1, un ligand inhibiteur des NK (Horiguchi et al., 2008; Taimr et al., 2003). La mort cellulaire des CEF se déroule selon un mécanisme de mort induite impliquant TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand), une cytokine inductrice de l'apoptose via l'activation de la caspase 3, et NKG2D dépendant, un récepteur présent à la surface des cellules les rendant susceptibles à la lyse induite par les cellules NK (Melhem et al., 2006; Radaeva et al., 2006). Deuxièmement, les cellules NK diminuent la fibrose hépatique via la production d'IFN- γ , une cytokine qui induit l'arrêt du cycle cellulaire des CEF et une apoptose de manière STAT-1 dépendante (Signal Transducer and Activator of Transcription 1-alpha/beta) (Baroni et al., 1996; Jeong et al., 2006). Or, il a été démontré lors d'une consommation chronique d'alcool une diminution du nombre et de l'activité des NK dans le foie (Jeong et al., 2008b; Laso et al., 1997; Szabo and Mandrekar, 2009), entre autres via la production d'IL-10 et de TGF- β par les monocytes et CEF activées elles-mêmes (Szabo et al., 1996), favorisant indirectement la fibrose par l'absence de NK antifibrosantes.

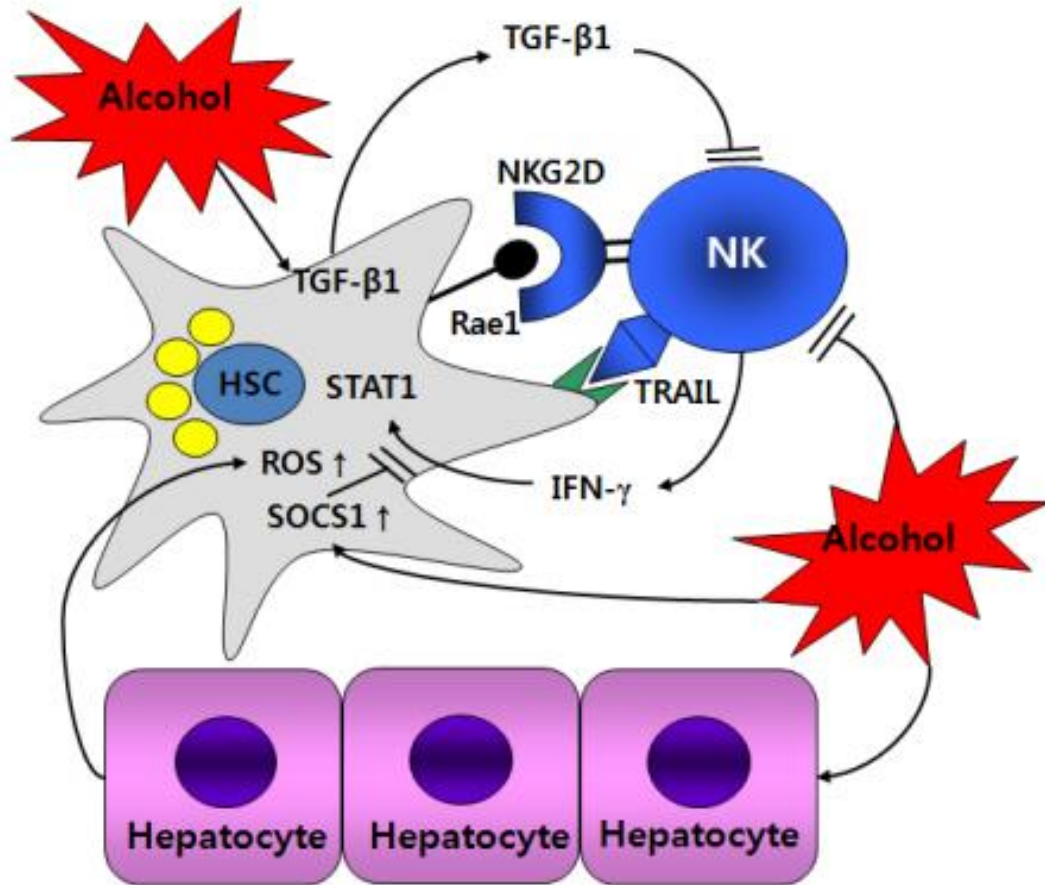


Figure 13: Dérégulations du rétrocontrôle NK-CEF provoquant la fibrose hépatique.

L'effet direct de l'alcool sur les CEF entraîne une surproduction de TGF- β , inhibiteur des cellules NK, empêchant ces dernières d'exercer leur effet inhibiteur sur les CEF par la production d'IFN- γ , participant ainsi aux mécanismes fibrosants (Jeong Wi et al, 2008).

Enfin, des travaux récents ont démontrés que les CEF expriment de nombreux composants des inflammasomes, et que ces inflammasomes permettent de réguler la fibrose hépatique dans un modèle de fibrose murine induite par le tétrachlorure de carbone (CCL4) ou le thioacetamide (TAA). En effet, l'injection de ces 2 produits dans des souris wild-type et des souris mutées pour certains composants de l'inflammasome (NLRP3 et ASP) a permis de voir que les souris n'exprimant pas ces composants développaient des lésions moindres par rapport aux souris wild-type (Watanabe et al., 2009).

1.4 Cirrhose et carcinome hépatocellulaire

Seuls 8% à 20% des consommateurs excessifs d'alcool développent une cirrhose. Tous les consommateurs chroniques d'alcool n'évoluent donc pas de manière similaire en termes de pathologie hépatique. Un carcinome hépatocellulaire est précédé d'une cirrhose du foie dans 80 à 90% des cas (Nordenstedt et al., 2010). La cirrhose est le stade ultime de la fibrose dans laquelle la destruction des cellules hépatiques et leur régénération anarchique a entraîné la formation de nodules de régénération. La maladie conduit à la perte des fonctions de l'organe et s'accompagne de multiples complications graves telles que les hémorragies digestives en cas de rupture de varices œsophagiennes (dilatation des veines de la paroi œsophagienne), d'ascites (accumulation de liquide dans le péritoine), voire d'insuffisance rénale concomitante à une insuffisance hépatique dont les conséquences sont dramatiques pour le patient.

Le sexe joue aussi un rôle important dans la gravité de l'atteinte hépatique. Les femmes sont plus sensibles à l'hépatotoxicité de l'alcool que les hommes, et développent une cirrhose pour une quantité d'alcool consommée et une durée d'alcoolisation moindres. Une des raisons proposées est la moindre activité de l'alcool déshydrogénase gastrique chez la femme (Frezza et al., 1990).

D'autre part, la sévérité de la stéatose joue aussi un rôle important : dans un travail portant sur 83 patients n'ayant pas cessé de boire entre les évaluations histologiques, le risque d'évoluer vers la cirrhose était 7,4 fois plus grand chez les patients ayant une stéatose concernant plus de 50% des hépatocytes (Giraud et al., 1998). Par ailleurs, une étude des polymorphismes du gène encodant pour le TLR4, qui atténuent la signalisation intracellulaire en réponse à une stimulation par du LPS, a permis d'associer ces polymorphismes à un risque décreu de développer une cirrhose (Figuroa et al., 2012; Huang et al., 2007).

En cas de carcinome hépatocellulaire, seule l'exérèse (possible seulement si le cancer est localisé) des parties du foie atteintes ou la transplantation hépatique peuvent permettre la guérison du patient. Cependant, du fait de la pénurie de greffons, seulement 900 personnes en moyenne sont sélectionnées pour une transplantation hépatique chaque année, 1100 en 2011 (Agence de la biomédecine). Pour les

patients alcooliques, la durée d'abstinence doit être d'au moins 6 mois car c'est au-delà de ce délai que le risque de rechute est le moins prononcé. Finalement, un des critères de sélection pour ces patients est le score de MELD (Model for end-stage liver disease). Ce score prend en compte la bilirubine, l'INR (International normalized ratio of prothrombin time), la créatininémie, et permet d'estimer la survie du patient. Ainsi en cas de score MELD de 20, la probabilité de survie à 3 mois est de 90%, alors qu'elle n'est plus que de 60 % avec un score de 30 et de 10 % avec un score de 40. On considère donc que le bénéfice d'une transplantation est supérieur au risque à partir d'un critère de MELD de 17. L'évolution des pathologies hépatiques vers des formes inéluctables montre bien la nécessité d'approfondir nos connaissances des mécanismes impliqués dans cette évolution, afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques.

2 METABOLISME DE L'ETHANOL

2.1 Pharmacocinétique de l'éthanol

La toxicité de l'éthanol pour le foie vient du fait que c'est le principal organe de détoxification de l'alcool de l'organisme. L'absorption d'éthanol par ingestion entraîne son passage par la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac et le petit intestin. A chaque étape de son transit, l'éthanol peut être absorbé et passer dans la circulation sanguine. L'éthanol est une petite molécule absorbée par simple diffusion. Cette diffusion s'effectue au niveau gastrique et la majeure partie (70 % à 80 %) est absorbée au niveau de l'intestin grêle (duodénum et jéjunum). Quand l'alcool est ingéré à jeûn, la concentration maximale plasmatique est atteinte rapidement, environ une demi-heure après l'ingestion (Jones and Jonsson, 1994). Cependant, l'absorption d'alcool forts (d'une concentration supérieure à 20 %) entraîne un spasme pylorique qui retarde la vidange gastrique et donc ralentit l'absorption (Holt, 1981). L'ingestion de nourriture ralentit la vidange gastrique en entraînant la fermeture du verrou

pylorique et en réduisant la motricité gastrique, en particulier au niveau antral. En conséquence, l'ingestion de nourriture, en prolongeant le temps de séjour de l'éthanol dans l'estomac, va modifier la cinétique de l'absorption de l'éthanol.

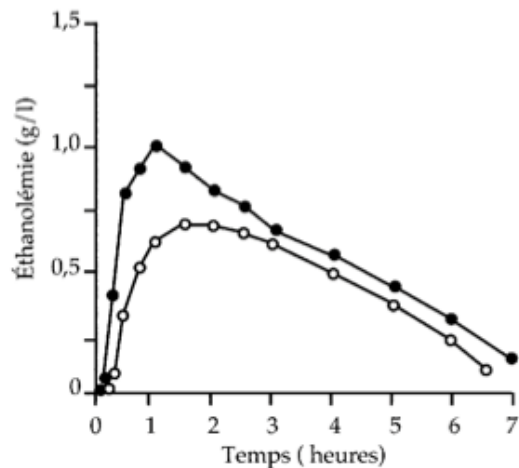


Figure 14: Evolution de l'éthanolémie plasmatique en fonction du temps (Lands, 1998).

Ainsi, les graisses ont tendance à retarder la vidange gastrique de manière plus efficace que les hydrates de carbone. Cependant, l'effet de la nourriture ne se manifeste pas uniquement sur la vidange gastrique, mais également sur le métabolisme. Ainsi, les graisses augmentent le flux sanguin mésentérique, favorisant l'absorption de l'éthanol (Jones and Jonsson, 1994 ; Jones et al., 1997).

Hommes et femmes sont inégaux à plus d'un égard devant l'alcool : il semble en effet que le même repas entraînerait un allongement du délai de vidange gastrique plus important chez les femmes que chez les hommes, principalement à cause d'une diminution plus importante des contractions antrales chez la femme (Knight et al., 1997). Cependant, d'autres études attribuent ces différences de métabolisme à des différences hormonales, l'oestradiol et la progestérone qui ralentissent le transit intestinal, plutôt qu'à des variations de vidange gastrique (Frezza et al., 1990).

La distribution de l'éthanol est très rapide (demi-vie de distribution de 7 à 8 minutes) (Jones et al.,

1990) aux organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie. Les concentrations dans ces différents organes sont très rapidement équilibrées avec les concentrations sanguines. L'éthanol, petite molécule très diffusible, franchit la barrière placentaire, et les concentrations dans le liquide amniotique et chez le fœtus sont proches des concentrations plasmatiques de la mère.

Deux voies contribuent à l'élimination de l'éthanol : l'oxydation enzymatique, c'est-à-dire le métabolisme, et l'excrétion sous forme inchangée (Lands, 1998).

2.2 Enzymes du métabolisme de l'éthanol

L'essentiel du métabolisme de l'éthanol a lieu dans le foie bien que d'autres tissus, comme le rein ou le tractus digestif (traité plus loin dans le manuscrit), peuvent participer pour une faible part à sa métabolisation. Le métabolisme hépatique élimine plus de 80 % de l'alcool ingéré par oxydation dans les hépatocytes. Il fait intervenir deux oxydations successives ; l'éthanol est d'abord transformé en acétaldéhyde selon trois voies enzymatiques : la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) qui est la voie prépondérante, la voie microsomale qui fait intervenir une isoenzyme du cytochrome P450 (le CYP2E1) et une voie accessoire, celle de la catalase. L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'ALDH.

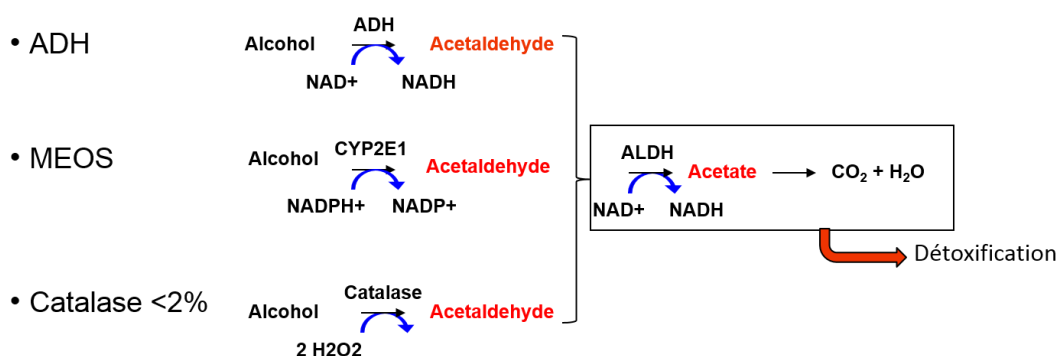


Figure 15: Métabolisme de l'éthanol.

L'éthanol est métabolisé principalement par l'ADH et la voie microsomale (MEOS) en acétaldéhyde, dont l'accumulation est toxique pour l'organisme lorsque les mécanismes de détoxification sont insuffisants.

Les principales enzymes du métabolisme de l'éthanol, l'ADH et l'ALDH, se répartissent en différentes sous-classes d'isoenzymes dont l'affinité pour l'éthanol ou l'acétaldéhyde et la vitesse maximale d'activité varient. Diverses sous-populations porteuses d'allèles particuliers de l'ADH ou de l'ALDH se distinguent donc par un métabolisme de l'éthanol modifié. Ainsi, 50 % de la population asiatique, dotée d'une activité ALDH déficiente voire nulle, présentent une intolérance à l'alcool en raison d'une accumulation de l'acétaldéhyde, à l'origine d'une association de troubles décrite sous le nom d'effet « antabuse ». La conséquence de cette ALDH inactive est une accumulation d'acétaldéhyde associée à un afflux de sang (« flush ») facial et à des signes d'intolérance à l'alcool (maux de tête, hypotension, tachycardie, faiblesse musculaire, brûlures épigastriques).

L'alcool déshydrogénase (ADH) est une enzyme cytosolique utilisant le NAD⁺ comme cofacteur. Les sous-unités sont associées 2 à 2 pour former des isoenzymes. Elle appartient à une famille polygénique dans laquelle on peut identifier, chez l'homme, 7 gènes (ADH1 à ADH7) qui codent pour des sous-unités différentes. Les isoenzymes de l'ADH constituent 1% des protéines cytosoliques du foie et leur ARN messager y est très abondant, indiquant que ces gènes sont très actifs dans le foie. La distribution de l'ADH dans les hépatocytes fait état d'une localisation majoritairement périportale. Les quantités d'ADH diffèrent selon les sujets.

La deuxième voie d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde la mieux établie est la voie microsomale ou MEOS (Microsomal Ethanol Oxidizing System) qui fait intervenir principalement le CYP2E1. Cette enzyme appartient à la superfamille des cytochromes P450 qui utilisent le NADPH et l'oxygène comme cofacteurs. D'autres isoenzymes du P450, les CYP1A2 et CYP3A4, peuvent également contribuer au métabolisme de l'éthanol (Salmela et al., 1998). Le métabolisme de l'éthanol par le CYP2E1 s'accompagne de la production de radicaux libres, notamment des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) qui vont participer à l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et à la formation de radicaux hydroxyéthyles (Albano et al., 1999) impliqués dans la toxicité de l'éthanol. Le CYP2E1 possède également la capacité d'oxyder l'acétaldéhyde en acétate et son affinité pour l'acétaldéhyde est environ 1 000 fois plus grande que pour l'éthanol (Terelius et al., 1991). Le CYP2E1 est exprimé en grande quantité au niveau de l'hépatocyte, et en quantité 10 à 100 fois plus faible dans les cellules de Kupffer (Koivisto et al., 1996) et les tissus extrahépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau,

lymphocytes) (Lieber and Abittan, 1999). Les hépatocytes exprimant CYP2E1 sont localisés principalement dans la région périveineuse du lobule hépatique (Lindros et al., 1990), là où son induction par l'éthanol et la toxicité sont les plus prononcées. Une consommation chronique d'éthanol entraîne une augmentation adaptative du métabolisme de l'éthanol, qui se traduit par la surexpression de la CYP2E1, dont l'expression augmentait de 4 à 10 fois dans des biopsies de foie de patient alcooliques (Tsutsumi et al., 1989). Cette induction a pour conséquence une oxydation plus rapide (10 % à 20 %) de l'éthanol (Lands, 1998), une accélération du métabolisme en partie compensée par une diminution de l'activité de l'ADH chez les consommateurs excessifs et chroniques. Cette induction est observée soit à la suite de l'administration d'une seule dose forte d'éthanol (4 g/kg chez le rat) (Petersen et al., 1982), soit au cours de l'alcoolisation chronique (Roberts et al., 1994), elle est favorisée chez l'animal par l'association de l'alcoolisation avec une diète enrichie en acides gras insaturés (Takahashi et al., 1992). Chez l'homme, il a été montré que l'alcoolisation chronique induisait le CYP2E1 dans la zone périveineuse du lobule hépatique et était accompagnée d'une augmentation de l'ARNm corrélée avec la quantité de protéines (Takahashi et al., 1993). Après arrêt de l'intoxication alcoolique, le taux de CYP2E1 diminue rapidement pour retrouver le taux de base en 5 jours environ (Mishin et al., 1998).

L'acétaldéhyde est oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Comme l'ADH, elle est NAD⁺ dépendante. Cette enzyme oxyde les aldéhydes en leur acide carboxylique correspondant. L'activité de l'ALDH est également diminuée, comme l'ADH, au cours de l'alcoolisme chronique mais remonte après quelques semaines de sevrage. Plusieurs isoformes de l'ALDH1 existent chez l'homme, toutes impliquées dans le métabolisme de l'éthanol (Yoshida, 1992).

2.3 Effet de premier passage

L'effet de premier passage est le phénomène de métabolisation d'une molécule par l'organisme, qui conduit à diminuer la fraction de substance active à atteindre la circulation sanguine générale et donc le site d'action au niveau des organes. Pour des doses modérées d'éthanol, les concentrations plasmatiques sont moins élevées lors d'une perfusion intragastrique que lors d'une injection

intraveineuse, suggérant un métabolisme partiel au niveau du tube digestif et du foie. Cependant, ce métabolisme demeure quantitativement mineur comparé au métabolisme hépatique. Les enzymes responsables de ce premier métabolisme sont contenues dans la muqueuse digestive et dans le foie. En effet, après avoir traversé la muqueuse digestive, les produits absorbés gagnent le foie par la veine porte, où ils subissent un premier métabolisme hépatique avant de gagner la circulation générale par la veine sus-hépatique. Différents facteurs influencent l'amplitude de ces premiers métabolismes. En ralentissant la vidange gastrique, la nourriture entraîne un temps de séjour plus long de l'alcool dans l'estomac et donc « favorise » l'effet de premier passage gastrique. De même, une « mise à disposition » plus lente de l'alcool au niveau hépatique éviterait la saturation des enzymes hépatiques et favoriserait l'effet de premier passage hépatique. D'autre part, cet effet de premier passage pourrait être une autre cause de l'inégalité entre hommes et femmes vis-à-vis de l'alcool. Ainsi, l'absorption d'éthanol par voie orale provoquerait des concentrations plasmatiques plus élevées chez les femmes que chez les hommes, alors qu'elles sont comparables lorsque l'éthanol est injecté par voie intraveineuse (Frezza et al., 1990). Le rôle de la muqueuse gastrique dans le métabolisme de l'éthanol reste cependant très controversé. Nous verrons plus loin que ce rôle est peut-être à attribuer non à la muqueuse intestinale même mais au microbiote intestinal.

2.4 Elimination et toxicité de l'éthanol

L'éthanol est éliminé sous sa forme native par l'air expiré, les urines et la sueur (Lands, 1998), la contribution de ces différentes voies étant variable suivant les concentrations plasmatiques. L'estimation de l'éthanolémie à partir des concentrations dans l'air expiré repose ainsi sur l'élimination pulmonaire. En effet, le rapport des concentrations sang/air expiré est constant et égal à 2100, en considérant la relation suivante : éthanolémie = concentration dans l'air expiré x 2100. La clairance pulmonaire est estimée à 0,16 L/h/70 kg. La clairance rénale est estimée 0,06 L/h/70 kg, et la clairance cutanée à 0,02 L/h/70 kg. L'éthanol est présent dans le lait maternel à des concentrations environ 10 % plus élevées que les concentrations plasmatiques, en raison de la teneur en eau

supérieure du lait. Environ 3 % à 5 % de la quantité totale d'éthanol absorbée serait éliminée sous forme inchangée par le rein.

De très nombreuses études ont montré que les principaux facteurs responsables de désordres métaboliques et de la toxicité de l'éthanol étaient l'augmentation du NADH, la production d'acétaldéhyde, l'induction du CYP2E1 et la génération de radicaux libres (Lieber and Abittan, 1999). Dans le foie, la principale conséquence métabolique de l'oxydation de l'éthanol est l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (NAD⁺ étant le coenzyme des ADH et ALDH), ce qui entraîne une perturbation du métabolisme des glucides et des lipides utilisant ce coenzyme. Il existe ainsi une augmentation de la transformation du pyruvate en lactate, avec plusieurs conséquences : freinage de la néoglycogénèse à partir du pyruvate, favorisant l'hypoglycémie, hyperlactacidémie susceptible de conduire à une acidose ou à une hyperuricémie, ou de jouer un rôle dans les crampes musculaires.

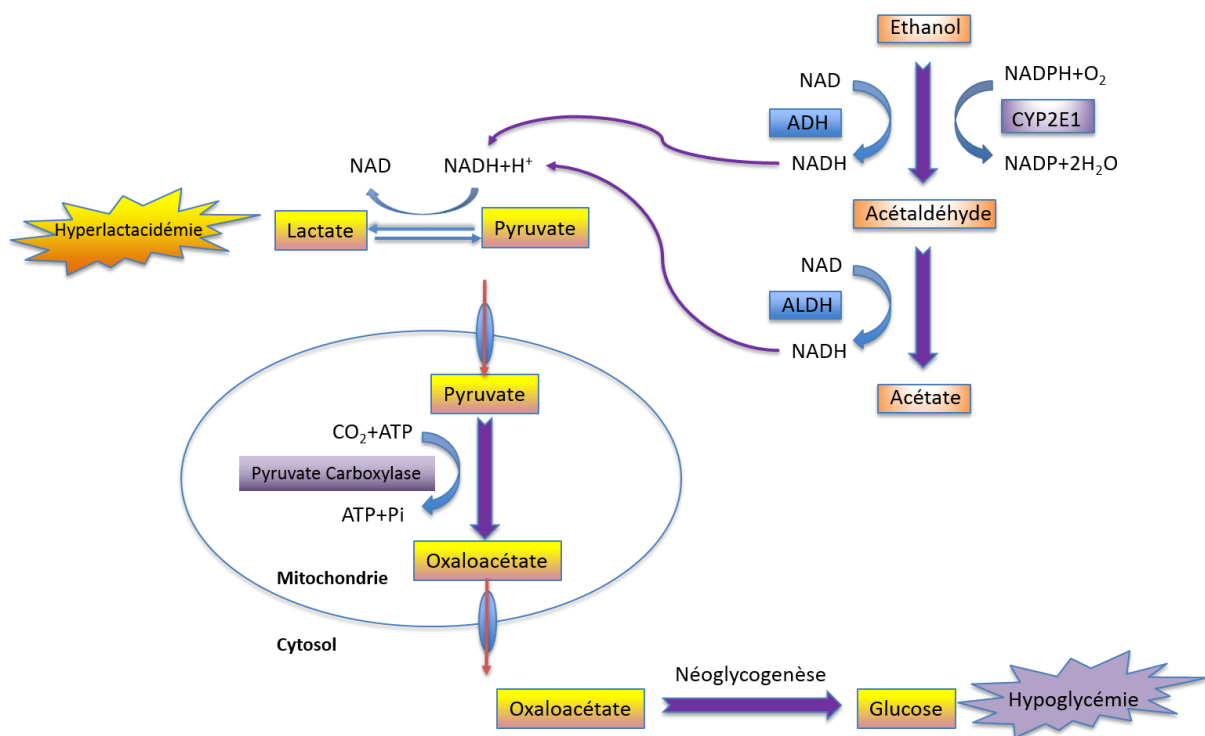


Figure 16: Dérégulations métaboliques liés à une surconsommation d'alcool.

La surproduction de cofacteur NADH favorise la transformation du pyruvate en lactate, entraînant une hyperlactacidémie, et une inhibition de la néoglycogénèse entraînant une hypoglycémie.

On observe également une augmentation intrahépatique de L-glycérol-3-phosphate utilisé dans la synthèse des triglycérides, de même qu'une diminution du catabolisme des acides gras par inhibition de la β -oxydation, favorisant la stéatose comme nous l'avons vu précédemment. L'acétaldéhyde, métabolite très toxique car très réactif, est un intermédiaire obligatoire dans le métabolisme oxydatif de l'éthanol. Ce composé est capable de former des adduits aux molécules environnantes (protéines, enzymes, glutathion). Ces adduits ont été retrouvés aussi bien au niveau du foie que du cerveau (Rintala et al., 2000) : ils modifient les propriétés de certaines protéines (diminution de l'activité enzymatique, transformation en protéines antigéniques à l'origine de réactions immunologiques). Les adduits acétaldéhyde-protéine stimulent en outre la production de collagène participant ainsi à la fibrose. Les adduits acétaldéhyde-ADN sont eux connus pour leur carcénogénicité (par leurs effets mutagènes et génotoxiques) (Brooks and Theruvathu, 2005). L'acétaldéhyde est par ailleurs particulièrement toxique pour la mitochondrie : il favorise la mort cellulaire en diminuant le glutathion réduit et en augmentant la peroxydation lipidique et les effets toxiques des radicaux libres. L'acétaldéhyde traverse le placenta, diminue la méthylation de l'ADN fœtal et peut contribuer au syndrome d'alcoolisation fœtale. Ces réactions sont cependant limitées par le maintien de concentrations très basses en acétaldéhyde par l'ALDH. Après ingestion d'éthanol, la concentration circulante en acétaldéhyde est inférieure à 1 μ M, grâce à l'ALDH dont le K_m pour l'acétaldéhyde est très bas, la vitesse de réaction étant supérieure à celle de la transformation d'éthanol en acétaldéhyde. Les concentrations d'aldéhyde circulantes sont augmentées chez les consommateurs excessifs chroniques. D'autre part, une grande part de la toxicité de l'éthanol est liée à la production de radicaux libres par l'activité microsomale liée à la CYP2E1, ou de l'oxydation de l'acétaldéhyde par la xanthine oxydase (Nordmann, 1994). Leur production est nettement liée à la présence de fer non lié à des protéines. Différents modèles expérimentaux ont montré un lien entre l'induction du CYP2E1, la peroxydation lipidique et la toxicité hépatique ((Nanji, 1994 #56 ; Wu, 2000 #61).

L'éthanol exerce un effet toxique sur d'autres organes que le foie. Au niveau du cerveau, l'action directe de l'alcool sur le cerveau est celui d'un déprimeur. Il inhibe l'activité du système nerveux. Le fait qu'il favorise le comportement social en rendant la personne plus active vient de ses propriétés

désinhibantes. Au niveau du rein, l'alcool favorise l'excrétion urinaire dans les 20 minutes suivant sa consommation. Ceci s'explique par le fait que l'alcool inhibe l'activité de l'hormone antidiurétique, qui favorise la rétention de fluides dans le rein et permet donc de concentrer l'urine. La consommation d'éthanol entraîne donc une perte d'eau plutôt que sa récupération. Les niveaux plasmatiques d'électrolytes augmentent en conséquence, affectant ainsi d'autres organes tel que le cerveau, où le fonctionnement des neurones est hautement dépendant des concentrations de sodium, potassium, chlorure et calcium disponibles.

