



HAL
open science

Modifications du microbiote digestif de souris infectées par *Helicobacter pylori* en réponse à la metformine

Marine Jauvain

► **To cite this version:**

Marine Jauvain. Modifications du microbiote digestif de souris infectées par *Helicobacter pylori* en réponse à la metformine. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03263238

HAL Id: dumas-03263238

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03263238v1>

Submitted on 17 Jun 2021

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

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

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n°51

Mémoire du **DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Tenant lieu de Thèse pour l'obtention du

DIPLÔME d'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 31 mai 2021 à Bordeaux par

Marine JAUVAIN

Née le 15 janvier 1993 à Charleville-Mézières

**Modifications du microbiote digestif de souris infectées par
Helicobacter pylori en réponse à la metformine**

Sous la direction de :
Madame le Docteur Emilie Bessède

Membres du jury :

Madame le Professeur Véronique DUBOIS
Monsieur le Professeur Philippe LEHOURS
Madame le Docteur Emilie BESSEDE
Madame le Docteur Karine DEMENTHON
Monsieur le Docteur Raphaël ENAUD

Présidente
Juge
Juge
Juge
Juge

Remerciements

Au Professeur Véronique Dubois,

Je te remercie énormément d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je te suis très reconnaissante de ne jamais cesser de transmettre tes connaissances au quotidien au laboratoire, et je te remercie également pour ta grande disponibilité et tes conseils qui m'ont permis de m'épanouir dans cette spécialité qu'est la bactériologie. C'est un plaisir et une chance d'apprendre à tes côtés.

Au Professeur Philippe Lehours,

Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche et de m'avoir lancée dans cette belle aventure qu'est l'étude du microbiote. Merci pour vos conseils précieux, pour le partage de vos connaissances notamment pour me faire découvrir le monde fabuleux de QIIME, et aussi pour votre rigueur qui m'a encouragée à fournir un travail toujours plus abouti. Je vous admire beaucoup et je suis très heureuse que vous ayez accepté de participer à ce jury de thèse.

Au Docteur Karine Dementhon,

Merci d'avoir immédiatement accepté de participer à ce jury, veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Docteur Raphaël Enaud,

Je te remercie pour ta disponibilité, ton aide et tes réponses toujours très pédagogiques et complètes lors de la réalisation de ce projet. Je suis honorée et reconnaissante que tu aies accepté de juger ce travail.

Au Docteur Emilie Bessède,

Je te remercie infiniment pour ton encadrement pour cette thèse et la publication de cet article. Merci de m'avoir confié ce beau projet, pour la confiance que tu m'as accordée et pour ces nombreuses conversations toutes plus enrichissantes les unes que les autres. Tu es toujours très disponible et bienveillante et je te suis très reconnaissante pour tout le temps passé sur mes travaux. Je serais très heureuse de pouvoir continuer à apprendre à tes côtés.

A l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce travail :

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe 2 de l'UMR BaRITOn qui m'a accueillie pendant un an ; au Pr Francis Mégraud, au Pr Christine Varon, au Dr Armelle Ménard, au Dr Océane Martin ainsi qu'à Lornella, Camille, Elodie, Alban, Jérôme, Sarah et toute l'équipe du CNR des Campylobacters et Hélicobacters ; Lucie, Astrid, Chloé et Quentin, merci pour vos précieux conseils et pour le temps passé à m'initier à l'univers de la recherche, j'ai énormément appris à vos côtés.

Je remercie également Sarah Courtois pour les travaux qu'elle a effectués et qui ont précédé la réalisation de ce projet, pour sa rigueur pour la conservation et la préparation des échantillons sans lesquels ce projet n'aurait pas pu aboutir.

Aux personnes qui ont contribué à ma formation :

Au Pr Cécile Bébéar, je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous m'accordez, mais aussi pour votre soutien et votre bienveillance pendant les différentes étapes de mon internat. Au Pr Sabine Pereyre, au Dr Olivia Peuchant et au Dr Alice Blosse un grand merci pour votre pédagogie et vos enseignements pendant ces différents semestres, et également pour la confiance que vous m'avez donnée pour la validation de vos paillasses impliquant des échanges qui me font progresser chaque jour. Merci également au Dr Léa Bientz et au Dr Jennifer Guiraud qui m'ont accompagnée pendant ce dernier semestre et qui m'ont permis d'énormément évoluer.

Également un grand merci à l'ensemble de l'équipe technique du laboratoire de bactériologie avec qui j'ai partagé trois semestres d'internat, merci pour le temps passé à la paillasse pour me faire découvrir cette discipline qui me passionne aujourd'hui. Je suis très heureuse d'avoir commencé mon parcours avec vous. Un petit mot spécial pour Lison, qui m'a formée dès mes premiers jours, toujours avec beaucoup de patience et de pédagogie, et Estelle pour sa bonne humeur communicative au quotidien.

Merci à l'ensemble des biologistes que j'ai pu côtoyer dans les différents laboratoires de biologie au cours de mon internat et qui ont participé à ma formation.

Un petit mot en particulier au Pr Laurence Delhaes, au Dr Frédéric Gabriel et au Dr Isabelle Accoceberry, merci pour ce semestre très formateur à vos côtés en mycologie-parasitologie, ce fut un stage extrêmement enrichissant tant sur le plan professionnel que personnel.

Merci également au Pr Marie-Edith Lafon pour sa gentillesse et son accueil au sein du laboratoire de virologie, au Dr Pascale Trimoulet, au Dr Isabelle Garrigue pour le partage sans limite de leurs connaissances et au Dr Camille Lebreton une assistante très présente et à l'écoute.

A ma famille :

Je ne serais pas ici si vous ne m'aviez pas soutenue et encouragée depuis le début de mes études. Il a été essentiel pour moi de savoir que quoi qu'il arrive, en cas d'échec vous seriez là pour m'aider à rebondir. J'ai conscience de la chance incroyable que j'ai eu de grandir à vos côtés, merci pour tout.

A mes parents, Thierry et Marie-Laure,

Maman, simplement merci de toujours m'accompagner de la meilleure des façons, merci de m'avoir rappelée la nécessité de souffler pendant les révisions, pour tous ces bons petits plats et d'avoir passé avec moi toutes les étapes de ces longues études. Merci pour cette présence si rassurante, tes mots toujours justes et ton dévouement au quotidien pour qu'Orlane et moi ayons la vie la plus belle. Papa, tu m'as appris à toujours faire de mon mieux mais sans jamais aucune pression, merci de m'avoir toujours encouragée dans mes choix et de m'avoir transmis cette passion pour le sport qui nous caractérise si bien tous les deux. Merci pour ta bonne humeur, tes blagues douteuses et pour tous ces footings partagés. Je suis fière de te ressembler.

A Orlane, ma petite sœur, merci pour ton soutien pendant nos années ensemble à la fac où tu as été un véritable pilier pour moi. Merci pour ces fous rires et ces soirées mémorables. Nous avons évolué main dans la main et je suis heureuse que nous terminions ensemble ces longues études. Je suis fière de cette belle relation que nous avons créée.

A mes grands-parents, Pierre, Colette et Simone merci pour votre soutien et pour la place primordiale que vous occupez dans ma vie, vous rendre fière est un grand bonheur. A mon grand-père Roger qui doit aussi être fier.

A ma tata Mimi et mon tonton Michel, merci pour ces parenthèses merveilleuses en Bretagne, les révisions se passent toujours mieux au bord de l'océan avec des crêpes et une bolée de cidre.

A ma marraine Elise et Alain, merci pour tous vos précieux conseils, ces sorties en voiliers et ces premières conversations autour du microbiote.

A Philippe, Laure, Alice et Eve, merci pour tous ces moments formidables partagés aux quatre coins de la France et de l'Europe.

A Benjamin, merci pour ta bonne humeur et de toujours répondre présent pour un petit tour en Belgique ou une ascension en ski.

A ma belle-famille, André, Muriel, Théo et Romane, merci pour cet accueil si chaleureux et pour votre bonne humeur, je suis certaine que l'avenir nous réserve de bons moments tous ensemble.

A mes amis :

A Laura et Justine, mes copines d'enfance, nous avons bien grandi et ne vivons plus les unes à côté des autres mais c'est à chaque fois un plaisir de vous retrouver.

Aux copains du lycée ; Lara, Thomas, Clara, Théophile, Salim-Eric, Charlotte, Lucile, Maxime et Florine qui m'ont toujours encouragée. A Thibaut, tu es toujours là pour faire rire ta Praline après toutes ces années, merci d'être ce que tu es et pour la confiance placée en moi pendant tous ces TP. Mais aussi à Camille, merci de m'avoir soutenue pendant cette PACES que nous avons traversée ensemble, je crois que cela crée des liens particuliers, merci pour cette belle amitié.

A tous les copains de la fac de pharma à Reims et particulièrement à Lorine, Corentin et Thibaut. Nous avons été inséparables à la fac, ces années auraient été bien différentes sans vous trois à mes côtés. Merci pour ces soirées, ces fous rires inoubliables et merci Corentin de m'avoir accompagnée en cours, presque jusqu'à la fin !

A Justine, merci pour tous ces voyages partagés ensemble qui ont toujours été une aventure ! Tu m'as énormément fait évoluer et grandir et je te remercie pour ça, j'ai hâte de te retrouver.

A Maxime, mon meilleur binôme de cet internat, merci pour ton soutien et l'image si positive que tu as de moi qui me redonne toujours confiance, je sais que ce n'est que le début d'une belle amitié.

Aux copains rencontrés à l'internat ; à Julie, merci pour toutes ces conversations que ce soit en courant ou bien au bord de la piscine, à Cécile, pour ta fraîcheur et ta joie de vivre, et à Mickaël, merci pour tout ce que tu apportes aux personnes qui te côtoient, tu es un véritable rayon de soleil.

Aux autres copains de l'île intense ; Maïté, Thomas, Nicolas, Solène, Lucile et Charlotte toujours prêts pour les bons plans (de Micka), merci pour ces moments incroyables passés ensemble : de ce voyage magnifique à la Réunion, en passant par des crémaillères folles, ou encore lors de cette AG bordelaise.

Aux copains dijonnais ; Louis, Margaux, Clémence et Romain, merci de m'avoir accueillie comme l'une des vôtres.

A tous les internes rencontrés ; Guillaume, merci pour ta pédagogie et ta patience dès les premiers jours. Florent, merci pour tes blagues mais aussi pour nos conversations presque philosophiques. Merci à Florian, Jacques, Medhi, Charly, Charlotte et ceux que je n'aurais pas cités qui ont rendu cet internat riche en bons moments.

Merci également à mes co-internes de bactério lors de ce dernier stage, pour votre soutien lors de la rédaction de cet article et d'avoir partagé ma joie lors de sa publication.

Enfin, à Thibault, merci de partager ma vie et pour tout l'amour et le soutien que tu m'apportes. C'est un véritable bonheur de vivre à tes côtés, merci de rendre le quotidien si doux et chacun de nos voyages si incroyables. C'est une nouvelle page qui se tourne et j'ai hâte que nous écrivions la suite de l'histoire ensemble.

Table des matières :

Introduction générale	8
I) Le microbiote digestif :.....	8
I.1. Composition du microbiote digestif :.....	8
I.2. Facteurs de l'hôte pouvant moduler le microbiote digestif :.....	10
I.3. Microbiote digestif et carcinogénèse :.....	13
I.4. Méthodes d'étude du microbiote digestif :	14
I.4.i. Méthodes dépendantes de la culture :.....	15
I.4.ii. Caractérisation moléculaire du microbiote :	16
I.5. Analyse des données et caractérisation du microbiote digestif :	23
I.5.i. Alpha diversité :.....	24
I.5.ii. Bêta diversité :.....	24
I.5.iii. Etude des fonctions du microbiote digestif :	25
II) Metformine :	27
II.1. Utilisation de la metformine dans le diabète non-insulino dépendant :.....	27
II.2. La metformine, de nouvelles propriétés prometteuses :	29
II.3. Activité anti-cancéreuse de la metformine :.....	29
II.3.i. Etudes épidémiologiques :.....	29
II.3.ii. La metformine, une molécule candidate pour la prise en charge et la prévention du cancer :.....	30
II.3.iii. Mécanisme d'action de la metformine dans la carcinogénèse :.....	30
Objectif du travail de thèse	33
Article original	34
Discussion générale et conclusion	66
Références bibliographiques de l'introduction et de la discussion générale	71
Serment de Galien.....	77

Liste des figures de l'introduction générale :

Figure 1 : Organisation bactérienne dans le tractus gastro-intestinal inférieur de l'homme (d'après Donaldson et <i>al.</i>, 2016, (3))	9
Figure 2 : Microbiote humain : apparition, évolution et perturbation au cours des étapes de la vie (Ottman et <i>al.</i>, 2012, (25))	13
Figure 3 : Principe de la culturomique (Lagier et <i>al.</i>, 2018, (40))	16
Figure 4 : Principe simplifié de la métagénomique ciblée	17
Figure 5 : Schéma représentatif de l'ADNr16S (d'après ezbiocloud.net).	18
Figure 6 : Les différentes étapes du séquençage par la méthode Illumina (d'après Illumina.net)	20
Figure 7 : Stratégies de clustering (d'après Navas-Molina et <i>al.</i>, 2013, (41))	22
Figure 8 : Comparaison entre l'approche « clustering-first » et « assignment-first » (d'après Siegwald et <i>al.</i>, 2017, (42))	23
Figure 9 : Analyse en coordonnées principale de différents échantillons provenant de différents sites digestifs à partir des distances Weighted Unifrac	25
Figure 10 : La metformine inhibe la production hépatique de glucose (d'après Viollet et <i>al.</i>, 2012, (50))	28
Figure 11 : Activités antitumorales de la metformine (d'après Daugan et <i>al.</i>, 2016, (69))	31

Liste des abréviations :

ADA : American Diabetes Association
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGCC : Acide gras à chaîne courte
AMPK : AMP-activating protein kinase
ARN : Acide ribonucléique
ASV : Amplicon Sequence Variant
BHI : Brain Heart Infusion
CRC : Colorectal cancer
CSC : Cellule Souche Cancéreuse
EASD : European Association for the Study of Diabetes
HAS : Haute Autorité de Santé
IGF-R1 : Insulin-like Growth Factor Receptor
IR : Insulin Receptor
KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO : KEGG Orthologs
LDA : Linear Discriminant Analysis
LEFSE : Linear discriminant analysis effect size
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
OD : Optical density
OTU : Operational Taxonomic Unit
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCoA : Principal coordinate analysis
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD : Phylogenetic Distance
PICRUSt : Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
RDP : Ribosomal Database Project
SBS : Sequencing By Synthesis
TAME : Targeting Aging With Metformin
TNF : Tumor Necrosis Factor
UFC : Unité Formant Colonie

Introduction générale

I) Le microbiote digestif :

Le microbiote se définit par l'ensemble des micro-organismes qui colonisent l'être humain. Depuis plusieurs années, les connaissances concernant le microbiote ont énormément évolué, non seulement en ce qui concerne sa composition mais également sur son rôle physiologique exercé chez son hôte. Le microbiote est composé de bactéries, mais également d'autres micro-organismes comme les virus, les champignons ou encore les archées. L'être humain possède des microbiotes propres à différents sites anatomiques, comme le microbiote cutané, vaginal, pulmonaire ou encore le microbiote digestif. Cette thèse portera sur le microbiote digestif bactérien.

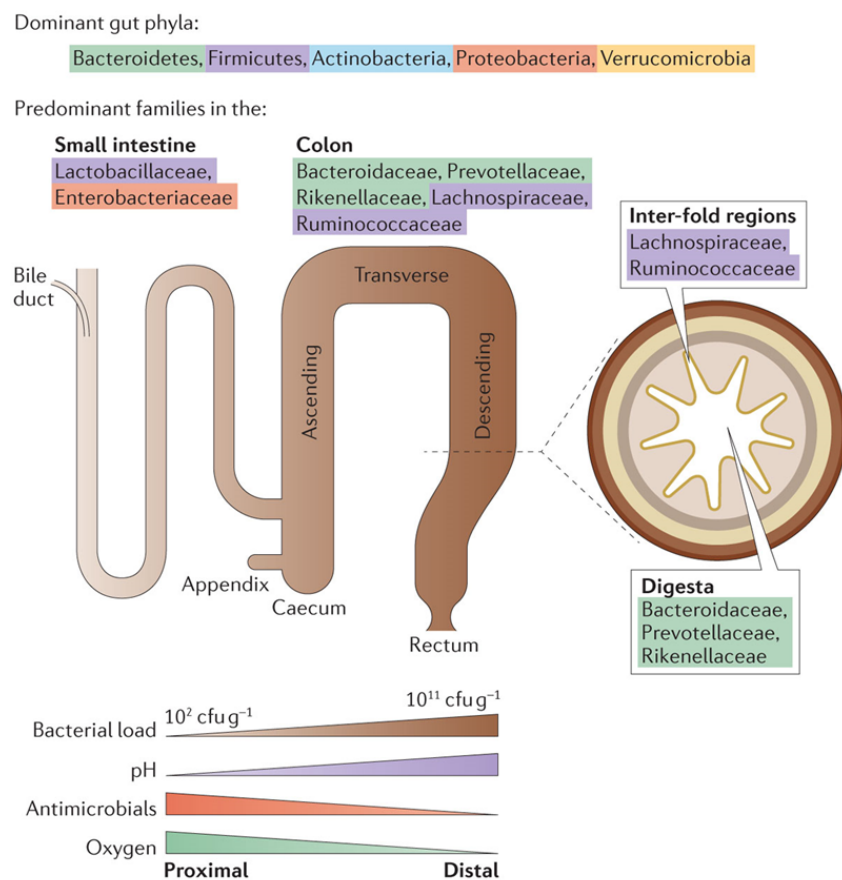
I.1. Composition du microbiote digestif :

Le microbiote digestif est composé d'environ 100 000 milliards de bactéries qui appartiennent à des centaines d'espèces différentes (1). Quarante-vingt-dix pour cent de ces espèces bactériennes appartiennent à 4 grands phyla : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Le microbiote digestif est soumis à différentes contraintes physiologiques (pH, concentration en sels biliaires, concentration en peptides antimicrobiens ou encore le péristaltisme) qui vont déterminer la composition bactérienne dominante au sein de chaque site digestif.

Le microbiote gastrique correspond à l'ensemble des bactéries qui colonisent l'estomac. Pendant longtemps, il était établi que l'estomac était un environnement stérile qui ne pouvait pas être le site d'une colonisation bactérienne à cause de la trop forte acidité du contenu gastrique, le pH pouvant varier entre 1,5 durant la nuit et 5 au moment de la digestion (2). Il est maintenant bien établi qu'un microbiote gastrique existe, mais ce dernier a jusqu'à maintenant été assez peu étudié notamment en comparaison avec les études du microbiote fécal. L'estomac est beaucoup moins colonisé que l'intestin ou le colon puisque le microbiote gastrique est composé de 10^{1-3} Unité Formant Colonie (UFC) par gramme de contenu (3). L'infection par la bactérie *Helicobacter pylori* influence de manière importante la composition du microbiote gastrique d'un individu. Ce bacille Gram négatif microaérophile qui appartient au phylum des *Proteobacteria*, est capable de coloniser la muqueuse gastrique. Lorsque ce dernier est présent, il domine le microbiote gastrique des patients infectés et la diversité du microbiote gastrique de ces patients est significativement diminuée (4).

En revanche, les patients non infectés ont un microbiote gastrique dominé par les bactéries du phylum des *Actinobacteria* (comprenant les *Bifidobacterium* sp.) et des *Firmicutes* (comprenant les *Lactobacillus* sp. et les *Streptococcus* sp.) (5).

Au sein même du tractus gastro-intestinal inférieur il existe une variété d'habitats microbiens distincts le long de l'intestin grêle, du cæcum et du côlon (Figure 1). Les gradients chimiques et nutritifs ainsi que l'activité immunitaire de l'hôte influencent la composition de la communauté bactérienne présente.



Nature Reviews | Microbiology

Figure 1 : Organisation bactérienne dans le tractus gastro-intestinal inférieur de l'homme (d'après Donaldson et al., 2016, (3))

Dans l'intestin grêle, le pH est plus acide et l'oxygène est encore présent en faible quantité par rapport au côlon. La présence d'acides biliaires au niveau du duodénum influence également la composition du microbiote bactérien, les acides biliaires ayant un effet bactéricide sur certaines espèces (6). La composition du microbiote est également influencée par la présence de peptides antimicrobiens retrouvés en plus grande concentration au niveau de l'intestin grêle (3).

La communauté bactérienne de l'intestin grêle est donc plutôt dominée par des espèces bactériennes anaérobies facultatives qui vont tolérer la présence d'acides biliaires notamment au niveau du duodénum. Chez l'homme, la charge bactérienne intestinale est comprise entre 10^4 et 10^8 UFC par gramme de contenu et les phyla dominants sont les *Firmicutes* et les *Proteobacteria* (3).

Le cæcum et le côlon accueillent les communautés bactériennes les plus denses avec environ 10^{11} UFC par gramme de contenu, et les plus diversifiées par rapport à l'ensemble des autres types de microbiotes que le corps humain abrite. L'environnement retrouvé au niveau du cæcum et du côlon est caractérisé par une faible concentration en peptides antimicrobiens, un temps de transit lent, une atmosphère anaérobie stricte et une faible quantité de sucre simple disponible. Ces conditions vont favoriser la croissance de bactéries anaérobies fermentatives qui vont dégrader les polysaccharides comme par exemple la famille des *Bacteroidaceae* (3).

Le microbiote digestif est dominé par des populations bactériennes différentes en fonction du site digestif étudié. Différents paramètres, dépendants ou indépendants de l'hôte influencent la composition du microbiote digestif de chaque individu.

1.2. Facteurs de l'hôte pouvant moduler le microbiote digestif :

Le microbiote digestif d'un même individu à l'âge adulte subit peu de variations mais il existe d'importantes variations interindividuelles liées à des facteurs physiologiques et de l'environnement qui influencent la composition du microbiote digestif. Sans être exhaustif, voici quelques exemples de facteurs qui peuvent influencer la composition du microbiote digestif.

✓ Age :

Le microbiote digestif de l'enfant va évoluer au cours des premiers mois de vie sous l'influence de l'environnement et de l'alimentation pour se stabiliser vers l'âge de 3 ans (7). Après une grande période de stabilité, le microbiote digestif se modifie chez la personne âgée de plus de 65 ans. Les changements physiologiques liés à l'âge (modification des capacités d'absorption intestinale, hypochlorhydrie) et l'usage de nombreux médicaments dont des antibiotiques sont des facteurs entraînant des modifications du microbiote digestif de la personne âgée. Les principales caractéristiques du microbiote digestif du sujet âgé sont une plus grande variabilité interindividuelle associée à une diminution de la biodiversité (8).

✓ Sexe :

Certaines études suggèrent que le genre a un impact limité sur le microbiote digestif (9,10) alors que d'autres ont montré des différences dans la composition du microbiote entre les sexes (11,12). Ces études sont difficiles à mener chez les êtres humains. Chez les souris avec un terrain génétique déterminé, dans un environnement contrôlé, les mâles et les femelles présentent des différences au niveau de l'abondance de certains taxons bactériens. Ces modifications pourraient être médiées par les hormones sexuelles (13). Le génotype semble néanmoins avoir un impact plus déterminant que le sexe sur la composition du microbiote (9).