3 MICROBIOTE INTESTINAL : SON ROLE DANS LA MAF

3.1 Microbiote intestinal : un organe à part entière

Le tractus digestif abrite une multitude de microorganismes qui, à l'heure actuelle, sont considérés comme un organe à part entière. Le microbiote intestinal de tous les animaux supérieurs est composé d'une association de diverses communautés de micro-organismes, incluant principalement des bactéries telles que les archées, mais aussi des virus, protozoaires et mycètes (Sommer and Backhed, 2013). Les micro-organismes recouvrent toutes les surfaces mucoales mais la grande majorité réside dans le tractus gastro-intestinal. De nombreuses études récentes se sont focalisées sur le rôle du microbiote intestinal dans plusieurs pathologies affectant l'homme, comme les maladies inflammatoires telles que la colite inflammatoire. Cependant, durant la décennie passée, le domaine de la recherche sur le microbiote a connu une évolution exponentielle, résultant en la publication d'une pléthore d'articles décrivant chaque population intestinale de manière individuelle mais aussi leur impact à grande échelle sur l'organisme-hôte.

Un microbiote intestinal « standard » est dominé par les bactéries anaérobies, qui surpassent en nombre les bactéries aérobies d'un facteur allant de 100 à 1000 (Clemente et al., 2012). Le tractus gastrointestinal humain abrite de 10 à 100 trillion de bactéries, contenant de 500 à 1500 espèces différentes (Lozupone et al., 2012).

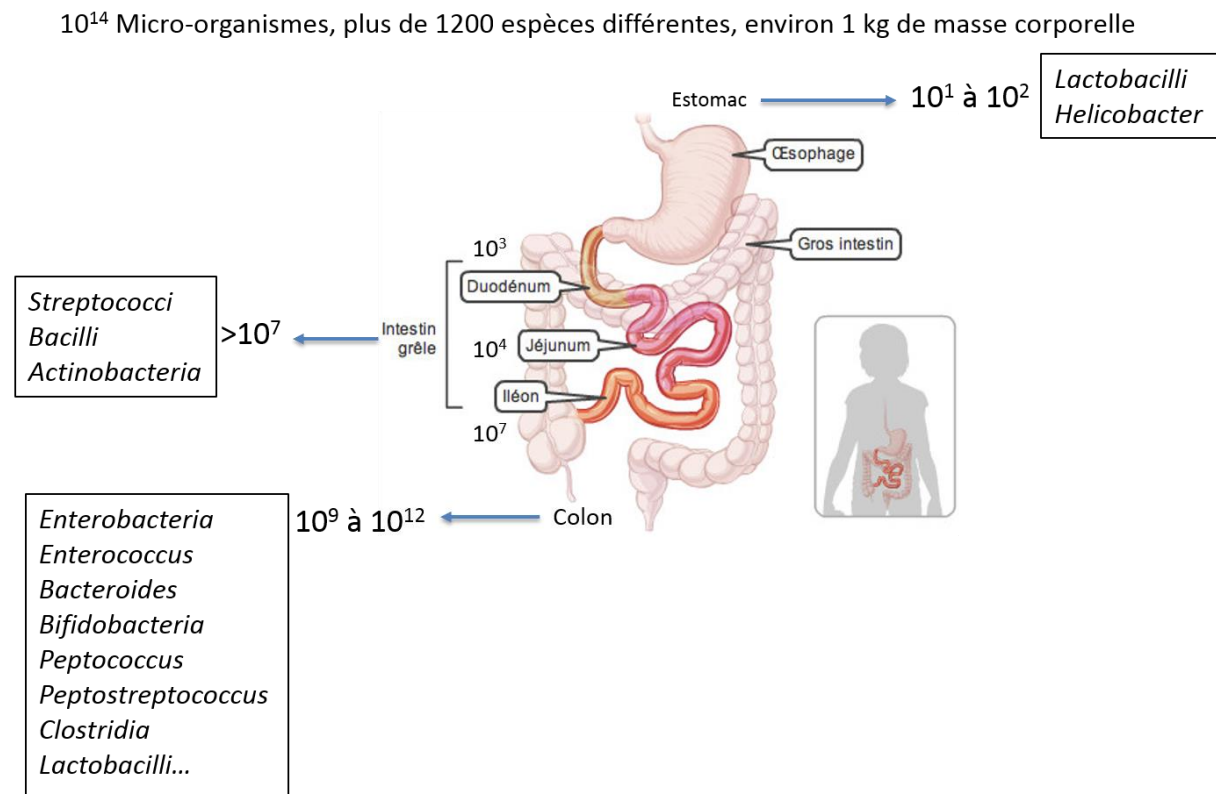


Figure 17: Microbiote intestinal et sa répartition dans le tractus digestif.

Gradient croissant de bactéries, en nombre et en diversité, depuis l'estomac jusqu'au colon. Densité exprimée en nombre de bactéries par gramme de tissu.

Leur génome combiné (connu sous le nom de microbiome) contient plus de 5 millions de gènes, surpassant ainsi d'un facteur 10 le « potentiel » génétique de l'hôte. Cet arsenal de gènes permet au microbiote de participer à de nombreuses réactions biochimiques et métaboliques en complément de la physiologie de l'hôte. En réalité, la capacité métabolique du microbiote équivaut à celle du foie, il peut ainsi être considéré comme un véritable organe à part entière (Gill et al., 2006). Il facilite ainsi le

métabolisme de polysaccharides non digestibles, et produisent des vitamines essentielles telle que la vitamine K. Le microbiote est requis pour le développement et la différenciation de l'épithélium intestinal et le système immunitaire de l'organisme hôte, conférant ainsi une protection contre les pathogènes opportunistes. Le microbiote intestinal diffère d'un individu à l'autre. Le génotype de l'hôte, l'âge, l'état de santé, le régime et l'exposition à des antibiotiques sont des paramètres critiques régulant la composition de ce microbiote (Claesson et al., 2012 ; Turnbaugh et al., 2009). Les phyla les plus abondants dans le microbiote intestinal humain sont, de loin, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, bien que d'autres espèces soient aussi présentes en grande quantité telles que les *Protéobactéries*, les *Verrucomicrobiales*, les *Actinobactéries*, les *Fusobactéries* et les *Cyanobactéries*.

La colonisation du tractus intestinal commence dès la naissance et sa composition évolue tout au long du développement de l'hôte. Récemment, il a été démontré que le microbiote intestinal a des fonctions critiques dans de multiples aspects de la physiologie des mammifères, incluant la régulation de la température corporelle et les métabolismes homéostatiques associés, l'instruction du système immunitaire et la régulation de la réponse des cellules épithéliales essentielle pour maintenir le mutualisme hôte-bactéries (Maynard et al., 2012 ; Tremaroli and Backhed, 2012). Les multiples processus dépendant des interactions réciproques entre le foie et le tractus gastro-intestinal soulignent la relation fonctionnelle clé qu'entretiennent ces 2 organes. Le foie est constamment exposé à de multiples produits, néfastes ou bénéfiques, ainsi qu'aux micro-organismes eux-mêmes qui les produisent et qui résident dans le petit et le gros intestin (Miyake and Yamamoto, 2013). Une modification impactant cet écosystème de populations bactériennes dans le tractus gastro-intestinal ainsi que des altérations de la barrière intestinale peuvent ainsi déclencher des pathologies métaboliques et inflammatoires.

3.2 *Interaction microbiote intestinal et hôte*

Les cellules de l'hôte sont dotés de récepteurs servant à la médiation des interactions entre l'hôte et sa microflore intestinale, les PRR (Pattern-Recognition Receptor) (Carvalho et al., 2012). Bien que ces récepteurs sont principalement connus pour leur rôle dans la reconnaissance de micro-organismes

pathogènes, et ainsi déclencher la réponse immunitaire, il est aujourd'hui clair qu'ils jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance de la microflore commensale.

Les interactions entre les micro-organismes commensaux et les PRR de l'hôte dans des conditions homéostatiques est nécessaire pour préserver le mutualisme entre la microflore et son hôte (Slack et al., 2009).

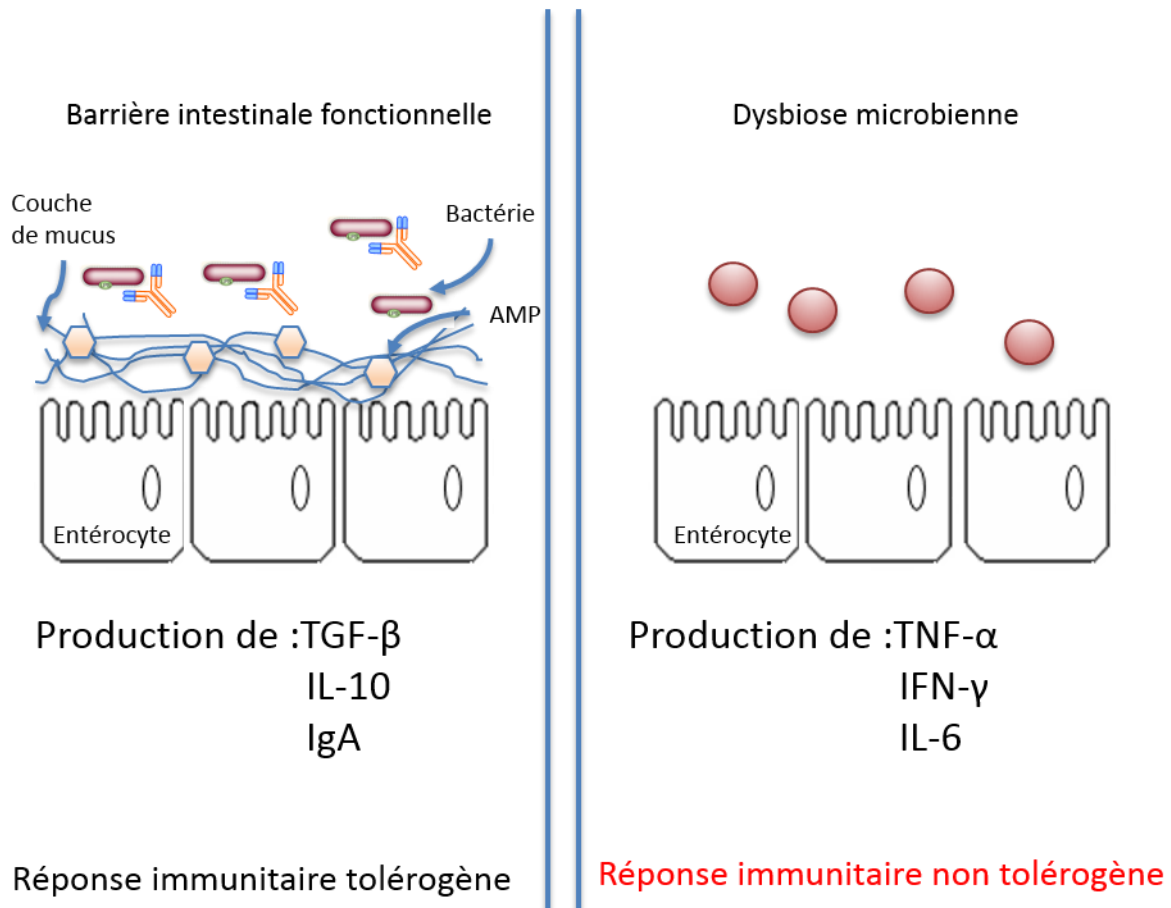


Figure 18: Dysbiose et pathologie hépatique.

Un déséquilibre de la barrière intestinale entraîne une rupture de la tolérogénicité et la production de cytokines et chimiokines de l'inflammation.

Ces récepteurs sont présents dans de multiples types cellulaires hépatiques telles que les cellules biliaires, les cellules endothéliales, les cellules stellaires, les cellules de Kupffer et les hépatocytes (Hosel et al., 2012 ; Visvanathan et al., 2007; Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2009 ; Yokoyama et al.,

2006). Les trillions de bactéries intestinales présentes dans le tube digestif ne déclenchent pourtant pas de réponse inflammatoire spontanée. Plusieurs couches de défense permettent de compartimenter les bactéries commensales présentes dans la lumière intestinale (la lamina propria, les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques). Le mutualisme nécessite donc la mise en place de mécanismes de reconnaissance minimisant la réaction immunitaire et permettant la cohabitation entre le microbiote intestinal et son hôte. De même, le foie doit maintenir un équilibre délicat entre sa tolérance envers les produits dérivés des bactéries et sa capacité à promouvoir la réponse inflammatoire contre les bactéries pathogènes et leurs produits, transloqués plus facilement dans le sang portal grâce à une déstabilisation de la paroi intestinale, comme il est observé par exemple dans la MAF (Enomoto et al., 2001).

Comme abordé précédemment (page 23 de ce manuscrit), nous retrouvons principalement parmi les PRR, les TLR, des récepteurs impliqués dans la perception et l'interprétation des signaux bactériens provenant du microbiote intestinal. Les TLR reconnaissent une grande variété de ligands microbiens, incluant des composants des parois bactériennes et fongiques, ainsi que les acides nucléiques bactériens. Différents types cellulaires présents dans le foie expriment de multiples TLRs et jouent un rôle critique dans la pathogenèse de maladies chroniques du foie. De manière plus spécifique, les TLR2, TLR3 et TLR4 sont hautement exprimés dans les cellules de Kupffer.

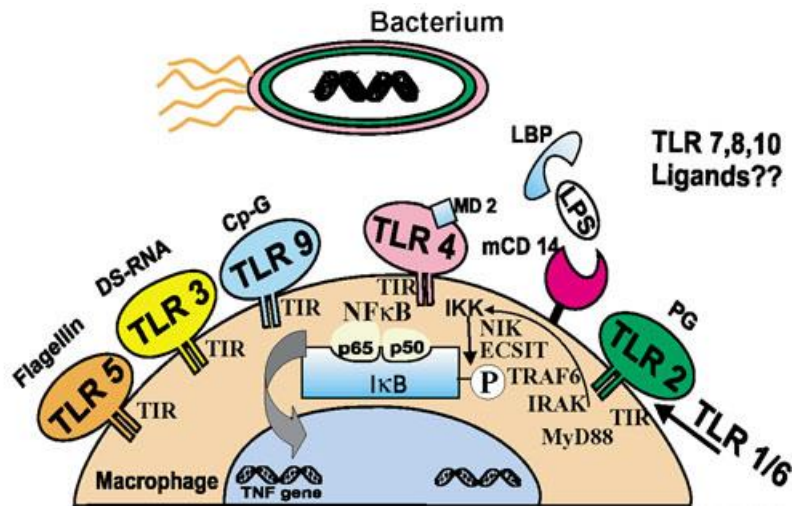


Figure 19: Interactions de différents TLR avec leurs PAMPs associés et déclenchement de la réponse immunitaire (Critical Care).

Ils peuvent être stimulés par des endotoxines et déclenchent une production rapide de TNF- α , IL-6 et d'IFN- γ . Des travaux ont démontré le rôle protecteur des interférons de type I dans un modèle de MAF basé sur la signalisation associée au TLR-4 (Petrasek et al., 2011). D'autres TLRs, tel que le TLR-9 via son activation d'IRF-7 (Interferon regulatory factor), ont été associés à une augmentation de la sévérité des lésions associées à une maladie inflammatoire du foie. Le rôle critique de ces TLR dans les maladies chroniques du foie suggère que la translocation augmentée de composants bactériens à travers la paroi intestinale et la reconnaissance hépatique de ces composants joue un rôle important dans la pathologie hépatique. Une étude a récemment permis de démontrer le rôle important du microbiote intestinal dans la fibrose hépatique, puisque que la déficience en TLR-4 et un traitement antibiotique ont permis de réduire la fibrose dans un modèle de ligature du canal du cholédoque (Seki et al., 2007). Cependant, les bactéries produisent différents types de LPS, induisant des activations plus ou moins prononcées de leur récepteur associé, le TLR-4. Une étude comparant par exemple 2 espèces bactériennes phylogénétiquement proches, l'une étant commensale et bénéfique pour la santé (*Bacteroidetes thetaiotamicron*), l'autre pathogène (*Porphyromonas gingivalis*), a permis de démontrer que la position du phosphate du lipide A (une partie du LPS sécrété) jouait un rôle clé dans le pouvoir d'immunostimulation de son LPS associé vis-a-vis du TLR4 (Coats et al., 2011). La

reconnaissance d'un LPS produit par une bactérie non pathogène permettrait donc à l'hôte de l'identifier et d'inhiber la réponse immunitaire en conséquence.

3.3 *Microbiote et MAF*

Il est bien établi que les déséquilibres de la flore intestinale participent à des pathologies digestives, les plus connues étant les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) comprenant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. La physiopathologie de ces maladies inclut des altérations dans la perception viscérale, la mobilité de l'intestin et le fonctionnement de la barrière intestinale. Bien que les polymorphismes de NOD2 soient reconnus parmi les facteurs majeurs de développement de ces pathologies (Hampe et al., 2001), d'autres mécanismes connus participant au développement de ces pathologies sont les infections entériques aiguës (Spiller and Garsed, 2009) et les antibiotiques (Mendall and Kumar, 1998), deux perturbateurs de la flore intestinale. D'autres études dans des modèles animaux ont démontré que la composition du microbiote intestinal jouait un rôle-clé dans la régulation de l'activité inflammatoire et son rôle au cours de la MAF commence à être étudié.

Le LPS bactérien, un composant lipidique présent en abondance dans la membrane externe des bactéries Gram négative, déclenche une réponse pro-inflammatoire dans l'organisme de l'hôte infecté, qui peut être excessive et mener à un choc septique et une défaillance multiviscérale (Glauser et al., 1994; Raetz et al., 1991). Des expériences impliquant un traitement avec des antibiotiques ou des *Lactobacilli* pour supprimer des populations bactériennes cibles ou diminuer la flore intestinale confère une protection contre l'évolution des lésions (score pathologique et endotoxémie stables entre contrôles et alcool) dans la MAF (Nanji et al., 1994). De nombreux travaux ont permis de démontrer le lien entre LPS, cytokines inflammatoires et lésions hépatiques au cours de l'alcoolisation (Adachi et al., 1995; Bjarnason et al., 1984; Nanji et al., 1993; Yin et al., 1999). Ainsi, une administration chronique d'alcool augmente la translocation de LPS provenant des bactéries intestinales vers la circulation portale, entraînant une activation des cellules de Kupffer et la production de plusieurs cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 (Enomoto et al., 1998). De plus, la stérilisation

intestinale à l'aide d'antibiotiques (polymyxine et neomycine) (Adachi et al., 1995), ainsi que la modulation de bactéries Gram négative à l'aide d'un gavage de *Lactobacillus* a permis d'inhiber les lésions hépatiques dues à l'alcool (Nanji et al., 1994). Une autre variable impliquée dans ces mécanismes serait le pH gastrique. Chez le patient alcoolique, une augmentation significative du pH gastrique pourrait être la cause de l'augmentation de la quantité de bactéries présentes dans le jéjunum, favorisant la translocation de LPS dans la circulation portale (Ruddell et al., 1980). Des travaux sur les interactions lipidiques intra membranaires par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont montré que l'exposition à l'éthanol augmentait la fluidité membranaire par le biais d'un changement de composition des lipides et des lipoprotéines de la membrane cellulaire.

L'augmentation de la perméabilité intestinale est un phénomène identifié depuis plusieurs années comme participant au développement de la MAF. Bien que l'on pensait au début que c'était une conséquence de la MAF, de nombreux travaux ont démontré que c'était en réalité une des causes de la pathologie. Cette perméabilité intestinale augmentée se traduit par une translocation augmentée de LPS à travers la barrière intestinale dans la circulation portale, participant ainsi à l'activation des cellules de Kupffer et leur orientation vers un profil inflammatoire (Mathurin et al., 2000). D'autres études plus récentes ont confirmé l'augmentation de la perméabilité intestinale dès 24 h après une absorption d'éthanol de 3 g/kg chez le rat. Des antibiotiques et le doxantrazole (stabilisateur des membranes mastocytaires) a permis d'inhiber de manière significative l'augmentation de la perméabilité intestinale causée par l'alcool, confirmant le rôle des bactéries et de la déstabilisation des jonctions intracellulaires dans ces mécanismes. De plus, d'autres expériences ont permis de montrer que l'éthanol en lui-même n'avait pas d'effet direct sur la perméabilité intestinale, contrairement à l'acétaldéhyde, qui pouvait également être produit par le microbiote intestinal (Ferrier et al., 2006). D'autres études plus récentes, utilisant un modèle de culture cellulaire Caco-2, ont mesuré l'impact de l'éthanol, de l'acétaldéhyde, et des 2 combinés sur la perméabilité intestinale, mesurée par un flux de dextran-FITC depuis la lame basale vers la lumière intestinale. Bien que l'éthanol et l'acétaldéhyde causent tous les deux une augmentation de la perméabilité intestinale, l'acétaldéhyde semble avoir un effet plus important puisque une concentration moindre suffit à entraîner les mêmes effets sur la

barrière intestinale que l'éthanol. L'analyse de l'ultrastructure des jonctions serrées et d'autres jonctions cellulaires n'a révélé aucune modification apparente suite à l'exposition à l'éthanol ou à l'acétaldéhyde. Par contre, dans les cellules épithéliales exposées à l'acétaldéhyde, on remarque une réorganisation des protéines ZO-1 et Occludin, qui pourrait être à l'origine de l'altération des jonctions serrées entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale (Elamin et al., 2012).

Il est maintenant décrit que la modification du microbiote intestinal influence aussi l'inflammation hépatique. Dans des modèles de lésions hépatiques induites par des substances chimiques ou une surconsommation d'alcool, la supplémentation en probiotiques contenant des espèces telles que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* a permis de diminuer la translocation de composants bactériens dans la circulation portale en diminuant la proportion de bactéries aérobies telles que *E.coli*, ainsi qu'en augmentant la stabilité intestinale et en réduisant l'inflammation hépatique (Forsyth et al., 2009 ; Kirpich and McClain, 2012; Osman et al., 2007). D'autre part, il a été démontré que les modifications du microbiote intestinal influençaient directement le métabolisme hépatique (par exemple les métabolismes des acides aminés, des acides gras, des acides organiques et des carbohydrates) en modulant leur expression génique, indépendamment de l'action propre du foie (Bjorkholm et al., 2009; Chuang et al., 2012). Chez des rats nourris avec un régime riche en cholestérol, une supplémentation en *Lactobacillus* a permis de diminuer la proportion d'*E.coli* intestinal et d'augmenter les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium*, résultant ainsi en une diminution des niveaux de cholestérol et de triglycérides hépatiques (Xie et al., 2011). La modification de la flore intestinale a donc un impact évident sur les pathologies hépatiques, en particulier au cours de la consommation d'alcool.

Globalement, le rôle du microbiote intestinal est au cœur des recherches actuelles sur la MAF. En revanche, le rôle spécifique de chaque population bactérienne est encore mal connue.

4 MODELES MURINS D'ALCOOLISATION

Les études expérimentales pour étudier les effets de l'alcool nécessitent la mise en place de modèles adaptés et le plus proche possible de l'homme. Les plus anciennes références à des études expérimentales sur les effets de l'alcool datent du XIX^{ème} siècle et consistaient en l'étude de l'effet de l'abus d'alcool sur le cerveau (Dahlstrom, 1852 et Duchek, 1853). Lors d'expériences similaires en 1868, Kremiansky a remarqué qu'un des 4 chiens recevant une dose d'éthanol croissante jusqu'à 170 ml par jour pendant 3 mois développait une stéatose hépatique et cardiaque et une inflammation chronique rénale. En 1870, Ruge fut le premier à démontrer clairement une corrélation entre l'accumulation de graisses se produisant dans le foie de chiens auxquels on injectait des doses croissantes d'éthanol à travers un tube relié directement à l'estomac. Il remarqua ainsi que la nature du régime contenant l'éthanol influençait grandement la quantité de graisses retrouvées dans le foie. En 1934, dans une revue critique et exhaustive des travaux expérimentaux sur la cirrhose alcoolique, Moon conclut qu'aucune de ces expériences n'a permis de déclencher l'apparition d'une cirrhose chez des animaux, autre que les lapins, par l'alcool seul. Les premiers à démontrer une corrélation entre stéatose d'origine alcoolique et cirrhose sont Chaikoff, Connor et Biskind qui, en 1938, ont démontré l'apparition systématique de cirrhose consécutive à une accumulation de graisses intra hépatiques chez des chiens pancréatéctomisés. En 1941, une série d'articles publiés par le NIH (National Institute of Health) permit de confirmer une apparition de la pathologie hépatique suite à une surconsommation d'alcool, et qu'une supplémentation en choline chlorure ou en méthionine (ou une augmentation de la teneur en caséine du régime) permettaient d'inhiber l'apparition de la cirrhose et étaient donc bénéfiques dans le cadre d'un traitement de la pathologie.

Jusqu'à aujourd'hui, aucun modèle animal n'a permis de développer une hépatite alcoolique caractéristique de la MAF et typiquement observée dans le foie des patients alcooliques. Ceci est une des raisons pour lesquelles autant de modèles d'alcoolisation différents ont été développés et testés. Un des modèles précurseurs consistait à alcooliser des rats avec de l'éthanol dilué dans l'eau de boisson (Best et al., 1949). Cependant, dû à l'aversion naturelle des rongeurs pour l'alcool, ce modèle

n'engendrait qu'une concentration négligeable d'éthanol dans le sang. La prise d'éthanol était insuffisante pour engendrer des dommages hépatiques suffisants.

4.1 *Modèle de Tsukamoto-French : Gastrostomie et Lieber de Carli*

Comme l'alcool « déplace » normalement les autres nutriments comme source de calories alimentaires, tous les modèles voulant reproduire une MAF doivent contrôler de manière rigoureuse la prise d'alcool et de nutriments. Chez le rat et la souris, ce contrôle rigoureux peut s'opérer via le gavage d'alcool et de régime liquide à travers une canule insérée de manière permanente dans l'estomac (French et al., 1984). Grâce à ce modèle, nommé modèle de gavage intragastrique, les animaux peuvent recevoir de l'alcool pendant plusieurs semaines, et des concentrations sanguines d'alcool élevées peuvent être maintenues plus longtemps qu'avec tous les autres modèles. Dans le cadre d'un régime isocalorique correspondant, les souris contrôles associées à celles recevant le régime alcool reçoivent le même régime, avec des calories glucidiques (maltodextrine) à la place de calories alcooliques. Ce système permet d'une part de s'affranchir des aléas d'une consommation *ad libitum*, mais aussi d'obtenir des lésions hépatiques. Ce modèle a fourni une base permettant de retrouver chez le rat des symptômes de la MAF, incluant la stéatose et l'inflammation (Tsukamoto et al., 1985). Dans un modèle où un supplément de fer carbonyl (fer hautement purifié) était donné en plus du régime, il a été observé l'apparition d'une fibrose, mais seulement chez 2 animaux sur 10 (Tsukamoto et al., 1995).

Ce modèle présente cependant des contraintes expérimentales importantes (infection bactérienne des tubules nécessitant un entretien quotidien, chirurgie ouverte avec risques de mortalité élevé) ce modèle n'a pas donné de résultats concluants dans notre laboratoire en termes de pathologies hépatiques, ou de paramètres tels que les transaminases (ALAT), la stéatose et l'inflammation nécessitant comme avec d'autres modèles une injection de LPS.

4.2 Alcoolisation par un régime adapté : Lieber DeCarli

Le modèle le plus couramment utilisé actuellement est d'alcooliser des rongeurs avec un régime Lieber DeCarli, auquel ils ont accès *ad libitum*. Ce régime a été créé il y'a près de 40 ans (Lieber et al., 1965) en réponse à un besoin de développer un modèle animal d'alcoolisation pertinent et fonctionnel. Diluer l'éthanol dans un régime semi-liquide a permis de surmonter l'aversion de l'alcool chez les rats, augmentant ainsi considérablement la prise d'éthanol et favorisant l'apparition de pathologies hépatiques. Le régime Lieber DeCarli est adapté pour fournir les nutriments et calories nécessaires à des rongeurs soumis à un protocole d'alcoolisation. Les graisses telles que l'huile de maïs sont naturellement riches en graisses polyinsaturées

Composants	Concentration (g/litre, 1000kcal)
Caséine	41,4
L-cystine	0,5
DL-méthionine	0,3
Huile de maïs	8,5
Fibres	28,4
Huile de tournesol	2,7
Maltodextrine	115,2
Choline de bitartrate	0,53
Fibres	10
Gomme de xanthane	3
Vitamines et minéraux	

Figure 20: Composition du régime standard Lieber DeCarli (de la et al., 2001)

Les graisses telles que l'huile de maïs sont naturellement riches en graisses polyinsaturées. Il a été démontré que remplacer ces graisses polyinsaturées par des acides gras à chaînes moyennes (AGCM), composés uniquement d'acides gras saturés, permettait d'inhiber la formation de radicaux libres ainsi que la production de TNF- α par les cellules de Kupffer chez les rats soumis à un protocole d'alcoolisation (Kono, 2000 #136). Il existe de nombreux variants du régime Lieber DeCarli (teneur

élevée en carbohydrates, riche en AGCM, riche en vitamine A), et l'importance de leurs effets sur le foie varie grandement d'un régime à l'autre.

*Régime original Lieber DeCarli (1963)
 *Régime LDC appauvri en graisses (5-12%) (Lieber et al, 1966)
 *Régime LDC enrichi en vitamine A (Leo and Lieber, 1982)
 *Régime standard enrichi en caséine (protéines représentent 18% de l'apport énergétique total, les graisses 35%, les carbohydrates 47%, ou 11% et 36% de l'éthanol) (Lieber et DeCarli, 1994)

Régime	Stéatose	Apoptose	Inflammation	Fibrose
Standard	+ à ++	+	-	-
Pauvre en carbohydrates, riche en graisses	+++	+	+	+
Enrichi en AGCM	- a +	- a +	-	-
Enrichi en protéines	+	+	-	-
Enrichi en Vitamine A	+ a ++	+	+ a +++	+ a +++

+ : Présent - : Absent

Figure 21: Différents régimes LDC avec les observations histologiques associées (de la et al., 2001)

Cela dit, le régime « standard », nutritionnellement équilibré et complet, permet déjà d'obtenir des lésions hépatiques significatives : augmentation par 6 de la quantité de triglycérides hépatiques, apoptose cellulaire et altérations frappantes de la mitochondrie et du réticulum. endoplasmique (Iseri et al., 1966).

Des troubles fonctionnels correspondants ont été décrits, anomalies de la production d'énergie, induction de l'activité de la voie MEOS, et une augmentation par 6 de l'activité de CYP2E1 (Lieber et al., 1988), surproduction de radicaux libres et altérations des défenses associées. L'intégralité de ces effets ont d'abord été démontrés chez le rat, et jouent un rôle clé dans le développement de la MAF.

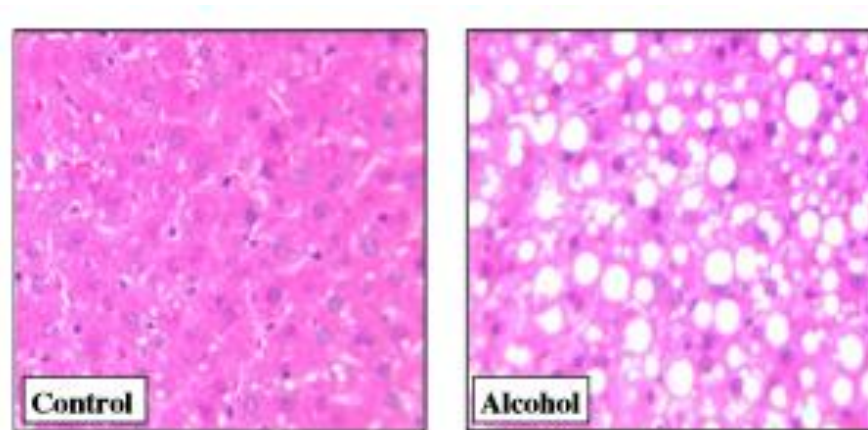


Figure 25: Coupes de foie en histologie. Atteintes cellulaires et mitochondriales liées au régime LDC. Accumulation de triglycérides dans des granules de stéatose (à droite) (Lieber et al., 2007).

Par conséquent, le régime Lieber DeCarli nous fournit un moyen de reproduire l'apparition des lésions précoces liées à la surconsommation d'alcool. Concrètement, ce modèle a permis la découverte de nouveaux traitements efficaces contre certaines de ces lésions, comme par exemple la prévention de la stéatose par le polyenylphosphatidylcholine chez des rongeurs (Navder et al., 1997) ou par le remplacement des triglycérides à longues chaînes par des AGCM, diminuant ainsi de manière significative la stéatose (DeCarli and Lieber, 1967).

Le régime provoquant l'apparition de la fibrose et de l'inflammation la plus sévères est un régime nutritionnellement équilibré, contenant des quantités adéquats de protéines et de lipotropes (choline et méthionine) et supplémenté en vitamine A. La supplémentation en vitamine A, inoffensive en elle-même, a entraîné l'apparition de lésions hépatiques sévères incluant fibrose et inflammation hépatique, lorsque associée à une consommation chronique d'alcool (Leo and Lieber, 1983). Pour ne pas introduire de biais dans nos expériences et reproduire un modèle d'alcoolisation le plus « physiologique » possible nous avons opté pour un régime Lieber DeCarli standard, sans déficience ou supplémentation, comprenant des huiles végétales de plusieurs origines différentes (huile de tournesol, huile d'olive, huile de maïs).

PRESENTATION DU PROJET DE
THESE

La recherche de facteurs impliqués dans le développement de la MAF est essentielle pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge des formes graves. Le but de ma thèse avait pour objectif premier d'étudier les dérégulations lymphocytaires au cours de cette maladie. Il existe peu de données dans la littérature concernant ces dérégulations. Notre étude s'est d'abord concentrée sur l'infiltration lymphocytaire hépatique caractéristique de l'état inflammatoire, et qui a lieu pendant les stades précoces de la maladie. Les premières expériences ont permis de voir des différences modestes dans les sous-types majoritaires de lymphocytes CD3, CD4, CD8 et CD19. Nous avons retrouvé des différences déjà référencées dans la littérature, telles qu'une augmentation des lymphocytes NKT et une diminution des cellules NK, 2 types cellulaires impliqués dans l'aggravation de la pathologie hépatique. Ces premières expériences réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'INRA avaient nécessité d'alcooliser les souris dans une animalerie hors site. Afin de poursuivre nos études sur les dérégulations lymphocytaires nous avons donc réalisé les mêmes expériences dans notre animalerie. Les paramètres physiopathologiques associés à la maladie alcoolique du foie n'étaient pas concluants durant nos premiers protocoles d'alcoolisation. Nous n'observions en effet qu'une très faible stéatose, difficilement visible en histologie et non significative par quantification des triglycérides hépatiques, des transaminases stables (l'augmentation des transaminases plasmatiques est un marqueur d'atteinte du foie, et plus particulièrement de lésion des hépatocytes), et aucune différence dans l'expression génique de marqueurs inflammatoires reconnus dans la MAF tels que le TNF- α et l'IL-1 β .

Nous avons testé notre protocole dans une autre animalerie (animalerie B). Ceci nous a permis d'observer l'apparition d'une pathologie hépatique, caractérisée par des paramètres physiopathologiques significativement différents chez les souris ayant consommé un régime alcool par rapport aux souris contrôles. Une analyse du microbiote intestinal de ces souris nous a révélé qu'en fin de protocole d'alcoolisation, les souris alcoolisées dans l'animalerie B présentaient un déficit dans une population bactérienne, les *Bacteroides*, alors que cette population restait stable tout au long du protocole dans l'animalerie A, dans laquelle nous n'observions pas de lésions hépatiques. Mon projet s'est donc ensuite focalisé sur le rôle du microbiote intestinal dans la MAF. Nous présenterons dans la

partie I les expériences d'alcoolisation préliminaires nous montrant des différences dans les populations lymphocytaires hépatiques, et la dysbiose intestinale chez les souris consommant un régime alcool sera présentée en annexe I à la fin de ce manuscrit. Dans la partie II, nous verrons les résultats des expériences d'alcoolisation obtenus dans les 2 animaleries, les différences de microbiote intestinal associées ont donné lieu à des expériences par transfert de microbiote et par prébiotique. Ces résultats seront présentés dans l'article à soumettre et inclus dans cette partie.

RESULTATS

PARTIE I : IMPLICATION DES DEREGULATIONS LYMPHOCYTAIRES DANS LA MAF

Une première série d'expériences menées en collaboration entre notre équipe et l'INRA a permis de mettre en évidence des dérégulations lymphocytaires dans un modèle d'alcoolisation avec un régime Lieber DeCarli. Des souris femelles, qui présentent une plus grande sensibilité à l'alcool de 8 semaines reçoivent un régime Lieber DeCarli à 3% d'alcool pendant une durée de 5 semaines. Le régime alcool est obtenu en additionnant de l'éthanol absolu à une solution de régime Lieber DeCarli dilué dans de l'eau filtrée. Après une adaptation à leur nouvelle animalerie de 7 jours, les souris sont nourries avec des concentrations croissantes d'alcool pendant une semaine jusqu'à atteindre la concentration finale de 3%. L'éthanol représente 28% de l'apport calorique journalier, et le régime contrôle est obtenu en remplaçant l'éthanol par de la maltodextrine isocalorique. Une perte de poids est observée chez les souris sous régime alcool comparé aux souris sous régime contrôle. L'atteinte hépatique est confirmée par le dosage des transaminases qui est significativement plus élevé chez les souris sous régime alcool, et une stéatose est apparente en histologie, bien que le dosage des triglycérides hépatiques ne montre pas d'élévation significative (Figure 23).

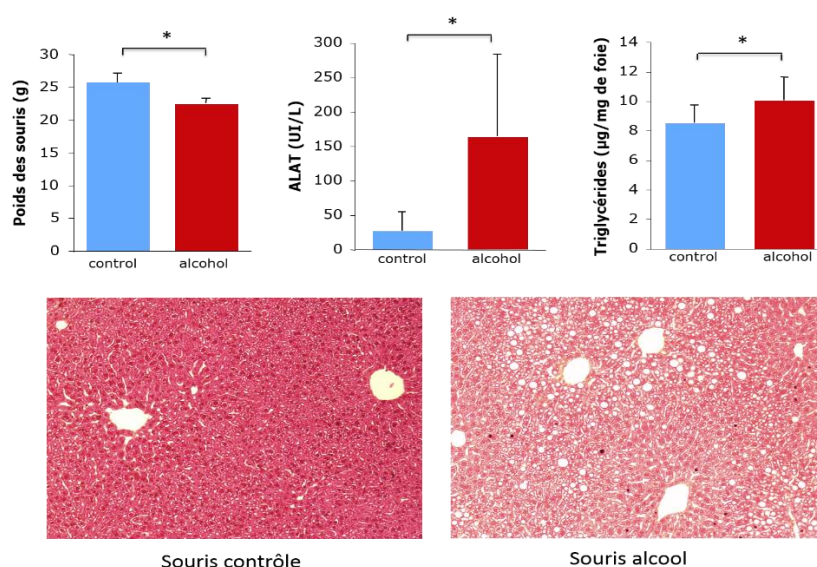


Figure 23 : Atteinte hépatique lors de la première expérience d'alcoolisation par régime LDC. Le poids des souris alcool est diminué, les ALAT augmentées, une stéatose est visible en histologie mais non confirmée par le dosage des triglycérides hépatiques (* : $p < 0,05$ Mann-Whitney).

L'analyse des populations lymphocytaires hépatiques a permis de voir une augmentation significative de NK et de NKT. L'augmentation de NK constitue un résultat contradictoire au vu des résultats obtenus ultérieurement qui montraient une diminution de NK, comme il a déjà été démontré dans la littérature (Jeong et al., 2008b ; Laso et al., 1997 ; Szabo and Mandrekar, 2009). L'augmentation du nombre de lymphocytes NKT a déjà été décrite par Minagawa et al, qui ont montré que ces dérégulations étaient associées à la pathologie, et que le fait d'empêcher l'augmentation des lymphocytes NKT améliorerait les lésions hépatiques. Nous avons constaté une augmentation des lymphocytes CD3⁺, qui peut s'expliquer par l'augmentation des lymphocytes NKT. Nous avons également vu une diminution des lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ (Figure 24), une observation en contradiction avec ce qui a été démontré dans la littérature. En effet, la consommation chronique d'alcool aurait tendance à augmenter le nombre de lymphocytes CD8 circulants, ces lymphocytes possédant de plus une activité cytotoxique augmentée par rapport à ceux de patients sains. D'autres travaux ont démontré une augmentation du recrutement de lymphocytes CD8⁺ hépatiques lors d'une surconsommation d'alcool. Ils participeraient ainsi à la progression et l'aggravation des lésions hépatiques lors de la MAF (Haydon et al., 2002; Laso et al., 2010).

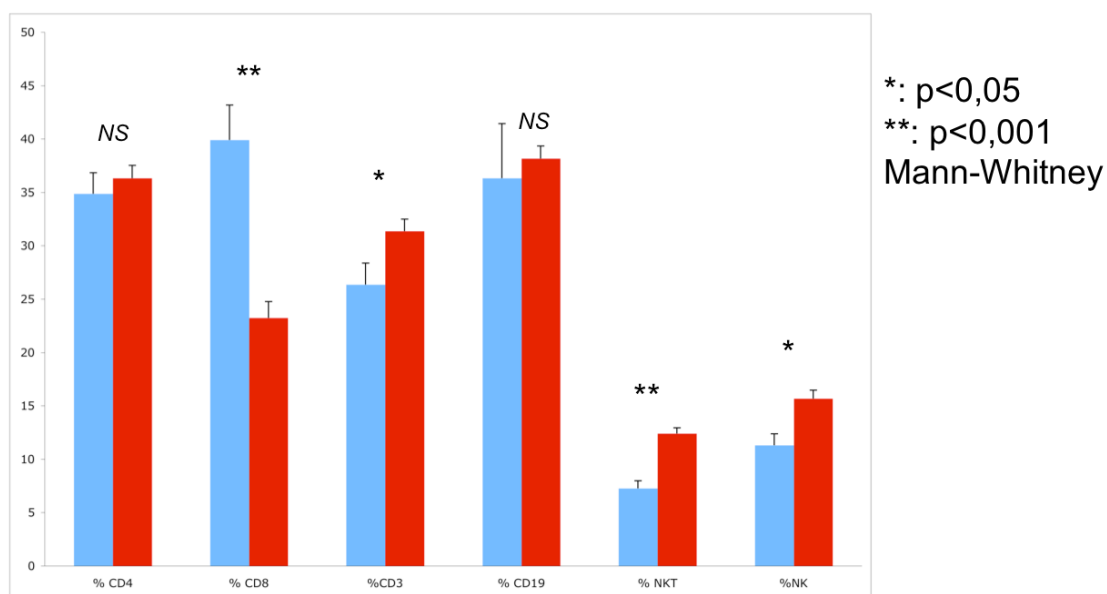
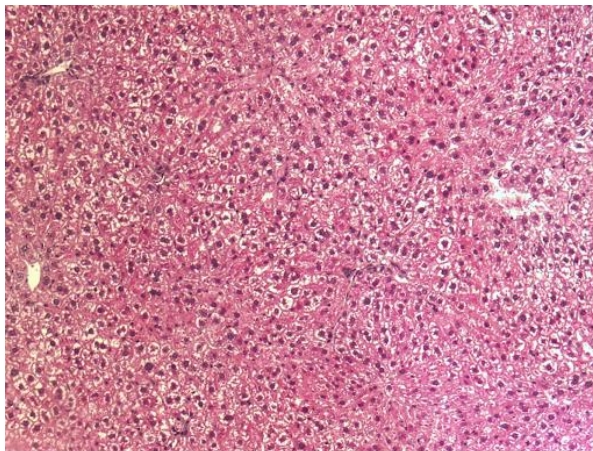


Figure 24 : Infiltration lymphocytaire hépatique chez les souris alcool.

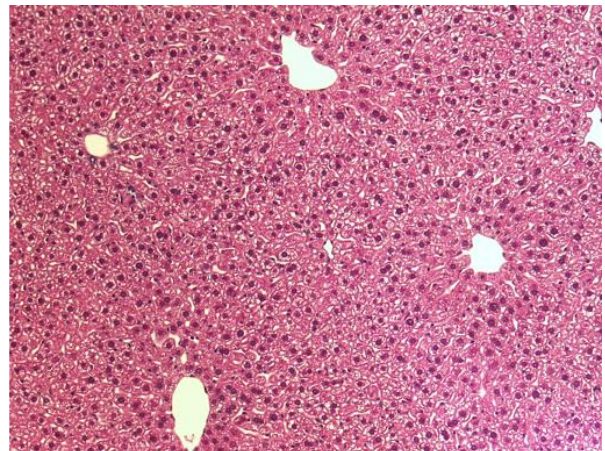
On observe une augmentation significative des NKT, NK et CD3⁺ chez les souris alcool par rapport aux souris contrôles, et une diminution des CD8

Ces résultats nous ont encouragé à rechercher en détail les populations lymphocytaires (naïves, activées, mémoires) et régulatrices qui pouvaient être impliquées dans l'inflammation.

Nous avons donc réalisé des séries d'alcoolisation dans notre animalerie. Nous avons d'abord tenté de reproduire le modèle d'alcoolisation à 3% pendant 5 semaines, le modèle utilisé dans le cadre de notre collaboration avec l'INRA. Nous avons constaté que bien que le modèle d'alcoolisation soit identique, le lot de régime également, nous n'avons pas de lésions hépatiques comme celles observées précédemment. L'analyse de l'infiltration lymphocytaire par cytométrie en flux n'a pas permis d'observer de différences significatives parmi les populations observées (CD3, CD4 naïfs activés mémoires, CD8 naïfs activés mémoires, NK, NKT). Nous avons réitéré l'expérience plusieurs fois en faisant varier les durées et les pourcentages d'alcoolisation sans succès (Figure 25). Nous avons donc envisagé de réaliser des protocoles d'alcoolisation dans une autre animalerie, puisque cela restait le seul facteur variable. Ces expériences seront détaillées en partie II des résultats.



Souris contrôle



Souris alcool

Figure 25 : Alcoolisation régime LDC 3% pendant 5 semaines testée dans notre laboratoire.

Nous n'observons pas de stéatose chez les souris sous régime alcool par rapport aux souris sous régime contrôle.

Des travaux que nous menions en collaboration avec l'INRA ont permis de découvrir des disparités dans les flores intestinales de patients alcooliques. Dans cette étude, nous avons étudié 3 groupes de patients en les classifiant selon des critères histologiques permettant de déterminer la sévérité de

l'atteinte hépatique : des patients ne présentant pas d'hépatite alcoolique, des patients atteints d'une hépatite alcoolique non sévère, et des patients atteints d'hépatite alcoolique sévère. Un 4^e groupe composé de patients atteints d'une infection chronique au virus de l'hépatite C était utilisé comme groupe contrôle. Ces expériences ont mis en évidence une dysbiose caractéristique affectant exclusivement les patients atteints d'une hépatite alcoolique sévère. Le microbiote de ces patients était composé par des quantités anormalement élevées d'*Enterobacteria*, de *Bifidobacteria* et de *Streptococcus*, et une proportion diminuée d'*Atopobium*. Nous avons ainsi démontré une corrélation positive en la proportion élevée d'*Enterobacteria* et le score de bilirubine sanguine et celui de la gradation de l'hépatite alcoolique. Suite à ces résultats, nous avons réalisé des transplantations de microbiotes provenant de patients alcooliques atteints d'une hépatite alcoolique sévère ou présentant un foie sain. Ces transplantations étaient réalisées sur des souris axéniques maintenues en isolateurs, l'environnement ayant un rôle clé sur la composition du microbiote intestinal. Ces souris ont ensuite été alcoolisées pendant 5 semaines. L'analyse des microbiotes de ces souris a permis de voir une augmentation d'*Enterobacteria*, de *Bifidobacteria*, ainsi qu'une diminution d'*Atopobium*, confirmant ainsi les résultats observés précédemment chez l'homme. L'analyse de l'infiltration lymphocytaire a permis de démontrer une proportion plus élevée de lymphocytes CD3⁺, CD4⁺, CD8 et NKT dans le foie des souris implantées avec un microbiote d'hépatite alcoolique sévère, contrairement aux souris implantées avec un microbiote provenant de patient alcoolique contrôle. Cette augmentation de populations lymphocytaires a aussi été retrouvée dans le tissu adipeux viscéral et les ganglions lymphatiques mésentériques. Ces résultats sont présentés dans l'article en annexe I de ce manuscrit.

Compte tenu de ces données et de nos résultats disparates observés dans notre animalerie et celle de l'INRA pendant nos essais d'alcoolisation, nous avons analysé le microbiote intestinal des souris, et réalisé ces mêmes alcoolisations dans une animalerie différente. Ces expériences ont fait l'objet de la suite de mes études et sont présentés dans la partie II des résultats.

**PARTIE II : CORRIGER LA DYSBIOSE INTESTINALE CHEZ
LES SOURIS ALCOOL PERMET D'INHIBER LA TOXICITE
HEPATIQUE DE L'ETHANOL**

Inhibition of hepatic alcohol toxicity by correcting intestinal dysbiosis in mice

Frédéric Cailleux, Laura Wrzosek, Françoise Gaudin, Marie-Louis Noordine, Dominique Berrebi,
Mathieu Horckmans, Muriel Thomas, Sylvie Naveau, Gabriel Perlemuter, Anne-Marie Cassard-
Doulcier.

En cours de soumission à Gastroenterology

Objectif

Nous avons préalablement montré, dans un modèle murin d'alcoolisation avec un régime Lieber DeCarli, que des dérégulations lymphocytaires ainsi que des dysbioses intestinales étaient impliquées dans les phases précoces de la maladie. Des résultats obtenus dans 2 animaleries différentes nous ont permis de mettre en évidence des différences de microbiotes indépendamment de la présence d'alcool dans le régime, donc seulement influencées par l'environnement. Les proportions de *Bacteroides*, une population bactérienne intestinale majeure, restaient stables dans l'animalerie où l'atteinte hépatique lors d'un régime alcool était faible voire nulle, alors qu'elle diminuait dans l'animalerie où les souris développaient une maladie alcoolique du foie. L'objectif de nos travaux était de démontrer que le rétablissement de cette population bactérienne permettait d'empêcher l'apparition des symptômes de la pathologie.

Méthodes

La MAF est induite chez la souris par un régime Lieber DeCarli. Une semaine d'adaptation à l'animalerie ainsi qu'une semaine d'adaptation au régime liquide sont respectées pour habituer graduellement les souris d'une part au régime semi-liquide, d'autre part à l'alcool. La pectine, un prébiotique connu pour favoriser la croissance des *Bacteroides*, est ajouté pour un groupe de souris de l'animalerie B. D'autre part, un transfert de flore (FMT) est réalisé 3 fois par semaine, à l'aide de fèces fraîches provenant de souris de l'animalerie A vers celles de l'animalerie B. L'atteinte hépatique est évaluée à l'aide de plusieurs paramètres physiopathologiques, le dosage des transaminases plasmatiques (ALAT), le dosage des triglycérides hépatiques et l'analyse de la stéatose en histologie, et par l'analyse de l'expression des cytokines inflammatoires par PCR quantitative. La composition des microbiotes intestinaux murins est analysée par marquage FISH (Fluorescence in situ hybridization) quantifié par cytométrie en flux.

Résultats

Une première série d'expériences nous avait montré qu'à protocole identique, les souris développaient une pathologie hépatique lors d'une alcoolisation dans l'animalerie B mais non dans l'animalerie A. Les souris provenaient du même fournisseur, le régime d'un même lot, les bilans sanitaires des 2 animaleries étaient identiques. Les microbiotes des souris avant alcoolisation étaient aussi identiques. Les souris sous régime alcool de l'animalerie B présentaient cependant une atteinte hépatique prononcée, caractérisée par des transaminases significativement plus élevées et des triglycérides hépatiques augmentés, contrairement aux souris sous régime alcool de l'animalerie A. Lors de notre deuxième série d'expériences impliquant la pectine et le transfert de flore, nous avons aussi réalisé une alcoolisation témoin, impliquant un groupe de souris recevant le régime LDC contrôle et un groupe de souris

recevant le régime LDC alcool, dans chaque animalerie. Nous avons confirmé les résultats obtenus précédemment, puisque les souris recevant le régime alcool développaient une pathologie seulement dans l'animalerie B (augmentation significative des ALAT, des triglycérides hépatiques, stéatose visible en histologie et augmentation de l'expression de gènes de l'inflammation). Pour les groupes de souris de l'animalerie B recevant la pectine avec le régime LDC ou le transfert de flore, l'analyse de leurs microbiotes intestinaux a montré une augmentation des *Bacteroides* dans ces 2 groupes de souris (1.5X pour le groupe FMT, 2 à 4X pour le groupe Pectine). La pectine et le FMT ont donc bien permis de maintenir les *Bacteroides* à un niveau élevé dans l'animalerie B. Ce maintien des *Bacteroides* à un niveau élevé est cumulé à une protection contre le développement des lésions hépatiques après alcoolisation. En effet, nous n'observons pas de pathologie hépatique chez ces 2 groupes (ALAT non augmentées, triglycérides stables et stéatose en histologie faible voire nulle, pas d'augmentation d'expression des gènes de l'inflammation), contrairement au groupe d'alcoolisation témoin.

Conclusion

L'apparition de la maladie alcoolique du foie dans un modèle murin d'alcoolisation est fortement liée à la composition du microbiote intestinale des souris. La présence de *Bacteroides* à un niveau élevé dans le tube digestif est un facteur clé qui semble protecteur vis-à-vis du développement des lésions hépatiques. L'utilisation de traitements permettant de moduler cette population constitue une piste intéressante pour l'amélioration du pronostic de la MAF.

Title : Inhibition of hepatic alcohol toxicity by correcting intestinal dysbiosis in mice

Short Title : corrected dysbiosis prevents alcoholic liver damage

**Frédéric Cailleux^{1,2}, Laura Wrzosek^{1,2}, Françoise Gaudin^{1,2}, Marie-Louis Noordine³,
Dominique Berrebi^{1,4}, Mathieu Horckmans^{1,2}, Muriel Thomas³, Sylvie Naveau^{1,2,5},
Gabriel Perlemuter^{1,2,5}, Anne-Marie Cassard-Doulier^{1,2}.**

¹INSERM U996, IPSIT, Clamart, 92140, France;

²Univ Paris-Sud, Faculté de médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, 94270, France;

³INRA, UMR 1319 MICALIS, AgroParisTech, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, 78350,
France;

⁴AP-HP, Hôpital Robert Debré, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, 75019, France;

⁵AP-HP, Hôpital Antoine Bécère, Service d'hépatogastroentérologie, Clamart, 92140,
France.

Grant support: Supported by INSERM, Université Paris-Sud, the National French Society of Gastroenterology (SNFGE), Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons (IREB), Institut de recherches internationales Servier (IRIS). FC holds fellowships from the Ministère de la recherche and a grant from ARC (Association pour la recherche contre le cancer).

Abbreviations. Alc :Alcoholized mice, Ctrl : Control mice, IM : Intestinal microbiota, IL: Interleukine, LDC: Lieber DeCarli diet, LPS : lipopolysaccharide.

Correspondence: Anne-Marie Cassard-Doulicier, INSERM U996, 32 rue des Carnets, Clamart, F-92140, France. E-mail: cassard.doulicier@u-psud.fr

Disclosures : All authors declare they have no conflicts of interest.

Author Contributions :

FC, acquisition of data, statistical analysis of data, drafting of figures; LW, gut prelevements and analysis; FG, DB, histology and immunohistochemistry; LMN, western blots ; MH, technical support; MT and SN, critical revision of the manuscript for important intellectual content; GP, obtained funding, critical revision of the manuscript for important intellectual content; AMCD, study concept and design, study supervision, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, obtained funding.

Acknowledgments. The authors thank Mylène Levant and Valérie Domergue-Dupont for the follow-up of mice; the biochemistry department of the Antoine Bécère hospital for transaminase measurements. The authors warmly thank Philippe Gérard for useful discussions and relevant research leads.

ABSTRACT (260 words max)

Background & Aims: The susceptibility of alcoholics to liver disease is diverse. Therefore, factors other than alcohol intake must influence the development of liver injuries. We previously showed in humans that acute alcoholic steatohepatitis was associated with key changes of the intestinal microbiota. The aim of this work was to determine if maintaining a high level of specific bacterial species could inhibit the onset of alcoholic liver damage.

Methods: The alcoholisation protocol was performed in 2 different animal facilities (A and B) with a Lieber DeCarli diet, added with ethanol or control isocaloric maltodextrin. Intestinal microbiota transfer was realised with fresh feces from healthy donor mice (animal facility A). The group of receiver mice from animal facility B were force-fed 3 times a week. The group receiving the pectin treatment was treated during the alcoholization protocol.

Results: In animal facility B, ethanol consumption induced a liver inflammation with a marked steatosis, an increase of plasmatic ALT and of inflammatory markers mRNA expression (TNF, CCL-2, IL β). In animal facility A, a similar alcoholization protocol did not induce any noticeable liver damage. Analysis of the intestinal microbiota showed that *Bacteroides* were significantly decreased in animal facility B, but not in animal facility A. Restoring this population with a fecal microbiota transfer from animal facility A, or via feeding with pectin, a prebiotic increasing *Bacteroides* growth, allowed the inhibition of early alcoholic liver injuries in animal facility B.

Conclusions: Increasing *Bacteroides* via the addition of pectin or fecal microbiota transfer protected the mice from the onset of alcoholic liver disease in a Lieber DeCarli ethanol diet

Keywords: Alcohol; microbiota; dysbiosis; fecalotherapy

INTRODUCTION

Chronic alcohol consumption is the major etiological factor of chronic liver disease in the world. Despite this major public health concern, factors that link ethanol intake to the onset and progression of liver injury are poorly understood. In fact, among long-term heavy drinkers, the majority of patients will develop fatty liver (i.e. steatosis) but only 10-35% liver inflammation (i.e. hepatitis) and 8-20 % will progress to cirrhosis. Therefore, important factors other than the only quantity of alcohol intake influence the onset and progression of alcoholic liver disease ¹. Among these factors, it is now admitted that gut bacteria play a role in the pathogenesis of ALD. Molecular technics using comparative analysis of cloned 16S rRNA gene (rDNA) sequences, allowed to investigate the bacterial diversity of the gut ^{2,3}. Currently, human gut bacteria or intestinal microbiota (IM) encompasses 10-100 trillion microorganisms and harbors more than 1000 different bacterial species ⁴. Recently several publications highlight the role of IM in health diseases especially intestinal bowel diseases. Indeed, a reduced diversity in the Firmicute phyla was observed in patients with Crohn's disease, in particular of *F. praunsnitzii* which is the main bacterium of the *C. leptum* group ^{5,6}. Authors established the protective role of anti-inflammatory factors produced by *F. praunsnitzii* highlighting the dysbiosis as an actor of the disease ⁶. IM plays an important role in the maintenance of the intestinal barrier: on one hand by preventing colonization by pathogen bacteria ⁷ and on the other hand by cooperating with the intestinal epithelium to produce mucin ^{8,9}. It is well established that the gut leakiness is associated with ALD ¹⁰⁻¹² and more recent data could suggest that intestinal barrier disruption is a prerequisite to liver injury in ALD ¹³. If the liver metabolizes 80% of total ethanol, the role of IM in the ethanol metabolism during ALD is not clearly established. Since they harbour an alcohol dehydrogenase activity several bacteria can metabolize ethanol and produce acetaldehyde ¹⁴. The ability of gut bacteria to metabolize acetaldehyde is low. However, the increase of acetaldehyde in the gut is not clearly demonstrated as a deleterious compound acting on the gut epithelium and thus on the barrier disruption.