✓ Régime alimentaire :

Le régime alimentaire influence dès les premiers jours de vie la composition du microbiote digestif (14). En fonction du régime alimentaire, la nature des polysaccharides présents influence la composition de la communauté bactérienne au niveau de la lumière digestive. La modification de la nature et de la teneur en polysaccharides du régime alimentaire entraîne la sélection d'espèces capables de métaboliser les polysaccharides spécifiquement présents (15). Une modification radicale à court terme du régime alimentaire entraîne des changements dans la structure du microbiote digestif. Une alimentation d'origine essentiellement animale est liée à une augmentation de l'abondance des bactéries tolérantes aux acides biliaires (*Alistipes spp.* et *Bacteroides spp.*) et à une diminution de l'abondance des *Firmicutes* qui métabolisent notamment les polysaccharides végétaux. Quelques jours de modification de régime alimentaire suffisent pour visualiser ces changements, le microbiote digestif peut donc réagir rapidement à une modification de régime alimentaire (16). Ces effets sont réversibles lorsque la modification du régime est de courte durée. Il s'agit d'une adaptation transitoire du microbiote par l'intermédiaire de la prolifération sélective de certaines espèces bactériennes au niveau de la lumière digestive alors que le compartiment bactérien présent au niveau des muqueuses reste inchangé.

✓ Traitements antibiotiques :

Les antibiotiques, en exerçant leurs activités sur les bactéries composant le microbiote digestif, en modifient la composition et peuvent entraîner des effets délétères plus ou moins persistants chez les patients.

Une étude réalisée sur des volontaires sains traités par de la clindamycine pendant une semaine, a mis en évidence une diminution de la diversité du microbiote, la perte de la représentation de certains taxons ou bien encore l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques. Ces effets ont persisté de six mois jusqu'à deux ans après l'arrêt du traitement (17). De plus en plus de questions se posent sur les conséquences à long terme de la prise d'antibiotique pendant l'enfance en lien avec la modification du microbiote digestif (18). Chez les jeunes enfants, l'exposition aux antibiotiques est associée à un risque accru de développer diverses maladies, comme le diabète, l'obésité, l'allergie ou encore l'asthme (18,19). La causalité de cette corrélation a été montrée sur des modèles expérimentaux murins. Les antibiotiques administrés à de jeunes souriceaux, en perturbant le développement du microbiote pendant la période de croissance, entraînent des perturbations métaboliques qui influencent la croissance osseuse et altèrent le développement immunologique normal (20).

✓ Autres médicaments :

Aujourd'hui de plus en plus de médicaments non antibiotiques ont été associés à des changements dans la composition du microbiote digestif. C'est le cas par exemple de certains inhibiteurs de la pompe à proton (21), d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (22) ou encore d'antipsychotiques atypiques (23). Une équipe a récemment étudié l'effet de 835 médicaments non-antibiotiques commercialisés, sur 40 souches bactériennes digestives représentatives. Dans cette étude 24% des médicaments testés, provenant de différentes classes thérapeutiques, inhibaient la croissance d'au moins une souche *in vitro* (24). Dans cette même étude des mécanismes communs de résistance aux antibiotiques et aux médicaments non antibiotiques ont été mis en évidence, suggérant la possibilité que les substances non antibiotiques favorisent la survenue de résistance aux antibiotiques. Cette hypothèse mérite des études plus approfondies et les effets de médicaments non antibiotiques sur le microbiote digestif restent encore à caractériser.

Le microbiote digestif est donc modulé, tout au long de la vie, par de nombreux facteurs (Figure 2).

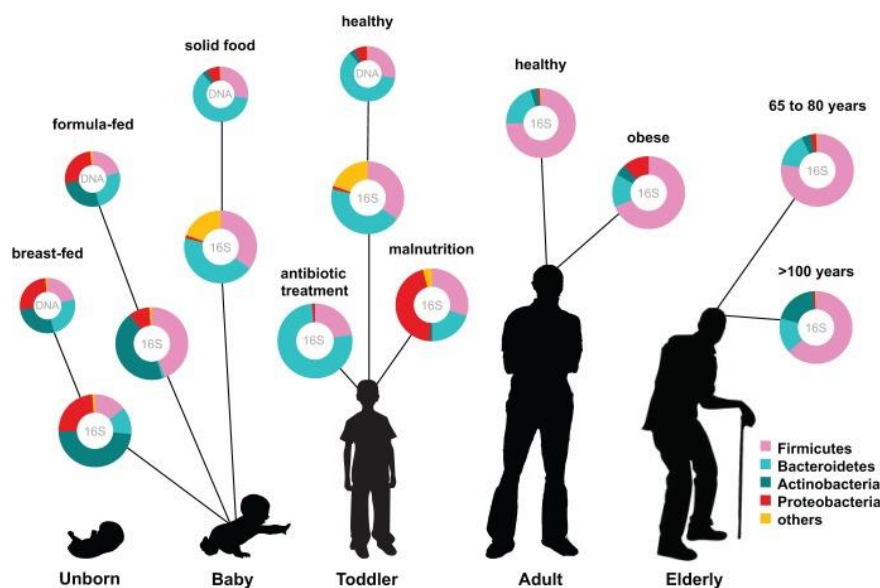


Figure 2 : Microbiote humain : apparition, évolution et perturbation au cours des étapes de la vie (Ottman et al., 2012, (25))

1.3. Microbiote digestif et carcinogénèse :

Chez un individu en bonne santé, le microbiote digestif et son hôte entretiennent une relation symbiotique où chaque partie tire des bénéfices nutritionnels et énergétiques. Le microbiote digestif est considéré comme un organe à part entière et exerce différentes fonctions au sein du corps humain. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques, dans la maturation du système immunitaire de l'hôte et joue un rôle protecteur de l'épithélium intestinal.

En revanche, le microbiote digestif peut également avoir une influence sur le développement de certaines pathologies et notamment sur la survenue de cancers digestifs. Il est désormais bien établi que les facteurs environnementaux et le microbiote digestif jouent un rôle essentiel dans l'histoire naturelle des cancers digestifs (26). L'infection par la bactérie *Helicobacter pylori* est l'un des exemples les mieux décrits.

H. pylori est retrouvé chez 93,2% des patients atteints de cancer gastrique (27). La bactérie colonise la muqueuse gastrique et entraîne systématiquement une gastrite chronique. Cette gastrite pourra évoluer dans 1% des cas vers un cancer gastrique (28). En 1994, l'Organisation Mondiale de la Santé a classé *H. pylori* comme carcinogène de classe I, et l'éradication de *H. pylori* permet de faire régresser les gastrites superficielles et la plupart des gastrites chroniques, prévenant ainsi le cancer de l'estomac (29).

Parmi les facteurs de risques influençant la survenue du cancer gastrique chez les patients infectés par *H. pylori*, on retrouve les facteurs environnementaux de l'hôte incluant le microbiote digestif. Différentes études ont pu montrer que le microbiote gastrique était modifié en fonction du statut de l'infection par *H. pylori*, rapportant notamment une diminution importante de la diversité du microbiote gastrique en cas d'infection par la bactérie (4). Une équipe a identifié des modifications de la diversité et de la richesse des microbiotes gastriques chez des patients en fonction de l'état d'évolution de la muqueuse au cours de la carcinogenèse gastrique (30). Enfin, il a également été montré que les patients atteints de cancer gastrique présentaient une communauté microbienne dont l'activité nitrate réductase était augmentée par rapport aux patients présentant une gastrite chronique simple (31).

D'autre part, dans le modèle du cancer colorectal, les micro-organismes présents au niveau des muqueuses digestives font partie du microenvironnement tumoral et peuvent influencer la croissance du cancer (32). L'impact du microbiote sur la carcinogenèse colorectale a été particulièrement étudié. Des selles de patients atteints de cancer colorectal ou de patients sains ont été administrées à des souris chez qui une néoplasie a été induite chimiquement. L'administration des selles des patients atteints de cancer colorectal a induit une augmentation du nombre de polypes, du niveau de dysplasie intestinale ainsi que des marqueurs de l'inflammation en comparaison avec les souris qui ont reçu les selles de patients sains (33). Il est par ailleurs maintenant bien établi que l'inflammation chronique est un facteur de risque du développement de cancer (34) et le microbiote, en fonction de sa composition, peut moduler l'environnement inflammatoire et promouvoir la carcinogenèse (35).

Le microbiote peut influencer la carcinogenèse de différentes manières, que ce soit en augmentant ou en diminuant le risque de cancer pour un hôte. Il peut agir en modifiant l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire, en modulant le fonctionnement du système immunitaire ou encore en influençant le métabolisme de facteurs produits par l'hôte, des aliments consommés ou des médicaments (36).

1.4. Méthodes d'étude du microbiote digestif :

Les premières descriptions du microbiote digestif ont été faites dès le début du XXème siècle. Depuis, le microbiote digestif fait l'objet de plus en plus de publications.

Ce sont les progrès et l'amélioration des techniques culturales et de séquençages qui ont permis une meilleure compréhension de ce dernier. Mais les études du microbiote sont complexes et présentent souvent des limites importantes. De nombreuses contraintes sont à prendre en compte pour donner une image la plus complète possible de sa composition.

I.4.i. Méthodes dépendantes de la culture :

Les méthodes classiques de cultures bactériennes ont longtemps été les seules méthodes à disposition des laboratoires pour l'étude du microbiote digestif. La reconstitution des conditions proches de l'environnement digestif est cependant complexe. Ces contraintes ont entraîné des anomalies de dénombrement, puisqu'on estime qu'environ 50% des espèces détectées par des approches moléculaires ne sont pas cultivables (37).

Cependant, depuis 2007, grâce aux progrès des techniques de culture, principalement apportées par les microbiologistes environnementaux (38), les méthodes d'étude du microbiote basées sur la culture ont connu un essor important. La culturomique microbienne repose sur la multiplication des conditions et des milieux de culture combinés avec des incubations prolongées (Figure 3). L'identification bactérienne repose dans un premier temps sur la spectrométrie de masse par MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight). Puis, les bactéries qui n'ont pas pu être identifiées par cette méthode, sont identifiées dans un second temps après séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr16S) (39). Cette technique a permis de mettre en évidence de nombreuses espèces présentes dans le microbiote digestif qui était jusqu'alors inconnues (40).

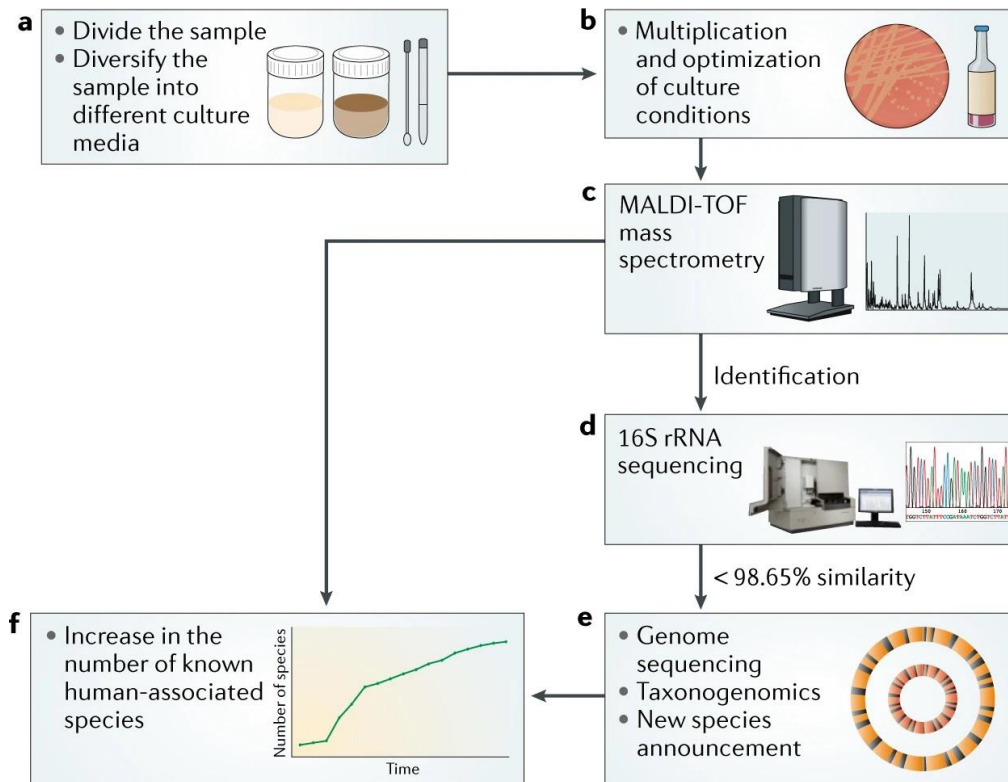


Figure 3 : Principe de la culturomique (Lagier et al., 2018, (40))

L'avantage de cette technique pour la compréhension du microbiote digestif et de son interaction avec son hôte, est que contrairement aux techniques de biologie moléculaire, elle permet d'obtenir la souche bactérienne pour réaliser des expériences *in vitro*. La confirmation du rôle de certaines bactéries impliquées dans des pathologies peut ainsi être faite par l'intermédiaire de modèles expérimentaux animaux. Cette technique est encore peu standardisée mais permet de mieux évaluer les taxons bactériens minoritaires. La métagénomique, décrite en suivant, et la culturomique sont donc deux techniques complémentaires pour l'étude du microbiote digestif.

1.4.ii. Caractérisation moléculaire du microbiote :

Les technologies de séquençage de l'ADN, permettent la caractérisation de la composition bactérienne des échantillons sans qu'il soit nécessaire de les cultiver. Ce sont les progrès majeurs des techniques de séquençage haut débit qui ont rendu ces technologies plus accessibles aux équipes de recherche. La métagénomique est une méthode basée sur le séquençage et l'analyse de l'ADN contenu dans un environnement.

Méthode shotgun

La méthode « shotgun », ou métagénomique globale, est une technique qui repose sur le séquençage de l'ensemble de l'ADN présent dans un échantillon après fragmentation de celui-ci. L'alignement et le réarrangement des séquences par rapport à des génomes bactériens de référence permettent de reconstruire l'ensemble du génome bactérien d'origine. Cette approche permet non seulement d'obtenir un aperçu global de la composition du microbiote mais également de son potentiel métabolique par l'identification de l'ensemble des gènes présents. Cette méthode fournit une identification taxonomique précise et des informations fonctionnelles directes. En revanche, c'est une méthode très coûteuse qui nécessite des analyses bio-informatiques complexes, notamment pour l'alignement des séquences, et qui présente un risque de contamination par l'ADN de l'hôte significatif.

Métagénomique ciblée

Contrairement à la métagénomique globale, la métagénomique ciblée repose sur l'amplification d'un fragment cible de l'ADN d'un échantillon à l'aide d'un couple d'amorce prédéfini.

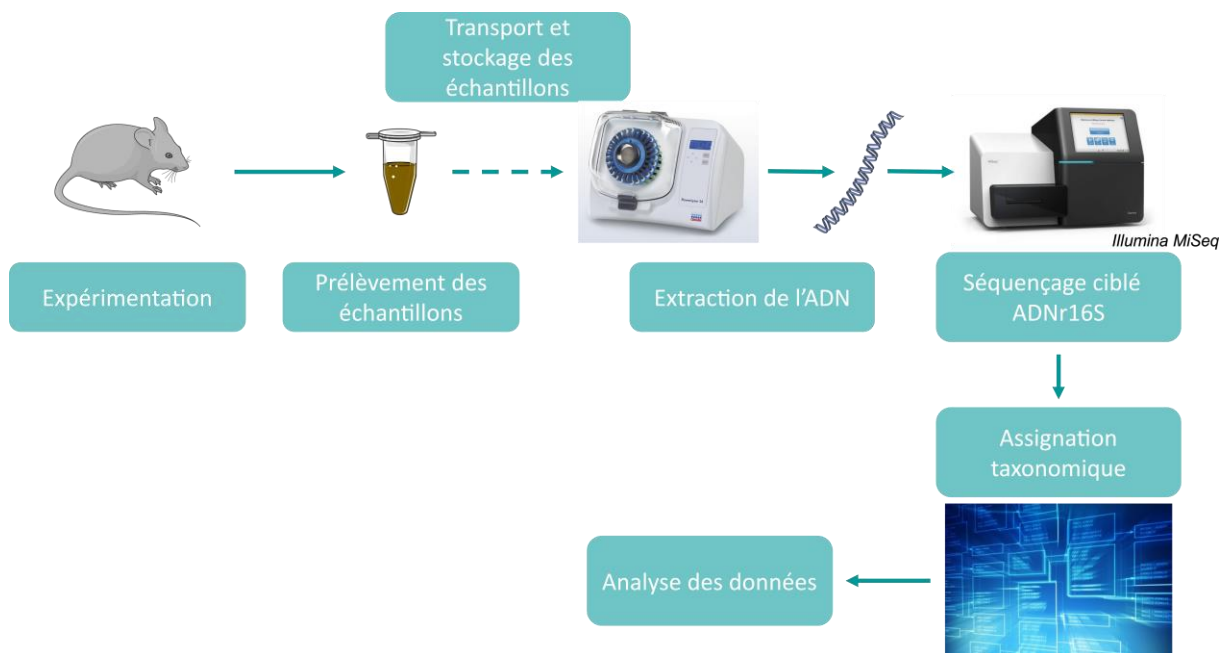


Figure 4 : Principe simplifié de la métagénomique ciblée

- ✓ Détermination du gène ciblé :

La métagénomique bactérienne adaptée à la caractérisation du microbiote repose majoritairement sur le séquençage ciblé du gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr16S).

L'ARNr 16S est un ARN non codant qui constitue la petite sous unité du ribosome bactérien, qui participe à la traduction de l'ARNm en protéine. L'ADNr16S est constitué de régions constantes et de neuf régions hypervariables (Figure 5). Les régions hautement conservées vont permettre la fixation des amorces nécessaires aux séquençages. Et le séquençage des régions variables après comparaison avec une base de données adaptée, permet l'identification du taxon bactérien.

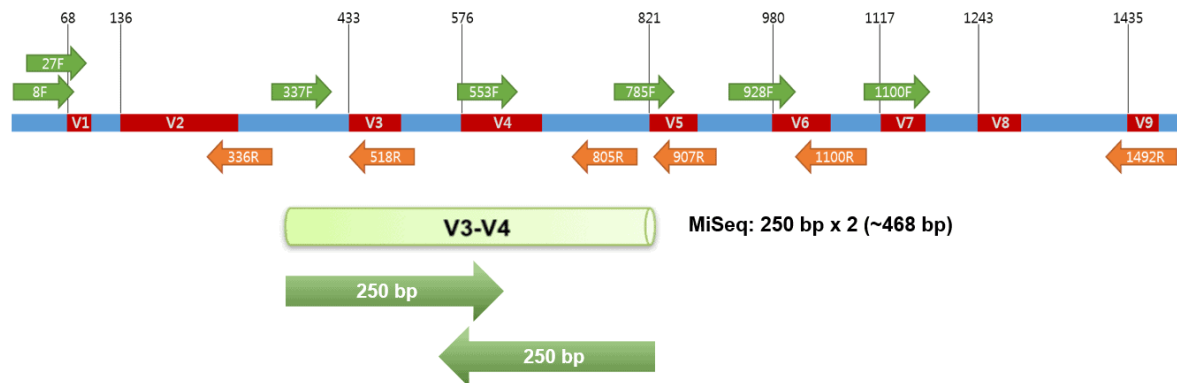


Figure 5 : Schéma représentatif de l'ADNr16S (d'après ezbiocloud.net).
Les régions variables sont colorées en rouge et les régions conservées en bleu. La position des amorces est indiquée par les flèches.

Cette méthode a plusieurs avantages ; elle présente un faible coût en comparaison au séquençage total de l'ADN bactérien du milieu. L'ADNr16S est présent chez toutes les espèces bactériennes, en revanche, il est spécifique des procaryotes et est bien différencié du gène eucaryote équivalent (l'ADNr 18S). Les banques de données permettant l'identification des taxons bactériens sont particulièrement bien développées. Enfin, le séquençage d'une à deux régions hypervariables est suffisant pour une identification bactérienne, permettant l'utilisation des séquenceurs haut débit. Classiquement les études du microbiote reposent sur l'amplification des régions V3-V4 qui permet d'obtenir des fragments de taille suffisante pour obtenir un chevauchement en séquençage « paired-end ». Le « paired-end » signifie que le séquençage est effectué par les deux extrémités du fragment amplifié, ce qui permet un alignement des séquences de haute qualité.

Cependant, le nombre de copies du gène d'ADNr16S par génome est variable, rendant cette technique peu fiable pour estimer les abondances relatives des taxons bactériens dans le milieu. Le séquençage de certaines régions de l'ADNr16S n'est pas suffisamment discriminant pour séparer des espèces très proches.

Enfin, le séquençage des régions V3-V4 ne permet pas toujours d'obtenir une résolution suffisante pour établir une identification au niveau de l'espèce. L'identification est classiquement faite au niveau de la famille bactérienne avec cette technique.

✓ Extraction de l'ADN

Comme pour toute approche moléculaire, la technique d'extraction de l'ADN conditionne le seuil de sensibilité de la technique de séquençage pouvant constituer une source de biais majeur. Dans les échantillons comme les selles, l'étape de lyse est cruciale afin d'extraire une quantité suffisante d'ADN bactérien. L'utilisation de tubes de lyse avec des billes de céramique associés à un homogénéisateur performant permet une lyse mécanique qui complètera la lyse chimique des échantillons de selles précédant l'extraction de l'ADN sur colonne de silice.

✓ Mise en librairie et séquençage :

Les technologies de séquençage haut débit permettent de séquencer simultanément des milliers de séquences sur une période de temps très courte. La technique Illumina Miseq, largement utilisée à l'heure actuelle, permet des lectures de 2x250pb par une technologie en « paired-end ».

Dans un premier temps, les librairies sont établies par amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de la région ciblée, grâce aux amorces spécifiques choisies préalablement, avec une étape pour l'insertion d'index qui sont spécifiques à chaque échantillon et des adaptateurs de séquençage (Figure 6a). Les amplicons ainsi préparés sont ensuite séquencés par une technique de séquençage par synthèse (SBS pour Sequencing By Synthesis) (Figure 6b).

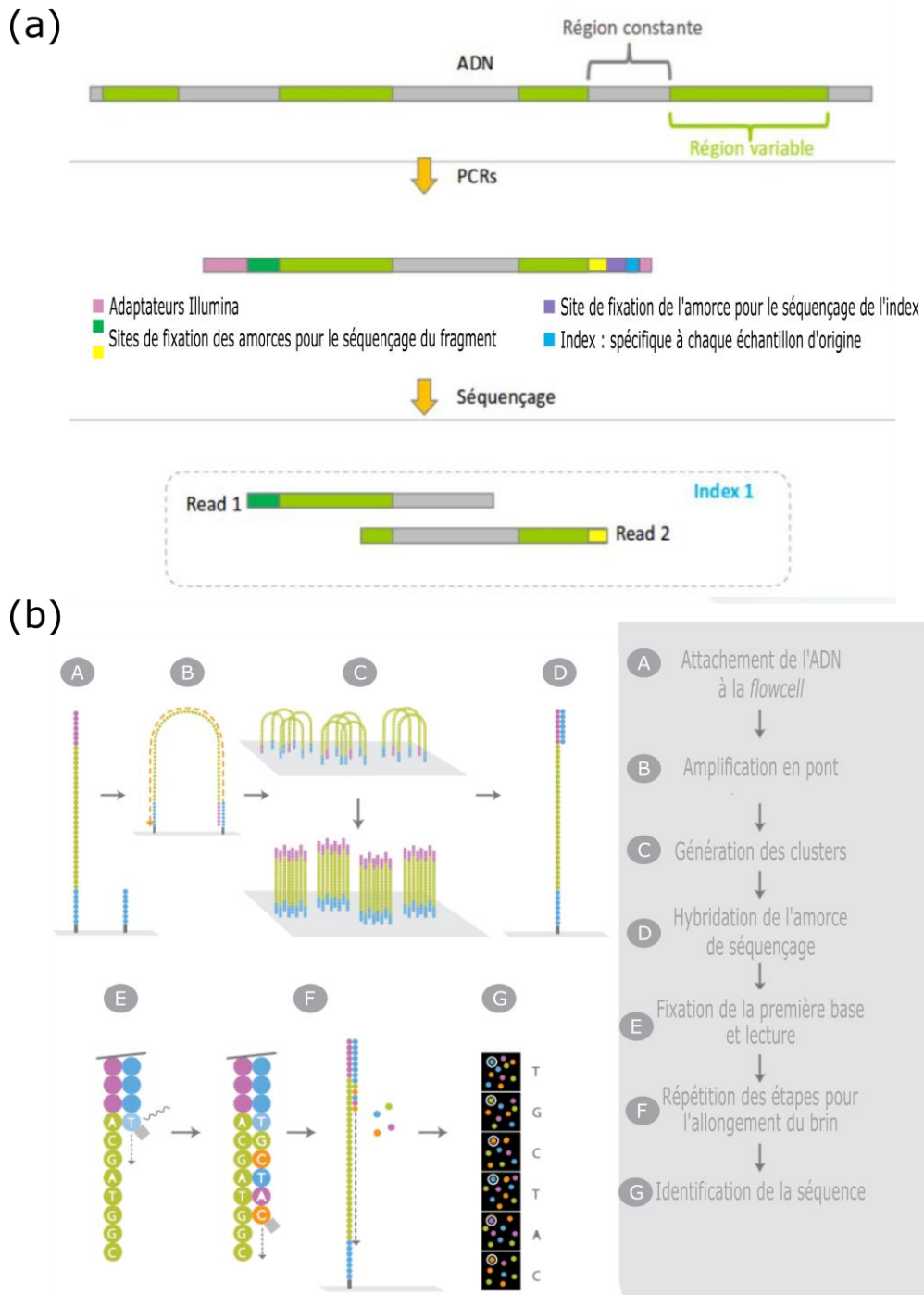


Figure 6 : Les différentes étapes du séquençage par la méthode Illumina (d'après Illumina.net)

(a) : Préparation des librairies, (b) : Générations des clusters et séquençage

✓ Assignment taxonomique :

L'assignation taxonomique permet de rattacher chaque séquence, ou « read », à un taxon afin de connaître la composition de son échantillon d'origine.