However, the involvement of IM in ALD was recently addressed in humans and especially the impact of alcohol abuse on dysbiosis. In an adult human cohort, dysbiosis was observed in alcoholic group with reduced numbers of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, and *Enterococci*. A short-term oral supplementation with probiotics (*Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus plantarum*-8PA3) was associated with restoration of IM and improvement of liver injury ¹⁵. More recently, fecal microbiota dysbiosis was described in patients with liver cirrhosis compared to healthy patients. *Bacteroidetes* were significantly reduced whereas *Proteobacteria* and *Fusobacteria* were highly enriched in the cirrhosis group comprising 30% of alcoholic patients ¹⁶.

In rodents, use of probiotics (*Lactobacillus GG*) preserved intestinal barrier and improved liver injury in a rat model of alcoholization ¹⁷. In mice, the percentage of *Firmicutes* was decreased in alcoholised mice and conversely *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* were relatively more abundant ¹⁸. Conversely, another study described a decrease of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* after alcoholization ¹⁹. However, the use of fructo-oligosaccharides infused concomitantly to alcohol allowed to partially restore the translocation of bacteria and lowered steatosis ¹⁸. A *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) treatment in alcoholised mice prevented barrier dysfunction and hepatic lesions development ¹⁹.

Altogether these data show that the IM composition is modified by alcohol. We alcoholized mice with a Lieber-DeCarli diet in order to address the role of IM in the onset of the ALD. Surprisingly, alcoholization did not induce liver lesions like it effectively did in our previous experiments performed in another animal facility. Nevertheless, as it has been previously established that breeding facilities could influence IM composition ²⁰, we performed alcoholization of mice in two different animal facilities. Discrepancies in the development of hepatic lesions between animal facilities after alcoholization pointed out a relevant decrease in *Bacteroides* population. Fecalotherapy and pectin treatment were used

to maintain high *Bacteroides* level and we showed this elevated *Bacteroides* level prevents the development of hepatic lesions.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Female C57BL/6J were purchased from Janvier laboratory (Le Genest, France). Animals received human care in compliance with institutional guidelines. Animals were kept in humidity and temperature-controlled rooms, and kept on a 12-hour light-dark cycle in 2 separate animal facilities, named House A and House B. Mice had access to chow diet and water ad libitum before the study, in the 2 animal facilities. During the protocol of alcoholization water was added to the semi-liquid Lieber-DeCarli diet. To avoid any stress to the mice, a piece of wood is given to the mice so they can gnaw on it.

Chronic exposure to ethanol. 8 weeks old mice were fed for 17 days with a liquid diet adapted from Lieber-DeCarli, as described by Gustot et al. ²¹ and adapted from Ki et al. ²². Briefly, the ethanol diet was obtained by adding absolute ethanol to a solution of a Lieber-DeCarli powder (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) in filtered water. After a 7 days animal facility adaptation, mice were given increasing ethanol concentration for 7 days (2% increase every two days). The final concentration of ethanol in this liquid diet is 5% (vol/vol), and ethanol accounts for 28% of total caloric intake. The control diet was obtained by replacing the ethanol by an isocaloric amount of maltodextrin (Maldex150, Safe, 89290 Venoy, FRANCE) ²³. Alcoholized groups were allowed free access to a 5% (vol/vol) ethanol diet for 10 days. Control mice were pair-fed with isocaloric control diet over entire feeding period. During the Lieber-DeCarli diet, animals did not have access to drinking water. 3 independent experiments were performed with different number of animals but same treatments, in 2 different animal facilities A and B. Microbiota transfer was realized by feces gavage. Feces, coming from 20 mice housed in animal facility A, were recovered,

resuspended in transfer buffer (Dulbecco's phosphate buffered saline solution, Gibco, Saint-aubin, France) and a 100 µl volume was administered to each mouse housed in animal facility B once every 2 days for 21 days. An alternative Lieber-DeCarli diet containing 6.5% pectin from apple (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was given to mice in animal facility B. Body weight was measured weekly for each experiment and food intake once every 2 days.

Tissues and samples. Mice were anesthetized and blood samples were collected in EDTA coated tubes. Then, the livers were perfused inversely to the normal flux with PBS/EDTA (5 mM). After removing blood, livers were excised, weighed and either fixed in buffered formaldehyde or snap-frozen in liquid nitrogen for TG and RNA extractions. All samples were stored at -80°C until use. The serum was use for liver alanine aminotransferase (ALT) determination (Olympus, AU400). Proximal ileum and colon were cut in two pieces, one piece was fixed in buffered formaldehyde and the other one was stored at -80°C until protein extraction.

Measurement of liver triglycerides. Portions of frozen liver from mice were homogenized in chloroform-methanol (2 :1) in order to extract total lipids and triglycerides (TGs) were separated by thin layer chromatography. TGs were extracted from the silica plate with acetone, measured with a colorimetric diagnostic kit (Triglycerides FS; Diasys) and expressed in mg of triglycerides per milligram of liver.

Liver and gut histology. Liver and gut (ileum, colon) were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Paraffin sections (4-µm) were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Immunohistochemical staining was performed on paraffin sections using Abs against : Mucin 2 (H-300) (SC-15334, Santa Cruz Biotechnology, Tébu-

bio SAS, France). ZO-1 (617300, Invitrogen, Carlsbad, CA USA). The sections were washed and incubated with an appropriate biotinylated secondary Ab and then with streptavidin-horseradish peroxidase complex (LSAB kit, Dako France, Trappes, France). Sections were then counterstained with hematoxylin. Negative controls were carried out by applying the same procedure with omission of the primary Ab. Images were obtained on a Leica DMLA microscope (Leica Microsystems) equipped with Fluotar optic objectives, at the indicated magnification, and were digitized directly with a Leica camera DFC 450C and kit software. Liver steatosis was assessed semi-quantitatively in five grades: none = 0; mild = 1 (1% to 5% of hepatocytes); moderate = 2 (6% to 32%); marked = 3 (33% to 66%); and severe = 4 (67% to 100%). Intestine pathology mucus layer was also assessed. 0–3 scale for mucus layer as follows: 0 = mucus layer >50% similar to control mice , 1 = mucus layer ≤50%, 2 = mucus layer ≤10%, 3 = no mucus.

Reverse transcription of RNA. Mice livers were disrupted in Qiazol solution. Total RNA was extracted using a Qiagen RNeasy Lipid tissue minikit (Qiagen, Valencia, Canada). RNA integrity was determined with the Agilent bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano Labchip kit. Samples with an RNA integrity inferior to 8 were eliminated. For cDNA synthesis, 1 µg of each total RNA sample was reverse transcribed. A 12 µl mix containing 1 µg of RNA, random hexamers (Roche Diagnostics, Meylan, France), and 10 mM dNTP Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) was prepared for each sample. Mixtures were heated at 65°C for 5 minutes and cooled on ice, and then a 8 µl reaction mix containing 1 µl of M-MuLv RT (Invitrogen), 4 µl of 5x Buffer (Invitrogen), 2 µl of 0.1 M dithiothreitol (Invitrogen), and 1 µl of Protector RNase Inhibitor (40 U/µl; Invitrogen) was added. The reaction conditions were 10 minutes at 25°C, 50 minutes at 50°C, 15 minutes at 70°C.

Gene expression analysis by quantitative PCR. Real-time qPCR was performed in a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using the LC FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Amplification was initiated with an enzyme activation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles consisting of 20 seconds of denaturation at 95°C, 15 seconds of annealing at the temperature appropriate for each primer, and 10 seconds of elongation at 72°C. We amplified the cDNAs for 18S, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β , IL-1 β and CCL-2. The following primers were used are as follows : 18S 5'GTA-ACC-CGT-TGA-ACC-CCA-TT3' (sense) and 5'CCA- TCC-AAT-CGG-TAG-TAG-CG 3' (antisense), TNF- α 5'ACG-TCG-TAG-CAA-ACC-ACC-AA3' (sense) and 5'ATA-GCA-AAT-CGG-CTG-ACG-GT3' (antisense), IL-6 5'GTT-CTC-TGG-GAA-ATC-GTG-GA3' (sense) and 5'TGT-ACT-CCA-GGT-AGC-TAT-GG3' (antisense), IL-10 5'TTT-GAA-TTC-CCT-GGG-TGA-GAA3' (sense) and 5'ACA-GGG-GAG-AAA-TCG-ATG-ACA3' (antisense), TGF- β 5'GCA-ACA-TGT-GGA-ACT-CTA-CCA-GAA3' (sense) and 5'GAC-GTC-AAA-AGA-CAG-CCA-CTC-A3' (antisense), IL-1 β 5'AGC-TTC-AGG-CAG-GCA-GTA-TC3' (sense) and 5'TGG-TGA-TGA-TGC-CGT-GTT-CT3' (antisense), CCL-2 5'AGG-TCC-CTG-TCA-TGC-TTC-TG3' (sense) and 5'TCT-GGA-CCC-ATT-CCT-TCT-TG3' (antisense). Data were analyzed using LC 480 Software (Roche). The relative genes expression were normalized to the 18S reference gene.

Analysis of the gut microbiota composition by Fluorescent in Situ Hybridization combined with Flow Cytometry (FISH-FCM). Fecal samples were collected from mice fed with ethanol diet from animal facilities A and B at different time points and fixed as previously described²⁴. A set of 9 probes targeting bacterial 16S rRNA were used to assess the relative proportion of intestinal bacteria phylogenetic groups *Clostridium coccooides*, *Bacteroides*, *Clostridium leptum*, *Atopobium*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus-Enterococcus*, *Bifidobacterium*, and Mouse Intestinal Bacteria. Fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry was performed as described previously²⁵.

Western blot analyses. Ileum and colonic epithelial cells were isolated from gut prelevements according to the method described by Cherbuy et al. ²⁶. The cell pellets were immediately used for protein extraction and Lowry's procedure was used for protein assays ²⁷. Western blot analysis were performed as previously described ²⁷ using 12% SDS-PAGE and anti-occludin (1:250 (colon or 1:100 (ileum); 404700, Invitrogen, Carlsbad, CA USA), anti-Claudin 1 (1:500; ab15160, Abcam, Cambridge, MA, USA), or anti-Claudin 2 (1:500; 325600, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or anti-Claudin 5 (1:500; 352500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). For each Western blot, protein loads were determined using anti-cullin1 antibodies (1:400; sc-17775, Santa Cruz Biotechnology). Signals detected on autoradiographic films were quantified by scanning densitometry with Biovision 1000 and Bio-1D software (Vilber-Lourmat, France).

Statistical analyses. Results are represented as mean±SEM. Statistical analysis were performed by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests (Graphpad Prism, Graphpad Software Inc, La Jolla, California, USA) ; $p < 0,05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Liver alcoholic damages were different in the two animal facilities. We alcoholized mice using the Lieber-DeCarli diet in two animal facilities, named House A and House B. Mice were progressively adapted to the ethanol diet over one week, then chronically fed ethanol diet for ten days (Fig.1A). Control group mice were pair-fed with a control diet containing isocaloric amount of maltodextrin ^{21, 22}. Diet consumption was similar in the two animal facilities and between the control and alcohol groups (Fig.1B). We noticed a slightly higher diet consumption in the control group compared to the alcoholized group at day d21 which

was not observed later. The weight gain of mice was not significantly different during alcohol adaptation but alcoholized mice lost weight compared to the control mice at the end of the alcoholization protocol, despite consuming similar amounts of diets (Fig.1C). There were no differences in liver weights, however hepatic lesions induced by alcoholization in the two animal facilities were clearly different (Fig.1D). A significant steatosis was detected in alcoholized mice of the House B as quantified by the TG content (Fig. 1E). Liver histology showed significant steatosis and the semi-quantitative score of steatosis was significantly increased in livers of mice alcoholized in the House B (Supplemental Fig 1A and B). This steatosis was associated to a significant increase of ALT (Fig.1F). Alcoholization induced liver inflammation compared to control groups as shown by the significant increase of inflammatory markers (TNF, IL1 β , CCL2). IL6 and TGF β showed increase tendency but IL10 was not significantly modified (Fig.2). These results highlight that other factors than alcohol are involved in the onset of hepatic lesions during alcoholization.

Liver damages due to alcoholization were correlated to high level of *Bacteroidetes*.

Although there were no differences in alcohol diet consumption and the health report between the two animal facilities, we hypothesized that intestinal microbiota could be involved in the differences of hepatic lesions. The starting IM composition before alcoholization was similar in the two animal facilities (supplemental Fig.2). As alcohol is a substrate used by bacteria, we checked the evolution of IM after alcoholization. We observed a significant decrease of *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum* and *Enterobacteria* (Fig.3 A and B). The decrease of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was significantly in one of the animal facilities with a decrease tendency in the other one. Alcoholization induced the increase of only one species of bacteria, *E. Cylindroides* which were significantly increased in the House A. Except for *E. Cylindroides*, alcoholization induced similar evolution of IM independently of the animal facility. Then, we analyzed IM differences between animal facilities regardless of alcohol consumption (Fig. 3 C et D). Interestingly, we found that *Bacteroides* were

systematically decreased by 50% in the House B, in the two groups of mice, control and alcoholized mice. We also noticed a decrease of *Lactobacillus* and an increase of *E. cylindroides* but only in the control group.

Correction of dysbiosis by fecalotherapy or prebiotics restores MI.

To further demonstrate that the dysbiosis participates to the alcoholic hepatic lesions, we performed a fecal microbiota transfer (FMT) from the mice of the House A to the mice of House B. Furthermore, since *Bacteroides* were particularly decreased in the House B, we treated mice with pectin, a prebiotic increasing *Bacteroides* growth in intestinal microbiota²⁸. Recent publications described the relevance of fecal transfer to treat insulin sensitivity in human and infections in mice^{29, 30}. However, the described protocols included a partial depletion of IM by antibiotics treatment or a polyethyleneglycol treatment. It has been largely proved by us and others that antibiotics improve hepatic lesions during non alcoholic hepatitis³¹. Then, to avoid any impact on the development of liver lesions during a later alcoholization, nor antibiotics treatment neither polyethyleneglycol treatment were performed. The transfer of fecal microbiota began one week before alcoholization (Fig.4A). Receiving mice of House B were force-fed three times a week with fresh feces of donors mice from the House A, until the end of alcoholization. The FMT efficiency was verified by analysing IM at the end of alcoholization. The FMT allowed to modify bacterial populations especially *Bacteroides* since we observed that the difference in relative amounts between House A and House B was totally abolished in alcoholized group of mice (Fig.4 B). *Enterobacteria* were also increased to the level observed in House A within the two groups. However, in a previous experiment (Fig.3C) analysis showed lower percentage of this population. The FMT was not sufficient to induce an increase of MIB, and conversely the percentage of *E. cylindroides*, higher in House B, was maintained at a high level after the FMT in the control group. These differences were absent in the alcoholized group. Similarly to the FMT, we treated mice with pectin before alcoholization of mice. Pectin was directly added to the

Lieber-DeCarli diet in the pectin treated groups until the end of the protocol. The pectin treatment induced a large increase of *Bacteroides* which were four fold increased in the control group and two fold increased in the alcoholized group compared to their respective group of the House A (Fig.4D and E). MIB and *E. cylindroides* were decreased by the pectin treatment in the control group of mice. *Enterobacteria* were decreased in the alcoholized group of mice. The FMT and pectin treatment were consequently sufficient to maintain a high level of *Bacteroides*.

Maintaining a high level of *Bacteroides* prevent the development of liver alcoholic lesions.

As shown in the previous experiment (Fig. 1), the diet consumption was globally similar in the different group of mice, except for the group of mice treated with pectin (Fig. 5A). Mice weight gain was not significantly different between groups except for the group of pectin treated mice, correlated with their lower diet consumption explained by modifications in the diet viscosity (Fig. 5B). Similar weight differences were observed in the alcoholized group versus the control group as in Fig.1. We could notice a lower liver weight in alcoholized and pectin treated group (Fig.5C). The steatosis quantification showed that the FMT or pectin treatment were sufficient to prevent the steatosis development and transaminases increase (Fig. 5D and E). Liver histology showed no steatosis lesion in alcoholized groups of mice. However, we surprisingly notice that pectin induced a slight steatosis in the control group of mice. This steatosis was not sufficient to be significantly detected in TG quantification but was observed in histology.

Alcoholization induced liver inflammation as shown by the significant increase in inflammatory markers (TNF, IL1 β , CCL2, TGF β) with IL6 showing an increase tendency and IL10 a decrease tendency (Fig. 6) as previously shown (Fig. 2). FMT and pectin treatments were sufficient to restore levels of liver inflammatory markers similar to the ones of mice

protected from ethanol induced hepatic lesions. Moreover, mucin producing goblet cell counts in colon wall showed a significant decrease in housing facility B compared to housing facility A, in histology and quantification (Fig.7).

DISCUSSION

Results discrepancies have often been noticed from one article to another, even sometimes from one experiment to another experiment performed within the same laboratory. We investigated these discrepancies in 2 different animal facilities, and discovered that one particular intestinal microbiota bacterial population, *Bacteroides*, was maintained at a high level in one facility, although significantly reduced in the other facility.

Bacteroides have previously been involved in an array of pathology linked to the body metabolism, particularly to obesity-related pathologies. A recent work³² demonstrated that a decrease in *Bacteroides* in the intestinal microbiota of obese patients led to an increase sensibility to hepatic pathologies linked to this metabolism disorder.

In our study, we demonstrate that maintaining these *Bacteroides* at a level similar to animal facility A allowed to inhibit the development of the hepatic pathology linked to an ethanol overconsumption. Increasing the *Bacteroides* population indeed led to significantly decreased ALT, hepatic triglycerides, histology steatosis and inflammatory markers expression compared to mice receiving the LDC diet alone, without pectin or FMT. These results clearly show that *Bacteroides* are highly involved in the early stages of the alcoholic hepatic disease, although due to the short length of the alcoholization (10 days), we cannot hypothesize on the long-term effect of increasing this particular population.

It has previously been demonstrated that intestinal permeability was increased during alcoholic liver disease^{10, 33}. It is accepted that acetaldehyde plays a key role in this mechanism. Intestinal microbiota bacteria indeed have the ability to directly metabolize ethanol to its subsequent product, acetaldehyde. Acetaldehyde, but not ethanol, led to increased intestinal permeability in dextran-FITC experiments³⁴. Bode et al³⁵ showed that

ethanol can induce overgrowth of gram-negative anaerobic bacteria in the jejunum of alcoholics, predisposing them to increased levels of luminal LPS. Recent works suggest that ethanol alone can exert a deleterious effect on gut barrier, even though it is less potent than acetaldehyde. The intestinal barrier destabilization could be caused by a decrease in tight junction proteins such as ZO-1, Occludin, Claudin ³⁶.

Intestinal microflora can also modulate intestinal barrier integrity by modulation of tight junction proteins. The effect differs between bacterial strains. *E.Coli* has been demonstrated to disrupt tight junctions in vitro and to increase intestinal permeability in vivo ³⁷.

The mechanisms by which *Bacteroides* exerts a beneficial effect on the alcoholic liver disease is probably linked as well to its effects on the intestinal permeability. Intestinal mucus composition plays an important role in bacteria-host interactions. A modification of proteins composing this mucus layer would result in intestinal dysbiosis, altered mutualism and thus provoke noxious inflammatory reactions. We show in our experiments that Mucine (Muc-2) expressing cell counts is significantly decreased in animal facility B compared to animal facility A. This could lead to intestinal microbiota triggering an abnormal inflammatory reactions, hence increased LPS intestinal translocation, Kupffer cells priming and activation, ultimately leading to an increase in inflammatory markers expression, liver steatosis and hepatic triglycerides content. *Bacteroides* is a known consumer of polysaccharides, using it to fuel its growth ^{38, 39}. Thus, *Bacteroides* can feed on polysaccharides contained in goblet cells produced mucin. Moreover, it has been shown in a recent work using gnotobiotic rats, whose intestinal tract were colonized with *Bacteroides* only, that this specific bacterial population could induce mucin production by its host, enhancing polysaccharides availability ⁴⁰. Conversely, the beneficial effect of having a high *Bacteroides* population count and high mucin secretion could be counter-balanced by the fact that these mucins can be used by other deleterious bacteria for their growth, thus participating in alcoholic liver disease onset. Indeed, recent work showed that mucin^{-/-} mice undergoing a Tsukamoto-French

alcoholization protocol were protected from alcohol associated microbiota changes, thus inhibiting LPS increased translocation usually observed in this disease ⁴¹.

Altogether, our data suggest that *Bacteroides*, at least during the early stages of alcoholic liver disease, plays a protective role against liver injuries onset. To corroborate our results, it would be informative to perform an experiment involving the selective depletion of *Bacteroides*, using a fecal microbiota transfer or antibiotics, and thus enhance or accelerate the onset of alcoholic liver disease. Further analyses of tight junctions and extracellular junctions would provide relevant input regarding the mechanism by which *Bacteroides* exert their effects on the gut barrier.

REFERENCES

1. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;488:178-84.
2. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-8.
3. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology* 1999;65:4799-807.
4. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220-30.
5. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205-11.
6. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731-6.
7. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology* 2013;13:790-801.
8. Johansson ME, Sjovall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 2013;10:352-61.
9. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology* 2013;11:61.
10. Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742-7.
11. Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 2000;32:1008-17.
12. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;50:638-44.
13. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, Banan A, Fields JZ. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol* 2009;50:538-47.
14. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutrition reviews* 2013;71:483-99.
15. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, Bazhukova TA, Soloviev AG, Barve SS, McClain CJ, Cave M. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008;42:675-82.

16. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Lei D, Wang Y, Zhu B, Li L. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2011;54:562-72.
17. Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2009;43:163-72.
18. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
19. Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, Wang Y, Qin X, Liu Y, Gobejishvili L, Joshi-Barve S, Ayvaz T, Petrosino J, Kong M, Barker D, McClain C, Barve S. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of Lactobacillus rhamnosus GG treatment. *PLoS One* 2013;8:e53028.
20. Tomas J, Langella P, Cherbuy C. The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 2012;13:54-63.
21. Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, Franchimont D, Louis H, Deviere J, Le Moine O. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006;43:989-1000.
22. Ki SH, Park O, Zheng M, Morales-Ibanez O, Kolls JK, Bataller R, Gao B. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology* 2010;52:1291-300.
23. Lieber CS, DeCarli LM. Animal models of chronic ethanol toxicity. *Methods in enzymology* 1994;233:585-94.
24. Gerard P, Brezillon C, Quere F, Salmon A, Rabot S. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered lactobacillus probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008;14:115-22.
25. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Philippe C, Walker F, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM, Gerard P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2012.
26. Cherbuy C, Darcy-Vrillon B, Morel MT, Pegorier JP, Duee PH. Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine. *Gastroenterology* 1995;109:1890-9.
27. Cherbuy C, Honvo-Houeto E, Bruneau A, Bridonneau C, Mayeur C, Duee PH, Langella P, Thomas M. Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2010;299:G348-57.
28. Dongowski G, Lorenz A, Proll J. The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. *The Journal of nutrition* 2002;132:1935-44.
29. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913-6 e7.
30. Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, Thanachayanont T, Finlay BB. Altering host resistance to infections through microbial transplantation. *PLoS One* 2011;6:e26988.
31. Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselini I, Couderc J, Valet P, Emilie D, Perlemuter G. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 2008;134:1459-69.

32. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, McGilvray ID, Allard JP. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;58:120-7.
33. Worthington BS, Meserole L, Syrotuck JA. Effect of daily ethanol ingestion on intestinal permeability to macromolecules. *Am J Dig Dis* 1978;23:23-32.
34. Ferrier L, Berard F, Debrauwer L, Chabo C, Langella P, Bueno L, Fioramonti J. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol* 2006;168:1148-54.
35. Bode JC, Bode C, Heidelberg R, Durr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 1984;31:30-4.
36. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr Rev* 2013;71:483-99.
37. Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Lab Invest* 2005;85:1308-24.
38. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, Hooper LV, Gordon JI. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* 2003;299:2074-6.
39. Martens EC, Chiang HC, Gordon JI. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 2008;4:447-57.
40. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* 2013;11:61.
41. Hartmann P, Chen P, Wang HJ, Wang L, McCole DF, Brandl K, Starkel P, Belzer C, Hellerbrand C, Tsukamoto H, Ho SB, Schnabl B. Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology* 2013;58:108-19.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Effect of alcoholization of mice on diet consumption, body weight, steatosis and ALT level. (A) mice were adapted to the Lieber-DeCarli diet (LDC), then they were progressively alcoholized (in grey) before 10 days of 5% alcoholized or maltodextrin diet, (B) diet consumption, (C), mice weight (D) liver weight, (E) liver triglycerides, (F) ALT levels. °: $p < 0.05$ Ctrl A vs Alc A, *: $p < 0.05$ Ctrl B vs Alc B, ***: $p < 0.0001$ Ctrl B vs Alc B. Ctrl A n=8 ; Alc A n=11 ; Ctrl B n=18 ; Alc B=21.

Figure 2: Gene expression of hepatic inflammatory markers. Relative mRNA expression in the liver for the following genes determined by quantitative real-time PCR: (A) $TNF\alpha$, (B) IL6, (C) IL1 β , (D) CCL2, (E) TGF β , (F) IL10. *: $p < 0.05$. Ctrl A n=8 ; Alc A n=12 ; Ctrl B n=18 ; Alc B n=19.

Figure 3: Dysbiosis induced by alcoholization or by the environment. (A) comparison of IM between control and alcoholized mice in animal facility A, (B) in animal facility B, (C) comparison of IM between the two animal facilities in the control group, (D) in the alcoholized group. *: $p < 0.05$. Ctrl A n=8 ; Alc A n=11 ; Ctrl B n= 9 ; Alc B n=10.

Figure 4: Correction of dysbiosis by fecalotherapy or pectin treatment. (A) Ethanol diet timeline is identical to figure 1, the pectin group received 6.5% pectin added to the diet from day 7 until the sacrifice, the fecal microbiota transfer (FMT) group was force-fed with fresh feces three times a week from d7. (B) (C) Efficiency of the pectin treatment in the control group, (D) in the alcoholized group. *: $p < 0.05$. Ctrl A n=16 ; Alc A n=5 ; Ctrl B n=8 ; Alc B n=10 ; FMT Ctrl n=4 ; FMT Alc n=7 ; Pectin Ctrl n=6 ; Pectin Alc n=4.

Figure 5: Alcoholization of mice in animal facilities A and B and after fecalotherapy or pectin treatment. (A) liver histology, (B) mice weight, (C) diet consumption, (D) liver weight, (E) liver TG, (F) ALT levels. °: $p < 0.05$ Ctrl A vs Alc A, *: $p < 0.05$ Ctrl B vs Alc B, **: $p < 0.05$ Ctrl FMT vs Alc FMT. Ctrl A n=16 ; Alc A n=5 ; Ctrl B n=8 ; Alc B n=10 ; FMT Ctrl n=4 ; FMT Alc n=7 ; Pectin Ctrl n=6 ; Pectin Alc n=4.

Figure 6: Gene expression of hepatic inflammatory markers after correction of dysbiosis. Relative mRNA expression in the liver for the following genes determined by quantitative real-time PCR: (A) $TNF\alpha$, (B) IL6, (C) IL1 β , (D) CCL2, (E) TGF β , (F) IL10. *: $p < 0.05$. Ctrl A n=16 ; Alc A n=5 ; Ctrl B n=8 ; Alc B n=10 ; FMT Ctrl n=4 ; FMT Alc n=7 ; Pectin Ctrl n=6 ; Pectin Alc n=4.

Figure 7: Gut mucin production in the colon wall. (A) Representative pictures and graphs showing counts of goblet cells staining with muc-2 (B) goblet cells count per 10 villi. Scale bars, 50 μm . *: $p < 0.05$. Ctrl A n=16 ; Alc A n=5 ; Ctrl B n=8 ; Alc B n=10 ; FMT Ctrl n=4 ; FMT Alc n=7 ; Pectin Ctrl n=6 ; Pectin Alc n=4.

Supplemental Figure 1: Liver histology. (A) Representative micrographs of markedly steatosis in alcoholized group of the animal facility B compared to the same group in the animal facility A, (B) semi-quantification of steatosis *: $p < 0.05$. Alc A n=12 ; Alc B n=19.

Supplemental Figure 2: Similarity of mice intestinal microbiota between animal facilities before alcoholization. Comparison of IM between control and alcoholized mice in animal facilities A and B. Ctrl A n=8 ; Alc A n=11 ; Ctrl B n= 9 ; Alc B n=10.

Figure 1

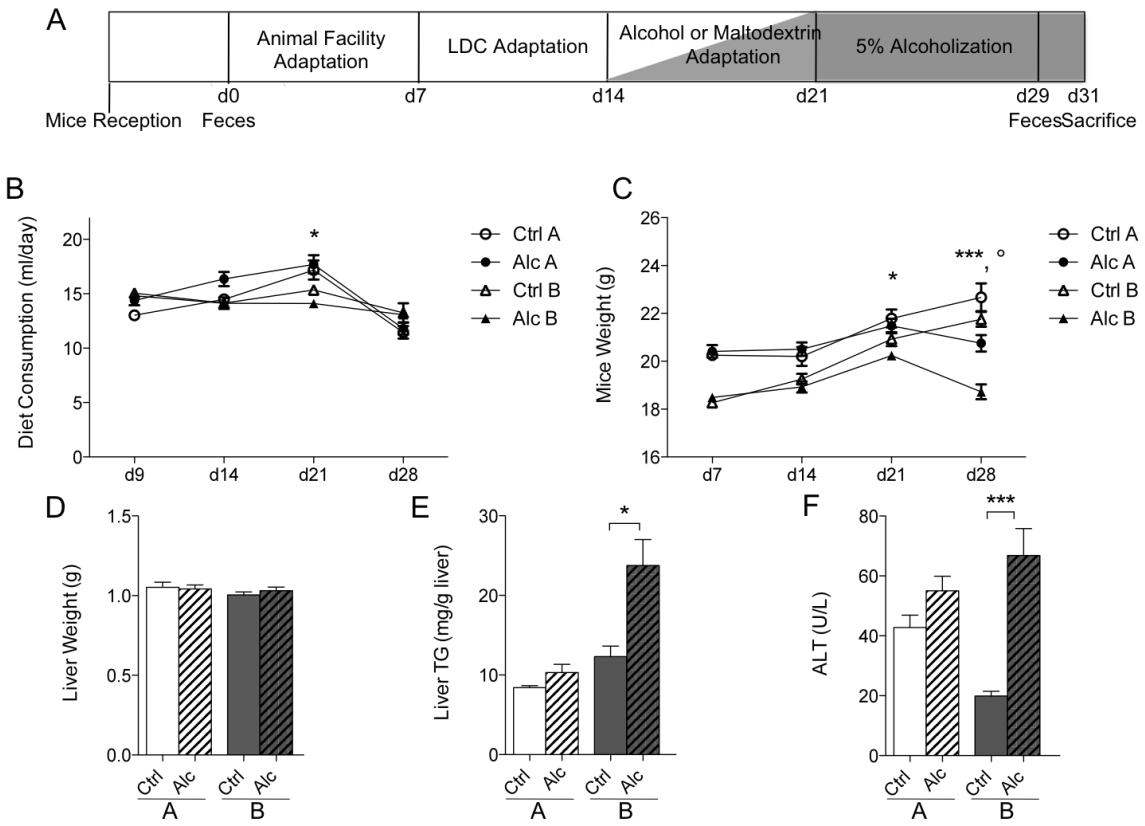


Figure 2

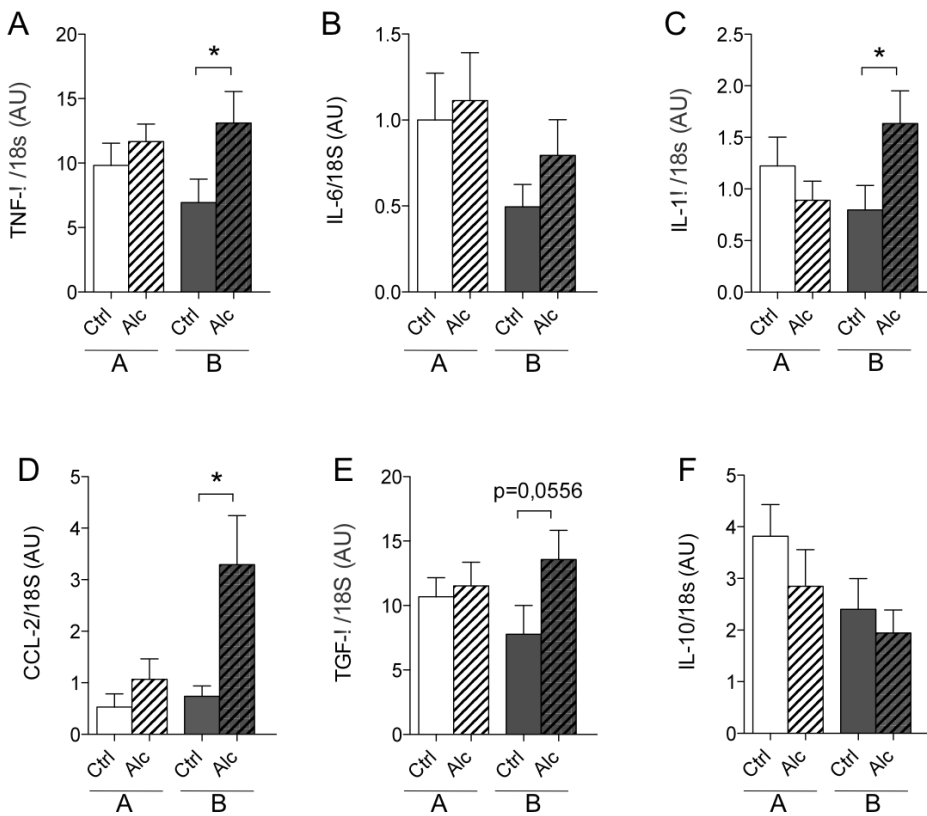


Figure 3

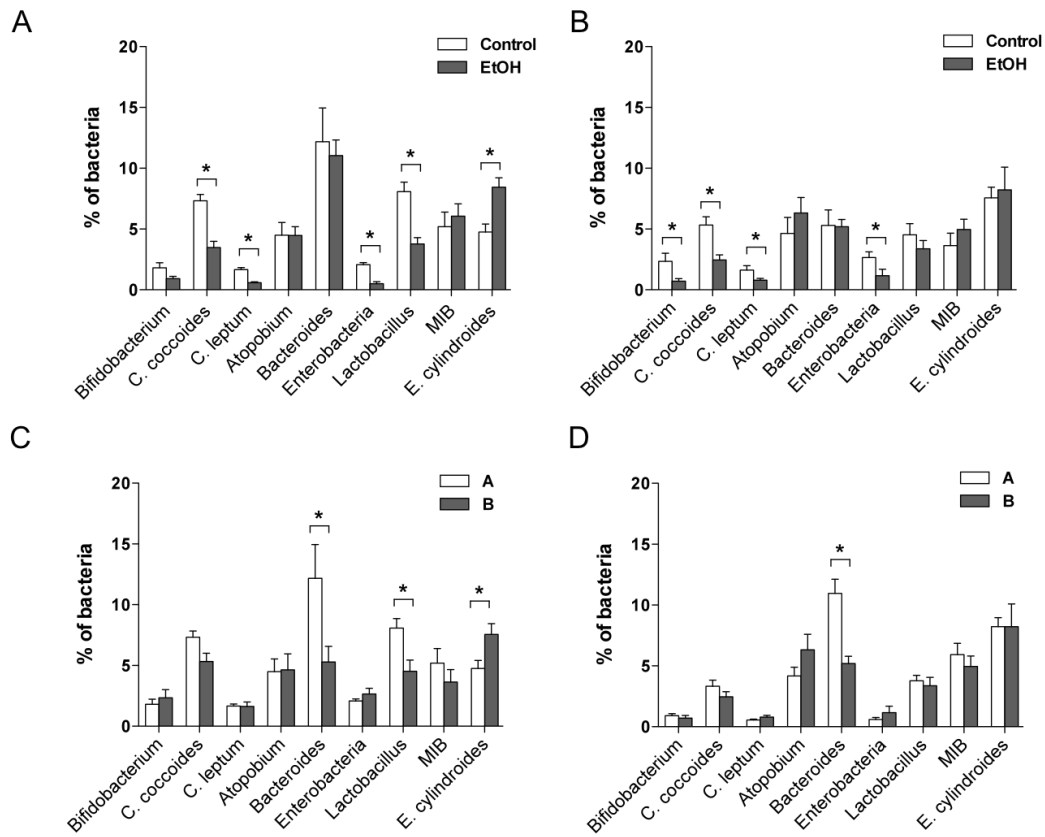


Figure 4

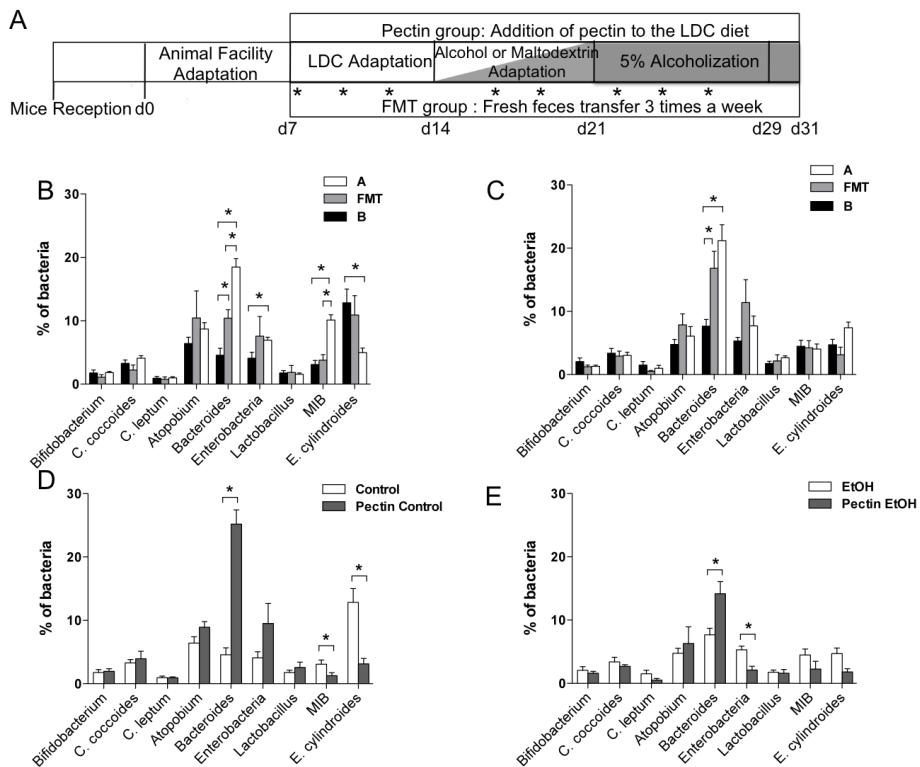


Figure 5

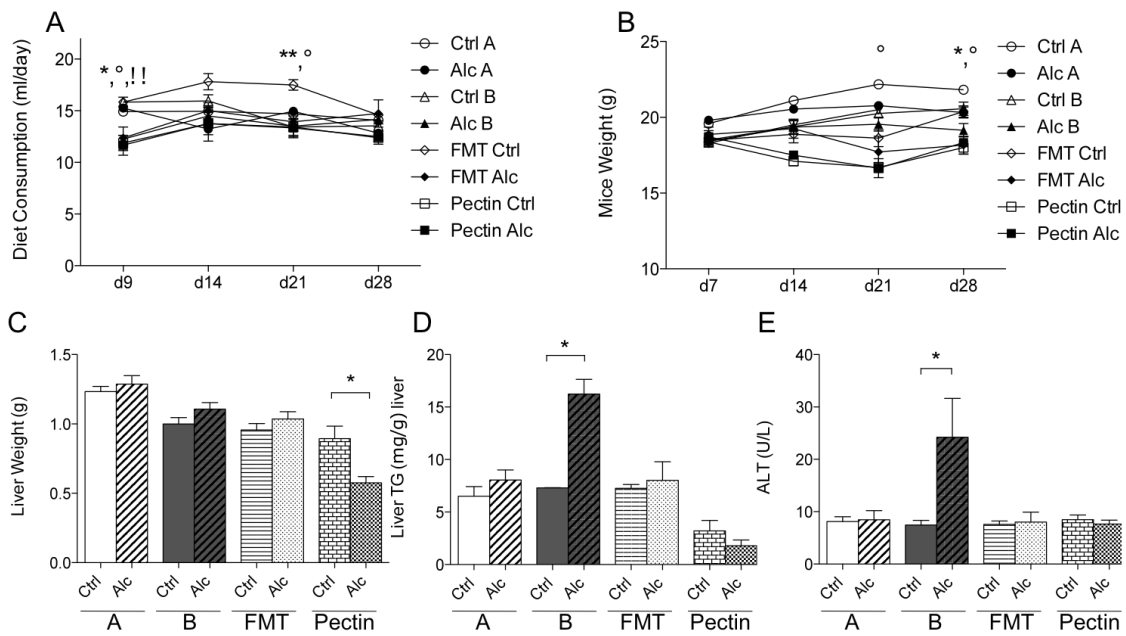


Figure 6

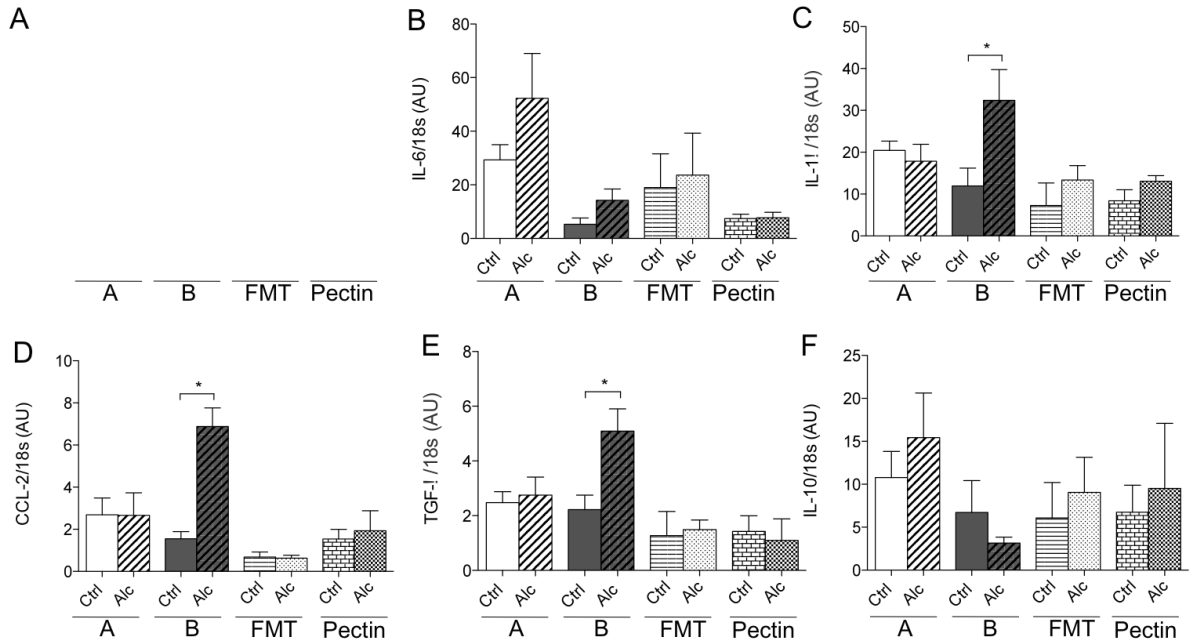
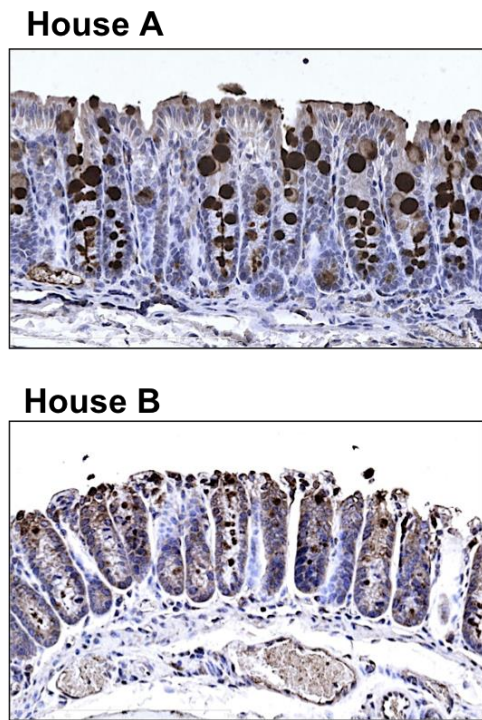
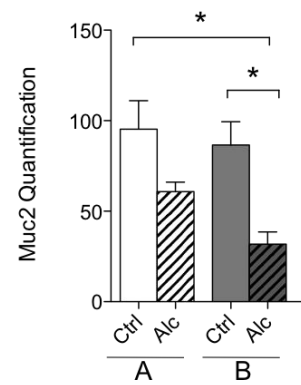


Figure 7

A

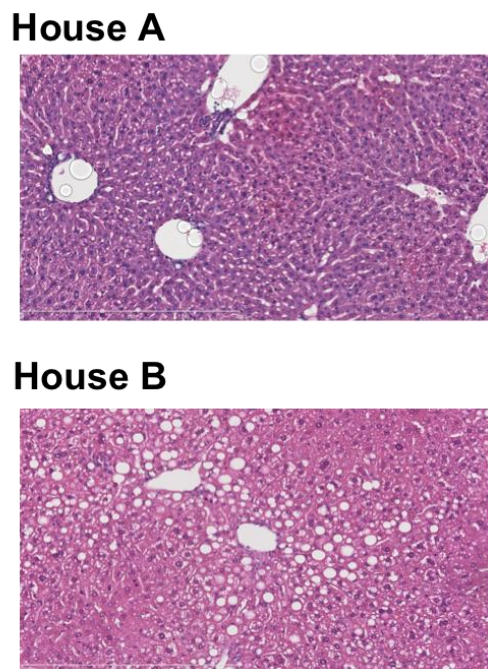


B

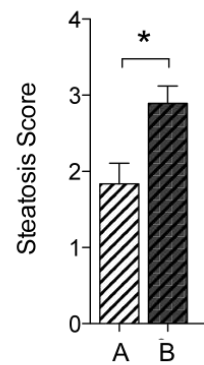


Supplemental Figure 1

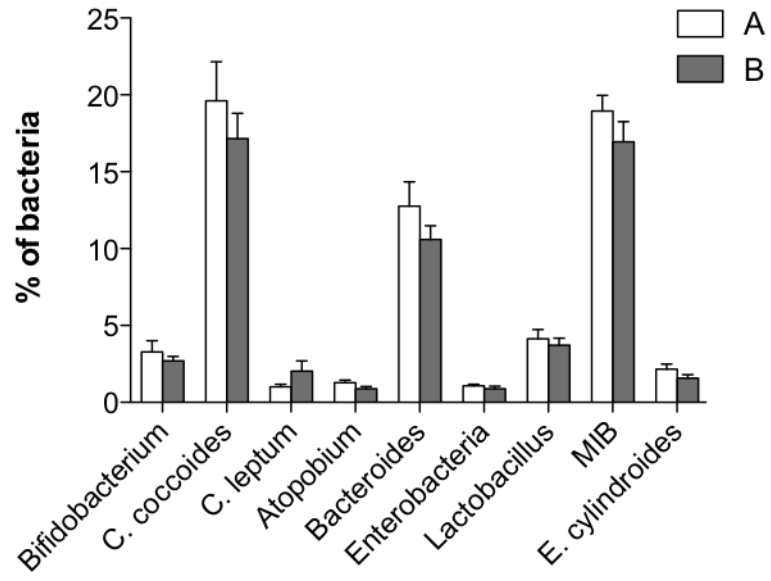
A



B



Supplementary Figure 2



DISCUSSION

Le début de ma thèse était consacré à l'étude de l'infiltration lymphocytaire hépatique lors de la MAF. Premièrement, il a été très difficile d'obtenir une pathologie hépatique prononcée liée à une surconsommation d'alcool, mes tentatives de dépasser la dose d'alcool dans le modèle utilisé précédemment dans l'animalerie de l'INRA s'étant soldées par la mort de toutes les souris. Nous avons donc opté pour une alcoolisation plus prononcée (5%) mais aussi plus courte (10 jours) permettant d'avoir un taux de mortalité minimum (inspiré de Gao et al.). L'analyse de l'infiltration lymphocytaire sur ces souris présentant une pathologie hépatique caractérisée par une légère stéatose et des ALAT plus élevées n'a pas permis de faire ressortir de différences significatives dans les populations lymphocytaires majoritaires (CD4⁺, CD3⁺, CD8⁺, NK, NKT). Suite aux résultats obtenus dans notre étude précédente, nous avons analysé et comparé les microbiotes intestinaux des souris des animaleries A et B avant l'alcoolisation et à la fin du protocole, qu'elles reçoivent un régime contrôle ou alcool. Ces analyses ont été réalisées à l'aide de marquage FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) par un panel de sondes sélectionnées pour reconnaître la plupart des populations bactériennes du tube digestif. Les marquages sont ensuite analysés par cytométrie en flux, qui nous ont fourni des informations quant aux proportions relatives de chaque population bactérienne analysée. Ces expériences nous ont permis de montrer que les microbiotes des souris dans les 2 animaleries, quel que soit le groupe (contrôle ou alcool), étaient similaires avant toute alcoolisation. Cependant, après une alcoolisation de 10 jours à 5% éthanol, la quantité de *Bacteroides* diminuait de manière significative chez les souris de l'animalerie B, alors qu'elle restait stable chez les souris de l'animalerie A. Des études ont déjà démontré le rôle des *Bacteroides* dans la pathologie hépatique liée à l'obésité, puisque les patients obèses ayant des *Bacteroides* en moindre proportion développaient plus facilement une NASH (non-alcoholic steatohepatitis) (Mouzaki et al., 2013). Suite à ce constat, nous avons tenté de maintenir les *Bacteroides* au même niveau tout au long de l'alcoolisation, comme ce qu'il se passe dans

l'animalerie A, pour déterminer si cela affectait l'apparition et l'évolution de la maladie alcoolique du foie.

Pour cela, nous avons effectué d'une part un transfert de flore qui consiste en un gavage de fèces provenant de l'animalerie A. Ce transfert de flore était initié une semaine avant le début de l'alcoolisation, pour permettre à la flore intestinale de s'établir dans le tractus digestif, et poursuivi pendant l'alcoolisation à raison d'un gavage de fèces fraîches tous les 2 jours pour s'affranchir de la résilience du microbiote. D'autre part, nous avons rajouté dans un autre groupe de la pectine dans les régimes contrôles et alcool des souris de l'animalerie B, un prébiotique connu pour favoriser la croissance de la population bactérienne qui nous intéresse, les *Bacteroides*. L'analyse des microbiotes intestinaux après l'alcoolisation des souris ayant suivi un protocole d'alcoolisation contrôle (sans transfert de flore ni pectine), dans les animaleries A et B, a permis de confirmer la diminution des *Bacteroides* au cours du protocole dans l'animalerie B, comme décrit précédemment. L'analyse des microbiotes intestinaux des souris soumises au transfert de flore a permis de voir une augmentation des *Bacteroides*, confirmant l'efficacité du transfert de flore. Lors de l'ajout de pectine dans le régime LDC, la même augmentation de *Bacteroides* a été constatée, bien que beaucoup plus prononcée qu'avec le transfert de flore (augmentation de 1.5X pour le transfert de flore, et de 3 à 4 X pour les *Bacteroides*). Ces résultats ont été retrouvés quel que soit le groupe (contrôle ou alcool), confirmant que l'augmentation des *Bacteroides* est bien dû au transfert de flore et à la pectine. L'analyse de paramètres permettant d'évaluer les lésions hépatiques nous a permis de constater que les transaminases et les triglycérides étaient augmentés de manière significative chez les souris recevant l'alcoolisation dans l'animalerie B, contrairement à celles dans l'animalerie A, confirmant nos résultats obtenus lors d'expériences précédentes. La mesure de l'expression de gènes de l'inflammation (TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , TGF- β) et l'observation de la stéatose hépatique en histologie a permis de confirmer l'apparition

d'une pathologie hépatique dans l'animalerie B, absente dans l'animalerie A. Le transfert de flore ou le rajout de pectine au régime LDC standard ont permis d'inhiber ces lésions, caractérisées par l'augmentation des triglycérides, l'apparition d'une stéatose hépatique en histologie, l'augmentation des transaminases et de l'expression des gènes de l'inflammation,. Ces résultats fournissent donc des informations importantes quant au rôle causal du microbiote dans la maladie alcoolique du foie, et fournissent des pistes pour l'élaboration de nouveaux traitements focalisés sur le microbiote intestinal et les populations bactériennes qui la composent.

Pour confirmer les résultats obtenus dans ces travaux quant à l'influence des *Bacteroides* sur la pathologie hépatique, la prochaine étape consisterait à dépléter en *Bacteroides* le microbiote intestinal des souris dans l'animalerie A, afin de vérifier que la diminution des *Bacteroides* est bien suffisante pour favoriser l'apparition des lésions hépatiques lors d'une alcoolisation. La principale difficulté résidant dans le fait qu'il existe peu de moyens de cibler une population bactérienne particulière, les antibiotiques existant agissant sur des catégories ou des familles de bactéries (par exemple, la pénicilline cible les bactéries Gram- en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne). Il faut donc envisager un autre type de transfert de flore, en implantant un microbiote déplété en *Bacteroides*. Diminuer une population bactérienne du microbiote intestinal à l'aide d'un transfert de flore paraît cependant plus compliqué que de l'augmenter. Dans le cadre d'un tel protocole, il serait possible d'effectuer un lavement intestinal à l'aide de polyéthylène glycol (PEG ou macrogol), une solution qui transitera sans absorption tout le long du tube digestif. D'autre part, pour obtenir ces souris déplétées en *Bacteroides* il faut donc disposer d'un groupe de souris en fin de protocole d'alcoolisation, avec une proportion de *Bacteroides* diminuée, pour les prélèvements de fécès. Finalement, la nécessité de transférer des fécès fraîches tout au long du protocole impliquerait qu'il faudrait

disposer de plusieurs groupes de souris, arrivant au terme du protocole d'alcoolisation à des jours réguliers tout au long du protocole de transfert de flore.

La pectine permet d'augmenter de manière significative la quantité de *Bacteroides* dans le microbiote intestinal. Mélangée à un liquide, la pectine gonfle et devient visqueuse. Dans l'estomac, elle grossit comme une éponge, provoquant la satiété. Mélangée au régime LDC, elle a pour effet de le solidifier, rendant le régime plus proche d'une pâte que d'un régime semi-liquide. Outre le temps nécessaire aux souris pour s'habituer au régime, la pectine pose de nombreuses contraintes expérimentales quant à sa préparation. L'utilisation de la pectine chez l'homme n'est pas nouvelle. La pectine est utilisée depuis longtemps dans le traitement des diarrhées, en favorisant l'absorption d'eau. Parmi les mécanismes proposés expliquant son effet de protection du tractus digestif, les pectines pourraient tapisser les parois gastriques d'un film gélifié, les protégeant des sécrétions acides. Parmi les effets indésirables de la pectine, on notera des météorismes parfois douloureux, fréquents lors de prises journalières de pectine de 20 à 60 g par jour, mais moins présents aux doses thérapeutiques envisagées (10 à 15 g par jour) (Seyrig et al., 1983). Varier les doses de pectine pour voir leur effet sur les *Bacteroides* et sur l'apparition des lésions hépatiques constitue donc une piste de recherche intéressante.

Finalement, transposer les résultats obtenus dans cet article à l'homme pose plusieurs problèmes. Premièrement, le modèle de surconsommation d'alcool utilisé, 5% d'alcool pendant 10 jours, est un modèle qui éprouve grandement les souris par son intensité. Il ne peut donc pas être comparé à la surconsommation d'alcool chronique mais qui s'étale sur plusieurs années caractérisant les patients alcooliques. Les atteintes hépatiques sont aussi d'une amplitude différente. Le modèle murin d'alcoolisation avec le régime Lieber DeCarli ne permet pas d'observer les lésions hépatiques avancées caractérisant la MAF chez l'homme : la fibrose, la cirrhose, l'hépatocarcinome. Dans notre modèle, l'effet bénéfique des

Bacteroides se repose plutôt sur un effet préventif de l'installation des lésions hépatiques plutôt que sur un effet réellement curatif. Etudier leur effet à plus long terme est donc essentiel.

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, Y., Moore, L.E., Bradford, B.U., Gao, W., and Thurman, R.G. (1995). Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* *108*, 218-224.
- Akriviadis, E., Botla, R., Briggs, W., Han, S., Reynolds, T., and Shakil, O. (2000). Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* *119*, 1637-1648.
- Albano, E., French, S.W., and Ingelman-Sundberg, M. (1999). Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front Biosci* *4*, D533-540.
- Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* *84*, 1045-1049.
- Baroni, G.S., D'Ambrosio, L., Curto, P., Casini, A., Mancini, R., Jezequel, A.M., and Benedetti, A. (1996). Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* *23*, 1189-1199.
- Bautista, A.P. (2002). Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* *27*, 17-21.
- Best, C.H., Hartroft, W.S., and et al. (1949). Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. *Br Med J* *2*, 1002-1006, pl.
- Bjarnason, I., Peters, T.J., and Wise, R.J. (1984). The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. *Lancet* *1*, 179-182.
- Bjorkholm, B., Bok, C.M., Lundin, A., Rafter, J., Hibberd, M.L., and Pettersson, S. (2009). Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PLoS One* *4*, e6958.
- Boaru, S.G., Borkham-Kamphorst, E., Tihaa, L., Haas, U., and Weiskirchen, R. (2012). Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J Inflamm (Lond)* *9*, 49.
- Brooks, P.J., and Theruvathu, J.A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* *35*, 187-193.
- Carvalho, F.A., Aitken, J.D., Vijay-Kumar, M., and Gewirtz, A.T. (2012). Toll-like receptor-gut microbiota interactions: perturb at your own risk! *Annu Rev Physiol* *74*, 177-198.
- Chuang, H.L., Huang, Y.T., Chiu, C.C., Liao, C.D., Hsu, F.L., Huang, C.C., and Hou, C.C. (2012). Metabolomics characterization of energy metabolism reveals glycogen accumulation in gut-microbiota-lacking mice. *J Nutr Biochem* *23*, 752-758.
- Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* *488*, 178-184.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* *148*, 1258-1270.