Après la vérification de la qualité des séquences, l'assignation taxonomique peut notamment reposer sur le « clustering », c'est-à-dire le regroupement des séquences, pour constituer une Unité Taxonomique Opérationnelle ou OTU (pour « Operational Taxonomic Unit »). Différentes pipelines bio-informatiques accessibles à tous permettent de réaliser ces regroupements, l'une des plus populaires est QIIME (41).

Différentes approches de clustering peuvent être utilisées (Figure 7) :

- **Stratégie « de novo »** : Cette stratégie consiste à comparer les « reads » obtenus deux à deux. Les reads ayant un pourcentage de similarité supérieur ou égal à 97% sont ensuite regroupés. Chaque regroupement, ou cluster, permet l'obtention d'une séquence consensus. Cette séquence est ensuite comparée à une base de données de référence qui permettra l'assignation de l'OTU au taxon de la séquence de référence à partir du moment où la similarité entre ces deux séquences est supérieure à 97%. Cette méthode a notamment pour inconvénient que la qualité des OTU dépend énormément de la méthode d'évaluation de la similarité entre les « reads », pouvant entraîner des OTU de moindre qualité. Avec cette méthode, le clustering est propre à chaque jeu de données, et ne permet donc pas la comparaison avec d'autres travaux. Il faudra fusionner les données et refaire le « clustering » pour pouvoir comparer les OTU générés. En revanche, cette stratégie n'exclut aucune séquence et permet de prendre en compte les espèces inconnues.
- **Stratégie « closed reference »** : Chaque « read » va être comparé à plusieurs séquences d'une banque de référence. Un « read » sera assigné à l'OTU de la séquence de référence dont la similarité est supérieure ou égale à 97%. Cette technique permet une assignation taxonomique directe car chaque OTU formé peut être assigné avec l'annotation taxonomique de la séquence de référence. C'est une méthode rapide et dont les bases de données sont évolutives. L'inconvénient de cette technique est que les « reads » qui n'ont pas présenté de similarité suffisante avec les séquences de références sont exclus, ce qui peut entraîner des pertes de données importantes.
- **Stratégie « open reference »** : Il s'agit d'une combinaison des deux stratégies précédentes. Les « reads » sont d'abord regroupés selon la stratégie « closed reference », puis la stratégie « de novo » permettra le regroupement des séquences restantes.

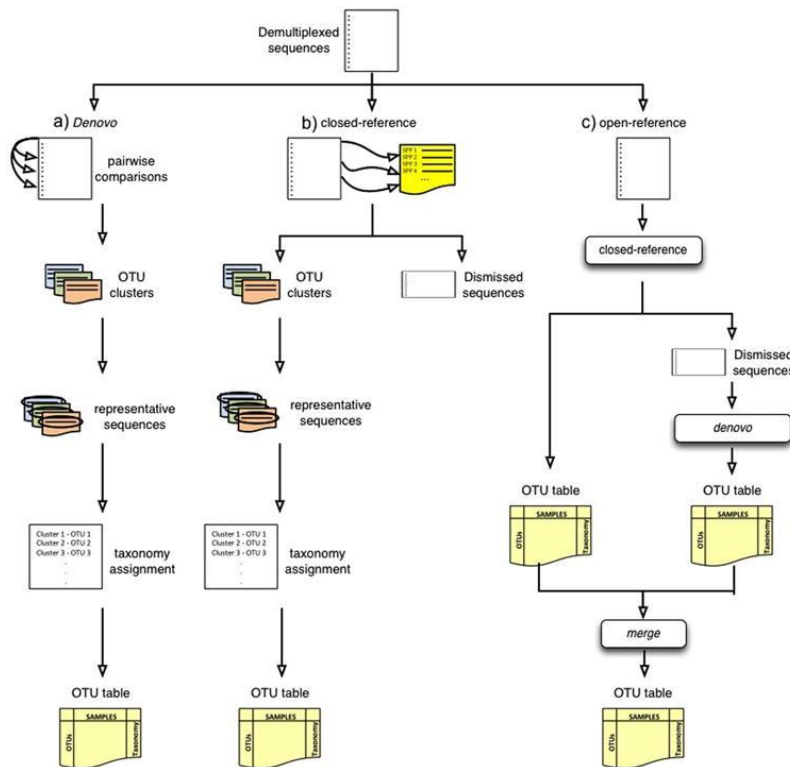


Figure 7 : Stratégies de clustering (d'après Navas-Molina et al., 2013, (41))

Un OTU constitue donc un niveau d'assignation taxonomique qui regroupe des séquences appartenant à des bactéries similaires à plus de 97%. L'utilisation de la pipeline QIIME permet d'obtenir en sortie la table des OTU, c'est un tableau à double entrée qui indique pour chaque OTU identifié le nombre de « reads » retrouvés dans chaque échantillon. Cette table des OTU sera le point de départ de toutes les analyses de données pour l'étude du microbiote. QIIME propose également un arbre phylogénétique qui renseigne sur la hiérarchie entre les OTU qui pourra être également utilisé pour l'analyse et l'interprétation des données.

Aujourd'hui, les OTU évoluent vers les « Amplicon Sequence Variant » (ASV). Cette évolution est liée au fait que les erreurs de séquençage impliquent de nombreux biais dans la génération des OTU. L'objectif est donc de corriger les « reads », en fonction des erreurs liées à la technologie de séquençage, par une étape de « débruitage ». Les lectures, ainsi que leurs variants « corrigés », sont regroupés en ASV et chaque ASV sera ensuite assigné à un taxon.

D'autres pipelines informatiques proposent une stratégie opposée en assignant chaque séquence à un taxon en la comparant avec une base de données dans un premier temps, puis en les regroupant en cluster sur la base d'annotations partagées dans un deuxième temps (Figure 8). C'est une approche en « assignment first » opposé au « clustering first » proposé par QIIME.

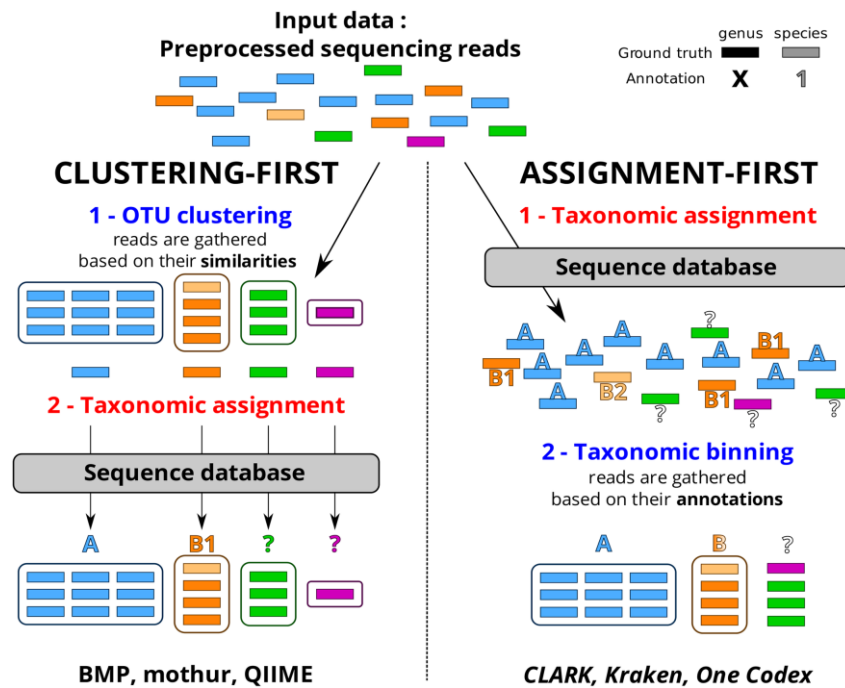


Figure 8 : Comparaison entre l'approche « clustering-first » et « assignment-first » (d'après Siegwald et al., 2017, (42))

Enfin, quelle que soit la stratégie choisie, le choix de la base de données de référence est crucial. Il en existe plusieurs aujourd'hui comme Greengenes, Silva et RDP (Ribosomal Database Project). Ces bases de données présentent des caractéristiques différentes et les pipelines d'analyses bio-informatiques sont généralement associées à une banque privilégiée selon les choix des développeurs.

1.5. Analyse des données et caractérisation du microbiote digestif :

Les résultats du séquençage de l'ADNr16S et la table des OTU représentent une quantité de données importantes à traiter. L'analyse et l'interprétation des résultats nécessitent donc des logiciels informatiques et des outils qui vont permettre la caractérisation des microbiotes et la comparaison entre différents groupes d'individus. Les analyses d'alpha et de bêta diversité vont permettre une approche globale et l'interprétation des résultats du séquençage.

I.5.i. Alpha diversité :

L'alpha diversité correspond à la diversité intrinsèque à chaque échantillon. Elle est évaluée en utilisant des indices qui sont utilisés pour caractériser la richesse et la diversité d'un échantillon. Plusieurs aspects de l'alpha diversité peuvent être étudiés en utilisant différents indices.

L'indice de Chao1, un estimateur de la richesse, va estimer le nombre réel de taxons différents présents dans l'échantillon. Le calcul de cet indice repose sur une méthode statistique d'estimation qui se base sur la fréquence des taxons observés pour estimer le nombre de taxons présents mais non observés. L'addition du nombre de taxons observés avec l'estimation du nombre de taxons non observés (mais statistiquement présents) permet d'obtenir le nombre de taxons différents « réellement » présents dans l'échantillon.

L'indice de Shannon est un estimateur de la biodiversité se basant sur le nombre de taxons différents présents dans l'échantillon ainsi que sur leurs abondances respectives. Enfin, le PD « Phylogenetic Distance » Whole Tree permet d'obtenir une information supplémentaire concernant la biodiversité en prenant en compte la différence phylogénétique qui existe entre les taxons de l'échantillon.

I.5.ii. Bêta diversité :

La bêta diversité consiste à mesurer la diversité entre les échantillons. Elle s'évalue à l'aide de matrices de distances qui permettent de déterminer la dissimilarité entre chaque échantillon. La distance de Bray Curtis permet une mesure quantitative de la dissimilarité communautaire en se basant sur les abondances relatives des bactéries qui composent les échantillons. D'une autre manière, la distance pondérée de l'UniFrac (Weighted Unifrac) offre une mesure quantitative de la dissimilarité communautaire en intégrant les distances phylogénétiques entre les échantillons.

Les analyses de bêta diversité reposent donc sur une analyse multivariée de la table des OTU et peuvent être représentées en utilisant des méthodes d'ordinations, comme l'analyse en coordonnées principales, qui permet de prendre en compte simultanément un nombre important de variables pour en faire un graphique global. Il s'agit donc de représenter les échantillons dans un diagramme de dispersion multivariable, c'est-à-dire sous la forme de points le long d'axes de référence. Une fois que le graphique est réalisé, les points représentant des échantillons dont la composition est semblable seront proches les uns des autres, alors que ceux dont les compositions sont différentes seront plus éloignés.

Des groupes de points peuvent être ainsi mis en évidence et la variable explicative est visualisée par une couleur (Figure 9).

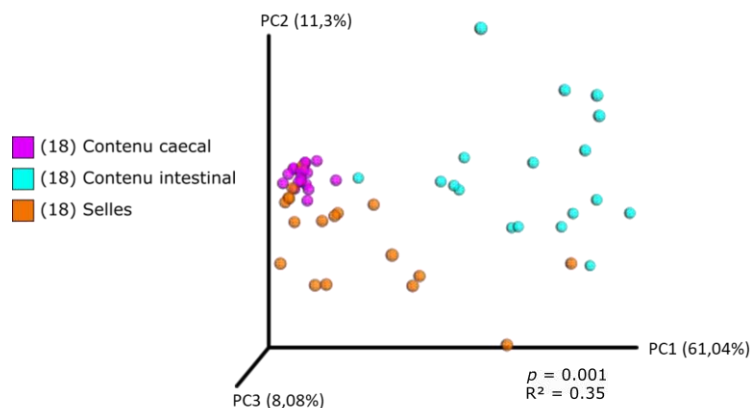


Figure 9 : Analyse en coordonnées principales de différents échantillons provenant de différents sites digestifs à partir des distances Weighted Unifrac

Les données utilisées pour réaliser ce schéma sont celles obtenues lors des travaux présentés dans cette thèse

Des tests statistiques permettent ensuite d'évaluer si la variable étudiée entraîne des différences significatives dans la composition des microbiotes. Adonis est une méthode statistique non paramétrique proposé par QIIME qui permet de déterminer le regroupement des échantillons (43). Elle calcule une valeur R² (taille de l'effet) qui indique le pourcentage de variation expliqué par le paramètre étudié ainsi qu'une valeur p pour déterminer la signification statistique. Dans l'exemple présenté dans la figure 9, l'origine anatomique du site digestif d'où provient le microbiote influence significativement la composition de ce dernier ($p=0,001$).

1.5.iii. Etude des fonctions du microbiote digestif :

L'étude du microbiote digestif repose sur des études descriptives qui permettent de renseigner sur la composition taxonomique mais également sur des études mécanistiques pour analyser la contribution fonctionnelle du microbiote à la santé ou à la maladie chez l'homme. Pour cela, l'étude des fonctions exercées par le microbiote digestif est fondamentale.

L'un des résultats apporté par le « Human Microbiome Project » américain était que la composition taxonomique du microbiote variait significativement d'un individu à l'autre. En revanche, les fonctions biologiques exercées par le microbiote étaient plus similaires et redondantes entre les individus (10).

Plusieurs méthodes existent pour étudier les fonctions exercées par le microbiote chez son hôte :

- **La méthode prédictive** : Le logiciel bio-informatique PICRUSt (pour Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States), développé par une équipe américaine, permet de prédire le répertoire fonctionnel bactérien avec une efficacité de 80 à 85% en utilisant le profil taxonomique du microbiote (44). Le logiciel associe les taxons bactériens identifiés à leurs génomes de référence et leurs annotations KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Orthologs (KO). Pour les taxons bactériens identifiés dont le génome n'a pas encore été séquencé ou annoté, PICRUSt leur attribue le profil fonctionnel de l'ancêtre phylogénétique le plus proche dont le génome est référencé. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'utiliser les résultats du séquençage ciblé, donc moins onéreux, pour obtenir des données très informatives sur les fonctions exercées par le microbiote. Cependant cette méthode ne permet pas de fournir une preuve totale car reste basée sur de la prédiction.
- **La méthode du séquençage du génome total** : le séquençage de l'ensemble du génome bactérien et donc de tous les gènes, permet d'obtenir le reflet du potentiel génétique de l'écosystème bactérien. Cependant, tout comme les méthodes prédictives, les analyses de l'ADN ne permettent pas de déterminer si l'ADN étudié est issu de bactéries mortes ou vivantes ou encore si les gènes portés par les bactéries sont effectivement exprimés ou non. Le séquençage total du génome bactérien ne révèle pas les fonctions réellement actives du microbiote mais seulement des fonctions potentielles.
- **L'approche transcriptomique** : La transcriptomique est l'étude des ARN produits lors de l'étape de transcription du génome, permettant de quantifier l'expression des gènes. Cette méthode permet d'établir un profil fonctionnel bactérien des bactéries « actives ».
- **L'approche métabolomique** : La métabolomique est une technologie récente qui se définit par l'étude de l'ensemble des métabolites présents dans un organite, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme à un temps donné et dans des conditions données.

Cette méthode permet l'étude des métabolites directement produits par l'écosystème bactérien en analysant par spectrométrie de masse les métabolites présents dans un échantillon. Cette méthode est encore très expérimentale, difficile à mettre en place et sujette à de nombreuses limites notamment concernant la préparation des échantillons.

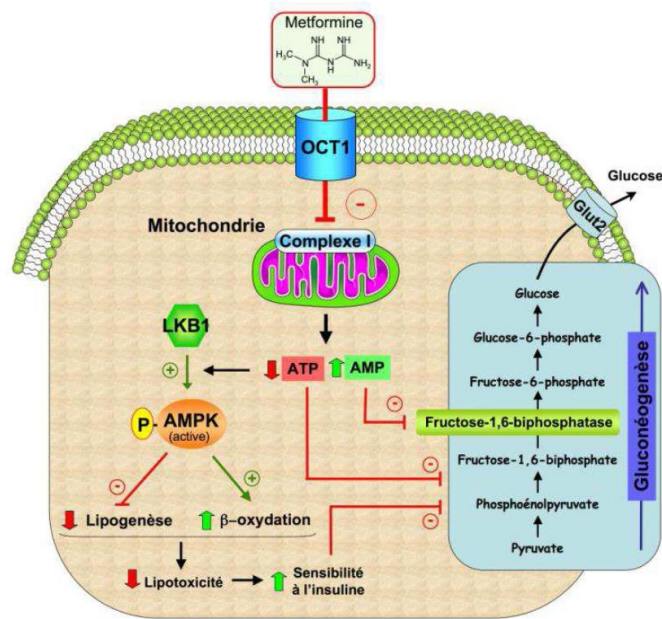
Le microbiote digestif est un écosystème complexe où chaque bactérie interagit non seulement avec son hôte, mais aussi avec son environnement et avec les autres bactéries qui le compose, ce qui rend les études de causalités difficiles à mener.

II) Metformine :

II.1. Utilisation de la metformine dans le diabète non-insulino dépendant :

La metformine (1,1 diméthylbiguanide) est bien connue par les cliniciens pour son utilisation dans la prise en charge du diabète de type 2. Cet antidiabétique oral possède un effet normoglycémiant, il ne stimule pas la sécrétion d'insuline, contrairement aux sulfamides, et n'est donc pas à l'origine d'hypoglycémie réactionnelle (45). La Haute Autorité de Santé (HAS) recommande son utilisation en première intention en monothérapie dans la stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2 (46). Cette recommandation est également celle de l'ADA (American Diabetes Association) et de l'EASD (European Association for the Study of Diabetes) (47). La metformine, utilisée depuis les années 1960, est donc l'un des antidiabétiques par voie orale les plus prescrits à travers le monde.

Même si les mécanismes d'action de la metformine ne sont pas encore tous clairement décrits, plusieurs voies permettent d'expliquer son effet normoglycémiant. L'effet pharmacologique de la metformine est en particulier lié à l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (48) provoquant ainsi l'activation de l'AMPK (« AMP-activating protein kinase »). L'AMPK est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisations cellulaires. Cette activation entraîne une inhibition de la néoglucogenèse hépatique, une augmentation de l'entrée de glucose dans les cellules et une inhibition de la lipogenèse (Figure 10) (49).



**Figure 10 : La metformine inhibe la production hépatique de glucose
(d'après Viollet *et al.*, 2012, (50))**

Au niveau du système digestif, la metformine diminue l'absorption intestinale du glucose (51). Plus récemment, il a été mis en évidence que la prise de metformine entraînait une augmentation de la libération du glucose dans le tube digestif, suggérant que la metformine pouvait favoriser le transport du glucose de la circulation générale vers les selles (52).

La metformine est absorbée au niveau intestinal et sa biodisponibilité est d'environ 50% chez le sujet sain. Après administration orale, la fraction non absorbée retrouvée dans les selles est de 20 à 30 %. La partie absorbée n'est pas métabolisée et sera éliminée principalement dans les urines (53). Une étude menée chez l'animal sur la distribution de la metformine dans différents tissus a montré une accumulation de la molécule principalement au niveau de l'intestin, du foie et des reins (54). La concentration en metformine au niveau intestinal est 30 à 300 fois supérieure à celle retrouvée au niveau plasmatique (55).

Au début du traitement, la metformine entraîne des effets indésirables digestifs de types nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et perte d'appétit qui disparaissent spontanément dans la plupart des cas.

Au-delà de ces propriétés métaboliques utiles pour la prise en charge du diabète de type 2, la découverte de nouvelles activités étonnantes permet à la metformine de connaître un nouvel essor.

II.2. La metformine, de nouvelles propriétés prometteuses :

Depuis plusieurs années, on attribue à la metformine des effets favorables prouvés qui ne concernent pas le métabolisme des carbohydrates (56). On lui confère un effet cardioprotecteur puisque l'utilisation de la metformine est associée à une diminution du risque d'infarctus du myocarde chez les patients avec un diabète de type 2 (56). D'autres études suggèrent que la metformine, en modifiant le métabolisme des folates et de la méthionine, retarde le vieillissement de *Caenorhabditis elegans*, un parasite de l'embranchement des nématodes (57). Des observations similaires sur l'allongement de la durée de vie ont également été faites chez les rongeurs (58). Chez l'homme, la metformine et son utilisation pour cibler le vieillissement fait l'objet actuellement d'un vaste essai clinique randomisé chez des personnes âgées entre 65 et 80 ans sans diabète, le projet TAME (Targeting Aging With Metformin), dont les résultats ne sont pas encore connus (59).

D'autre part, de manière surprenante, une propriété antibactérienne de la metformine a été mise en évidence récemment sur *H. pylori*. L'effet inhibiteur de la metformine sur la croissance de *H. pylori* a été démontré *in vitro* et *in vivo* (60). A ce jour, le mécanisme d'action de la metformine sur *H. pylori* n'a pas encore été déterminé. Dans ce travail, il a été supposé que la metformine pouvait avoir un effet sur d'autres bactéries, en particulier des bactéries qui composent le microbiote digestif.

Enfin, en 2005 une équipe écossaise a suggéré que l'utilisation de la metformine chez des patients diabétiques pouvait diminuer le risque de cancer (61).

II.3. Activité anti-cancéreuse de la metformine :

II.3.i. Etudes épidémiologiques :

Evans et *al.* dans une étude pilote observationnelle, a mis en évidence une diminution du risque de cancer chez les patients diabétiques traités par metformine par rapport aux patients diabétiques non traités par cette molécule (odd ratio ajusté = 0.85). L'incidence du risque de cancer était diminué d'autant plus que le traitement par metformine était de longue durée (61). Depuis ces premiers travaux, de nombreuses études épidémiologiques ont été menées sur l'effet du traitement par la metformine sur la survenue de différents types de cancer chez des patients diabétiques (62). En 2021, une méta-analyse de 67 études effectuées entre 2007 et 2019, sur le risque de cancer chez les patients diabétiques traités par metformine a été réalisée.