Coats, S.R., Berezow, A.B., To, T.T., Jain, S., Bainbridge, B.W., Banani, K.P., and Darveau, R.P. (2011). The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. *Infect Immun* 79, 203-210.

de la, M.H.P., Lieber, C.S., DeCarli, L.M., French, S.W., Lindros, K.O., Jarvelainen, H., Bode, C., Parlesak, A., and Bode, J.C. (2001). Models of alcoholic liver disease in rodents: a critical evaluation. *Alcohol Clin Exp Res* 25, 254S-261S.

DeCarli, L.M., and Lieber, C.S. (1967). Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr* 91, 331-336.

Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van Ijzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., Broers, J., Verheyen, F., Dekker, J., and Masclee, A. (2012). Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: in vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PLoS One* 7, e35008.

Enomoto, N., Ikejima, K., Bradford, B., Rivera, C., Kono, H., Brenner, D.A., and Thurman, R.G. (1998). Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology* 115, 443-451.

Enomoto, N., Ikejima, K., Yamashina, S., Hirose, M., Shimizu, H., Kitamura, T., Takei, Y., Sato, and Thurman, R.G. (2001). Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res* 25, 51S-54S.

Espina, N., Lima, V., Lieber, C.S., and Garro, A.J. (1988). In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis* 9, 761-766.

Ferrier, L., Berard, F., Debrauwer, L., Chabo, C., Langella, P., Bueno, L., and Fioramonti, J. (2006). Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol* 168, 1148-1154.

Figuroa, L., Xiong, Y., Song, C., Piao, W., Vogel, S.N., and Medvedev, A.E. (2012). The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *J Immunol* 188, 4506-4515.

Forsyth, C.B., Farhadi, A., Jakate, S.M., Tang, Y., Shaikh, M., and Keshavarzian, A. (2009). Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 43, 163-172.

French, S.W., Benson, N.C., and Sun, P.S. (1984). Centrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol-fed rats. *Hepatology* 4, 912-917.

Frezza, M., di Padova, C., Pozzato, G., Terpin, M., Baraona, E., and Lieber, C.S. (1990). High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med* 322, 95-99.

- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359.
- Giraud, V., Naveau, S., Balian, A., Belda, E., Capron, F., Lemaigre, G., and Chaput, J.C. (1998). [Predictive risk factors for progression to cirrhosis in early stage alcoholic liver disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 22, 997-1002.
- Glauser, M.P., Heumann, D., Baumgartner, J.D., and Cohen, J. (1994). Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin Infect Dis* 18 Suppl 2, S205-216.
- Grube, B.J., Cochane, C.G., Ye, R.D., Green, C.E., McPhail, M.E., Ulevitch, R.J., and Tobias, P.S. (1994). Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem* 269, 8477-8482.
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J., *et al.* (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357, 1925-1928.
- Hartley, D.P., and Petersen, D.R. (1997). Co-metabolism of ethanol, ethanol-derived acetaldehyde, and 4-hydroxynonenal in isolated rat hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 298-304.
- Haydon, G., Lalor, P.F., Hubscher, S.G., and Adams, D.H. (2002). Lymphocyte recruitment to the liver in alcoholic liver disease. *Alcohol* 27, 29-36.
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Strowig, T., and Flavell, R.A. (2012). Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol* 13, 321-324.
- Holt, S. (1981). Observations on the relation between alcohol absorption and the rate of gastric emptying. *Can Med Assoc J* 124, 267-277, 297.
- Horiguchi, N., Wang, L., Mukhopadhyay, P., Park, O., Jeong, W.I., Lafdil, F., Osei-Hyiaman, D., Moh, A., Fu, X.Y., Pacher, P., *et al.* (2008). Cell type-dependent pro- and anti-inflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. *Gastroenterology* 134, 1148-1158.
- Hosel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., *et al.* (2012). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* 55, 287-297.
- Huang, H., Shiffman, M.L., Friedman, S., Venkatesh, R., Bzowej, N., Abar, O.T., Rowland, C.M., Catanese, J.J., Leong, D.U., Sninsky, J.J., *et al.* (2007). A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 46, 297-306.
- Iseri, O.A., Lieber, C.S., and Gottlieb, L.S. (1966). The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am J Pathol* 48, 535-555.

- Jeong, W.I., Osei-Hyiaman, D., Park, O., Liu, J., Batkai, S., Mukhopadhyay, P., Horiguchi, N., Harvey-White, J., Marsicano, G., Lutz, B., *et al.* (2008a). Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 7, 227-235.
- Jeong, W.I., Park, O., and Gao, B. (2008b). Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 134, 248-258.
- Jeong, W.I., Park, O., Radaeva, S., and Gao, B. (2006). STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 44, 1441-1451.
- Ji, C., Chan, C., and Kaplowitz, N. (2006). Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *J Hepatol* 45, 717-724.
- Jones, A.W., and Jonsson, K.A. (1994). Between-subject and within-subject variations in the pharmacokinetics of ethanol. *Br J Clin Pharmacol* 37, 427-431.
- Jones, A.W., Jonsson, K.A., and Kechagias, S. (1997). Effect of high-fat, high-protein, and high-carbohydrate meals on the pharmacokinetics of a small dose of ethanol. *Br J Clin Pharmacol* 44, 521-526.
- Jones, A.W., Jorfeldt, L., Hjertberg, H., and Jonsson, K.A. (1990). Physiological variations in blood ethanol measurements during the post-absorptive state. *J Forensic Sci Soc* 30, 273-283.
- Kato, J., Sato, Y., Inui, N., Nakano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Kobune, M., Kuroiwa, G., Miyake, S., Kohgo, Y., *et al.* (2003). Ethanol induces transforming growth factor- α expression in hepatocytes, leading to stimulation of collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 27, 58S-63S.
- Kirpich, I.A., and McClain, C.J. (2012). Probiotics in the treatment of the liver diseases. *J Am Coll Nutr* 31, 14-23.
- Knight, L.C., Parkman, H.P., Brown, K.L., Miller, M.A., Trate, D.M., Maurer, A.H., and Fisher, R.S. (1997). Delayed gastric emptying and decreased antral contractility in normal premenopausal women compared with men. *Am J Gastroenterol* 92, 968-975.
- Koivisto, T., Mishin, V.M., Mak, K.M., Cohen, P.A., and Lieber, C.S. (1996). Induction of cytochrome P-450E1 by ethanol in rat Kupffer cells. *Alcohol Clin Exp Res* 20, 207-212.
- Lands, W.E. (1998). A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 15, 147-160.
- Laso, F.J., Almeida, J., Torres, E., Vaquero, J.M., Marcos, M., and Orfao, A. (2010). Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 34, 876-885.

Laso, F.J., Madruga, J.I., Giron, J.A., Lopez, A., Ciudad, J., San Miguel, J.F., Alvarez-Mon, M., and Orfao, A. (1997). Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology* 25, 1096-1100.

Le Roy, D., Di Padova, F., Tees, R., Lengacher, S., Landmann, R., Glauser, M.P., Calandra, T., and Heumann, D. (1999). Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to CD14. *J Immunol* 162, 7454-7460.

Leo, M.A., and Lieber, C.S. (1983). Interaction of ethanol with vitamin A. *Alcohol Clin Exp Res* 7, 15-21.

Lieber, C.S. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34, 9-19.

Lieber, C.S., and Abittan, C.S. (1999). Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. *Clin Dermatol* 17, 365-379.

Lieber, C.S., Cao, Q., DeCarli, L.M., Leo, M.A., Mak, K.M., Ponomarenko, A., Ren, C., and Wang, X. (2007). Role of medium-chain triglycerides in the alcohol-mediated cytochrome P450 2E1 induction of mitochondria. *Alcohol Clin Exp Res* 31, 1660-1668.

Lieber, C.S., Jones, D.P., and Decarli, L.M. (1965). Effects of Prolonged Ethanol Intake: Production of Fatty Liver Despite Adequate Diets. *J Clin Invest* 44, 1009-1021.

Lieber, C.S., Lasker, J.M., DeCarli, L.M., Saeli, J., and Wojtowicz, T. (1988). Role of acetone, dietary fat and total energy intake in induction of hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *J Pharmacol Exp Ther* 247, 791-795.

Lindros, K.O., Cai, Y.A., and Penttila, K.E. (1990). Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 IIE1 in carbon tetrachloride-induced damage to centrilobular hepatocytes from ethanol-treated rats. *Hepatology* 12, 1092-1097.

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220-230.

Ma, X., Svegliati-Baroni, G., Poniachik, J., Baraona, E., and Lieber, C.S. (1997). Collagen synthesis by liver stellate cells is released from its normal feedback regulation by acetaldehyde-induced modification of the carboxyl-terminal propeptide of procollagen. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 1204-1211.

Mathison, J.C., Tobias, P.S., Wolfson, E., and Ulevitch, R.J. (1992). Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* 149, 200-206.

Mathurin, P., Deng, Q.G., Keshavarzian, A., Choudhary, S., Holmes, E.W., and Tsukamoto, H. (2000). Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 32, 1008-1017.

- Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 231-241.
- Melhem, A., Muhanna, N., Bishara, A., Alvarez, C.E., Ilan, Y., Bishara, T., Horani, A., Nassar, M., Friedman, S.L., and Safadi, R. (2006). Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 45, 60-71.
- Mendall, M.A., and Kumar, D. (1998). Antibiotic use, childhood affluence and irritable bowel syndrome (IBS). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10, 59-62.
- Minagawa, M., Deng, Q., Liu, Z.X., Tsukamoto, H., and Dennert, G. (2004). Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor-alpha during alcohol consumption. *Gastroenterology* 126, 1387-1399.
- Mishin, V.M., Rosman, A.S., Basu, P., Kessova, I., Oneta, C.M., and Lieber, C.S. (1998). Chlorzoxazone pharmacokinetics as a marker of hepatic cytochrome P4502E1 in humans. *Am J Gastroenterol* 93, 2154-2161.
- Miyake, Y., and Yamamoto, K. (2013). Role of gut microbiota in liver diseases. *Hepatol Res* 43, 139-146.
- Mouzaki, M., Comelli, E.M., Arendt, B.M., Bonengel, J., Fung, S.K., Fischer, S.E., McGilvray, I.D., and Allard, J.P. (2013). Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 58, 120-127.
- Nakano, H., Boudjema, K., Alexandre, E., Imbs, P., Chenard, M.P., Wolf, P., Cinquabre, J., and Jaeck, D. (1995). Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 22, 539-545.
- Nanji, A.A., Khettry, U., and Sadrzadeh, S.M. (1994). Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med* 205, 243-247.
- Nanji, A.A., Khettry, U., Sadrzadeh, S.M., and Yamanaka, T. (1993). Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E2, leukotriene B4, and thromboxane B2. *Am J Pathol* 142, 367-373.
- Navder, K.P., Baraona, E., and Lieber, C.S. (1997). Polyenylphosphatidylcholine decreases alcoholic hyperlipemia without affecting the alcohol-induced rise of HDL-cholesterol. *Life Sci* 61, 1907-1914.
- Nordenstedt, H., White, D.L., and El-Serag, H.B. (2010). The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 42 Suppl 3, S206-214.
- Nordmann, R. (1994). Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 29, 513-522.
- Osman, N., Adawi, D., Ahrne, S., Jeppsson, B., and Molin, G. (2007). Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of Lactobacillus, Bifidobacterium and blueberry. *Dig Liver Dis* 39, 849-856.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424.

Parlesak, A., Schafer, C., Schutz, T., Bode, J.C., and Bode, C. (2000). Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 32, 742-747.

Petersen, D.R., Atkinson, N., and Hjelle, J.J. (1982). Increase in hepatic microsomal ethanol oxidation by a single dose of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 221, 275-281.

Petrasek, J., Dolganiuc, A., Csak, T., Nath, B., Hritz, I., Kodys, K., Catalano, D., Kurt-Jones, E., Mandrekar, P., and Szabo, G. (2011). Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology* 53, 649-660.

Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., and Gao, B. (2006). Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 130, 435-452.

Raetz, C.R., Ulevitch, R.J., Wright, S.D., Sibley, C.H., Ding, A., and Nathan, C.F. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J* 5, 2652-2660.

Rintala, J., Jaatinen, P., Parkkila, S., Sarviharju, M., Kiiianmaa, K., Hervonen, A., and Niemela, O. (2000). Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol* 35, 458-463.

Roberts, B.J., Shoaf, S.E., Jeong, K.S., and Song, B.J. (1994). Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1064-1071.

Ruddell, W.S., Axon, A.T., Findlay, J.M., Bartholomew, B.A., and Hill, M.J. (1980). Effect of cimetidine on the gastric bacterial flora. *Lancet* 1, 672-674.

Salmela, K.S., Kessova, I.G., Tsyrllov, I.B., and Lieber, C.S. (1998). Respective roles of human cytochrome P-450E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol Clin Exp Res* 22, 2125-2132.

Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 13, 1324-1332.

Seyrig, J.A., Naveau, S., Gonzales, R., and Petit, R. (1983). [Pectins. Present state of knowledge]. *Gastroenterol Clin Biol* 7, 1031-1037.

Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M.A., Geuking, M.B., Beutler, B., Tedder, T.F., Hardt, W.D., *et al.* (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 325, 617-620.

- Sommer, F., and Backhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* *11*, 227-238.
- Spiller, R., and Garsed, K. (2009). Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *136*, 1979-1988.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* *481*, 278-286.
- Szabo, G., and Mandrekar, P. (2009). A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* *33*, 220-232.
- Szabo, G., Mandrekar, P., Girouard, L., and Catalano, D. (1996). Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. *Alcohol Clin Exp Res* *20*, 900-907.
- Taimr, P., Higuchi, H., Kocova, E., Rippe, R.A., Friedman, S., and Gores, G.J. (2003). Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* *37*, 87-95.
- Takahashi, H., Johansson, I., French, S.W., and Ingelman-Sundberg, M. (1992). Effects of dietary fat composition on activities of the microsomal ethanol oxidizing system and ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in the liver of rats chronically fed ethanol. *Pharmacol Toxicol* *70*, 347-351.
- Takahashi, T., Lasker, J.M., Rosman, A.S., and Lieber, C.S. (1993). Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology* *17*, 236-245.
- Terelius, Y., Norsten-Hoog, C., Cronholm, T., and Ingelman-Sundberg, M. (1991). Acetaldehyde as a substrate for ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1). *Biochem Biophys Res Commun* *179*, 689-694.
- Tremaroli, V., and Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* *489*, 242-249.
- Tsukamoto, H., French, S.W., Benson, N., Delgado, G., Rao, G.A., Larkin, E.C., and Largman, C. (1985). Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology* *5*, 224-232.
- Tsukamoto, H., Horne, W., Kamimura, S., Niemela, O., Parkkila, S., Yla-Herttuala, S., and Brittenham, G.M. (1995). Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* *96*, 620-630.
- Tsutsumi, M., Lasker, J.M., Shimizu, M., Rosman, A.S., and Lieber, C.S. (1989). The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. *Hepatology* *10*, 437-446.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsuneneko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., *et al.* (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480-484.

Uesugi, T., Froh, M., Arteel, G.E., Bradford, B.U., and Thurman, R.G. (2001). Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 34, 101-108.

Vale, J.A., and Proudfoot, A.T. (1995). Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* 346, 547-552.

Visvanathan, K., Skinner, N.A., Thompson, A.J., Riordan, S.M., Sozzi, V., Edwards, R., Rodgers, S., Kurtovic, J., Chang, J., Lewin, S., *et al.* (2007). Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 45, 102-110.

Wang, A.P., Migita, K., Ito, M., Takii, Y., Daikoku, M., Yokoyama, T., Komori, A., Nakamura, M., Yatsushashi, H., and Ishibashi, H. (2005). Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25, 85-91.

Wang, B., Trippler, M., Pei, R., Lu, M., Broering, R., Gerken, G., and Schlaak, J.F. (2009). Toll-like receptor activated human and murine hepatic stellate cells are potent regulators of hepatitis C virus replication. *J Hepatol* 51, 1037-1045.

Watanabe, A., Sohail, M.A., Gomes, D.A., Hashmi, A., Nagata, J., Sutterwala, F.S., Mahmood, S., Jhandier, M.N., Shi, Y., Flavell, R.A., *et al.* (2009). Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G1248-1257.

Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.N., Zhao, X., Yang, J.W., Wang, Z.G., Fu, N., Tang, Y., Wang, X.H., Liu, X.W., *et al.* (2011). Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med* 11, 53.

Yin, M., Bradford, B.U., Wheeler, M.D., Uesugi, T., Froh, M., Goyert, S.M., and Thurman, R.G. (2001). Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 166, 4737-4742.

Yin, M., Wheeler, M.D., Kono, H., Bradford, B.U., Gallucci, R.M., Luster, M.I., and Thurman, R.G. (1999). Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 117, 942-952.

Yokoyama, T., Komori, A., Nakamura, M., Takii, Y., Kamihira, T., Shimoda, S., Mori, T., Fujiwara, S., Koyabu, M., Taniguchi, K., *et al.* (2006). Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways. *Liver Int* 26, 467-476.

Yoshida, A. (1992). Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics* 2, 139-147.

You, M., Fischer, M., Deeg, M.A., and Crabb, D.W. (2002). Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J Biol Chem* 277, 29342-29347.

Zhu, P., Duan, L., Chen, J., Xiong, A., Xu, Q., Zhang, H., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., and Fang, M. (2011). Gene silencing of NALP3 protects against liver ischemia-reperfusion injury in mice. *Hum Gene Ther* 22, 853-864.

Résumé :

Nous avons réalisé des expériences d'alcoolisation avec un régime Lieber DeCarli dans 2 animaleries différentes, les animaleries A et B. Les souris développaient des lésions hépatiques dans une animalerie (triglycérides, transaminases et expression des gènes de l'inflammation augmentés), mais non dans l'autre. En étudiant le microbiote intestinal de ces souris, nous nous sommes aperçus que les souris de l'animalerie B présentaient une proportion de *Bacteroides* diminuée comparée aux souris de l'animalerie A. Le rétablissement de ces *Bacteroides* à un niveau élevé, d'une part grâce à un transfert de flore et d'autre part grâce à un prébiotique, la pectine, a permis d'inhiber l'apparition des lésions hépatiques lors d'un protocole d'alcoolisation dans l'animalerie B.

Mots clefs : MAF, microbiote intestinale, *Bacteroides*, régime Lieber DeCarli

Abstract :

We performed two alcoholisation protocols with a Lieber DeCarli diet in 2 different animal housing facilities, A and B. Mice in animal house B developed liver injuries following the alcoholization protocol (increased triglycerides, transaminases and inflammation genes expression), but not in animal house A. Intestinal microbiota study of these mice showed us that mice in animal house B had a much lower proportion of *Bacteroides* compared to animal house A. Restoring this bacterial population via fecal microbiota transfer and the use of a prebiotic enhancing *Bacteroides* growth, pectin, allowed to inhibit the onset of liver injuries during a Lieber DeCarli alcoholisation protocol in animal house facility B.

Key words : ALD, intestinal microbiota, *Bacteroides*, Lieber DeCarli diet

ANNEXE :
TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES

ANNEXE I

Intestinal dysbiosis explains individual differences in susceptibility to alcoholic liver disease

Intestinal dysbiosis explains individual differences in susceptibility to alcoholic liver disease

Marta Llopis^{1,2,3,4,5}, Anne-Marie Cassard-Doulier^{3,4}, Laura Boschat^{1,2}, Jean-Charles Martin^{6,7}, Aurélie Bruneau^{1,2}, Lucas Lefèvre⁸, Bénédicte Langelier^{1,2}, Frédéric Cailleux^{3,4}, Tiphaine Le Roy^{1,2}, Laura Wrzosek^{3,4}, Ana Maria González-Castro⁵, Sylvie Rabot^{1,2}, Françoise Gaudin⁹, Hélène Agostini¹⁰, Sophie Prévot^{4,11}, Dominique Berrebi^{3,12}, Sylvie Naveau^{3,4,13}, Philippe Gérard^{1,2}, Gabriel Perlemuter^{3,4,13}

¹INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France.

²AgroParisTech, UMR Micalis, Jouy-en-Josas, France.

³INSERM U996, DHU Hepatinov, Clamart, France.

⁴Univ Paris-Sud, CHU Bicêtre, Kremlin Bicêtre, France.

⁵Department of Gastroenterology, Digestive System Research Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron and Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona (Departamento de Medicina), Barcelona, Spain.

⁶Aix-Marseille University, Faculté de Médecine, Marseille, France.

⁷INSERM, UMR1062 ‘‘Nutrition, Obésité et Risque Trombotique’’, Marseille, France.

⁸INRA -UMR 1313, GABI-LGS Plateforme ICE, Jouy-en-Josas, France

⁹Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), IFR141, Faculté de Pharmacie, Univ Paris-Sud, Châtenay-Malabry, F-92296, France.

¹⁰AP-HP, Hôpital Bicêtre, Unité de recherche clinique Paris-Sud, Bicêtre, F-94270, France.

¹¹AP-HP, Anatomie-pathologique, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France.

¹²AP-HP, Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Robert Debré, Paris, France.

¹³AP-HP, Hepatogastroenterology and Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France.

Correspondence

Prof. Gabriel PERLEMUTER

Service d'Hépatogastroentérologie et Nutrition, Hôpital Antoine Bécclère,
157 rue de la Porte de Trivaux, F-92141 Clamart cedex, France.

Phone: +33 1 45 37 43 72

Fax: +33 1 40 94 06 56

E-mail: gabriel.perlemuter@abc.aphp.fr

Key words: intestinal microbiota, alcohol, alcoholic hepatitis, liver, inflammation.

The susceptibility of alcoholics to ethanol-induced liver injury is diverse. Therefore, factors other than alcohol intake must influence the development of alcoholic liver disease. The intestinal microbiota appears to be a determinant of human health, but its involvement in alcoholic liver disease has not been investigated. Here, we show that patients with severe alcoholic hepatitis harbor an intestinal microbiota of particular composition, including abundant Bifidobacteria and Streptococci, and a low Akkermansia counts. We also report a similar association between intestinal microbiota dysbiosis and susceptibility to severe intoxication in a mouse model of alcoholic liver disease. Following alcoholization, germ-free mice colonized with the intestinal microbiota from an alcoholic patient with severe alcoholic hepatitis developed a more severe liver injury than mice colonized with the intestinal microbiota from an alcoholic patient without alcoholic hepatitis. Therefore, susceptibility to alcohol-induced inflammation was transmissible from patients to mice via the transplantation of intestinal microbiota. Mice carrying intestinal microbiota from the alcoholic hepatitis patient also developed pronounced disruption of the intestinal mucosa integrity, together with a more important inflammation of visceral adipose tissue and an immune response in mesenteric lymph nodes. We found that donor patients and recipient mice with severe alcoholic liver disease harbored an intestinal microbiota characterized by a low microbial diversity, an increased proportion of *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Alistipes* and the presence of ethanol-producing *Clostridium*. These results implicate intestinal microbiota in the pathogenesis of alcoholic liver disease and demonstrate that the differences in susceptibility to alcoholic liver disease between alcoholics are, at least partly, a consequence of intestinal microbiota dysbiosis. Our findings reveal new possibilities for the control and management of alcoholic liver disease.

Alcoholic liver disease (ALD) can be divided into three overlapping phases with distinct pathological and clinical features: fatty liver (or steatosis) which is reversible but predisposes to more severe liver injury, alcoholic hepatitis (AH) with different stages of liver inflammation and severity, and finally fibrosis/cirrhosis. Some patients develop severe forms of AH with a high mortality rate whereas others remain reasonably healthy despite a similar alcohol intake.

Modulation of the intestinal microbiota (IM) by antibiotics and probiotics reduces the severity of liver lesions in experimental models of ALD¹ and in patients². Therefore, the IM composition may be an important determinant of the development of ALD. Chronic ethanol intake in rodents and humans can lead to dysbiosis in the small intestine, resulting from bacterial overgrowth³.

The intestinal epithelium acts as a barrier between contents of the intestinal lumen and the bloodstream. Alcohol consumption in humans and animals results in an increase in gut permeability. The resulting leakiness of the gut barrier enables bacteria and their pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which have high inflammatory potential, to enter the systemic circulation. From here they are transported to the liver where they contribute to inflammatory responses following alcohol consumption. Endotoxemia in alcoholic patients has been found to be associated with the occurrence and severity of cirrhosis⁴. Moreover, the IM is involved in ethanol-induced weakening of the intestinal barrier⁵, further underlining the link between the IM and AH.

We investigated the relationship between IM and the severity of ALD. We first used fluorescent *in situ* hybridization (FISH) combined with flow cytometry to examine the composition of the fecal IM from alcoholic patients, for who the severity of ALD was documented histologically. We classified alcoholic patients into three groups according to alcohol-induced liver histological lesions (AH score): no AH (noAH), non-severe AH (nsAH)

and severe AH (sAH). Patients chronically infected by hepatitis C virus (HCV) were used as controls (Supplementary Table 1). Patients with sAH harbored a dysbiosis characterized by larger amounts of Bifidobacteria and Streptococci and a tendency to have lower amounts of Atopobium than patients with nsAH, noAH, or HCV. Enterobacteria counts were higher in all patients with hepatitis than in alcoholic patients without AH, although only the difference between patients with sAH and noAH was significant (Fig. 1a). We found no significant differences between nsAH and noAH patients for Bifidobacteria, Streptococci, Enterobacteria, or Atopobium, revealing that this dysbiosis was specifically associated with sAH. Streptococci counts were significantly positively correlated with the AH score (Fig. 1b). Enterobacteria counts were positively correlated with blood bilirubin levels and the AH score. Conversely, the numbers of Atopobium correlated negatively with blood bilirubin levels and *Clostridium leptum* correlated negatively with the fibrosis score. These results indicate that specific groups of gut bacteria are associated with severe AH.

We developed a model of alcohol-induced liver disease in mice, adapted from the Lieber-DeCarli model⁶. This model recapitulates chronic alcohol intake by conventional mice; it involves feeding mice a liquid diet containing progressively increasing doses of ethanol of up to 5% (Supplementary Table 2). We scored mice according to an index of alcohol intoxication, from no signs of intoxication to death (Supplementary Table 3)⁷. The mice showed a wide range of susceptibility to alcohol, and 31% of the mice died. We recovered fecal samples at various times, and studied by FISH. Prior to alcohol intake, the percentages of Bifidobacteria and Mouse Intestinal Bacteria (MIB) were higher and the percentages of *Clostridium leptum* were lower in the IM from mice that died than in the IM from mice with a low alcohol intoxication index (Fig. 1c). These data suggest that initial IM composition determine the susceptibility to develop ALD, as we have previously shown for non-alcoholic fatty liver disease⁸.

To investigate whether the dysbiosis observed in patients with sAH was a cause or only a consequence of AH and to determine whether ethanol-induced inflammation was transmissible via the IM, we performed IM transplantation. We selected two alcoholic patients with a similar history of alcohol abuse, one with noAH and the other one with sAH. These patients each had an IM composition representative of their group. We split thirty adult female germ-free C57BL/6J mice into two groups and we colonized them by oral gavage with either the IM from the noAH patient (noAH mice; noAHm) or the IM from the sAH patient (sAH mice; sAHm). We subsequently maintained recipient mice in isolators to prevent interference by external bacteria. Both groups were fed the Lieber-DeCarli diet containing 3% ethanol concentration to prevent severe intoxication and death. Before being fed alcohol, the sAHm harbored more Bifidobacteria and Streptococci and less Atopobium than the noAHm (Supplementary Fig. 1). The recipient mice thus recapitulated the major differences observed between sAH and noAH patients.

Food intake was similar between the two groups of mice (Fig. 2a). Nevertheless, after 5 weeks on the alcohol diet, noAHm gained significantly more body weight than sAHm (Fig. 2b). At the end of the experiment, liver weight and the liver/body weight ratio were higher in the sAHm group (Fig. 2c, d). Serum ALT blood activity was 1.3 fold higher in sAHm than in noAHm (Fig. 2e). Liver histology showed no significant differences in steatosis between the two groups. Semiquantitative histological gradation showed no differences in liver steatosis but significant differences in liver necrosis between noAHm and sAHm (Supplementary Fig. 2). High throughput qRT-PCR analysis of total liver revealed differences in gene expression between the two groups (Supplementary Fig. 3). We observed the largest differences for genes involved in lipogenesis (Fas, Scd1, Dgat) and ethanol metabolism (alcohol and aldehyde dehydrogenases) (Supplementary Table 4). We examined liver inflammation by flow cytometry: sAHm had a higher percentage of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and NKT cells than

noAHm (Fig. 2f). Overall, these results demonstrate that alcohol-induced liver injury is transmissible from patients to mice by IM transplantation.