Une diminution significative du risque de cancer chez les patients diabétiques qui ont déjà pris de la metformine par rapport à ceux qui n'en ont jamais pris a été mise en évidence (63). A propos du cancer gastrique, la 3^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde, une méta-analyse réalisée sur 7 études de cohortes a montré que le risque de développer un cancer gastrique chez les patients diabétiques traités par metformine diminuait significativement (hazard ratio = 0.763) (64).

II.3.ii. La metformine, une molécule candidate pour la prise en charge et la prévention du cancer :

Après des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal qui ont montré que la metformine pouvait inhiber la prolifération de certaines lignées cellulaires cancéreuses (sein, poumon, foie ou estomac notamment), des essais cliniques chez l'homme se sont développés pour déterminer le potentiel thérapeutique de cette molécule dans la prise en charge des cancers (65). Les essais cliniques en cours s'intéressent principalement au rôle de la metformine dans la prévention des récurrences après un traitement contre un cancer. Mais la metformine est également proposée comme adjuvant des chimiothérapies conventionnelles, elle pourrait notamment potentialiser les effets cytotoxiques de certaines chimiothérapies (66,67).

Dans le cancer colorectal, avant même la survenue du cancer, chez des patients atteints de diabète de type 2, le traitement par metformine entraîne une diminution de l'incidence des adénomes qui pourront se transformer en cancer. L'hypothèse selon laquelle la metformine pourrait être utile dans la prévention du cancer colorectal chez les patients atteints de diabète de type 2 est donc évoquée (68).

II.3.iii. Mécanisme d'action de la metformine dans la carcinogenèse :

L'activité antitumorale de la metformine peut être directe, de par son activation de l'AMPK, ou bien indirecte, par la diminution de la concentration en glucose et en insuline dans le sang (Figure 11).

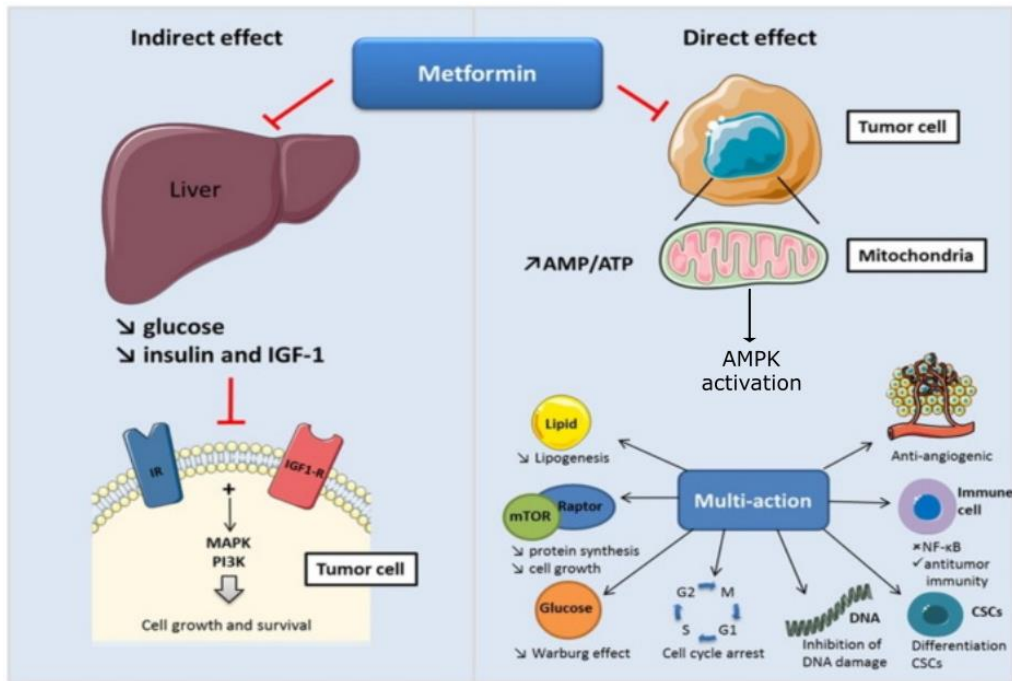


Figure 11 : Activités antitumorales de la metformine (d'après Daugan et al., 2016, (69))

La dérégulation de l'AMPK semble jouer un rôle dans la survenue de cancer (70) et l'activation de l'AMPK est l'un des mécanismes pharmacologiques de la metformine les mieux décrits. Cette activation de l'AMPK semble avoir une multitude d'effets sur le métabolisme des cellules cancéreuses, notamment l'inhibition de la prolifération cellulaire par le blocage du cycle cellulaire en phase G1 (70). La voie de signalisation mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), un effecteur de l'AMPK qui sert de régulateur central du métabolisme, de la croissance et de la prolifération cellulaire semble aussi être impliqué. La suractivation de la voie mTOR est associée avec le développement de tumeurs et il a été décrit que l'activation de l'AMPK par la metformine inhibe la voie mTOR (71). La metformine et l'activation de l'AMPK semblent également moduler l'inflammation, qui joue un rôle important dans la carcinogenèse au niveau du microenvironnement tumoral. Cet effet est en partie médié par l'inactivation de NF- κ B (nuclear factor kappa B) dans les macrophages et les adipocytes notamment, qui entraîne une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) et les interleukines 6 et 8 (62).

Enfin, la metformine a été décrite dans certains modèles de carcinogenèses comme étant capable de cibler les Cellules Souches Cancéreuses (CSC), une sous population de cellules qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler et de générer des cellules matures d'un tissu particulier après différenciation, notamment dans le cancer gastrique (72,73).

La metformine en diminuant la concentration sanguine de glucose et d'insuline, impacte également indirectement la carcinogenèse. L'insuline joue un rôle de facteur de croissance dans le développement de cancer en se fixant à deux récepteurs ; l'IR (Insulin Receptor) et l'IGF-R1 (Insulin-like Growth Factor Receptor) qui activent des voies cellulaires impliquées dans la survie et la croissance cellulaire (62). De plus, en régulant la glycémie, la metformine diminue le glucose disponible pour les cellules tumorales, ce qui entraîne une inhibition de leur croissance (74).

D'autres mécanismes de l'activité antitumorale de la metformine sont encore à explorer. A propos du cancer gastrique, l'hypothèse selon laquelle l'effet antibiotique de la metformine contre *H. pylori*, le principal facteur de risque de cancer gastrique, pouvait participer à la diminution du risque de cancer gastrique chez les patients diabétiques traités par metformine a été émise (75). Par ailleurs, nous savons aujourd'hui que la composition du microbiote digestif peut avoir une influence sur la survenue du risque de cancer (36). Dans cette étude nous avons émis l'hypothèse que la metformine pouvait modifier le microbiote digestif d'une part, et que ces modifications pouvaient avoir un effet sur la prévention du risque de cancer digestif.

Objectif du travail de thèse

Ce projet a été mis en place à la suite de travaux précédemment réalisés au laboratoire visant à démontrer *in vivo* l'effet anti-*H. pylori* de la metformine, initialement observé *in vitro*. L'expérimentation initiale avait pour objectif d'étudier les effets de la metformine sur la croissance de la bactérie *H. pylori in vivo* à l'aide d'un modèle expérimental murin. Des souris préalablement infectées par *H. pylori* ont été traitées soit par de la metformine soit par du tampon phosphate salin (PBS pour Phosphate-Buffered Saline) utilisé comme contrôle. La mise en culture des estomacs de ces souris traitées ou non par metformine a montré que la molécule inhibe la croissance de *H. pylori in vivo*. A la suite de ces résultats, l'hypothèse que la metformine agisse également sur d'autres bactéries et donc sur le microbiote digestif s'est posée. Au moment du sacrifice des souris, le contenu cæcal et intestinal, ainsi que les selles à différents temps de l'expérience avaient été collectés et stockés immédiatement à -80°C. Ces échantillons ainsi conservés, ont donc pu être utilisés pour caractériser le microbiote digestif de ces souris infectées par *H. pylori* et traités ou non par de la metformine.

L'objectif de cette étude était donc de décrire les effets de la metformine sur la composition ainsi que sur les fonctions métaboliques du microbiote de trois sites digestifs (selles, cæcum et intestin) chez des souris infectées par *H. pylori*.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article qui a été soumis au journal *Pharmaceuticals* et accepté pour publication le 3 Avril 2021.

Pour suivre les recommandations de l'Université de Bordeaux pour la rédaction des thèses, la discussion et la conclusion ont été écrites en français à la suite de l'article original.

Article original

Metformin Modifies the Gut Microbiota of Mice Infected with *Helicobacter pylori*

by Marine Jauvain ¹, Sarah Courtois ¹, Philippe Lehours ^{1,2} and Emilie Bessède ^{1,2,*}

1. INSERM, University of Bordeaux, UMR 1053 Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France

2. French National Reference Center for Campylobacters & Helicobacters in Bordeaux (CNRCH), University Hospital of Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

*Author to whom correspondence should be addressed.

Academic Editors: Agnieszka Sliwinska and Félix Carvalho

Pharmaceuticals **2021**, *14*(4), 329; <https://doi.org/10.3390/ph14040329>

Received: 15 January 2021 / Revised: 11 March 2021 / Accepted: 24 March 2021 / Published: 3 April 2021

Keywords: *Helicobacter pylori*; metformin; microbiota; PICRUSt



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRACT

Metformin is widely prescribed to treat type 2 diabetes. Diabetes patients treated with metformin have a decreased risk of cancers, including gastric cancer. Among the factors influencing digestive carcinogenesis, gut microbiota interactions have been intensively studied. Metformin exhibits direct antimicrobial activity toward *Helicobacter pylori*, which plays a crucial role in gastric carcinogenesis. Mice were infected with *H. pylori* and treated for 12 days with either metformin or phosphate-buffered saline (PBS) as a control. At the end of the treatment period, the mice were euthanized and cecal and intestinal contents and stool were collected. The gut microbiota of the three different digestive sites (stool, cecal, and intestinal contents) were characterized through 16S RNA gene sequencing. In mice infected with *H. pylori*, metformin significantly decreased alpha diversity indices and led to significant variation in the relative abundance of some bacterial taxa including *Clostridium* sp. and *Lactobacillus* sp., which were directly inhibited by metformin *in vitro*. PICRUSt analysis suggested that metformin modifies functional pathway expression, including a decrease in nitrate reducing bacteria in the intestine. Metformin significantly changed the composition and predicted function of the gut microbiota of mice infected with *H. pylori*; these modifications could be implicated in digestive cancer prevention.

INTRODUCTION

Metformin, also known as 1,1-dimethylbiguanide, is the most widely prescribed glucose metabolism regulator for the treatment of type 2 diabetes mellitus globally [1]. The pharmaceutical effect of metformin is partially determined by AMP-activated protein kinase (AMPK) activation [2]. In response, the digestive system modifies glucose absorption and enhances anaerobic glucose metabolism [3]. In animals, metformin is accumulated at very high concentrations in the wall of the intestine [4]. For several years metformin has also been studied intensively for its antitumor properties in different types of cancer [5].

In 2005, a Scottish study hypothesized that metformin treatment may reduce cancer risk in diabetic patients [6]. A meta-analysis of seven cohort studies of gastric cancer, which has the third greatest mortality among cancers worldwide [7], showed that gastric cancer risk decreased in diabetic patients treated with metformin [8]. *Helicobacter pylori* plays a crucial role in gastric carcinogenesis by promoting inflammation and degradation of the gastric epithelium [9]. This Gram-negative bacterium colonizes the stomach mucosa in more than 90% of all gastric cancer patients [10]. *H. pylori* infection is among the most prevalent infections worldwide [11]; however, only 1% of infected patients develop gastric adenocarcinoma [12]. Factors influencing gastric cancer occurrence in infected patients include genetic host factors and environmental factors including the host microbiota [13].

The gut microbiota has many functions, including intestinal homeostasis regulation, immune response, and metabolism energy regulation [14]. Modification of the gut microbiota can be associated with a number of diseases, including cancer [15]. In colorectal cancer, bacteria composing the digestive microbiota help to form the micro-tumoral environment and may influence cancer development [16]. *H. pylori* colonization influences the gastric microbiota; its infection leads to a significant decrease in gastric bacterial diversity [17]. Changes in the gastric microbiota with the evolution of gastric mucosa were shown including mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis [18]. Metformin has been shown to inhibit *H. pylori* growth directly *in vivo* and *in vitro*. Mice infected with *H. pylori* and treated with metformin show a decrease in gastric *H. pylori* colonization [19]. Therefore, in the present study, we hypothesized that metformin may affect other bacteria, especially gut bacteria.

In this context, the aim of this study was to describe the effects of metformin on the gut microbiota in *H. pylori*-infected mice. We studied metformin-induced changes in the composition and metabolic functions of the gut microbiota in three different digestive sites (stool, cecal, and intestinal contents), in mice infected with *H. pylori* that were treated with either metformin or phosphate-buffered saline (PBS) as a control.

MATERIALS AND METHODS

✓ Animal Protocol and Sample Collection

The animal protocol used in this study was previously described [19]. Five-week-old Specific Pathogen-Free C57Bl6J female mice were chosen for their better ability to live with partners. Mice were infected intragastrically on 3 consecutive days with 0.1 mL of a highly concentrated suspension of mouse-adapted *H. pylori* strains SS1 and B47 (Mc Farland 7 opacity standard) [20,21]. Three days after the last infection, the mice were divided randomly into two groups: an infected group treated with PBS as a control (n = 18, two mice died before the beginning of treatment) and an infected group treated with metformin (Sigma Aldrich, Missouri, USA) at 10 mg/mouse (n = 20). This dosage was determined using the method of dose conversion between human and animal studies [22]. With this method, 10 mg/mouse/day corresponds to 2.4 g of metformin/day for a human adult. The maximal dosage of metformin used to treat Type 2 diabetes patients is 3 g/day. Each group received a daily treatment (0.1 mL) for 12 days by gavage. During this period all mice had access to water ad libitum and a normal diet. Stool samples were collected before infection with *H. pylori* and after 12 days of treatment. Weight was controlled during the study. After the treatment, no differences were observed in mice weight between the two groups (data not shown). At the end of the treatment, mice were euthanized by cervical dislocation. Cecum and intestine were aseptically taken to collect cecal and intestinal content separately. Intestinal content corresponds to the entire content of mice intestine, no specific region in intestine was selected. Gastric samples were not available for use in this study. All collected samples were immediately stored in a sterile tube at -80°C . Mouse experiments were performed in level 2 animal facilities at Bordeaux University with the approval of the local Ethical Committee, and in conformity with the French Ministry of Agriculture (approval no. 4608).

Initially, alpha and beta diversity were analyzed using mouse stool samples collected from both groups prior to infection and treatment. This analysis confirmed that the groups were comparable and presented no differences in alpha or beta diversity (Figure S1). Same analysis was also performed on stools collected after infection with *H. pylori* and before any treatment with the same results (data not shown).

✓ DNA Extraction and rRNA Gene Sequencing

DNA was extracted from samples using the QIAamp PowerFecal Pro DNA kit with a PowerLyzer (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Quantification, sequencing of the V3–V4 region of 16S rRNA, and assembly were performed by Genoscreen (Lille, France). DNA was quantified using a SYBR Green assay (SYBR Green I, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). For all samples, DNA concentrations were $> 2\text{ng}/\mu\text{L}$ and sufficient for analysis. Primers (343F et 803R) targeting the V3–V4 region of the 16S rRNA gene and a Metabiote kit were used to prepare the amplicon library. Illumina MiSeq paired-end 2×250 bp (Illumina, San Diego, CA, USA) sequencing of the corresponding products was performed. On average, 66,333 full-length V3-V4 region of 16S rDNA sequences assembled at 97% nucleic identity were obtained. These full-length V3-V4 region of 16S rDNA sequences were qualitatively and quantitatively sufficient to allow affiliation, to obtain the taxonomic profiles of bacterial populations identified within the samples. The data were pre-processed according to the QIIME pipeline. The pre-processing parameters included the removal of PCR primers and poor quality readings (score below Q30). Then, a minimum overlap area of 30 bases to perform reassociation was search, and finally 97% nucleic identity over the entire overlap area were assembled. Chimeric sequences were detected and eliminated among the full-length 16S rDNA sequences using an internal method based on application of the Usearch 6.1 software. The number of sequences after preprocessing were available in Table S1. Next, a clustering step was performed on group similar sequences using a defined nucleic identity threshold (97% identity for affiliation at the genus level on the targeted region of the 16S rRNA gene) using the Uclust v1.2.22q program. An open reference operational taxonomical unit (OTU) creation process and full-length binding method were used to create groups of sequences. The most abundant sequence of each OTU was then considered, this reference sequence was taxonomically compared to the Greengenes ver. 13_8 reference database (www.greengenes.gov) using the RDP v2.2 classifier.

Rarefaction curves of observed OTUs indicating enough sequencing depth (Figure S2). Closed-reference OTUs were also created to allow the use of the PICRUSt software. The 16S rRNA sequencing datasets generated in this study can be found in the SRA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/701274>, accessed on 4 April 2021).

✓ Functional Metagenome Predictions

Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) 1.1.0 software was used to predict virtual metagenomes for each sample using the 16S rRNA gene sequencing results [23]. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was used as a reference database. Based on the predicted metagenomes, the relative abundance of KEGG genes or KEGG pathways (ko) within each sample was determined.

✓ Bioinformatics Analysis

Alpha and beta diversity were computed using the QIIME v1.9.1 software. The samples have been rarefied to 32,606 sequences for these analyses. Alpha diversity was calculated in terms of the Chao1, Shannon, and phylogenetic diversity (PD) whole-tree metrics. Beta diversity was calculated using weighted, unweighted UniFrac and Bray–Curtis distances. Ordination was performed using principal coordinate analysis (PCoA). The strength and statistical significance of beta diversity were computed using the Adonis method with QIIME.

Statistically significant differences in the relative abundance of taxa associated with the treatment groups were detected using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) [24]. Only taxa with LDA > 2 and $p < 0.05$ were considered significantly enriched.

Predicted functional genes were compared between groups and the results visualized using the STAMP v2.1.3 software [25]. Statistical differences in KEGG pathway frequencies were determined using White's nonparametric t -test, followed by Bonferroni correction to adjust p values.

✓ *In Vitro* Bacterial Growth Experiments

Strains of *Aerococcus sanguinicola*, *Lactobacillus harbinensis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Clostridium difficile*, and *Clostridium perfringens* were obtained from a collection at the University Hospital of Bordeaux. Strains were identified using matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight (MALDI–TOF) mass spectrometry.

All strains were pre-cultured for 24 hours by inoculation on Columbia blood agar (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) under anaerobic conditions (5% H₂, 10% CO₂, and 85% N₂) at 35°C. Pre-cultures were resuspended in sterile water at a concentration equivalent to the MC Farland 4 opacity standard for each strain. These solutions were mixed at 1:4 dilution with Brain Heart Infusion (BHI) broth (Thermo Scientific) containing various concentrations of metformin (0, 5, 10, 20, 50, and 100 mM). Solutions were then inoculated into a 96-well microplate and incubated under anaerobic conditions. The effect of metformin on bacterial growth was analyzed in terms of the optical density at a wavelength of 600 nm (OD₆₀₀) using a Nanodrop microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France) after 24 hours of incubation.

RESULTS

Alpha Diversity Indices are Reduced in the Gut Microbiota of Mice Infected with *H. pylori* and Treated with Metformin

The Chao1, Shannon, and phylogenetic diversity (PD) whole tree alpha diversity indices were used to characterize the richness and diversity of the bacterial community within each sample. At the end of the treatment period, alpha diversity indices were compared between the metformin and control groups for three different sample types: stool, cecal content, and intestinal content.

In stool, metformin treatment induced a significant reduction in alpha diversity indices ($p \leq 0.002$; Figure 1). These significant decreases were also observed in the other anatomical digestive sites studied (cecum and intestine). Thus, metformin treatment led to reductions in all alpha diversity indices studied in a homogenous manner throughout the mouse digestive system.

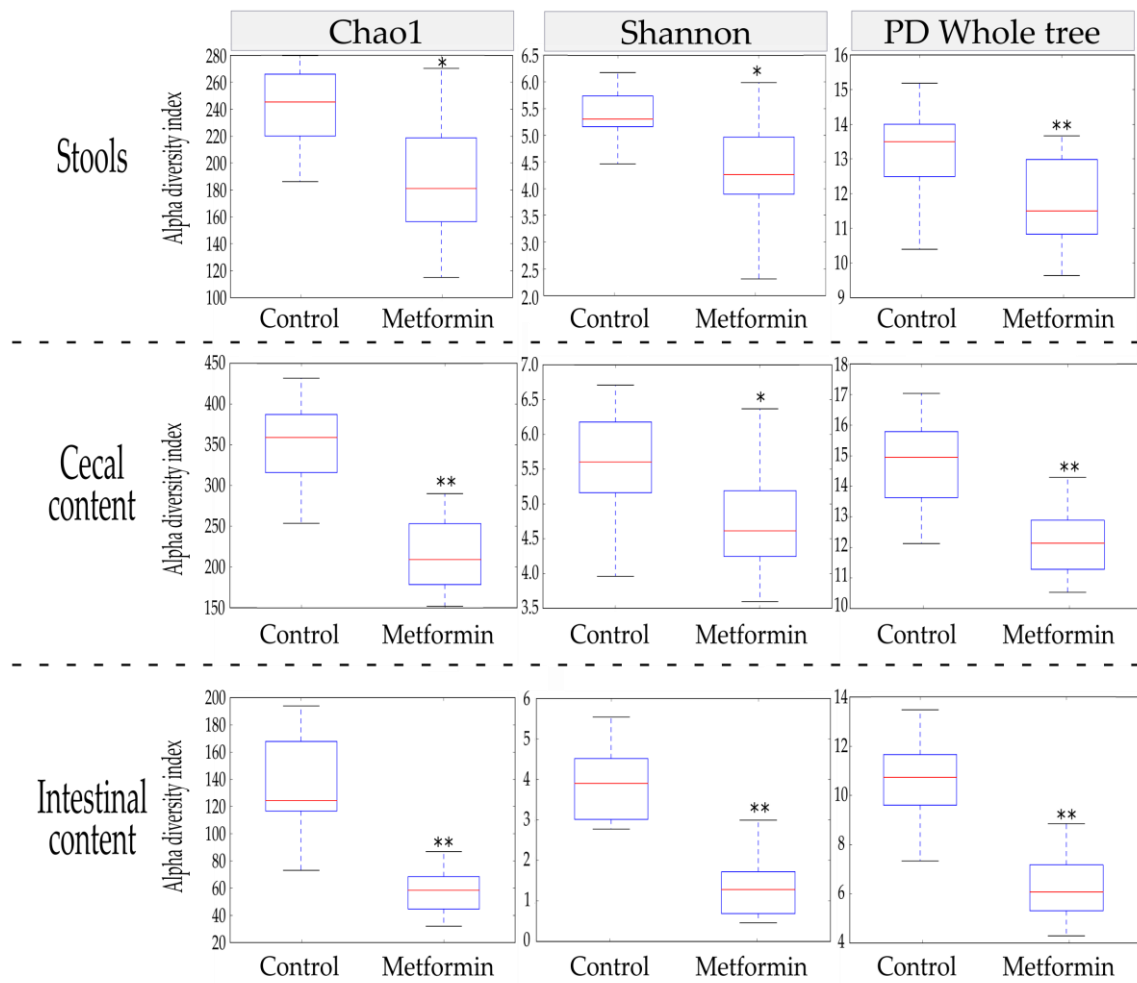


Figure 1. Comparison of alpha diversity indices between metformin (n = 20) and control (n = 18) treatment groups in stool, cecal, and intestinal content (Student's *t*-test; * $p \leq 0.002$; ** $p \leq 0.001$).

Beta Diversity Analysis Shows Changes in the Gut Microbiota of Mice Infected with *H. pylori* and Treated with Metformin

Beta diversity analysis of the three types of digestive samples clearly showed that the metformin and control treatment groups clustered separately at each digestive site (Figures 2 and S3). Weighted UniFrac distances showed that the total diversity values of the two principal coordinates were 74.91%, 75.05%, and 85.53% for stool, cecal, and intestinal content, respectively.

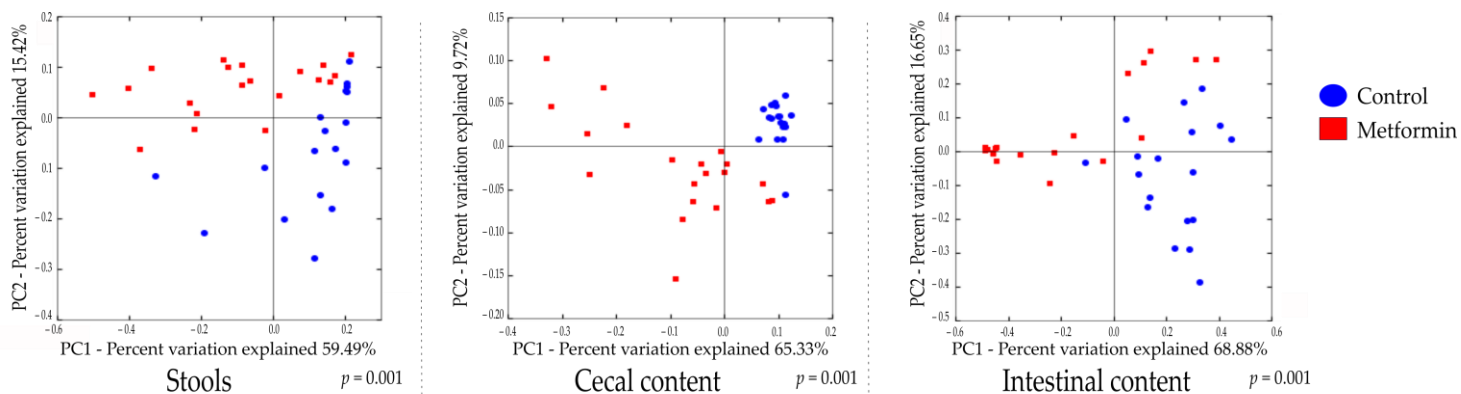


Figure 2. 2D principal coordinate analysis (PCoA) plots created using weighted UniFrac distances. Adonis statistical tests showed significant differences between the two groups (999 permutations; $R^2 = 0.224, 0.388, \text{ and } 0.377$ for stool, cecal, and intestinal content, respectively, $p = 0.001$).

A comparison of bacterial profiles based on weighted and unweighted UniFrac and Bray–Curtis distances showed significant differences between the metformin and control groups (Figures 2 and S3). Adonis statistical tests showed that these observed differences were statistically significant ($p = 0.001$ for weighted UniFrac, unweighted UniFrac, and Bray–Curtis distances). Thus, metformin induced significant modification of the gut microbiota composition in *H. pylori*-infected mice.

Metformin Treatment Changes Taxonomic Repartition in the Gut Microbiota of Mice Infected with *H. pylori*

The microbial compositions of the three digestive sites at the phylum, class, order, and family levels are shown in Table 1. Only taxa with a relative abundance $\geq 0.1\%$ were computed. Bacterial taxa with the most significantly different microbial abundance between treatment groups ($p < 1 \times 10^{-4}$) are highlighted.

Table 1. Comparison of the relative abundance of bacteria between the metformin and control treatment groups at all taxonomic levels for different digestive sites. The comparison was performed with Multiple t test and Holm-Sidak method was used for multiple testing correction. Bacterial taxa with $p < 1 \times 10^{-4}$ were highlighted, red and blue indicate greater abundance in the metformin and control groups, respectively. Ctrl, control; Met, metformin; NS, non-significant ($p > 0.05$).

Phylum	Stools				Cecal content				Intestinal content			
	Ctrl (%)	Met (%)	p		Ctrl (%)	Met (%)	p		Ctrl (%)	Met (%)	p	
<i>Firmicutes</i>	71.21	62.02	NS	<i>Firmicutes</i>	91.78	74.91	4.00E-06	<i>Firmicutes</i>	54.14	22.63	4.20E-05	
<i>Bacteroidetes</i>	17.94	6.504	6.80E-05	<i>Bacteroidetes</i>	5.637	4.666	NS	<i>Actinobacteria</i>	37.08	70.97	1.50E-05	
<i>Actinobacteria</i>	8.519	28.76	5.64E-04	<i>Actinobacteria</i>	1.844	18.53	3.00E-06	<i>Proteobacteria</i>	7.367	5.667	NS	
<i>Proteobacteria</i>	2.157	2.455	NS	<i>Proteobacteria</i>	0.69	1.682	7.17E-04	<i>Bacteroidetes</i>	1.046	0.4659	2.96E-02	
<i>Verrucomicrobia</i>	0.1462	0.248	NS	<i>Verrucomicrobia</i>	0.04292	0.2031	2.00E-06	<i>Verrucomicrobia</i>	0.2619	0.1808	NS	
<i>Clostridia</i>	64.08	59.39	NS	<i>Clostridia</i>	90.33	72.38	<1.00E-06	<i>Clostridia</i>	25.2	2.885	9.00E-06	
<i>Bacteroidia</i>	17.94	6.504	6.80E-05	<i>Bacteroidia</i>	5.637	4.666	NS	<i>Actinobacteria</i>	20.79	67.44	<1.00E-06	
<i>Actinobacteria</i>	7.277	28.14	2.83E-04	<i>Actinobacteria</i>	1.393	18.15	2.00E-06	<i>Erysipelotrichi</i>	18.29	19.24	NS	
<i>Erysipelotrichi</i>	3.741	2.467	NS	<i>Erysipelotrichi</i>	0.8205	2.44	NS	<i>Coriobacteria</i>	16.29	3.529	9.50E-05	
<i>Bacilli</i>	3.386	0.1616	4.16E-03	<i>Betaproteobacteria</i>	0.6795	1.667	6.63E-04	<i>Bacilli</i>	10.65	0.5026	1.80E-02	
<i>Betaproteobacteria</i>	2.142	2.427	NS	<i>Bacilli</i>	0.6257	0.08574	1.67E-02	<i>Betaproteobacteria</i>	6.716	4.445	NS	
<i>Coriobacteria</i>	1.241	0.6206	3.01E-02	<i>Coriobacteria</i>	0.451	0.3785	NS	<i>Bacteroidia</i>	1.044	0.4628	2.94E-02	
<i>Verrucomicrobiae</i>	0.1462	0.248	NS	<i>Verrucomicrobiae</i>	0.04292	0.2031	2.00E-06	<i>Alphaproteobacteria</i>	0.5376	1.076	NS	
								<i>Verrucomicrobiae</i>	0.2619	0.1808	NS	
<i>Clostridiales</i>	64.08	59.39	NS	<i>Clostridiales</i>	90.33	72.38	<1.00E-06	<i>Clostridiales</i>	25.2	2.885	9.00E-06	
<i>Bacteroidales</i>	17.94	6.504	6.80E-05	<i>Bacteroidales</i>	5.637	4.666	NS	<i>Bifidobacteriales</i>	20.79	67.44	<1.00E-06	
<i>Bifidobacteriales</i>	7.277	28.14	2.83E-04	<i>Bifidobacteriales</i>	1.392	18.15	2.00E-06	<i>Erysipelotrichales</i>	18.29	19.24	NS	
<i>Erysipelotrichales</i>	3.741	2.467	NS	<i>Erysipelotrichales</i>	0.8205	2.44	NS	<i>Coriobacteriales</i>	16.29	3.529	9.50E-05	
<i>Burkholderiales</i>	2.142	2.427	NS	<i>Burkholderiales</i>	0.6795	1.667	6.63E-04	<i>Bacillales</i>	7.818	0.05888	2.13E-02	
<i>Bacillales</i>	1.779	0.02667	1.47E-02	<i>Coriobacteriales</i>	0.451	0.3785	NS	<i>Burkholderiales</i>	6.716	4.445	NS	
<i>Lactobacillales</i>	1.606	0.135	1.12E-03	<i>Bacillales</i>	0.3566	0.01136	2.75E-02	<i>Lactobacillales</i>	2.833	0.4437	1.78E-02	
<i>Coriobacteriales</i>	1.241	0.6206	3.01E-02	<i>Lactobacillales</i>	0.2691	0.07438	1.40E-02	<i>Bacteroidales</i>	1.044	0.4628	2.94E-02	
<i>Verrucomicrobiales</i>	0.1462	0.248	NS	<i>Verrucomicrobiales</i>	0.04292	0.2031	2.00E-06	<i>Rickettsiales</i>	0.5069	1.056	NS	
								<i>Verrucomicrobiales</i>	0.2619	0.1808	NS	
<i>Lachnospiraceae</i>	34.13	34.93	NS	<i>Lachnospiraceae</i>	57.86	43.3	3.50E-04	<i>Bifidobacteriaceae</i>	20.79	67.44	<1.00E-06	
<i>Rikenellaceae</i>	16.58	5.729	1.28E-04	<i>Ruminococcaceae</i>	18.02	18.98	NS	<i>Lachnospiraceae</i>	19.8	2.11	9.00E-06	
<i>Ruminococcaceae</i>	14.88	15.05	NS	<i>Rikenellaceae</i>	5.371	4.218	NS	<i>Erysipelotrichaceae</i>	18.29	19.24	NS	
<i>Bifidobacteriaceae</i>	7.277	28.14	2.83E-04	<i>Bifidobacteriaceae</i>	1.392	18.15	2.00E-06	<i>Coriobacteriaceae</i>	16.29	3.529	9.50E-05	
<i>Erysipelotrichaceae</i>	3.741	2.467	NS	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.8205	2.44	NS	<i>Alcaligenaceae</i>	6.716	4.445	NS	
<i>Alcaligenaceae</i>	2.138	2.427	NS	<i>Alcaligenaceae</i>	0.6795	1.667	6.63E-04	<i>Bacillaceae</i>	5.125	0.002976	4.11E-02	
<i>Aerococcaceae</i>	1.521	0.1177	1.43E-03	<i>[Mogibacteriaceae]</i>	0.579	0.473	3.26E-02	<i>Aerococcaceae</i>	2.499	0.2731	2.28E-02	
<i>Bacillaceae</i>	1.361	0	1.90E-02	<i>Coriobacteriaceae</i>	0.451	0.3785	NS	<i>Planococcaceae</i>	2.439	0.001683	7.03E-03	
<i>S24-7</i>	1.358	0.7749	4.03E-02	<i>S24-7</i>	0.266	0.4476	2.37E-02	<i>Ruminococcaceae</i>	1.95	0.3866	3.99E-03	
<i>Coriobacteriaceae</i>	1.241	0.6206	3.01E-02	<i>Bacillaceae</i>	0.2608	0	3.73E-02	<i>S24-7</i>	0.7812	0.4473	NS	
<i>[Mogibacteriaceae]</i>	0.548	0.3557	7.34E-03	<i>Aerococcaceae</i>	0.2524	0.0623	1.30E-02	<i>[Mogibacteriaceae]</i>	0.4774	0.03272	2.23E-02	
<i>Planococcaceae</i>	0.2407	0	1.47E-02	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.04292	0.2031	2.00E-06	<i>Rikenellaceae</i>	0.2633	0.01555	2.32E-02	
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.1462	0.248	NS					<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.2619	0.1808	NS	
								<i>Staphylococcaceae</i>	0.2544	0.05422	NS	
								<i>Lactobacillaceae</i>	0.2505	0.0467	1.90E-04	
								<i>Enterococcaceae</i>	0.08181	0.1239	NS	

At the phylum level, fecal microbiota was dominated by *Firmicutes* in both groups, followed by *Actinobacteria* in the metformin group (8.52% control vs. 28.76% metformin, $p = 5.6 \times 10^{-4}$) and *Bacteroidetes* in the control group (17.94% control vs. 6.50% metformin, $p = 6.8 \times 10^{-5}$). The same trend occurred in cecal microbiota composition.

In the intestinal microbiota, the control group was dominated by *Firmicutes* (54.14% control vs. 22.63% metformin, $p = 4.2 \times 10^{-5}$), whereas the metformin group was dominated by *Actinobacteria* (37.08% control vs. 70.97% metformin, $p = 1.5 \times 10^{-5}$). Metformin treatment decreased abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* for the benefit of increased *Actinobacteria*, in the three digestive sites.

Notably, metformin treatment significantly decreased the abundance of *Clostridiales* in the cecum and intestine (90.33% control vs. 72.38% metformin, $p < 1 \times 10^{-6}$, 25.2% control vs. 2.89% metformin, $p = 9.0 \times 10^{-6}$ in cecal and intestinal samples, respectively). However, in the three digestive sites, metformin treatment increased *Bifidobacteriales* abundance (7.28% control vs. 28.14% metformin, $p = 2.8 \times 10^{-4}$, 1.39% control vs. 18.15% metformin, $p = 2.0 \times 10^{-6}$, 20.79% control vs. 67.44% metformin, $p < 1.0 \times 10^{-6}$, in stool, cecal, and intestinal samples, respectively).

Taxonomic repartition at the family level is shown as bar plots in Figure 3a. Interestingly, family *Bifidobacteriaceae* was significantly more abundant in the microbiota of the metformin group than in that of the control in all three digestive sites (7.3% control vs. 28.1% metformin, $p = 2.8 \times 10^{-4}$, 1.4% control vs. 18.2% metformin, $p = 2 \times 10^{-6}$; 20.8% control vs. 67.4% metformin, $p < 1.0 \times 10^{-6}$ in fecal, cecal, and intestinal samples, respectively). Metformin treatment significantly decreased *Lachnospiraceae* abundance in cecal and intestinal contents, but this effect was not observed in fecal samples (34.13% control vs. 34.93% metformin, non-significant, 57.86% control vs. 43.3% metformin, $p = 3.5 \times 10^{-4}$; 19.8% control vs. 2.11% metformin, $p = 9.0 \times 10^{-6}$ in fecal, cecal, and intestinal samples, respectively; Table 1, Figure 3a).

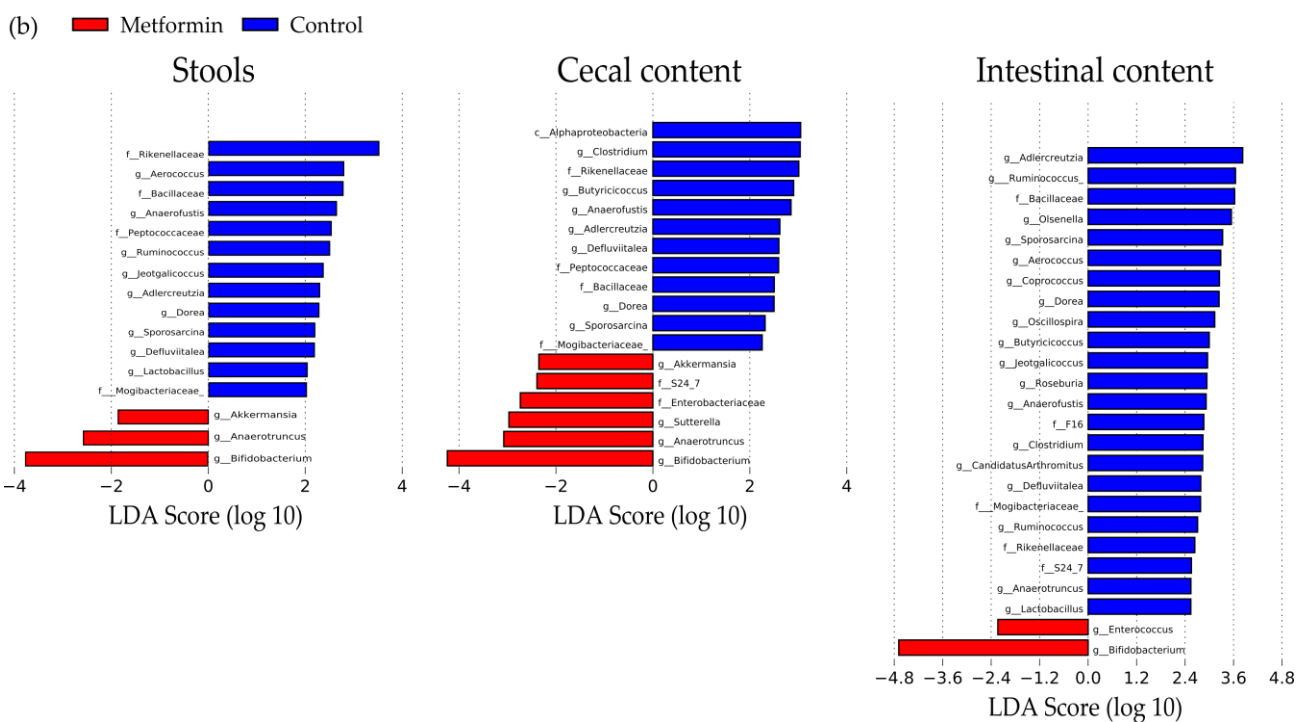
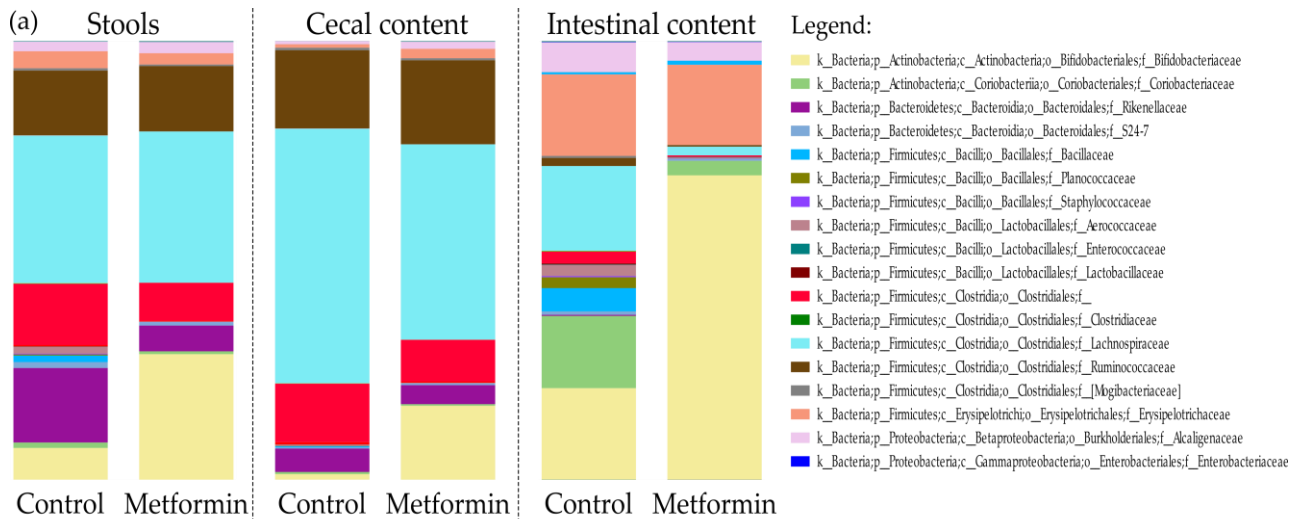


Figure 3. (a) Taxonomic distribution of the digestive microbiota in mice infected with *H. pylori* at the family level. (b) Histogram obtained using linear discriminant analysis (LDA) effect size analysis (LEfSe) to identify differentially abundant taxa in fecal, cecal, and intestinal samples. Genera and families with LDA scores > 2 were identified as significantly more abundant between the metformin and control groups ($p < 0.05$).

Liner discriminant analysis (LDA) effect size analysis (LEfSe) was conducted to identify differentially abundant taxa in the three sample types. LDA scores were determined, and the specific taxa associated with metformin treatment were identified (Figure 3b).

Among the fecal samples, 16 bacterial taxa were identified, including 12 genera that were differentially abundant between treatment groups (Figure 3b). Compared to the metformin group, 13 taxa were more abundant in the fecal microbiota of control mice.

In the metformin group, a higher abundance of *Akkermansia*, *Anaerotruncus*, and *Bifidobacterium* genera were observed in the fecal microbiota and also in the cecal content. Among them, *Bifidobacterium* was also more abundant in intestinal microbiota (Figure 3b). Within the genera *Akkermansia* and *Bifidobacterium*, the species *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium pseudolongum* were identified (Table S2).

Table S3 shows the LEfSe analysis results for the different digestive sites. Only bacterial taxa with LDA scores > 2 in at least two of the three digestive sites were included; this criterion was met by twelve bacterial taxa in the control group and three bacterial genera in the metformin group (*Bifidobacterium*, *Anaerotruncus*, and *Akkermansia*).

Metformin Directly Inhibits the *Lactobacillus* and *Clostridium* Gut Bacterial Strains *In Vitro*

To determine which bacterial strains are directly affected by metformin in the gut, we further examined those strains with significantly different relative abundance between the metformin and control groups and easily cultivable. Metformin treatment decreased the abundance of *Lactobacillus*, *Aerococcus*, and *Clostridiales* strains, and increased that of *Bifidobacterium* strains (Table S3).

We observed no significant growth differences in *Aerococcus sanguinicola*, *Bifidobacterium breve*, or *Bifidobacterium longum* at different metformin concentrations ($p > 0.01$, Figure 4). Significant decreases in growth were observed in *Lactobacillus harbinensis* and *Clostridium difficile* strains incubated with metformin concentrations of 20 and 50 mM ($p < 0.01$) and in *Clostridium perfringens* strains treated with higher metformin concentrations (50 and 100 mM, $p < 0.01$, Figure 4).

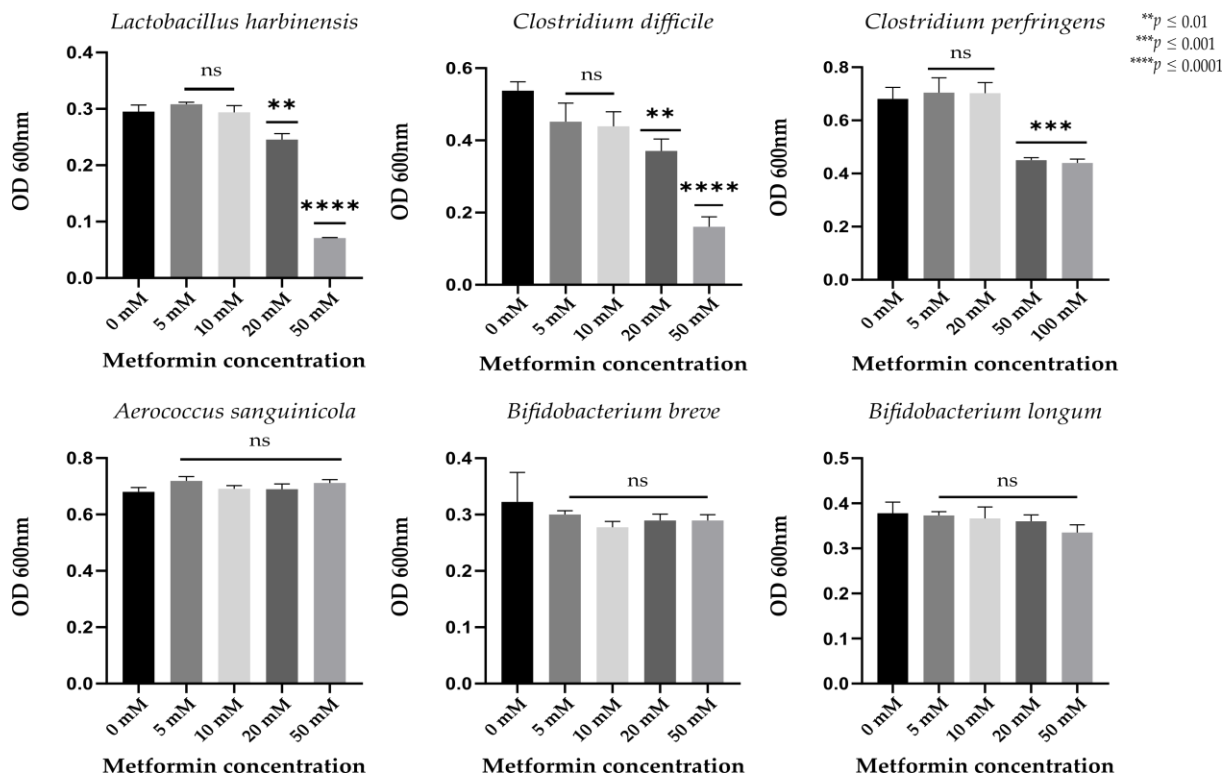


Figure 4. Growth of different bacterial strains at different metformin concentrations after 24 hours of anaerobic incubation. ns, non-significant. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Student's t -test; $n = 3$).