Disruption of the intestinal barrier is a common feature in ALD patients⁵, and results in an increase of gut permeability and translocation of bacterial components. We therefore investigated the integrity of the intestinal barrier in recipient mice. First, we evaluated gut permeability by measuring intestinal absorption of Dx FITC. Permeability to Dx FITC was higher in sAHm (Fig. 3a). We quantified bacterial translocation across mucosal surfaces by FISH and found higher numbers of translocating bacteria in the ileum and colon of sAHm than noAHm (Fig. 3b, c). To confirm these results, we counted bacteria in mesenteric lymph nodes (MLN). Numbers of bacteria tended to be higher in MLN from sAHm than in noAHm ($p=0.082$) (Fig. 3d). To investigate whether the immune system responded to increased numbers of translocating bacteria, we studied the immunocompetent cells in MLN by flow cytometry. The sAHm group had a higher proportion of CD3⁺, CD4⁺ and NKT cells than mice from the noAHm group (Fig. 3e).

Next, we investigated if the elevated intestinal permeability and the increase in bacterial translocation observed in the sAHm were associated with an active inflammatory process in the intestinal mucosa. We analyzed the integrity of the intestinal mucosal layer by histological and immunohistochemical analysis. As expected, the intestinal mucosal layer in the sAHm group showed more necrosis and inflammation, and a thinner protective mucin layer than that in the noAHm group (Supplementary Fig. 4). We analyzed the expression in the mouse ileum of genes related to inflammation, lipid metabolism, and bacterial-host crosstalk by high throughput qRT-PCR (Supplementary Table 5). Principal component analysis (PCA) revealed differences in gene expression between the noAHm and sAHm groups (Supplementary Fig. 5). Among genes related to lipid metabolism, the expression of CPT1 and MGAT2 were significantly lower in ileum tissue from sAHm than noAHm (Supplementary Table 5).

Among genes related to inflammation, *Nos2* was strongly overexpressed in sAHm compared to noAHm, while *Ccl11* was more expressed in noAHm than in sAHm. Genes related to microbial defense (*Ido*, *Reg3g*) were more strongly expressed in sAHm than noAHm. As observed for the liver, ileum samples from the sAHm group expressed the alcohol dehydrogenase gene weakly.

In human ALD, inflammation due to alcohol intake is a generalized process⁹. We therefore studied immunocompetent cells in visceral adipose tissue (VAT) of sAHm and noAHm. We found a higher proportion of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and NKT in VAT from sAHm than in VAT from noAHm (Fig. 3f). These inflammatory processes are likely the result of transplanted sAH microbiota, and our observations indicate that the inflammation extends to sites distal from the initial site of colonization, such as in VAT.

To identify the bacterial species associated with the noAH or sAH manifestations, we analyzed fecal microbiota profiles by Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE). PCA of the TTGE bacterial profiles indicated that bacterial composition differed between the noAHm and sAHm groups and that each clustered with its corresponding donor (Fig. 4a). Three bands were common to all sAHm, and two of these bands were also detected in the corresponding donor. None of these three bands were present in the noAHm group or their corresponding donor (Supplementary Fig. 6). We isolated these bands and the DNA was sequenced revealing that they correspond to *Clostridium* species, all of which have deleterious effects on the host. We found *C. bolteae* and *C. symbiosum*, recently associated with low intestinal microbiota richness¹⁰, in sAHm. Similarly, we found *C. bolteae* and *C. nexile* both in sAHm and their corresponding donor.

We investigated the response of *C. symbiosum* and *C. nexile* to ethanol *in vitro* by incubation with ethanol concentrations similar to those found in the intestine 2-3 hours after alcohol intake. We found that these bacteria produced ethanol separately (data not shown) and

in combination (Supplementary Fig. 7), with a 1.4 fold increase in ethanol concentration after 48h co-culture. Therefore, endogenous ethanol production by IM may contribute to the deleterious effects of alcohol, consistent with recent reports linking endogenous ethanol produced by commensal bacteria with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients¹¹.

We used pyrosequencing to analyse fecal samples from the human donors who provided the IM for transplantation and fecal samples from recipient mice that were fed the ethanol diet. The sAHm group mice and their donor harbored higher numbers of sequences belonging to the phylum Bacteroidetes than the noAHm group and their donor (Supplementary Table 6). *Bacteroides* was the main genus represented and was significantly more abundant in the sAHm group and their donor, as well as *Butyrivimonas* and *Blautia* (Supplementary Table 6). Also, there were significantly more *Alistipes* in the sAHm group (Fig. 4b). Conversely, the genus *Barnesiella* was significantly more dominant in noAHm (Fig. 4b). We found that bacteria of the genera *Desulfovibrio*, *Subdoligranulum*, and *Faecalibacterium*, which has anti-inflammatory properties, were significantly more abundant in the noAHm group and their corresponding donor (Supplementary Table 6, Fig 4b). Other subdominant genera such as *Odoribacter* and *Coprococcus* were significantly more abundant in sAHm (Fig. 4b). Several species of bacteria relevant to health status were overabundant in sAHm and their corresponding donor. These included *Bilophila wadsworthia*, a bile acid-metabolizing-bacterium which is associated with a pro-inflammatory immune response and colitis¹². Similarly, we found *Bacteroides caccae*, which is associated with inflammatory bowel diseases¹³, and *Clostridium bolteae*, an autism-associated bacterium¹⁴, in higher proportions in sAHm (data not shown). Given their association with a variety of health disorders, we suggest that the dysbiosis in sAHm is responsible, at least in part, for the increased susceptibility to ALD in these mice.

A low diversity of the fecal microbiota has been reported in patients with several illnesses¹⁰ and may therefore be a marker of an increased risk of developing diseases. The sAHm group and their corresponding donor had lower fecal bacterial diversity than the noAHm group and their corresponding donor, as expressed by the Chao1 index (Supplementary Table 6). Moreover, we found 14 bacterial groups exclusively in noAHm, but only two bacterial groups exclusively in sAHm (Supplementary Table 7). A small number of bacterial groups serve as indicators of either low gene count (LGC) microbiota profiles or high gene count (HGC) microbiota profiles¹⁰. The genus *Bacteroides*, which is characteristic of LGC profiles, was more abundant in sAHm and their donor than in noAHm and their donor (Supplementary Table 6). The species *Clostridium bolteae* and *Clostridium symbiosum*, representative of LGC profiles were also present in sAHm but not noAHm. Moreover, *C. bolteae* was also present in the sAH donor (Supplementary Fig. 6). The genera *Faecalibacterium* and *Alistipes*, which are characteristic of HGC profiles, were significantly more abundant in noAHm and their donor. *Akkermansia muciniphila* inhabits the intestinal mucus and it is poorly found in feces. It has beneficial properties for health and is a marker of high microbial richness¹⁵. We found low numbers of this bacterium in sAH patients (Fig. 4c). A similar profile was found between conventional mice with high and low alcohol intoxication indices (Fig. 4d). These results suggest that dysbiosis of the gut microbiota may define subsets of alcoholic patients with a higher risk of developing severe ALD. Consequently, analysis of the IM may have prognostic values for alcoholic patients.

We tested for bacterial metabolites that could contribute to the deleterious effect of sAH microbiota; we used liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) to analyze the metabolome in the caecal contents of sAHm and noAHm and in the feces from their corresponding donors. A selection of variables based on partial least-square discriminant analysis identified 22 spectral features that differed between noAHm and sAHm; (Fig. 4e and

Supplementary Fig. 8). Thirteen of these features could be annotated according to level two of the minimum standard for chemical analysis¹⁶, and corresponded to both bile acid derivatives and hydroxy/oxygenated fatty acids (Fig. 4e). The amounts of both primary and secondary bile acids, specifically produced by IM, were dissimilar between the sAHm and noAHm groups. Such metabolites are also altered in the intestine of rats upon ethanol exposure¹⁷. Of note, bile acids can modulate alcohol metabolism by binding to the nuclear receptor, FXR, and regulating class I alcohol dehydrogenase expression¹⁸. Hence, a particular IM composition may give rise to alterations in bile acids derivatives, which in turn could affect the efficiency of alcohol metabolism. This may explain the differences in susceptibility to alcohol-induced liver injury, as we observed between noAH and sAH mice.

In summary, we provide evidence that alcoholic patients with severe AH display a gut microbiota dysbiosis. The severity of ALD is transmissible from patients to mice, via transplantation of the IM. Our results demonstrate that inter-individual variation in the incidence and severity of alcohol-induced liver injury result, at least in part, from differences in colonic bacterial communities. Therefore, the study of IM may lead to the identification of patients at high risk of severe ALD and therapy targeted at the gut microbiome may be useful for the prevention or treatment of ALD.

Acknowledgments

The authors thank Martine Bensaada, Benoit Lignon-Couffon and Alain Joffre for their skilful technical assistance. We also thank Catherine Philippe for her support and valuable discussions, Jean-Pierre Furet for his technical recommendations on qPCR and Chantal Bridonneau for providing the *Clostridium* cultures.

This work was supported by the FRM (French Foundation for Medical Research), INSERM, Univ Paris-Sud, ERAB (European research advisory board), SNFGE (French

National Society of Gastroenterology), AFEF (French Association for the Study of Liver), IREB (Institut de Recherches sur les Boissons).

ML was supported by EASL (European Association for the Study of Liver) and FC by the French Ministry of Research and ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer).

Author contributions

ML designed and performed the experiments in animals and wrote the manuscript; A-MC-D conducted the experiments related to liver and immunocompetent cells and wrote the manuscript; LB performed the experiments in animals; J-CM performed the metabolomic analysis; AB supervised animal experimentation; BL and LL conducted gene expression analysis; FC, LW, A-MG-C and TL-R conducted sample analysis; SR advised in animal experiments; FG, DB and SP performed histological analysis; HA conducted the statistical analysis; SN designed the project; PG designed the project, supervised experiments and wrote the manuscript; GP designed the project, included patients, supervised experiments and wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Author informations

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to Prof. Gabriel Perlemuter, gabriel.perlemuter@abc.aphp.fr

References

1. Forsyth, C.B. *et al.* Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* **43**, 163-172 (2009).
2. Kirpich, I.A. *et al.* Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* **42**, 675-682 (2008).
3. Yan, A.W. *et al.* Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* **53**, 96-105 (2011).
4. Parlesak, A., Schafer, C., Schutz, T., Bode, J.C. & Bode, C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *Journal of hepatology* **32**, 742-747 (2000).
5. Ferrier, L. *et al.* Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *The American journal of pathology* **168**, 1148-1154 (2006).
6. Lieber, C.S. & DeCarli, L.M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol* **24**, 197-211 (1989).
7. FELASA working group. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory animals* **28**, 97-112 (1994).
8. Le Roy, T. *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **62**, 1787-1794 (2013).
9. Naveau, S. *et al.* Harmful effect of adipose tissue on liver lesions in patients with alcoholic liver disease. *Journal of hepatology* **52**, 895-902 (2010).
10. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541-546 (2013).
11. Zhu, L. *et al.* Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* **57**, 601-609 (2013).
12. Devkota, S. *et al.* Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. *Nature* **487**, 104-108 (2012).
13. Wei, B. *et al.* Molecular cloning of a Bacteroides caccae TonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. *Infection and immunity* **69**, 6044-6054 (2001).
14. Pequegnat, B. *et al.* A vaccine and diagnostic target for Clostridium bolteae, an autism-associated bacterium. *Vaccine* **31**, 2787-2790 (2013).
15. Belzer, C. & de Vos, W.M. Microbes inside--from diversity to function: the case of Akkermansia. *The ISME journal* **6**, 1449-1458 (2012).
16. Sumner, L.W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **3**, 211-221 (2007).
17. Xie, G. *et al.* Chronic ethanol consumption alters mammalian gastrointestinal content metabolites. *Journal of proteome research* **12**, 3297-3306 (2013).
18. Langhi, C., Pedraz-Cuesta, E., Haro, D., Marrero, P.F. & Rodriguez, J.C. Regulation of human class I alcohol dehydrogenases by bile acids. *Journal of lipid research* **54**, 2475-2484 (2013).

Figure legends

Figure 1: Specific communities of fecal microbiota are associated to severe forms of alcoholic hepatitis (AH) in humans and mice.

a) FISH analysis of the composition of fecal microbiota from chronic alcoholic patients (alcohol intake > 50g/day) with different stages of alcoholic liver disease: no alcoholic hepatitis (noAH, $n=15$); no severe alcoholic hepatitis (nsAH, $n=12$); severe alcoholic hepatitis (sAH $n=9$); viral hepatitis C (HCV $n=7$). Results are presented as percentages of bacteria. **b)** Correlation between alcoholic patients' fecal microbiota and alcoholic hepatitis score, bilirubin or fibrosis score. **c)** Composition of gut microbiota from conventional mice with low ($n=7$), moderate ($n=8$) and severe ($n=4$) alcohol intoxication. Data are means and s.e.m (**a,c**), and correlations (**b**). Mann Whitney test (**a**), Spearman rank (**b**), Unpaired t test (Bifidobacteria and *C.leptum*), and Mann Whitney (Mouse Intestinal Bacteria) (**c**). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 2: Phenotype of mice after the transplant of fecal microbiota and feeding on the alcoholic diet. noAHm: mice colonized with microbiota from a noAH patient ($n=15$), sAHm: mice colonized with microbiota from an sAH patient ($n=13$). **a)** Food intake. **b)** Body weight gain. **c)** Liver weight. **d)** Ratio liver weight/body weight. **e)** Plasma alanine aminotransferase (ALT). **f)** Liver immunocompetent cells assessed by flow cytometry. Data are presented as means and s.e.m. Significance was assessed by the unpaired t test (**a,b,c,d**), and the Mann Whitney t test (**e,f**). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 3: Properties of gut, adipose tissue and mesenteric lymph nodes of recipient mice fed on the alcoholic diet. noAHm: mice colonized with the microbiota of a noAH patient ($n=15$), sAHm: mice colonized with the microbiota of sAH patient ($n=15$). **a)** Recovery of DxFITC in

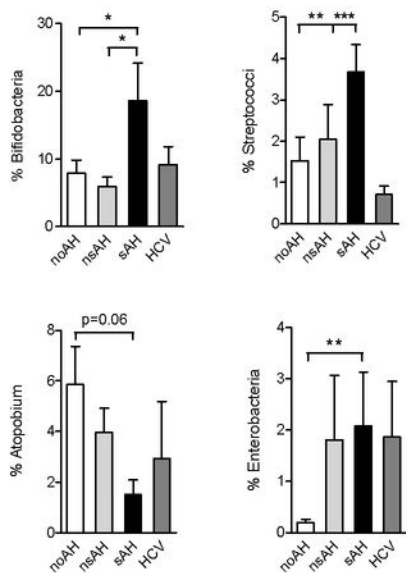
plasma 4 hours after its oral gavage. **b)** Quantification of bacteria across the ileum and colon assessed by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) ($n=8$ per group). **c)** FISH image of translocating bacteria representative from colons of sAHm group (magnification x 200). Sections are hybridized to a probe that recognizes the 16S rRNA genes of all bacteria (red), and counterstained with DAPI to visualize nuclei (blue). Arrows indicate translocating bacteria (magnification x 600). **d)** Colony forming units (CFU) of translocating bacteria in one mesenteric lymph node (MLN) per mouse. **e)** Immunocompetent cells in MLN assessed by flow cytometry. **f)** immunocompetent cells in visceral adipose tissue (VAT) assessed by flow cytometry. Data are presented as means and s.e.m. Significance was assessed by an unpaired t test (**a,f**) and the Mann Whitney t test (**b,d,e**). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 4: Gut microbiota composition and metabolites produced. **a)** Principal component analysis (PCA) of the TTGE profiles of bacteria from noAHm and sAHm after 5 weeks of feeding on the alcoholic diet ($n=6$ for both groups). Bacterial profiles from the corresponding donors are also shown. **b)** Analysis of the gut microbiota using pyrosequencing. Relative abundance of dominant and subdominant bacterial genera in sAHm and noAHm is indicated by the colored bars. The legend in bold indicates significant differences in the relative abundance between sAHm and noAHm. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, (unpaired t test). **c)** Percentages of *Akkermansia muciniphila* assessed by FISH combined with flow cytometry in feces from patients with no alcoholic hepatitis (noAH, $n=15$); non-severe alcoholic hepatitis (nsAH, $n=12$); severe alcoholic hepatitis (sAH, $n=9$); viral hepatitis C (HCV, $n=7$). Results are shown as percentages of bacteria. Data are presented as means and s.e.m, and significance was assessed using an unpaired t test. **d)** Percentages of *Akkermansia muciniphila* assessed by FISH combined with flow cytometry in feces from conventional

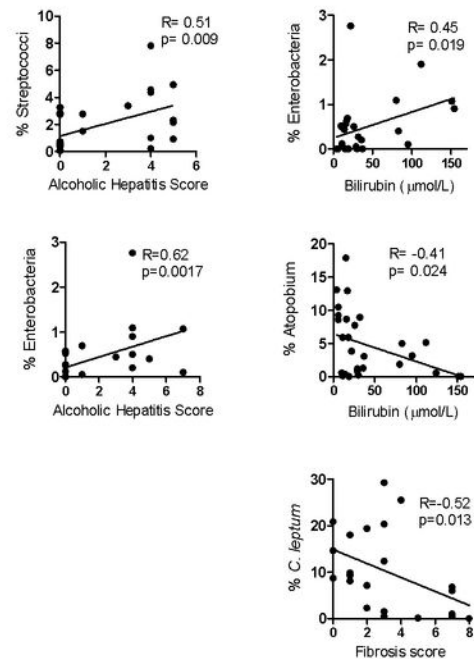
mice with low ($n=7$), moderate ($n=8$) and severe ($n=4$) alcohol intoxication (Alcohol Intoxication Index, Supplementary Table 3). Reported values are means and s.e.m, and significance was assessed using an unpaired t test. **e)** Hierarchical clustering analysis of the fecal metabolites from sAHm and no AHm ($n=15$ per group). We selected the fecal metabolites studied in mice by partial least square discriminant analysis: noAHm (numerical ID); sAHm (alphabetic ID). The relative amount of metabolites in the feces is displayed as a heatmap (values are pareto and log2 scaled). Unidentified MS signals are represented with an integer m/z value (M) and a liquid chromatography retention time value (T, in sec). The Ward method applied to euclidean distances was used for hierarchical clustering. Model validation parameters: Root mean square of the difference between observed and predicted individual values, e.g. error in model accuracy: 0.094. P value of the difference between the two groups of mice analyzed by PLS-DA calculated after cross-validation ANOVA: 1.29×10^{-15} . % of group assignment according to metabolites distribution: 100% with Fishers probability at 6.4×10^{-9} .

Figure 1

a



b



c

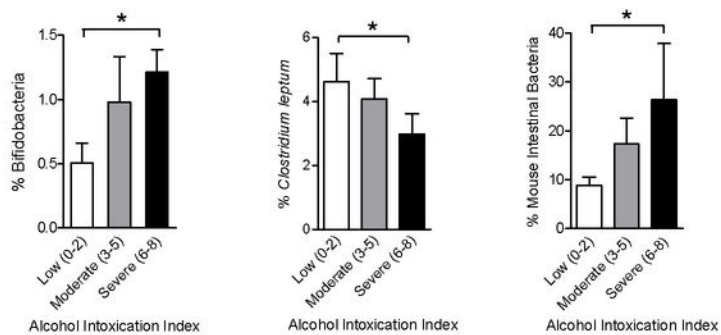


Figure 2

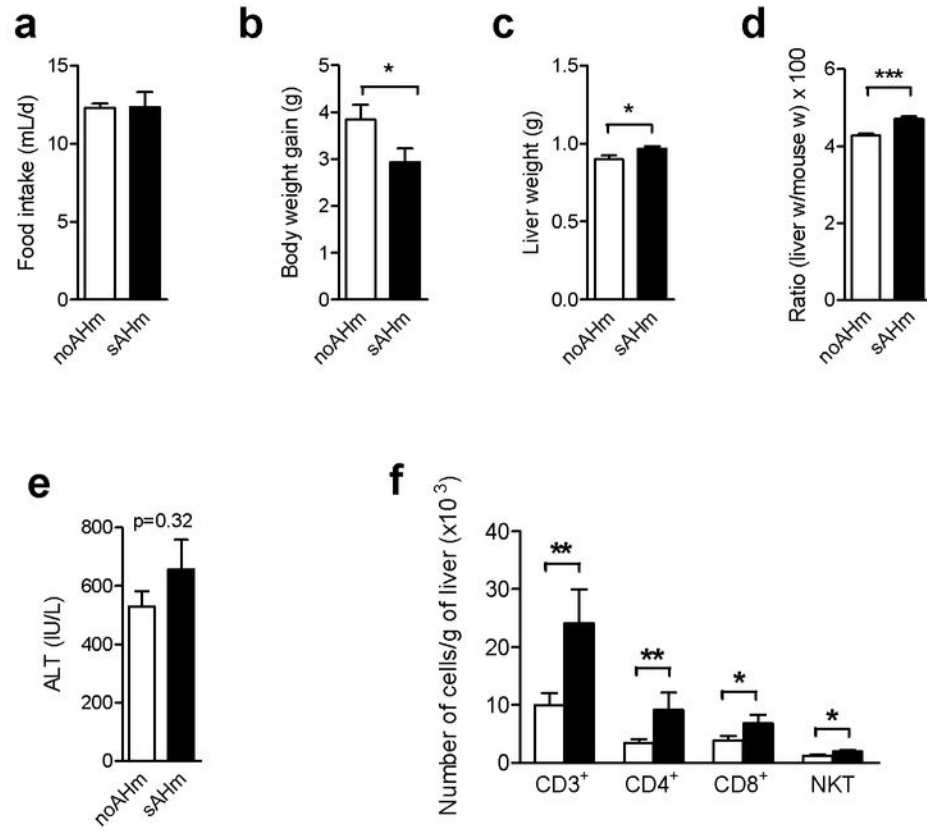


Figure 3

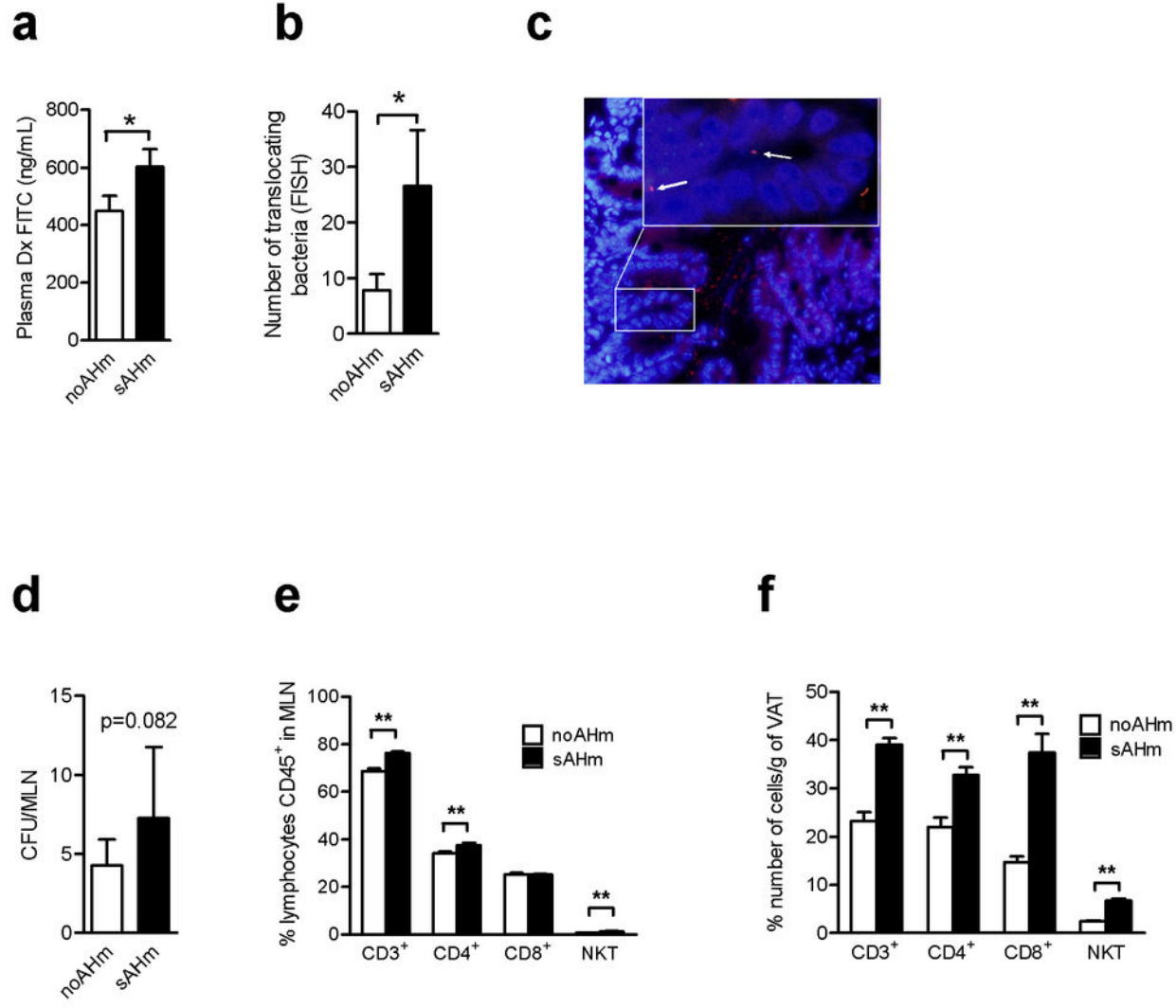
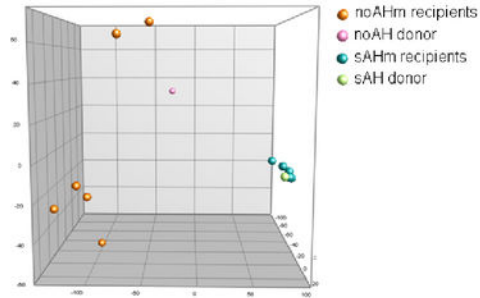
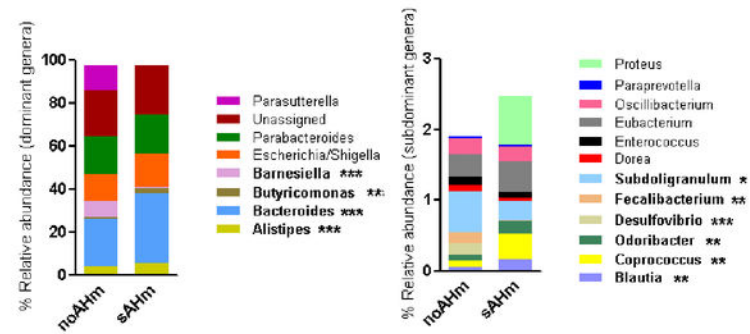


Figure 4

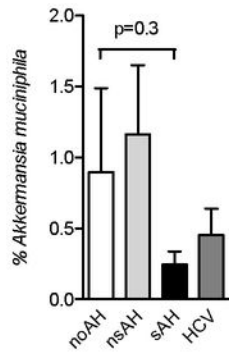
a



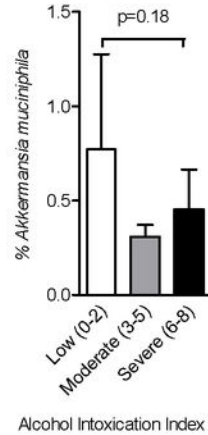
b



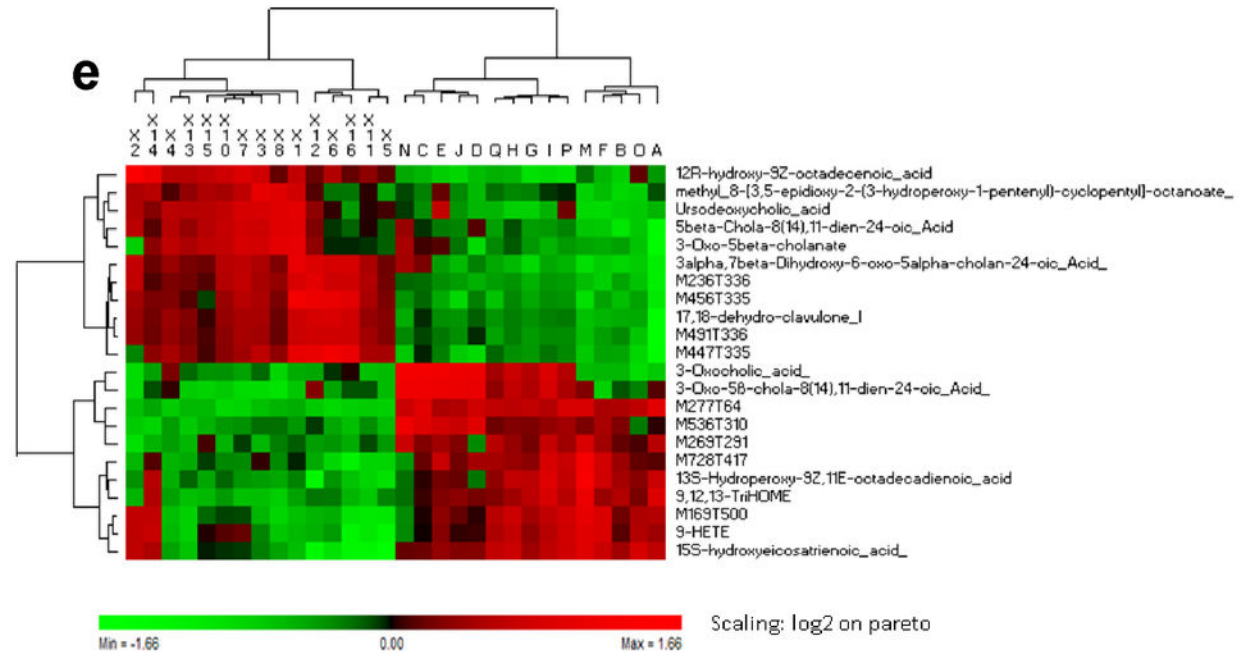
c



d



e



Supplementary Table 1. Characteristics of patients.