Potential Functional Pathways of Gut Microbiota are Modified by Metformin Treatment in Mice Infected with *H. pylori*

Functional analysis of the gut microbiota was performed using the PICRUSt software based on closed-reference selection of OTUs. We examined 159 pathways based on the KEGG reference database. Only KEGG pathways with a relative abundance $> 0.001\%$ were considered; these represented 124, 119, and 132 KEGG pathways in stool, cecal, and intestinal samples, respectively. Pathways with a significantly different abundance between the metformin and control groups were identified for all three different digestive sites ($p < 0.05$, after Bonferroni correction). These differentially enriched KEGG pathways are shown in Figures 5 and S4.

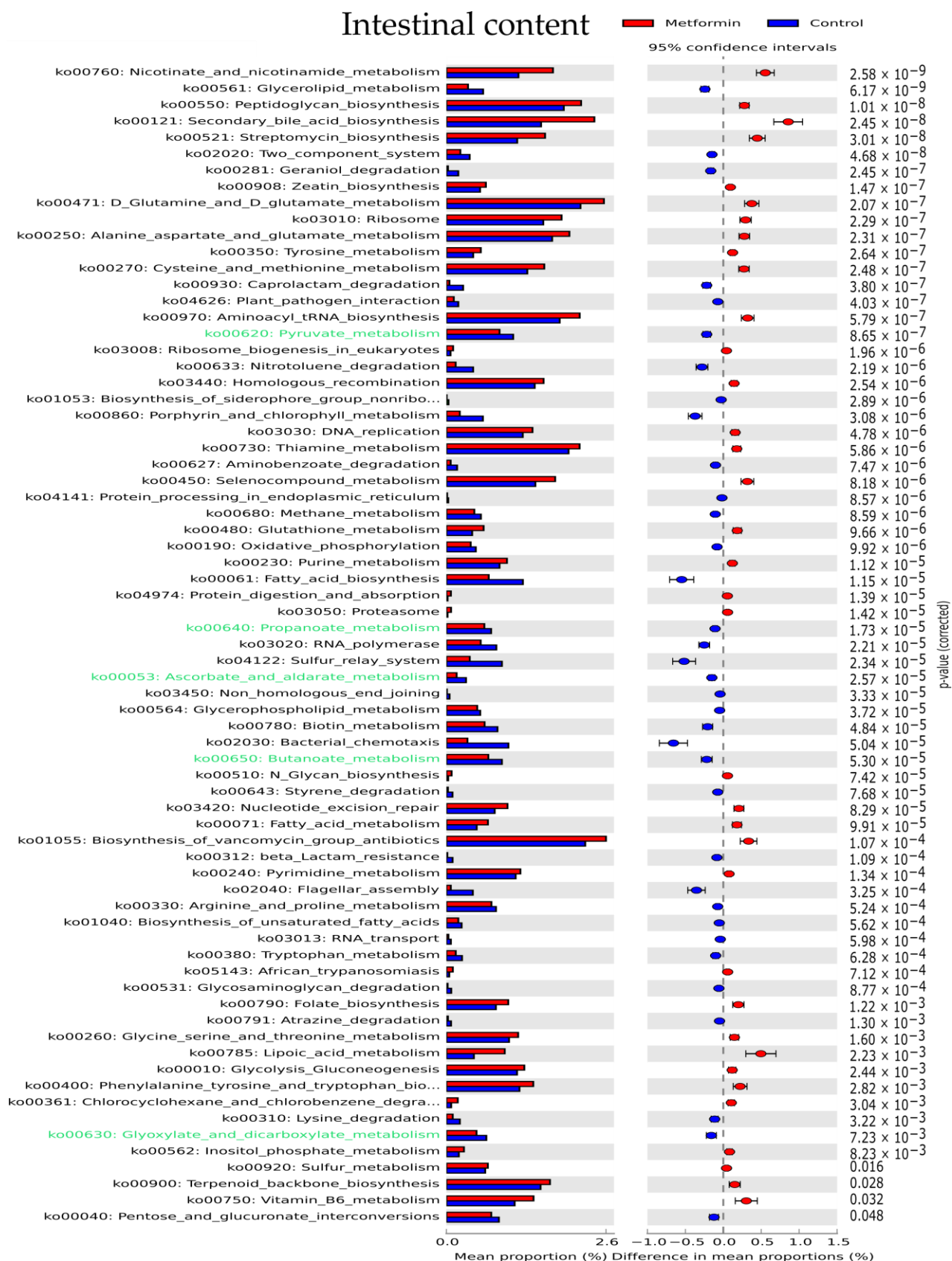


Figure 5. Differentially enriched KEGG pathways (relative abundance > 0.001%) in intestinal microbiota ($p < 0.05$). KEGG pathways implicated in carbohydrate metabolism are indicated with green text.

In intestinal samples, the most significantly enriched KEGG pathways in the metformin group were nicotinate and nicotinamide metabolism, peptidoglycan bio-synthesis, secondary bile acid biosynthesis, and streptomycin biosynthesis (Figure 5). Carbohydrate metabolism was predicted to be higher in the microbiota of control group mice than in metformin-treated mice. Pathways implicated in carbohydrate metabolism (green text, Figure 5) including pyruvate, propanoate, ascorbate, butanoate, and glyoxylate metabolism were predicted to be overexpressed in the control group.

Beta diversity analysis according to the predicted functional pathways for each group was performed. A comparison of the microbiota of the metformin and control groups based on metabolic function showed differential bacterial profiles on 2D PCoA plots (Figure 6a). Adonis statistical tests performed on these data showed significant differences among Bray–Curtis distances in all sample types ($p = 0.001$).

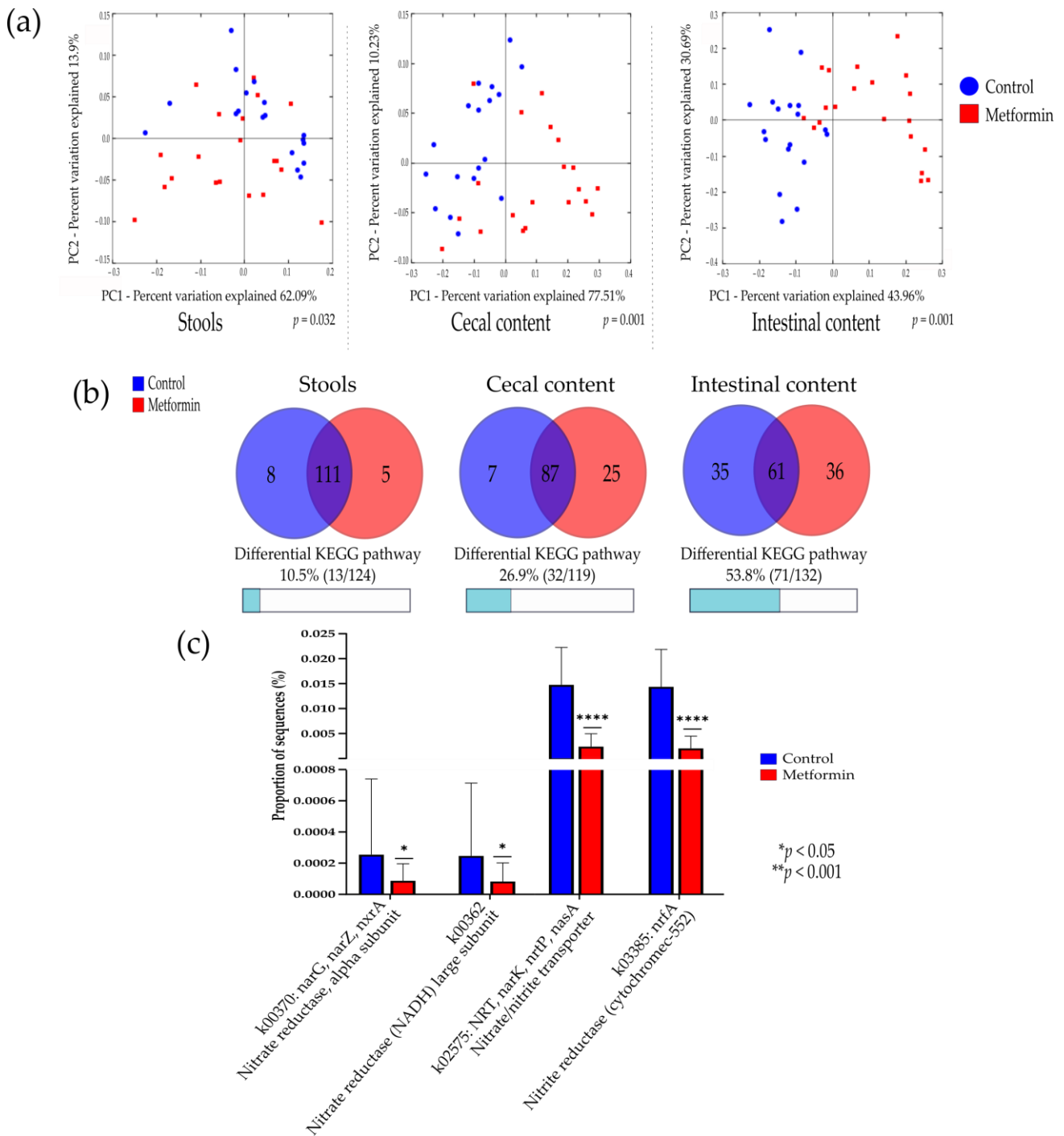


Figure 6. Potential functional pathways in the gut microbiota of metformin and control group mice. (a) PCoA plot comparing the microbiota of the metformin and control groups based on potential functional pathways identified using Bray–Curtis distances. Adonis statistical tests showed significant differences between the two groups (999 permutations, $R^2 = 0.103, 0.318,$ and 0.310 for stool, cecal, and intestinal content, respectively, $p = 0.032$ for stool, $p = 0.001$ for cecal and intestinal content). (b) Characteristics of differential KEGG pathway numbers in stool, cecal, and intestinal content.

Red and blue circles indicate the numbers of KEGG pathways predicted to be relatively overexpressed in the metformin and control group, respectively. (c) Proportion of sequences of specific genes coding for nitrate reductase and nitrite reductase enzyme in the intestinal microbiota for the metformin (n = 20) and control (n = 18) groups. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; Mann–Whitney U test.

In stool samples, five predicted KEGG pathways were significantly more abundant in the metformin group, compared with eight KEGG pathways in the control group. The differential KEGG pathways between the metformin and control groups represented 10.5% and 26.9% of all pathways examined for stool and cecal content, respectively. The highest number of differential KEGG pathways was found in intestinal content (53.8%, Figure 6b).

Finally, nitrate and nitrite-reducing bacterial species were specifically studied in intestinal content by focusing on the KEGG gene expression of k02575, k00370, k00363, and k03385, which code for nitrate or nitrite-reductase enzymes. Intestinal bacteria in the microbiota of metformin-treated mice showed significantly decreased nitrate and nitrite-reductase functions ($p < 0,05$, Mann–Whitney U test) (Figure 6c).

PICRUSt analyses showed that metformin treatment led to significant changes in predicted metabolic functions by gut bacteria in infected mice, specifically in intestinal sites.

DISCUSSION

In the present study, we examined changes in the gut microbiota at three different digestive sites, represented by stool, cecal, and intestinal samples, induced by oral metformin treatment of mice infected with *H. pylori*. We performed 16S rRNA gene sequencing and characterized the gut microbial profiles of mice infected with *H. pylori* and treated with metformin.

Our results showed that metformin decreased richness and diversity of the microbiota of mice. High microbiota diversity and richness are usually considered to be markers of a healthy microbiota; however, decreases in the abundance of any bacterial taxa may lead to the relative emergence of metabolically beneficial microorganisms such as *Akkermansia muciniphila*, which is associated with metabolic improvement [26].

In this study, *Akkermansia muciniphila* was found to be more abundant in metformin-treated mice than in control mice, which is consistent with the results of a previous study of diabetic patients that suggested that these effects could contribute to the therapeutic effect of metformin in diabetes treatment [27].

Beta diversity analyses showed that microbial features depended on the treatment received. Other studies have reported significant changes in the microbiota of obese mice, healthy mice, and diabetic humans following metformin treatment [27–30].

The direct effect of metformin on bacterial growth was measured on six bacterial strains. Thanks to taxonomic composition analysis, we selected six bacterial species that were available in the laboratory, easily cultivable, and with relative abundance either positively or negatively influenced by metformin treatment. This experiment showed that metformin directly inhibited the growth of *Lactobacillus* and *Clostridium* gut bacteria. Metformin can also indirectly modify the microbiota by acting on host physiology; for example, metformin increases the bile acid pool within the intestine [31], which may affect stool consistency and the microbiome [32]. More recently, metformin treatment was revealed to enhance the release of glucose into the intraluminal space of the intestine in humans [33]; therefore, high glucose concentration in the intestinal lumen may impact bacterial development. Thus, metformin-induced microbiota changes are probably the result of both direct and indirect effects.

The effects of metformin on human health have been intensively studied in recent years. Beyond its implication in diabetes treatment, metformin represents a promising anticancer drug in combination with conventional chemotherapies for different types of cancer [34]. Recent studies have also demonstrated the antiaging effects of metformin [35] and its direct antimicrobial effect against *H. pylori* has opened new avenues of research [19]. In cancer prevention, metformin has been shown to reduce cancer incidence in diabetic patients [6].

Microbiota composition and function are well recognized as influencing carcinogenesis through different mechanisms [36]. *H. pylori* is the best example of a specific bacterial pathogen that can trigger carcinogenesis by promoting inflammation and degradation of the gastric epithelium [9].

The bacterial microbiota may also influence intestinal barrier preservation, inflammation modulation, and the production of cancer-promoting metabolites [37]. In this context, we investigated the influence of metformin treatment on microbiota mechanisms potentially implicated in gut carcinogenesis.

Concerning specific bacterial taxa, despite decreases global richness, metformin treatment led to increases in *Bifidobacterium* abundance. *Bifidobacterium* species have demonstrated anti-colorectal cancer activity by producing metabolites that directly inhibit the growth of colon cancer cells *in vitro* [38]. *Bifidobacterium* species are often integrated into probiotic products for health treatments, including cancer prevention. It has been suggested that probiotics containing *Bifidobacterium* species can contribute to colorectal cancer prevention and improvement of safety and effectiveness of colorectal cancer therapy [39].

A recent study of diabetic and non-diabetic mice with induced colorectal cancer showed that metformin treatment in association with probiotics containing *Bifidobacterium* species actively prevented inflammatory and carcinogenic processes [40]. Furthermore, a study of *H. pylori*-related gastric lesions showed a higher relative abundance of *Firmicute* in gastritis and gastric metaplasia patients [41]. Interestingly, our results showed a decreased relative abundance of *Firmicute* bacteria in *H. pylori*-infected mice in response to metformin treatment.

Functional features of the microbiota of mice in this study were examined using the PICRUST software [23]. The resulting bacterial predicted profiles showed that the metformin and control groups had distinct metabolic functional signatures. The intestinal microbiota showed the highest expression among differential metabolic KEGG pathways between groups, indicating that metformin treatment leads to significant modification of the functional properties of the digestive microbiota, particularly in intestinal sites.

Specifically, metformin treatment decreased nitrate and nitrite reductase functions in intestinal bacteria. The nitrate-reducing bacterial pathway was analyzed because it has been suggested to participate in the increase of intragastric concentrations of nitrite and N-nitroso-compounds [42]. N-nitroso-compounds promote mutagenesis and protooncogene expression, and inhibit apoptosis; they can also contribute to gastric carcinogenesis [43,44]. Increased functional activity of nitrate reductase has been observed in the gastric microbiota of gastric cancer patients in comparison with chronic gastritis patients [45].

In the present study, KEGG pathways involved in carbohydrate metabolism were enriched in the control group, which comprised mice infected with *H. pylori* but not treated with metformin. These pathways are predictive of bacterial production of short-chain fatty acids [46], which have been linked to cell hyperproliferation in colorectal and esophageal cancer [47,48]. These pathways have also been found to be enriched in the gastric microbiota of gastric cancer patients [18]. Together, these findings demonstrate the potential contribution of bacteria-producing short-chain fatty acids to digestive tumorigenesis. These first results suggest that metformin, by modulating microbiota function, could be considered as a potentially interesting agent for digestive cancer prevention. Molecular mechanisms that sustain the anticancer effect of metformin through the regulation of glucose metabolism have been reported [49]. Thus, host physiology and the microbiota constitute different potential targets for metformin action in preventing cancer occurrence. In diabetic patients, metformin reduced the incidence of adenomas that could transform into colorectal cancer; therefore, metformin may be useful for the prevention of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes [50]. In mice, metformin use in association with probiotics reinforces beneficial effect on colorectal cancer prevention [40].

The limitations of this study were the lack of information about gastric microbiota; more experiments should be performed to understand the metabolic modifications induced with metformin microbiota changes. We used female mice, which are less aggressive than male and easier to use in animal facilities. Consequently, results obtained cannot completely be extrapolated to male as there are few differences in the composition of gut microbiota between genders and between female of different hormonal status [51,52]. However, a female from either the control or metformin group had the same age at the beginning and during all the length of the experiment; therefore, mice from the two groups were exposed to the same sexual hormonal modifications, allowing the groups comparison.

In conclusion, the results of this study show that metformin significantly alters the composition and predicted function of the gut microbiota of mice infected with *H. pylori*. These modifications could be implicated in gut cancer prevention.

Author Contributions: Conceptualization, E.B.; methodology, E.B., P.L., and M.J.; formal analysis M.J.; resources, E.B. and P.L.; data curation, S.C.; writing (original draft preparation), M.J.; writing (review and editing), M.J., E.B., S.C., and P.L.; supervision, E.B. and P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Experiments on mice were carried out in level 2 animal facilities at the University of Bordeaux in agreement with the local Ethics Committee on Animal Experiments CEEA50 of Bordeaux (approval number 10174, July 2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: The authors thank Raphaël Enaud for helpful discussion and useful advice regarding the DNA extraction protocol.

The English in this document has been checked by at least two professional editors, both native speakers of English. For a certificate, please see: <http://www.textcheck.com/certificate/Rvelva>

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

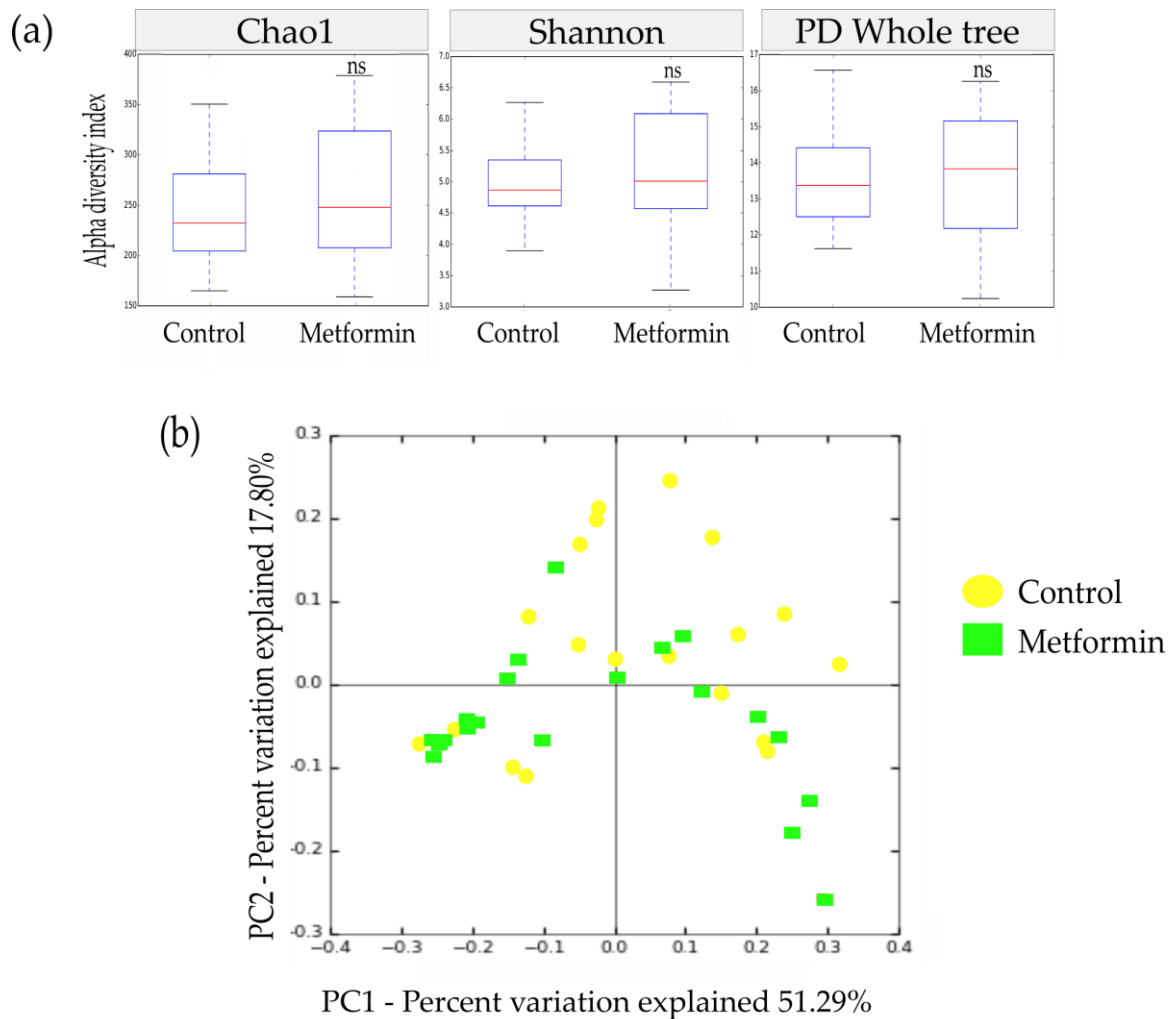
1. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 193–203. <https://doi.org/10.2337/dc08-9025>.
2. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 1167–74. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>.
3. Bailey CJ, Mynett KJ, Page T. Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br J Pharmacol* **1994**, *112*, 671–5. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13128.x>.
4. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* **1994**, *24*, 49–57. <https://doi.org/10.3109/00498259409043220>.
5. Morales DR, Morris AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med* **2015**, *66*, 17–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093128>.
6. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **2005**, *330*, 1304–5. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7>.

7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68*, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
8. Zhou X-L, Xue W-H, Ding X-F, Li L-F, Dou M-M, Zhang W-J, et al. Association between metformin and the risk of gastric cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. *Oncotarget* **2017**, *8*, 55622–31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16973>.
9. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* **1992**; *52*: 6735–40.
10. González CA, Megraud F, Buissonniere A, Lujan Barroso L, Agudo A, Duell EJ, et al. *Helicobacter pylori* infection assessed by ELISA and by immunoblot and noncardia gastric cancer risk in a prospective study: the Eurgast-EPIC project. *Ann Oncol* **2012**, *23*, 1320–4. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr384>.
11. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* **2000**, *22*, 283–97. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040>.
12. Mégraud F, Bessède E, Varon C. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection* **2015**, *21*, 984–90. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.004>.
13. Lofgren JL, Whary MT, Ge Z, Muthupalani S, Taylor NS, Mobley M, et al. Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 210–20. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.048>.
14. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **2015**, *21*, 8787–803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>.
15. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* **2016**, *16*, 341–52. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>.
16. Cremonesi E, Governa V, Garzon JFG, Mele V, Amicarella F, Muraro MG, et al. Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer. *Gut* **2018**, *67*, 1984–94. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313498>.
17. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *The ISME Journal* **2011**, *5*, 574–9. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.149>.
18. Coker OO, Dai Z, Nie Y, Zhao G, Cao L, Nakatsu G, et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut* **2018**, *67*, 1024–32. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314281>.
19. Courtois S, Bénéjat L, Izotte J, Mégraud F, Varon C, Lehours P, et al. Metformin can inhibit *Helicobacter pylori* growth. *Future Microbiol* **2018**, *13*, 1575–83. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0184>.
20. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **1997**, *112*, 1386–97. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(97\)70155-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(97)70155-0).
21. Lehours P, Ménard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, et al. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun* **2004**, *72*, 880–8. <https://doi.org/10.1128/iai.72.2.880-888.2004>.

22. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* **2016**, *7*, 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
23. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* **2013**, *31*, 814–21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.
24. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **2011**, *12*, R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
25. Parks DH, Beiko RG. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 715–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq041>.
26. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* **2017**, *106*, 171–81. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>.
27. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* **2017**, *23*, 850–8. <https://doi.org/10.1038/nm.4345>.
28. Lee H, Lee Y, Kim J, An J, Lee S, Kong H, et al. Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes* **2018**, *9*, 155–65. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1405209>.
29. Ma W, Chen J, Meng Y, Yang J, Cui Q, Zhou Y. Metformin Alters Gut Microbiota of Healthy Mice: Implication for Its Potential Role in Gut Microbiota Homeostasis. *Front Microbiol* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01336>.
30. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **2015**, *528*, 262–6. <https://doi.org/10.1038/nature15766>.
31. Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T. Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* **2008**, *149*, 2341–51. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1142>.
32. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* **2016**, *59*, 426–35. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3844-9>.
33. Morita Y, Nogami M, Sakaguchi K, Okada Y, Hirota Y, Sugawara K, et al. Enhanced Release of Glucose Into the Intraluminal Space of the Intestine Associated With Metformin Treatment as Revealed by [18F]Fluorodeoxyglucose PET-MRI. *Diabetes Care* **2020**, *43*, 1796–802. <https://doi.org/10.2337/dc20-0093>.
34. Zhang H-H, Guo X-L. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* **2016**, *78*, 13–26. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3037-3>.
35. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab* **2016**, *23*, 1060–5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.011>.
36. Rajagopala SV, Vashee S, Oldfield LM, Suzuki Y, Venter JC, Telenti A, et al. The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prev Res* **2017**, *10*, 226–34. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0249>.
37. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 800–12. <https://doi.org/10.1038/nrc3610>.

38. Bahmani S, Azarpira N, Moazamian E. Anti-colon cancer activity of *Bifidobacterium* metabolites on colon cancer cell line SW742. *Turk J Gastroenterol* **2019**, *30*, 835–42. <https://doi.org/10.5152/tjg.2019.18451>.
39. Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Hemati M, Nejad ZR, Arabkari V, et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 17127–43. <https://doi.org/10.1002/jcp.28473>.
40. Al Kattar S, Jurjus R, Pinon A, Leger DY, Jurjus A, Boukarim C, et al. Metformin and Probiotics in the Crosstalk between Colitis-Associated Colorectal Cancer and Diabetes in Mice. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*. <https://doi.org/10.3390/cancers12071857>.
41. Gao J-J, Zhang Y, Gerhard M, Mejias-Luque R, Zhang L, Vieth M, et al. Association Between Gut Microbiota and *Helicobacter pylori*-Related Gastric Lesions in a High-Risk Population of Gastric Cancer. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**, *8*, 202. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00202>.
42. Leach SA, Thompson M, Hill M. Bacterially catalysed N-nitrosation reactions and their relative importance in the human stomach. *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 1907–12. <https://doi.org/10.1093/carcin/8.12.1907>.
43. Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 8823–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8823>.
44. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* **2002**, *2*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-2-8>.
45. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut* **2018**, *67*, 226–36. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314205>.
46. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **2006**, *40*, 235–43. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>.
47. Kaakoush NO, Morris MJ. The oesophageal microbiome: an unexplored link in obesity-associated oesophageal adenocarcinoma. *FEMS Microbiol Ecol* **2016**, *92*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw161>.
48. Belcheva A, Irrazabal T, Robertson SJ, Streutker C, Maughan H, Rubino S, et al. Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells. *Cell* **2014**, *158*, 288–99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.051>.
49. Salani B, Del Rio A, Marini C, Sambuceti G, Cordera R, Maggi D. Metformin, cancer and glucose metabolism. *Endocr Relat Cancer* **2014**, *21*, R461-471. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0284>.
50. Cho YH, Ko BM, Kim SH, Myung YS, Choi JH, Han JP, et al. Does metformin affect the incidence of colonic polyps and adenomas in patients with type 2 diabetes mellitus? *Intest Res* **2014**, *12*, 139–45. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.2.139>.
51. Org E, Mehrabian M, Parks BW, Shipkova P, Liu X, Drake TA, et al. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes* **2016**, *7*, 313–22. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>.
52. Santos-Marcos JA, Rangel-Zuñiga OA, Jimenez-Lucena R, Quintana-Navarro GM, Garcia-Carpintero S, Malagon MM, et al. Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. *Maturitas* **2018**, *116*, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.07.008>

SUPPLEMENTARY MATERIALS



$$p = 0.142$$

Figure S1. Alpha and beta diversity comparison of fecal microbiota between the metformin and control groups before the beginning of treatment. (a) Alpha diversity analyses. ns, non-significant. Student's *t*-test. (b) PCoA plots created using weighted UniFrac distances. Green and yellow dots indicate metformin and control samples, respectively.

Table S1. Number of reads obtained in each sample after preprocessing.

Samples	Number of reads	Samples	Number of reads	Samples	Number of reads	Samples	Number of reads
1	79645	40	64949	79	63410	118	78084
2	55989	41	64579	80	52032	119	102842
3	92015	42	64265	81	57533	120	86872
4	58957	43	57574	82	59439	121	95966
5	77663	44	66610	83	54356	122	78709
6	70640	45	57122	84	50410	123	88562
7	87986	46	83783	85	45497	124	89355
8	66420	47	64824	86	62147	125	86426
9	84913	48	60005	87	64362	126	81709
10	95964	49	63235	88	51869	127	105105
11	91683	50	62651	89	52023	128	95330
12	72678	51	64494	90	59943	129	123933
13	87168	52	69597	91	41804	130	84681
14	66789	53	59757	92	62311	131	89451
15	79866	54	70762	93	54698	132	82373
16	65482	55	68541	94	42045	133	126809
17	66102	56	61862	95	61350	134	110943
18	62044	57	67608	96	44858	135	85467
19	57239	58	55190	97	32606	136	82502
20	87881	59	62301	98	53454	137	85507
21	66821	60	71317	99	45075	138	109549
22	86593	61	53220	100	44837	139	95059
23	104498	62	59081	101	59142	140	45628
24	78768	63	51903	102	51582	141	55684
25	74352	64	69273	103	50626	142	63501
26	53154	65	57854	104	41510	143	60142
27	70604	66	67666	105	52298	144	59139
28	71264	67	60616	106	45921	145	62810
29	71625	68	52588	107	48307	146	63360
30	80648	69	56615	108	51070	147	60401
31	65641	70	60102	109	61448	148	70067
32	65373	71	65017	110	53567	149	63861
33	55860	72	51024	111	58184	150	54678
34	64601	73	58001	112	61833	151	50451
35	74087	74	61585	113	81673	152	56174
36	82083	75	49701	114	77242	153	55721
37	41921	76	54286	115	74677		
38	71215	77	62250	116	66769		
39	63023	78	59153	117	88884		

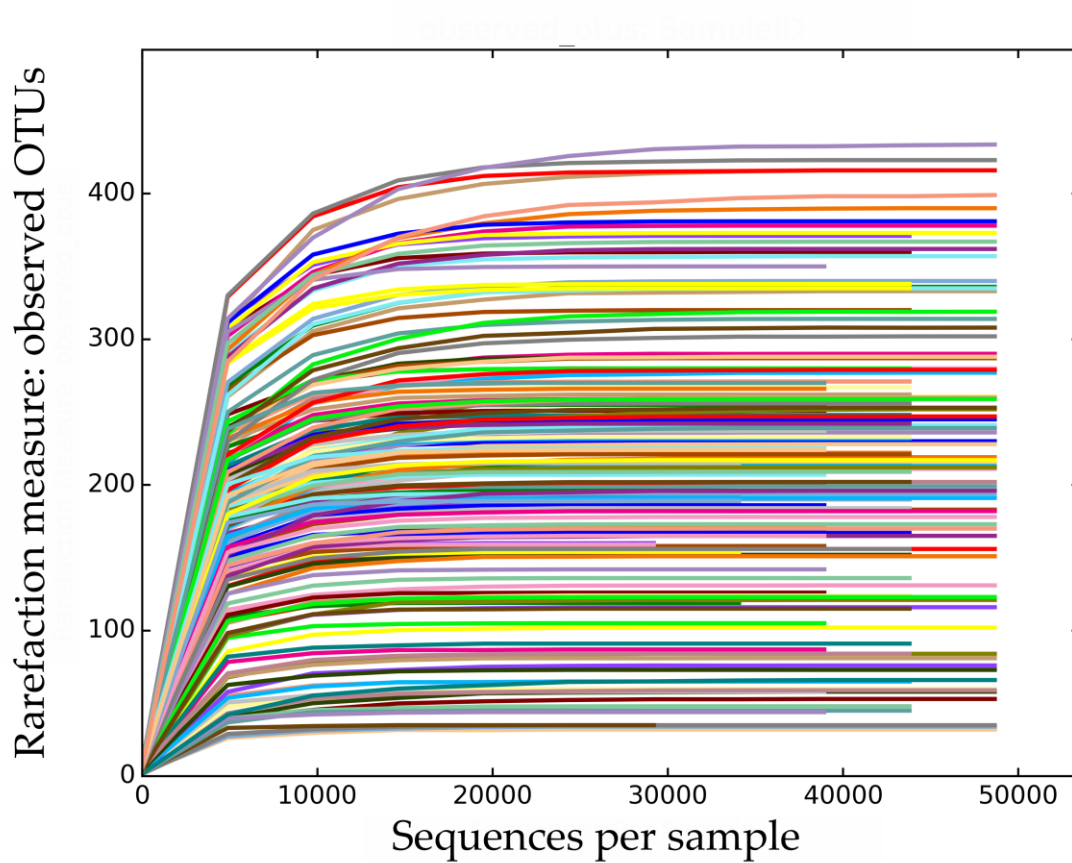


Figure S2. Rarefaction curves showing the number of observed OTUs as a function of the number of sequences per samples. All samples (153) analyzed in this study were presented.

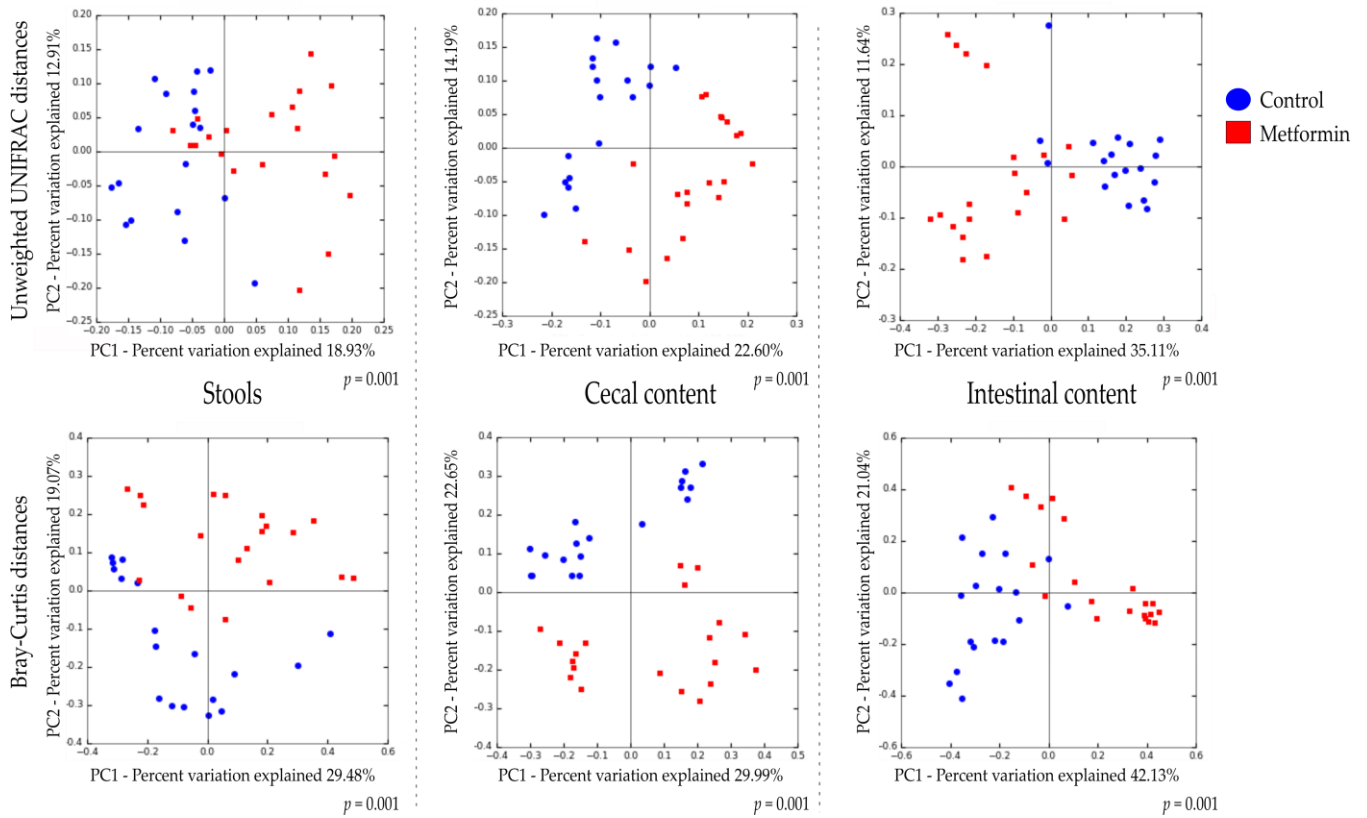


Figure S3. 2D PCoA plots created using unweighted UniFrac and Bray–Curtis distances. Red and blue dots indicate metformin and control samples, respectively. Adonis statistical tests showed significant differences between the two groups (999 permutations; for unweighted Unifrac distances $R^2 = 0.138$, 0.174 and 0.260 for stool, cecal and intestinal content respectively, for Bray-Curtis distances $R^2 = 0.162$, 0.200 and 0.297 for stool, cecal and intestinal content respectively, $p = 0.001$).

Table S2. Comparison of the relative abundance of bacteria between the metformin and control treatment groups at species level for different digestive sites. The comparison was performed with Multiple *t* test. Ctrl, control; Met, metformin; NS, non-significant ($p > 0.05$).

Species	Stools		Cecal content		Intestinal content		<i>p</i>
	Ctrl (%)	Met (%)	Ctrl (%)	Met (%)	Ctrl (%)	Met (%)	
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	7.28	28.14	2.83E-04	4.4E-04	0	0	NS
<i>Alistipes indistinctus</i>	0	2.77E-03	NS	1.92	18.31	9.00E-06	NS
<i>Jeogalicoccus psychrophilus</i>	0.148	0.020	6.12E-03	0.025	9.13E-03	NS	NS
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.026	4.28E03	1.31E-02	3.09E-03	2.20E-03	NS	NS
<i>Staphylococcus sciuri</i>	4.16E-03	2.19E-03	NS	0	6.21E-04	NS	NS
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1.89E-03	0	NS	0.058	0.023	8.62E-03	NS
<i>Defluvitalea saccharophila</i>	0.165	0.030	8.45E-04	2.54	2.55	NS	NS
<i>Ruminococcus gnavus</i>	2.42	2.15	NS	1.61	0.83	4.65E-04	NS
<i>Butyricoccus pullicaecorum</i>	0.919	0.745	NS	0.013	4.23E-03	3.27E-02	NS
<i>Clostridium methylopentosum</i>	5.40E-03	0.012	NS	0	7.56E-03	NS	NS
<i>Oxalobacter formigenes</i>	4.43E-03	0	2.83E-02	8.80E-04	8.9E-03	NS	NS
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0	8.95E-03	NS	0.048	0.21	2.00E-06	NS
<i>Escherichia coli</i>	9.11E-03	0.018	NS	0	0	0	NS
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.146	0.248	NS	0	0.085	0	NS
					0	0	NS
					1.40E-03	0	NS
					0.26	0.18	NS
					0.020	3.38E-03	1.24E-02
					2.04E-03	0	NS
					0.11	3.85E-03	1.80E-03
					4.9	0.627	8.58E-04
					0.22	0.031	5.30E-05
					0	3.78E-03	NS
					0	9.61E-03	NS
					0.085	0.084	NS
					0	9.34E-03	NS
					1.40E-03	0	NS
					0.26	0.18	NS

Table S3. Bacterial taxa with LDA scores > 2 in at least two of the three digestives sites in the metformin and control groups. S, stool; CC, cecal content; IC, intestinal content.

Bacterial taxa	Digestive site	LDA score	Group	p
k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinobacteria.f_Bifidobacteriales.f_Bifidobacteriaceae.g_Bifidobacterium	IC	4.66	Metformin	7.71E-06
k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinobacteria.f_Bifidobacteriales.f_Bifidobacteriaceae.g_Bifidobacterium	S	4.32	Metformin	1.62E-04
k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Actinobacteria.o_Actinobacteria.f_Bifidobacteriales.f_Bifidobacteriaceae.g_Bifidobacterium	CC	4.22	Metformin	5.76E-07
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaeae.g_Anaerotruncus	S	3.01	Metformin	5.01E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaeae.g_Anaerotruncus	CC	3.07	Metformin	8.60E-04
k_Bacteria.p_Verrucomicrobia.c_Verrucomicrobiae.o_Verrucomicrobiales.f_Verrucomicrobiaceae.g_Akkermansia	S	2.09	Metformin	1.09E-02
k_Bacteria.p_Verrucomicrobia.c_Verrucomicrobiae.o_Verrucomicrobiales.f_Verrucomicrobiaceae.g_Akkermansia	CC	2.32	Metformin	2.47E-05
k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Coriobacteria.o_Coriobacteriales.f_Coriobacteriaceae.g_Adlercreutzia	CC	2.47	Control	5.03E-04
k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Coriobacteria.o_Coriobacteriales.f_Coriobacteriaceae.g_Adlercreutzia	IC	3.83	Control	2.67E-07
k_Bacteria.p_Actinobacteria.c_Coriobacteria.o_Coriobacteriales.f_Coriobacteriaceae.g_Adlercreutzia	S	5.6	Control	5.10E-06
k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Rikenellaceae	IC	2.74	Control	2.53E-04
k_Bacteria.p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Rikenellaceae	S	4.05	Control	4.83E-05
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Bacillales.f_Planococcaeae.g_Sporosarcina	CC	2.42	Control	1.61E-04
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Bacillales.f_Planococcaeae.g_Sporosarcina	IC	3.37	Control	2.22E-08
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Bacillales.f_Planococcaeae.g_Sporosarcina	S	2.49	Control	5.94E-05
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Aerococcaeae.g_Aerococcus	IC	3.37	Control	7.09E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Aerococcaeae.g_Aerococcus	S	3.2	Control	2.83E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus	IC	2.81	Control	4.18E-05
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus	S	2.32	Control	2.80E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Mogibacteriaceae	IC	2.84	Control	5.76E-06
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Mogibacteriaceae	S	2.34	Control	3.80E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Eubacteriaceae.g_Anaerofustis	CC	2.87	Control	4.09E-05
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Eubacteriaceae.g_Anaerofustis	IC	3.18	Control	4.82E-06
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Eubacteriaceae.g_Anaerofustis	S	2.64	Control	1.09E-07
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Defluviitalea	CC	2.76	Control	6.04E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Defluviitalea	IC	3.00	Control	5.15E-05
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Defluviitalea	S	2.38	Control	1.30E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Dorea	CC	2.47	Control	5.48E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Dorea	IC	3.23	Control	1.39E-06
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.g_Dorea	S	2.62	Control	5.00E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.Other	CC	2.81	Control	6.25E-04
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Lachnospiraceae.Other	IC	2.92	Control	5.63E-04
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Peptococcaeae	CC	2.6	Control	4.30E-05
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Peptococcaeae	S	2.65	Control	1.14E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaeae.g_Butyricoccus	CC	2.92	Control	2.86E-03
k_Bacteria.p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaeae.g_Butyricoccus	IC	3.24	Control	4.30E-05

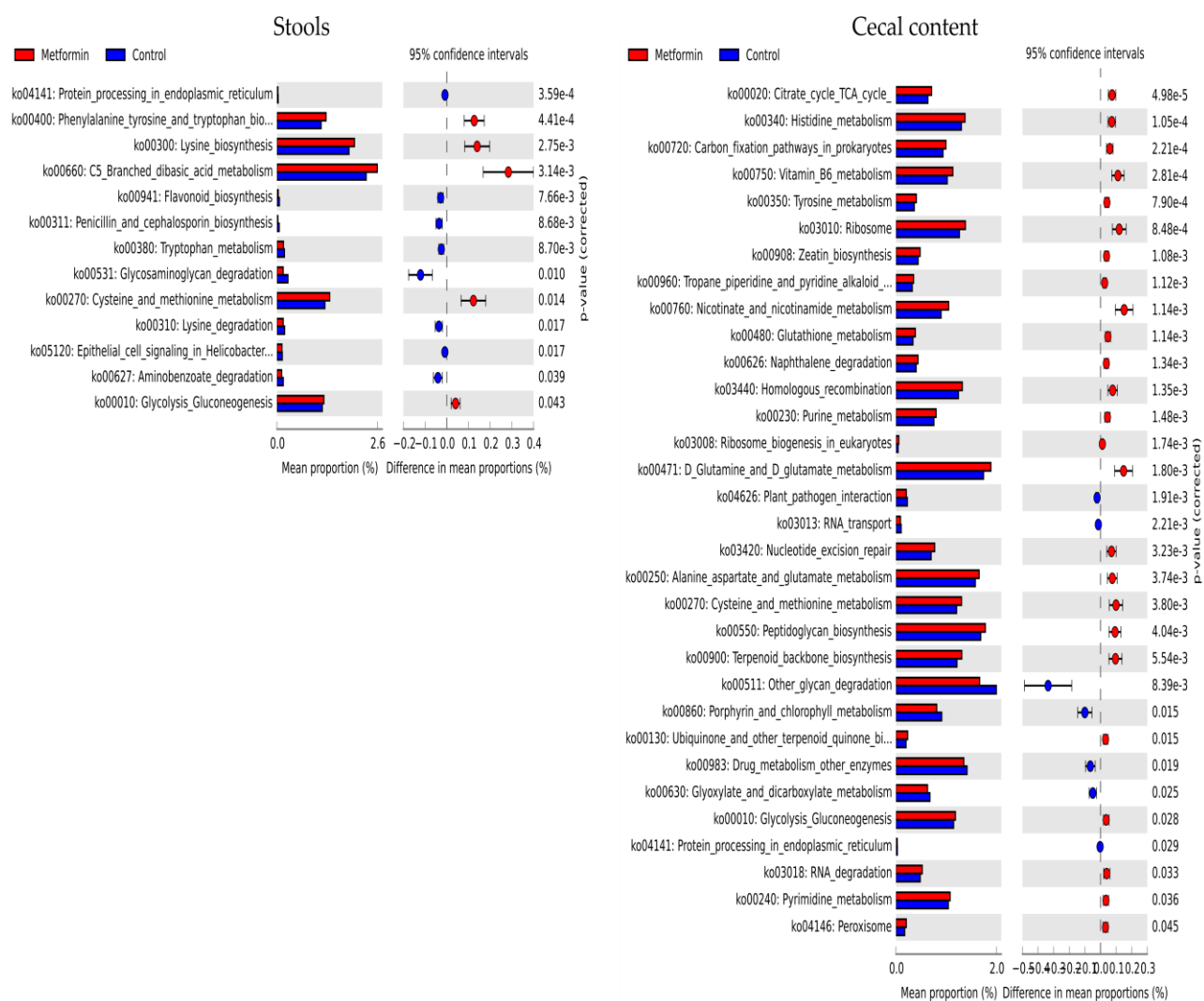


Figure S4. Differentially enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways (i.e., relative abundance > 0.001%) in cecal and fecal microbiota ($p < 0.05$).