	<i>noAH</i> <i>n=15</i>	<i>nsAH</i> <i>n=12</i>	<i>sAH</i> <i>n=9</i>	<i>HCV</i> <i>n=7</i>
Age (yr)	55 ± 3	50 ± 3	59 ± 9	65 ± 14
Alcohol consumption (g/dy)	160 ± 28	196 ± 21	86 ± 16	NA
Duration of chronic alcohol intake (yr)	16 ± 4	28 ± 5	23 ± 5	NA
BMI (kg/m²)	23.6 ± 1.6	24.0 ± 3.2	26.5 ± 7.8	22.1 ± 9.1
ALT (IU/L)	57 ± 18	93 ± 20	44 ± 8.8	66 ± 35
AST (IU/L)	68 ± 27	163 ± 39.9	99 ± 36	63 ± 27
Albumin (g/L)	38.3 ± 1.7	36.7 ± 2	28.7 ± 2.9	37 ± 21.0
Blood glucose (mmol/L)	5.15 ± 0.34	5.27 ± 0.28	5.1 ± 0.5	9.2 ± 5.1
Triglycerides (g/L)	1.15 ± 0.40	1.41 ± 0.4	0.46 ± 0.01	1.49 ± 1.14
PT (%)	86 ± 6	79 ± 78	55 ± 27	86 ± 35
Bilirubin (µmol/L)	21 ± 10	30 ± 10	96 ± 48.7	16 ± 7.5
Maddrey discriminant function	11.0 ± 7.5	16.4 ± 13.2	48.9 ± 23.9	NA

BMI: body mass index; PT: prothrombin time as percentage of control; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; noAH: no alcoholic hepatitis; nsAH: non-severe alcoholic hepatitis; sAH: severe alcoholic hepatitis; HCV, chronic hepatitis C virus infection; NA: not applicable. Data presented are mean ± s.e.m.

Supplementary Table 2. Composition of the modified Lieber-DeCarli diet.

Ingredients	<i>g/L</i>
Casein (100 Mesh)	41.4
L-Cysteine	0.5
DL-Methionine	0.3
Corn Oil	39.6
Maltose Dextrin	25.6
Cellulose	10.0
Salt Mix	8.75
Vitamin Mix	2.5
Choline Bitartrate	0.53
Xanthan Gum	3.0

Ethanol was added at the increasing concentrations as described in Material and Methods.

Supplementary Table 3. Intoxication index used to evaluate the effects of alcohol in mice.

Parameter	Description	Score
Appearance	Bright eyes, coat smooth, grooming	0
	Unkempt hair coat	1
	Hunching, piloerection	2
Natural behavior	Normal behaviour pattern, slight decrease in activity; less interactive	0
	Pronounced decrease in activity; isolated	1
	Possible self-mutilation; hyperactive or immobile	2
Provoked behavior	Quickly moves away	0
	Moves away after short period of time	1
	Does not move or reacts with excessively exaggerated response	2
Coordination and motor behavior	Good coordination	0
	Impaired coordination, wobbling	1
	Balance difficulty; unbalanced walk severe ataxia	2

FINAL ALCOHOL INTOXICATION SCORE	LOW MODERATE SEVERE	0-2 3-5 6-8 or death
---	------------------------------------	-------------------------------------

Mice were scored every two days. Low intoxication: final score 0-2; moderate intoxication: final score 3-5; severe intoxication: final score 6-8 or death.

Supplementary Table 4. Relative expression of genes analyzed in liver of mice colonized with the IM from a patient with severe alcoholic hepatitis (sAHm) versus mice colonized with the IM from an alcoholic patient without alcoholic hepatitis (noAHm).

LIPID METABOLISM		Fold change	P
Hmger	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	-1.383	0.001 *
Slc27a5	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5	-1.245	0.001 *
Fasn	Fatty acid synthase	-1.353	0.009 *
Dgat2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	-1.132	0.018 *
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-1.484	0.018 *
Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	-1.098	0.046 *
Mttp	Microsomal triglyceride transfer protein	-1.070	0.056 °
Dgat1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	-1.114	0.068 °
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	-1.114	0.114
Fabp2	Fatty acid binding protein 2, intestinal	1.089	0.146
Fabp4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	1.192	0.171
Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	-1.092	0.171
Cpt1a	Carnitine palmitoyl transferase 1a	-1.034	0.561
ALCOHOL METABOLISM			
Adh5	Alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-1.136	0.001 *
Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	-1.255	0.001 *
Aldh4a1	Aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	-1.220	0.001 *
Cyp2e1	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	-1.343	0.001 *
Cyp4a14	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	1.316	0.001 *
Adh1	Alcohol dehydrogenase 1 (class I)	-1.123	0.006 *
Adh7	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	-1.129	0.034 *
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	-1.076	0.042 *
Aldh1a3	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	-1.211	0.047 *
Acaca	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	-1.091	0.146
Abca6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	-1.070	0.184
Acat1	Acetyl-Coenzyme A acetyl transferase 1	1.038	0.406
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	1.047	0.56
Aldh3a1	Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1	1.047	0.67
Aldh3b1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	-1.035	0.913
FIBROSIS			
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	-1.134	0.077 °
Col18a1	Procollagen, type XVIII, alpha 1	-1.097	0.092 °
Col1a1	Procollagen, type I, alpha 1	1.657	0.183
a-SMA	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	1.697	0.265
Card14	Caspase recruitment domain family, member 14	1.091	0.305
Icam1	Intercellular adhesion molecule	-1.067	0.615
Card11	Caspase recruitment domain family, member 11	1.060	0.878
INFLAMMATION			
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-1.147	0.001 *
Nkiras2	NFkB inhibitor interacting Ras-like protein 2	-1.166	0.001 *
Tlr5	Toll-like receptor 5	-1.342	0.001 *
Tgfb2	Transforming growth factor, beta receptor II	-1.119	0.002 *
Tnfsf15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-1.485	0.002 *
Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	-1.195	0.003 *
Msr1	Macrophage scavenger receptor 1	-1.160	0.008 *
Traf4	Tnf receptor associated factor 4	-1.139	0.008 *
Tnfrsf11a	Tumor necrosis factor receptors superfamily, member 11a	-1.186	0.014 *
Traf5	Tnf receptor-associated factor 5	-1.146	0.015 *
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	-1.185	0.017 *
Hspa5	Heat shock protein 5	1.231	0.022 *
Tlr3	Toll-like receptor 3	-1.149	0.027 *
Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-1.136	0.030 *

Ikbkg	Inhibitor of kappaB kinase gamma	-1.105	0.030	*
Il10	Interleukin 10	-1.287	0.034	*
Ptafr	Platelet-activating factor receptor	-1.149	0.038	*
Traf6	Tnf receptor-associated factor 6	-1.108	0.038	*
Irak1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-1.083	0.042	*
Tgfb1	Transforming growth factor, beta receptor I	-1.105	0.042	*
Ikbkb	Inhibitor of kappaB kinase beta	-1.077	0.047	*
Irak1bp1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1	-1.162	0.052	o
Tnf	Tumor necrosis factor	-1.234	0.052	o
Emr1	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	-1.166	0.074	o
Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1.488	0.077	o
Cd68	Cd68 molecule	-1.182	0.081	o
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	-1.103	0.084	o
Tlr2	Toll-like receptor 2	-1.265	0.084	o
Cd163	CD163 antigen	-1.099	0.089	o
Marco	Macrophage receptor with collagenous structure	-1.081	0.097	o
Csf1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	-1.124	0.121	
Il1a	Interleukin 1 alpha	-1.101	0.121	
Tgfb3	Transforming growth factor, beta receptor III	-1.094	0.121	
Il2	Interleukin 2	-1.273	0.132	
Tlr7	Toll-like receptor 7	-1.083	0.143	
Fcrls	Fc receptor-like 5, scavenger receptor	1.217	0.146	
Il1b	Interleukin 1 beta	-1.144	0.156	
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	1.823	0.169	
Irf1	Interferon regulatory factor 1	-1.127	0.183	
Malt1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	-1.092	0.183	
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	-1.063	0.197	
Rbx1	Ring-box 1	-1.076	0.197	
Il12a	Interleukin 12	-1.146	0.213	
Tlr6	Toll-like receptor 6	-1.133	0.213	
Cxcl16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-1.065	0.245	
Nr1h3	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	-1.068	0.262	
Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-1.032	0.265	
Tlr4	Toll-like receptor 4	-1.028	0.280	
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-1.090	0.284	
Rel	Reticuloendotheliosis oncogene	-1.059	0.284	
Rela	Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	-1.047	0.284	
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	1.000	0.305	
Tlr9	Toll-like receptor 9	-1.074	0.340	
Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	-1.046	0.348	
Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I	1.084	0.370	
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	1.058	0.394	
Lbp	Lipopolysaccharide binding protein	1.037	0.406	
Arg1	Arginase, liver	-1.026	0.430	
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-1.135	0.471	
Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	-1.053	0.471	
Ifng	Interferon gamma	-1.110	0.480	
Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-1.146	0.498	
Irak2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-1.052	0.498	
Creb1	cAMP responsive element binding protein 1	-1.025	0.512	
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1	-1.041	0.533	
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	-1.033	0.555	
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1.047	0.585	
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	1.185	0.585	

Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	1.064	0.615
Il2ra	Interleukin 2 receptor, alpha chain	1.096	0.646
Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	-1.107	0.646
Il12b	Interleukin 12b	-1.044	0.678
Mlxipl	MLX interacting protein-like	-1.059	0.678
Nfkb2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	1.032	0.678
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	-1.172	0.710
Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1.142	0.743
Ptges	Prostaglandin E synthase	1.039	0.743
Mrc1	Mannose receptor, C type 1	-1.037	0.771
Cd14	CD14 antigen	-1.064	0.835
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88	-1.027	0.844
Relb	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	1.008	0.844
Il6	Interleukin 6	-1.017	0.878
Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-1.064	0.947
Nkiras1	NFKB inhibitor interacting Ras-like protein 1	-1.013	0.965
Tnfaip3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-1.014	0.982

($n = 15$ mice). The values shown are fold change for sAHm vs noAHm. Significance is calculated with the Mann-Whitney test * $p < 0.05$ and $^{\circ}p < 0.1$

Supplementary Table 5. Relative expression of genes in the ileum of mice colonized with the IM from a patient with severe alcoholic hepatitis (sAHm) versus mice colonized with the IM from an alcoholic patient without alcoholic hepatitis (noAHm).

LIPID METABOLISM		Fold change	P	
CPT1	Diacylglycerol choline phosphotransferase	-1.499	0.008	*
MGAT2	Mannosyl (α -1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetyl glucosaminyl transferase	-1.345	0.049	*
RXR α	Retinoid X receptor alpha	1.177	0.055	o
GPR41 (FFAR3)	Free fatty acid receptor 3	-1.631	0.085	o
DGAT1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	-1.161	0.126	
PPAR δ	Peroxisome proliferator activator receptor delta	1.138	0.167	
GPR120 (FFAR4)	Free fatty acid receptor 4	1.197	0.198	
FABP2/L-FABP	Fatty acid binding protein 2, intestinal	1.399	0.320	
GPR43 (FFAR2)	Free fatty acid receptor 2	-1.211	0.344	
CD36/FAT	CD36 antigen	-1.269	0.452	
PPAR α	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	1.057	0.512	
FATP4	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	1.121	0.577	
GPR40 (FFAR1)	Free fatty acid receptor 1	-1.118	0.610	
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	-1.086	0.610	
ACS (Acsl1)	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-1.006	0.752	
FABP4/I-FABP	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	1.070	0.790	
INFLAMMATION				
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible (NOS2)	2.227	0.004	*
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-1.548	0.014	*
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	-1.245	0.069	o
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	-1.241	0.085	o
LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor (LITAF)	1.287	0.085	o
IL11	Interleukin 11	-1.304	0.182	
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-1.255	0.423	
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19	-1.149	0.544	
TLR5	Toll-like receptor 5	-1.166	0.544	
MIP2	Macrophage inflammatory protein 2	-1.195	0.645	
IL6	Interleukin 6	-1.297	0.680	
KC	Interleukin 8	-1.139	0.716	
IL1B	Interleukin 1, beta	-1.036	0.827	
TLR4	Toll-like receptor 4	-1.013	0.942	
TLR2	Toll-like receptor 2	1.048	0.981	
INTESTINE INTEGRITY				
OCLN	Occludin	1.205	0.085	
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	-1.098	0.344	
ZO-1	Tight junction protein 1	1.019	0.680	
CLDN1	Claudin 1	-1.151	0.752	
MICROBIAL PROTECTION				
Reg3g	Regenerating islet-derived 3 gamma	1.984	0.003	*
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)	1.678	0.008	*
Reg3b	Regenerating islet-derived 3 beta	1.447	0.062	o

ALCOHOL METABOLISM

ADH1	Alcohol dehydrogenase ADH1	-1.356	0.005	*
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2, tandem duplicate 2	1.109	0.104	
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain containing 3	1.222	0.512	

($n = 10$ mice). The values shown are fold change for sAH vs noAHm. Significance is calculated with the Mann-Whitney test $*P \leq 0.05$ and $^{\circ}P < 0.1$

Supplementary Table 6. Dysbiosis of bacteria in fecal samples from alcoholic donors without alcoholic hepatitis (noAH) or with severe alcoholic hepatitis (sAH) and their corresponding recipient mice (noAHm and sAHm).

	noAH donor	sAH donor	noAHm recipient mice	sAHm recipient mice	<i>P</i>
Chao1 index	1300.01	429.5	625.7±25.63	502.4±17.82	0.0041
<i>C. symbiosum</i>	-	+	-	+	
<i>C. bolteae</i>	-	+	-	+	
Gen. Bacteroides	12.72	43.97	22.4±0.82	32.15±0.93	<0.0001
Gen. Faecalibacterium	18.16	0	0.14±0.06	0.01±0.006	0.0472
Phyl. Bacteroidetes	37.07	62.04	56.75±1.08	62.03±0.61	0.0029
Gen. Butyrivibrio	0.15	0.65	0.87±0.1	2.7±0.19	<0.0001
Gen. Desulfovibrio	0.53	0.00	0.168±0.037	0.005±0.005	0.0004
Gen. Subdoligranulum	1.60	0.00	0.58±0.09	0.27±0.07	0.017
Gen. Blautia	0.29	0.59	0.062±0.02	0.165±0.02	0.008

The values reported are percentages. For *Clostridium symbiosum* and *Clostridium bolteae*: (+) indicates presence and (-) absence. Donors: noAH and sAH. Recipients noAHm and sAHm (*n*=10 per group). Values are means ± s.e.m. Significance was assessed by the Mann Whitney test comparing noAHm to sAHm.

Supplementary Table 7. Dysbiosis of bacteria in fecal samples of mice colonized with the IM from an alcoholic patient without alcoholic hepatitis (noAHm) and mice colonized with the IM from a patient with severe alcoholic hepatitis (sAHm).

	noAHm	sAHm
Cl Alphaproteobacteria	+	-
Cl Bacteroidia	+	-
Cl Betaproteobacteria	+	-
Ord Burkholderiales	+	-
Ord Coriobacteriales	+	-
Gen <i>Enterorhabdus</i>	+	-
Gen <i>Acetanaerobacterium</i>	+	-
Gen <i>Akkermansia</i>	+	-
Gen <i>Howardella</i>	+	-
Gen <i>Parasutterella</i>	+	-
Gen <i>Phascolarctobacterium</i>	+	-
Gen <i>Turcibacter</i>	+	-
Fam Alcaligenaceae	+	-
Phil Verrucomicrobia	+	-
Gen <i>Proteus</i>	-	+
Gen <i>Sporacetigenium</i>	-	+

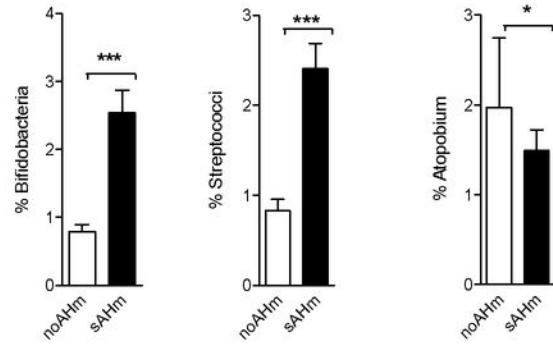
Results are reported as presence (+) or absence (-).

Supplementary Table 8. Nomenclature, sequences and targets of probes used for fluorescent in situ hybridization.

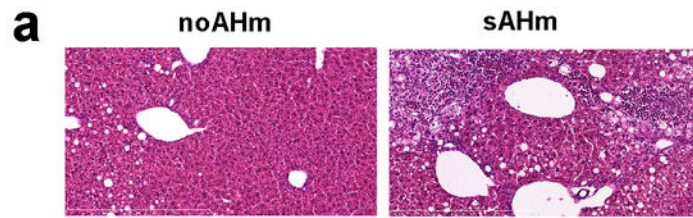
Probe name	Sequence (5' → 3')	Target	Fluorochrome
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC
NON EUB 338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus-Lactococcus-Enterococcus</i> group	5'CY5
	GTTTTTRTCAACGGCAGTC		
	Competitor 1		
Clep 1156	GRTTTRTCAYCGGCAGTC*	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	5'CY5
	Competitor 2		
	GTVTTRTCBACGGCAGTC*		
Ato 291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster and <i>Coriobacterium</i> group	5'CY5
Enter 1432	CTTTTGCAACCCACT	Enterobacteria	5'CY5
Erec 482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium coccoides</i> group	5'CY5
Stre 493	GTTAGCCGTCCTTTCTGG	Streptococci and Lactococci	5'CY5
Cdif198+Cperf 191	TCCATCCTGTACTGGCTCACC	<i>Clostridium difficile</i> and <i>Clostridium perfringens</i>	5'CY5
Muc 1437	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	<i>Akkermansia muciniphila</i>	5'CY5
Ecy1 387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	Erysipelotrichi	5'CY5
MIB 661	GCATTCGCGATACTTCTC	mouse intestinal Bacteria	5'CY5

*Y = C/T, R = G/A, K = G/T, M = C/A, W = A/T, B = C/G/T and V = G/C/A

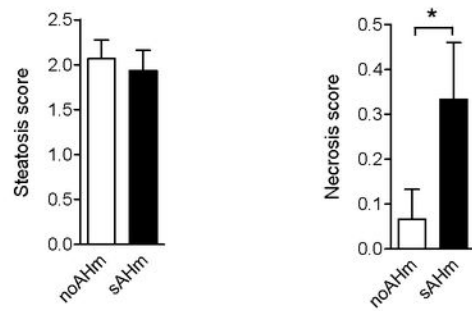
Supplementary Figure 1



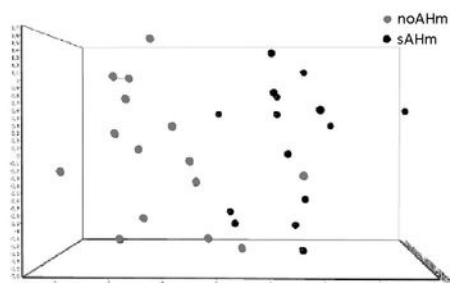
Supplementary Figure 2



b

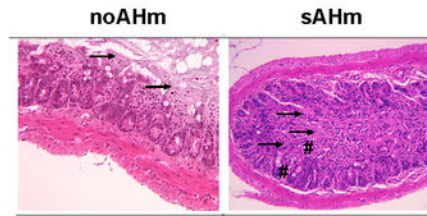


Supplementary Figure 3

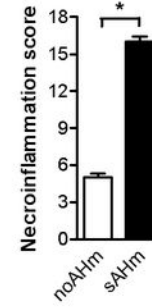


Supplementary Figure 4

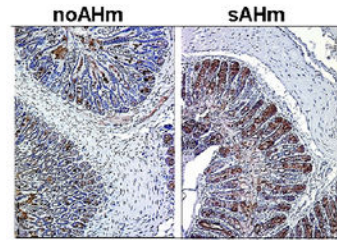
a



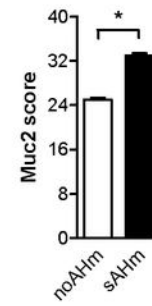
b



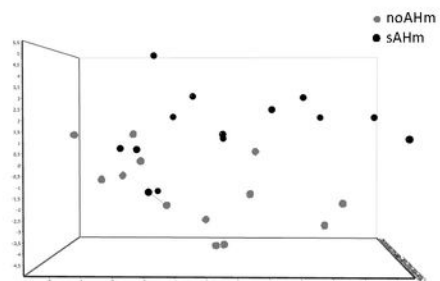
c



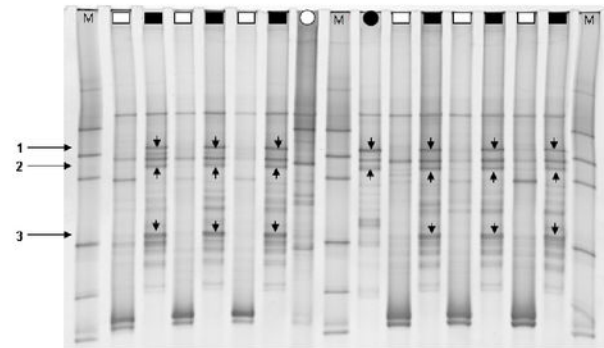
d



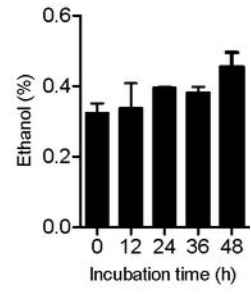
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

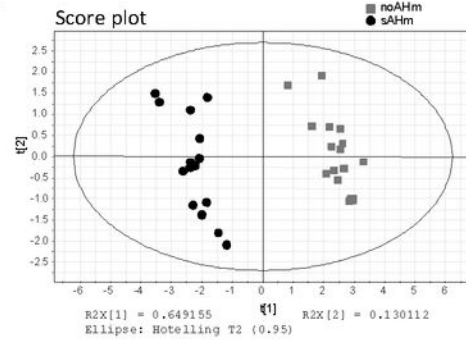


Supplementary Figure 7

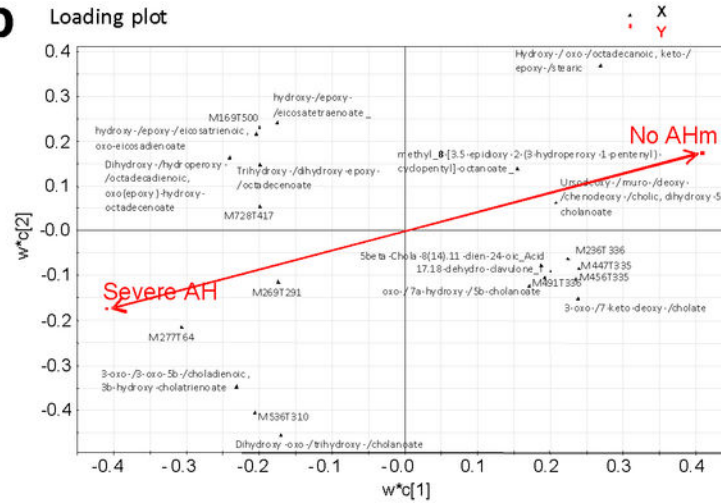


Supplementary Figure 8

a



b



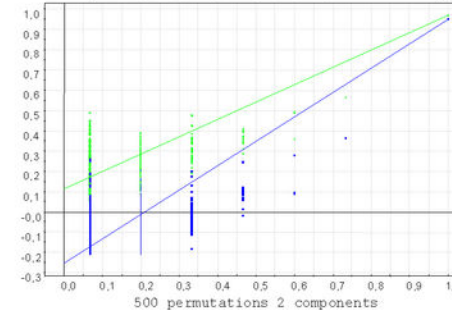
c

I

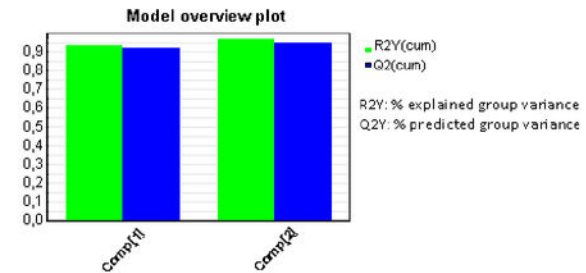
Model	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	29	29	1			1
Regression	27.48	4	6.87	112.8	1.2904e-015	2.62
Residual	1.52	25	0.061			0.26

II

Explained (R^2) and predicted (Q^2) variance after 500 permutations
 Intercepts: $R^2=(0.0, 0.111)$, $Q^2=(0.0, -0.253)$



III



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: FISH analysis of the fecal microbiota from noAHm and sAHm two weeks after IM transplant but prior to feeding on the alcoholic diet ($n=15$ per group). Data are presented as means and s.e.m, significance was assessed by the unpaired t test for Bifidobacteria and Streptococci, and the Mann Whitney test for Atopobium. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Supplementary Figure 2: Histological analysis of liver from recipient mice ($n=15$ for noAHm, $n=15$ for sAHm). **a)** Representative hematoxylin and eosin stained sections of liver from noAHm and sAHm groups. **b)** Mean scores of steatosis and necrosis. Data are presented as means and s.e.m, * $P < 0.05$, (Mann Whitney).

Supplementary Figure 3: Principal component analysis (PCA) of gene expression profiles in the liver of recipient mice. (P -values calculated with Student's t-test). This representation shows the separate clustering of the noAHm population (grey spots) and the sAHm population (black spots)).

Supplementary Figure 4: Histological analysis of intestine from recipient mice ($n=15$ for noAHm, $n=12$ for sAHm). **a)** Representative hematoxylin and eosin staining of sections of the ileum from noAHm and sAHm groups. Severe villi necrosis (shown by arrows) is observed in both noAHm and sAHm groups, but lamina propria inflammatory infiltrate (#) was observed in the sAHm group only. Original magnification x 250. **b)** Semi-quantification of necrosis and inflammation. **c)** Immunohistochemical staining of Muc-2 in colon sections from noAHm and sAHm. **d)** Semi-quantification of Muc-2 staining. Original magnification x 250.

Data are presented as means and s.e.m and significance was assessed by the Mann Whitney test **(b,d)**. * $P < 0.05$

Supplementary Figure 5: Principal component analysis (PCA) of gene expression profiles in the ileum of recipient mice. (P -values calculated with Student's t-test). This representation shows the separate clustering of the noAHm population (grey spots) and the sAHm population (black spots)).

Supplementary Figure 6: Fecal microbiota profiles from recipient mice and patient donor. Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE) of fecal samples from sAHm and noAHm ($n=6$ mice per group), collected after 5 weeks of feeding on the alcoholic diet. TTGE profiles for the corresponding patient donors are also shown. Black squares represent samples from the sAHm group, white squares from the noAHm group. Circles represent the donor for each group (black for sAHm and white for noAHm). Arrows show bands systematically detected in sAHm group (and donor). Band 1 corresponds to *Clostridium nexile*; band 2 corresponds to *Clostridium bolteae*, and band 3 corresponds to *Clostridium symbiosum*.

Supplementary Figure 7: *In vitro* production of ethanol by *Clostridium symbiosum* and *Clostridium nexile* ($n=2$). Results are the mean of ethanol percentage in the culture medium. Data are presented as means and s.e.m.

Supplementary Figure 8: Partial least square (PLS) discriminant analysis of the data presented in Fig. 4e. **a)** Total variance explained by the 2 significant components is $R^2 = 0.78$,

decomposed as $R^2[t1] = 0.65$ and $R^2[t2] = 0.13$. Each point on the score map represents the linear PLS combination of the metabolites values of each mouse.

Loading plot: weight of each metabolite X to explain the Y group score vector (severe AH or no AH) in the PLS regression. The weight can be inferred by projecting orthogonally each X (metabolite) on the Y vectors (higher weights when shifting from the origin, i.e. plot centre).

b) Metabolites annotation as in Fig. 4e of the manuscript.

c) Model validations indicate a perfect discrimination between noAHm and sAHm based on the metabolites selected (P value = 1.29×10^{-15} after cross-validation ANOVA), (I). The robustness of the model is further validated by the other validation parameters (permutations test and explained $R^2(Y)$ and predicted $Q^2(Y)$ group variances) (III).

I) The significance of the PLS model estimated through response permutation testing. The method first estimates a PLS model and its R^2Y and Q^2Y ; then, with X fixed, the order of the elements in the Y-vector is randomly permuted a number of times, say 100–1000 times. Each time a new PLS model is fitted using X and the permuted Y, providing a reference distribution of R^2Y and Q^2Y for random data. These distributions are then used to appraise the statistical significance of the R^2Y - and Q^2Y -parameters of the original ‘unperturbed’ PLS model; CV-ANOVA uses an F-test for the significance test (hypothesis test) of the null hypothesis of equal residuals of the two models²⁷.

II) The permutation test compares the goodness of fit (R^2 and Q^2) of the original model with the goodness of fit of several models based on data where the order of the Y-observations (class assignment) has been randomly permuted, whereas the X-matrix (biological variables) has been kept intact. R^2Y and mostly Q^2Y must decrease when observations are permuted across classes; especially, Q^2Y must have negative values with the intercept of the vertical axis.

III) R^2Y , fraction of the group variance modeled by all components, Q^2Y , predictable fraction of the group variance modeled by all components after cross-validation. 'Comp' for component.