Discussion générale et conclusion

Dans cette étude, nous avons examiné les modifications du microbiote digestif induites par un traitement oral avec de la metformine chez des souris infectées par *H. pylori* au niveau de trois environnements digestifs différents ; les selles, les contenus cœcaux et les contenus intestinaux. La caractérisation du microbiote digestif a été réalisée par séquençage du gène codant pour l'ARNr16S.

Nos résultats ont montré que la metformine diminue la richesse et la diversité du microbiote digestif des souris. La richesse et la diversité sont classiquement considérées comme des marqueurs de microbiote sain ; cependant, une diminution de l'abondance de certains taxons bactériens peut se faire au profit de l'émergence de microorganismes métaboliquement bénéfiques. C'est le cas par exemple d'*Akkermansia muciniphila*, dont la présence au niveau du microbiote digestif est associée avec une amélioration du profil métabolique de son hôte (76). Dans cette étude, la bactérie *Akkermansia muciniphila* a été retrouvée en abondance significativement plus importante chez les souris traitées par metformine par rapport aux souris du groupe contrôle. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans une étude réalisée chez des patients diabétiques. Dans ces travaux, les auteurs suggèrent également que les modifications du microbiote induites par la metformine pourraient contribuer en partie à l'effet thérapeutique du médicament pour la prise en charge du diabète (77).

Les analyses de bêta diversités ont montré que la composition du microbiote des souris dépendait de manière significative du traitement qu'elles avaient reçu. D'autres études ont également rapporté des modifications significatives du microbiote de souris obèses, de souris saines, ou encore de patients diabétiques à la suite d'un traitement par metformine (77–80).

Dans ce projet nous avons émis l'hypothèse, comme cela a été observé sur *H. pylori*, que la metformine pouvait avoir un effet d'inhibition direct de la croissance de certaines souches bactériennes. Cet effet antibactérien direct pourrait être à l'origine des modifications du microbiote observées chez les souris traitées par metformine. Pour cela, nous avons mesuré la croissance bactérienne de six souches en présence de concentrations croissantes de metformine. Nous avons sélectionné les souches à tester à l'aide des résultats de l'analyse de la composition taxonomique des microbiotes.

Les souches bactériennes choisies sont donc des bactéries qui étaient disponibles au laboratoire, facilement cultivables, et dont l'abondance relative était positivement ou négativement influencée par la metformine. L'abondance des bactéries appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* et des *Clostridiales* était diminuée dans le microbiote digestif des souris traitées par la metformine et de manière intéressante ces expériences ont montré que la metformine inhibait directement la croissance bactérienne de souches du genre *Lactobacillus* et *Clostridium*. Ces résultats peuvent soutenir l'hypothèse que les modifications du microbiote digestif observées suite au traitement par la metformine pourraient être liées à son activité inhibitrice directe sur la croissance de certaines bactéries.

Cependant, la metformine peut également modifier indirectement le microbiote par l'activité physiologique qu'elle exerce sur l'hôte ; par exemple, la prise de metformine est liée à une augmentation de la concentration en acides biliaires au niveau intestinal (81), ce qui peut modifier la consistance des selles et le microbiote (82). Plus récemment, il a été décrit que la metformine augmentait la libération de glucose dans l'intestin chez l'homme. Une forte concentration en glucose dans la lumière intestinale peut également avoir un effet sur le développement bactérien. Donc, les modifications de microbiote induites par la metformine sont probablement le résultat de son activité directe et indirecte.

Les effets de la metformine sur la santé humaine ont été intensément étudiés ces dernières années. Au-delà de son implication dans la prise en charge du diabète, la metformine représente une molécule anticancéreuse prometteuse en association avec des chimiothérapies conventionnelles dans la prise en charge de différents types de cancers (66). Des études récentes ont également montré un effet de la metformine sur la longévité (83). Enfin, la découverte de son activité antibactérienne sur *H. pylori* a ouvert de nouvelles perspectives de recherches (60). Dans le domaine de la prévention du risque de cancer, une diminution de l'incidence des cancers a été montrée chez les patients diabétiques traités par cette molécule (61). Il est maintenant bien établi que la composition et les fonctions exercées par le microbiote peuvent influencer la carcinogenèse à travers différents mécanismes (36,84). *H. pylori* est l'exemple le mieux connu d'une bactérie qui joue un rôle crucial dans la carcinogenèse en favorisant l'inflammation et la dégradation de l'épithélium gastrique (85). Le microbiote digestif peut influencer la carcinogenèse en jouant un rôle sur la préservation de la barrière intestinale, la modulation de l'inflammation ou encore la production de métabolites favorisant le développement de tumeurs (86).

Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'influence de la metformine sur les fonctions du microbiote potentiellement impliquées dans la carcinogenèse digestive.

Malgré la diminution globale de la richesse bactérienne, la metformine entraîne une augmentation de l'abondance du genre *Bifidobacterium*. Les espèces du genre *Bifidobacterium* ont montré une activité anticancer sur le cancer colorectal (CRC pour colorectal cancer) par l'intermédiaire de métabolites bactériens qui inhibent directement la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* (87). Il a également été suggéré que l'utilisation de probiotiques contenant des espèces du genre *Bifidobacterium* pouvait contribuer à la prévention du CRC et à l'amélioration de la sécurité et de l'efficacité des thérapies utilisées pour la prise en charge du CRC (88). Une étude récente réalisée sur des souris diabétiques et des souris saines dont le CRC a été induit, a montré que l'association de la metformine avec des probiotiques contenant des *Bifidobacterium* prévient la survenue du processus inflammatoire et de la carcinogenèse (89).

Nos résultats ont également montré une diminution de l'abondance relative du phylum des *Firmicutes* chez nos souris infectées par *H. pylori* en réponse au traitement par la metformine. De manière intéressante, une étude sur les lésions gastriques liées à l'infection par *H. pylori* a mis en évidence une abondance plus importante du phylum des *Firmicutes* chez les patients présentant une gastrite ou une métaplasie gastrique par rapport aux patients asymptomatiques (90).

Les caractéristiques fonctionnelles du microbiote des souris de cette étude ont été étudiées à l'aide du logiciel de prédiction du métagénome fonctionnel PICRUSt (44). Les profils métaboliques bactériens prédits ont montré que les souris présentaient des signatures fonctionnelles distinctes en fonction du traitement reçu. C'est au niveau du microbiote intestinal que nous avons observé le nombre le plus important de voies métaboliques KEGG dont l'expression était différente entre le groupe metformine et le groupe témoin. Le traitement par metformine entraîne donc une modification significative des propriétés fonctionnelles du microbiote digestif, et ce plus particulièrement au niveau de l'intestin.

Plus spécifiquement, le traitement par la metformine a entraîné une diminution des fonctions nitrite et nitrate réductase au niveau des bactéries intestinales.

La voie métabolique bactérienne liée à la réduction des nitrates a été particulièrement analysée puisque son implication a été suggérée dans l'augmentation de la concentration intragastrique en nitrites et en nitrosamine (ou composé N-nitrosé) (91). Il a été décrit que les composés N-nitrosé peuvent promouvoir la mutagenèse et l'expression de proto-oncogène ou encore inhiber l'apoptose ; ils peuvent donc contribuer à la carcinogenèse (92,93). Une augmentation de l'activité fonctionnelle nitrate réductase a été observée dans le microbiote gastrique de patients atteints de cancer gastrique par rapport aux patients qui présentaient seulement une gastrite chronique (31).

Dans cette étude, les voies métaboliques KEGG impliquées dans le métabolisme des carbohydrates étaient enrichies dans le groupe contrôle par rapport au groupe traité par la metformine. L'expression de ces voies métaboliques chez les bactéries est associée avec la production d'acide gras à chaîne courte (AGCC) (94). Ces AGCC sont mis en cause dans l'hyperprolifération cellulaire dans le cancer de l'œsophage et le CRC (95,96). Ces voies du métabolisme des carbohydrates sont également enrichies dans le microbiote gastrique des patients atteints de cancer gastrique (30). Ensemble, ces données permettent d'évoquer la potentielle contribution des bactéries productrices d'AGCC dans la carcinogenèse digestive. Ces premiers résultats suggèrent que la metformine, en modulant les fonctions du microbiote, pourrait être considérée comme un potentiel agent anticancer utile pour la prévention de cancer digestif. L'implication du microbiote digestif dans la prévention du cancer par la metformine a particulièrement été étudié dans le modèle du cancer colorectal. Une étude récente menée chez des souris a montré que l'utilisation de probiotiques en association avec la metformine renforçait les effets bénéfiques de la drogue sur la prévention du cancer colorectal, soutenant l'hypothèse de l'implication du microbiote digestif dans cet effet préventif (80). D'autres études rapportent des interactions entre la metformine, le microbiote digestif et la muqueuse épithéliale du côlon dans la prévention du cancer colorectal chez les patients diabétiques (89,90). Le rôle du microbiote digestif dans la prévention du cancer gastrique par la metformine n'a, à ce jour, pas été étudié.

D'autres mécanismes qui corroborent l'activité anticancer de la metformine, notamment à travers la régulation du métabolisme du glucose, ont été rapportés (97). De cette manière, la physiologie de l'hôte et le microbiote constituent des cibles potentielles de la metformine pour exercer son activité dans la prévention de la survenue de cancer.

Les limites de cette étude concernent notamment le manque d'information sur le microbiote gastrique. De plus, d'autres expérimentations devront être menées pour décrire et comprendre les modifications métaboliques induites par les changements du microbiote liés à la prise de metformine. Des souris femelles ont été utilisées dans cette étude pour leurs facilités d'expérimentation à l'animalerie, ces dernières étant moins agressives que les mâles. Par conséquent, les résultats obtenus ne sont pas complètement extrapolables aux souris mâles puisqu'il existe de légères différences dans la composition de microbiote digestif des souris en fonction du genre mais également du statut hormonal (13,98). Cependant, les femelles appartenant aux deux groupes de cette étude avaient toutes le même âge au début de l'expérimentation, de ce fait, les souris ont été exposées aux mêmes changements hormonaux, ce qui permet la comparaison entre les groupes.

Pour conclure, les résultats de cette étude ont montré que la metformine modifie significativement la composition et les fonctions prédites du microbiote digestif de souris infectées par *H. pylori*. Ces modifications pourraient être impliquées dans la prévention des cancers digestifs.

Ces résultats laissent encore de nombreuses questions sans réponses et ouvrent plusieurs perspectives de recherche. Le mécanisme d'action antibactérien de la metformine n'est à ce jour pas élucidé. Il pourrait être intéressant de déterminer les voies de signalisation communes aux espèces inhibées par la metformine afin d'essayer d'identifier la cible de la metformine. De plus, les prédictions obtenues par le logiciel PICRUSt proposent des voies métaboliques du microbiote qu'il sera intéressant d'explorer au niveau fonctionnel. L'étude de la voie du métabolisme des nitrates au niveau du microbiote digestif sous l'effet de la metformine semble particulièrement intéressante et pourra être réalisée pour définir si la metformine entraîne une diminution de la production de nitrite par le microbiote au niveau du système digestif, pouvant avoir un impact sur la carcinogénèse. Ces travaux pourront permettre une meilleure compréhension de l'effet de la metformine sur la prévention de cancers digestifs.

Références bibliographiques de l'introduction et de la discussion générale

1. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* sept 2014;38(5):996-1047.
2. Bhaskar KR, Garik P, Turner BS, Bradley JD, Bansil R, Stanley HE, et al. Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature.* 3 déc 1992;360(6403):458-61.
3. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* janv 2016;14(1):20-32.
4. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J.* avr 2011;5(4):574-9.
5. Cho I, Blaser MJ. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 13 mars 2012;13(4):260-70.
6. Islam KBMS, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, et al. Bile Acid Is a Host Factor That Regulates the Composition of the Cecal Microbiota in Rats. *Gastroenterology.* 1 nov 2011;141(5):1773-81.
7. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* juin 2012;486(7402):222-7.
8. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 mars 2011;108(Suppl 1):4586-91.
9. Kovacs A, Ben-Jacob N, Tayem H, Halperin E, Iraqi FA, Gophna U. Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Microb Ecol.* févr 2011;61(2):423-8.
10. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* juin 2012;486(7402):207-14.
11. Shastri P, McCarville J, Kalmokoff M, Brooks SPJ, Green-Johnson JM. Sex differences in gut fermentation and immune parameters in rats fed an oligofructose-supplemented diet. *Biol Sex Differ.* 2015;6:13.
12. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, et al. Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study. *Appl Environ Microbiol.* févr 2006;72(2):1027-33.
13. Org E, Mehrabian M, Parks BW, Shipkova P, Liu X, Drake TA, et al. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes.* 3 juill 2016;7(4):313-22.
14. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* janv 2019;16(1):35-56.
15. Sonnenburg ED, Zheng H, Joglekar P, Higginbottom S, Firkbank SJ, Bolam DN, et al. Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell.* 25 juin 2010;141(7):1241-52.
16. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* janv 2014;505(7484):559-63.
17. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* mai 2007;1(1):56-66.
18. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science.* 29 avr 2016;352(6285):544-5.

19. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med.* 30 sept 2015;7(307):307ra152.
20. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, et al. Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell.* 14 août 2014;158(4):705-21.
21. Jackson MA, Goodrich JK, Maxan M-E, Freedberg DE, Abrams JA, Poole AC, et al. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut.* mai 2016;65(5):749-56.
22. Rogers M a. M, Aronoff DM. The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* févr 2016;22(2):178.e1-178.e9.
23. Flowers SA, Evans SJ, Ward KM, McInnis MG, Ellingrod VL. Interaction Between Atypical Antipsychotics and the Gut Microbiome in a Bipolar Disease Cohort. *Pharmacotherapy.* 2017;37(3):261-7.
24. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature.* mars 2018;555(7698):623-8.
25. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:104.
26. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 27 mai 2016;16(6):341-52.
27. González CA, Megraud F, Buissonniere A, Lujan Barroso L, Agudo A, Duell EJ, et al. *Helicobacter pylori* infection assessed by ELISA and by immunoblot and noncardia gastric cancer risk in a prospective study: the Eurgast-EPIC project. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* mai 2012;23(5):1320-4.
28. Mégraud F, Bessède E, Varon C. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin Microbiol Infect.* 1 nov 2015;21(11):984-90.
29. Wong BC-Y, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, et al. *Helicobacter pylori* Eradication to Prevent Gastric Cancer in a High-Risk Region of China: A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 14 janv 2004;291(2):187-94.
30. Coker OO, Dai Z, Nie Y, Zhao G, Cao L, Nakatsu G, et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut.* 2018;67(6):1024-32.
31. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut.* févr 2018;67(2):226-36.
32. Cremonesi E, Governa V, Garzon JFG, Mele V, Amicarella F, Muraro MG, et al. Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer. *Gut.* nov 2018;67(11):1984-94.
33. Wong SH, Zhao L, Zhang X, Nakatsu G, Han J, Xu W, et al. Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology.* déc 2017;153(6):1621-1633.e6.
34. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl.* 17 févr 2001;357(9255):539-45.
35. Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol.* 8 sept 2016;70:395-411.
36. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science.* 3 avr 2015;348(6230):80-6.
37. Lagkouvardos I, Overmann J, Clavel T. Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota. *Gut Microbes.* 3 sept 2017;8(5):493-503.

38. Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating « uncultivable » microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*. 10 mai 2002;296(5570):1127-9.
39. Lagier J-C, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*. sept 2018;16(9):540-50.
40. Lagier J-C, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol*. 7 nov 2016;1:16203.
41. Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, Xu Z, et al. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol*. 2013;531:371-444.
42. Siegwald L, Touzet H, Lemoine Y, Hot D, Audebert C, Caboche S. Assessment of Common and Emerging Bioinformatics Pipelines for Targeted Metagenomics. *PLOS ONE*. 4 janv 2017;12(1):e0169563.
43. Comparing Categories — Homepage [Internet]. [cité 12 avr 2021]. Disponible sur: http://qiime.org/tutorials/category_comparison.html
44. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. sept 2013;31(9):814-21.
45. Metformine : substance active à effet thérapeutique [Internet]. VIDAL. [cité 19 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
46. HAS. Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2 [Internet]. 2013 [cité 19 mars 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2013-02/10irp04_reco_diabete_type_2.pdf
47. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach: Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 1 janv 2015;38(1):140-9.
48. Luengo A, Sullivan LB, Heiden MG. Understanding the complex-ty of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biol*. 24 oct 2014;12:82.
49. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2 déc 2014;20(6):953-66.
50. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci*. 11 nov 2011;122(6):253-70.
51. Wilcock C, Bailey CJ. Reconsideration of inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(2):120-1.
52. Morita Y, Nogami M, Sakaguchi K, Okada Y, Hirota Y, Sugawara K, et al. Enhanced Release of Glucose Into the Intraluminal Space of the Intestine Associated With Metformin Treatment as Revealed by [18F]Fluorodeoxyglucose PET-MRI. *Diabetes Care*. 1 août 2020;43(8):1796-802.
53. Résumé des caractéristiques du produit - METFORMINE ALTER 1000 mg, comprimé pelliculé - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 20 janv 2021]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=69939574&typedoc=R>
54. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst*. janv 1994;24(1):49-57.
55. Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JHB. Metformin and the intestine. *Diabetologia*. 5 juin 2008;51(8):1552.

56. Wróbel MP, Marek B, Kajdaniuk D, Rokicka D, Szymborska-Kajaneck A, Strojek K. Metformin - a new old drug. *Endokrynol Pol.* 2017;68(4):482-96.
57. Cabreiro F, Au C, Leung K-Y, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell.* 28 mars 2013;153(1):228-39.
58. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2192.
59. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature.* juill 2019;571(7764):183-92.
60. Courtois S, Bénéjat L, Izotte J, Mégraud F, Varon C, Lehours P, et al. Metformin can inhibit *Helicobacter pylori* growth. *Future Microbiol.* 2018;13:1575-83.
61. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 4 juin 2005;330(7503):1304-5.
62. Morales DR, Morris AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med.* 2015;66:17-29.
63. Zhang K, Bai P, Dai H, Deng Z. Metformin and risk of cancer among patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Prim Care Diabetes.* 1 févr 2021;15(1):52-8.
64. Zhou X-L, Xue W-H, Ding X-F, Li L-F, Dou M-M, Zhang W-J, et al. Association between metformin and the risk of gastric cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. *Oncotarget.* 8 avr 2017;8(33):55622-31.
65. Rizos CV, Elisaf MS. Metformin and cancer. *Eur J Pharmacol.* 5 avr 2013;705(1):96-108.
66. Zhang H-H, Guo X-L. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(1):13-26.
67. Lee J, Park D, Lee Y. Metformin Synergistically Potentiates the Antitumor Effects of Imatinib in Colorectal Cancer Cells. *Dev Reprod.* juin 2017;21(2):139-50.
68. Cho YH, Ko BM, Kim SH, Myung YS, Choi JH, Han JP, et al. Does metformin affect the incidence of colonic polyps and adenomas in patients with type 2 diabetes mellitus? *Intest Res.* avr 2014;12(2):139-45.
69. Daugan M, Dufaÿ Wojcicki A, d'Hayer B, Boudy V. Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol Res.* 1 nov 2016;113:675-85.
70. Faubert B, Vincent EE, Poffenberger MC, Jones RG. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett.* 28 janv 2015;356(2 Pt A):165-70.
71. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2011;12(1):21-35.
72. Courtois S, Durán RV, Giraud J, Sifré E, Izotte J, Mégraud F, et al. Metformin targets gastric cancer stem cells. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2017;84:193-201.
73. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* 1 oct 2009;69(19):7507-11.
74. Gallagher EJ, LeRoith D. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci.* déc 2011;1243:54-68.
75. Courtois S, Lehours P, Bessède E. The therapeutic potential of metformin in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 1 juill 2019;22(4):653-62.
76. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog.* mai 2017;106:171-81.

77. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med*. juill 2017;23(7):850-8.
78. Lee H, Lee Y, Kim J, An J, Lee S, Kong H, et al. Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes*. 4 mars 2018;9(2):155-65.
79. Ma W, Chen J, Meng Y, Yang J, Cui Q, Zhou Y. Metformin Alters Gut Microbiota of Healthy Mice: Implication for Its Potential Role in Gut Microbiota Homeostasis. *Front Microbiol* [Internet]. 22 juin 2018 [cité 18 nov 2019];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6023991/>
80. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 10 déc 2015;528(7581):262-6.
81. Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T. Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*. mai 2008;149(5):2341-51.
82. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 1 mars 2016;59(3):426-35.
83. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab*. 14 2016;23(6):1060-5.
84. Rajagopala SV, Vashee S, Oldfield LM, Suzuki Y, Venter JC, Telenti A, et al. The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 1 avr 2017;10(4):226-34.
85. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 15 déc 1992;52(24):6735-40.
86. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. nov 2013;13(11):800-12.
87. Bahmani S, Azarpira N, Moazamian E. Anti-colon cancer activity of *Bifidobacterium* metabolites on colon cancer cell line SW742. *Turk J Gastroenterol*. sept 2019;30(9):835-42.
88. Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Hemati M, Nejad ZR, Arabkari V, et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):17127-43.
89. Al Kattar S, Jurjus R, Pinon A, Leger DY, Jurjus A, Boukarim C, et al. Metformin and Probiotics in the Crosstalk between Colitis-Associated Colorectal Cancer and Diabetes in Mice. *Cancers* [Internet]. 10 juill 2020 [cité 22 sept 2020];12(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7408863/>
90. Gao J-J, Zhang Y, Gerhard M, Mejias-Luque R, Zhang L, Vieth M, et al. Association Between Gut Microbiota and *Helicobacter pylori*-Related Gastric Lesions in a High-Risk Population of Gastric Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:202.
91. Leach SA, Thompson M, Hill M. Bacterially catalysed N-nitrosation reactions and their relative importance in the human stomach. *Carcinogenesis*. déc 1987;8(12):1907-12.
92. Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8823-8.
93. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer*. 29 avr 2002;2:8.

94. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. mars 2006;40(3):235-43.
95. Kaakoush NO, Morris MJ. The oesophageal microbiome: an unexplored link in obesity-associated oesophageal adenocarcinoma. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92(10).
96. Belcheva A, Irrazabal T, Robertson SJ, Streutker C, Maughan H, Rubino S, et al. Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells. *Cell*. 17 juill 2014;158(2):288-99.
97. Salani B, Del Rio A, Marini C, Sambuceti G, Cordera R, Maggi D. Metformin, cancer and glucose metabolism. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(6):R461-471.
98. Santos-Marcos JA, Rangel-Zuñiga OA, Jimenez-Lucena R, Quintana-Navarro GM, Garcia-Carpintero S, Malagon MM, et al. Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. *Maturitas*. oct 2018;116:43-53.

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.