



HAL
open science

Lipopolysaccharides et glucagon-like peptide 1 : des mécanismes moléculaires à la physiopathologie

Lorène J Lebrun

► **To cite this version:**

Lorène J Lebrun. Lipopolysaccharides et glucagon-like peptide 1 : des mécanismes moléculaires à la physiopathologie. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS038 . tel-01511143

HAL Id: tel-01511143

<https://theses.hal.science/tel-01511143>

Submitted on 20 Apr 2017

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

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

Ecole Doctorale
Environnement - Santé



UFR Sciences de Santé
INSERM UMR866 - LNC
Equipe LIPNESS



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de l'Alimentation

Par :

Lorène Lebrun

Lipopolysaccharides et glucagon-like peptide 1 : des mécanismes moléculaires à la physiopathologie

Présentée et soutenue le 25 novembre 2016

Membres du jury :

Dr. Laurent Lagrost.....Président
Directeur de Recherche, INSERM UMR866, UB, Dijon

Dr. Claude Knauf.....Rapporteur
Professeur des Universités, INSERM UMR1220, UPS, Toulouse

Pr. Dominique Langin.....Rapporteur
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, INSERM UMR1048, UPS, Toulouse

Dr. Isabelle Dugail.....Examineur
Directeur de Recherche, INSERM UMRS1166, UPMC, Paris

Pr. Corinne Leloup.....Examineur
Professeur des Universités, CSGA, UMR CNRS 6265 – INRA 1324, UB, Dijon

Dr. Jacques Grober..... Directeur de thèse
Maître de Conférences HDR, INSERM UMR866, Agrosup Dijon, Dijon

*“ Jouis du moment présent.
Aujourd’hui fait partie du bon vieux temps
dont tu seras nostalgique un jour ”*

Anonyme

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury pour l'intérêt qu'ils portent à ces travaux de thèse.

Monsieur le Docteur Laurent Lagrost, je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre centre INSERM et équipe de recherche Lipness. J'ai réellement passé trois années enrichissantes. Merci pour votre présence, votre disponibilité, vos précieux conseils et pour avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.

Messieurs le Docteur Claude Knauf et le Professeur Dominique Langin, je vous remercie sincèrement pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps que vous consacrez à sa lecture et son évaluation.

Mesdames le Docteur Isabelle Dugail et le Professeur Corinne Leloup, je tiens à vous remercier pour avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse et pour le regard scientifique que vous y apportez.

Monsieur le Docteur Jacques Grober, directeur de cette thèse. Un grand merci pour ton investissement, ta disponibilité, ton objectivité, ta confiance, ton humanité, ta pédagogie, tes conseils, . . . et tout simplement pour avoir proposé ce sujet de thèse. Quand quelqu'un me demande « et avec ton chef ça se passe bien ? », ma seule réponse est : « on ne peut mieux, je n'aurai pas pu espérer un meilleur directeur de thèse ». Je le pense sincèrement. Bien plus qu'un encadrant scientifique, tu as su me redonner de la motivation dans les moments où les résultats n'étaient pas au rendez-vous, tu m'as laissé l'opportunité de valoriser nos travaux dans de nombreux congrès scientifiques prestigieux et ainsi d'éprouver ce merveilleux sentiment d'utilité pour le monde de la Recherche. Je me répète donc, bien plus qu'un chef, tu as été humainement irréprochable, tu as permis mon épanouissement scientifique et personnel. Tes prochains doctorants ont beaucoup de chance !

*Merci aux personnes ayant contribué à mon choix de me lancer corps et âme dans ce projet de thèse passionnant.
Je ne regrette pas du tout ma décision, c'est l'expérience d'une vie.*

Mon attrait pour la Recherche, je le dois à Madame le Docteur Hélène Poirier, Maître de Conférences et Directrice Scientifique à Agrosup Dijon. Tu m'as initiée à ce monde fantastique lors de mon stage de fin de DUT, tu m'as encadrée lors de mon stage de recherche à l'étranger. Enfin, perdue dans mon choix crucial entre un poste en industrie et cette proposition de thèse, j'ai à nouveau pu compter sur toi et tes conseils avisés. Tu as été mon « guide du monde de la Recherche ». Je ne pourrai jamais assez te remercier.

Monsieur le Docteur Alexander Bachmanov, directeur d'équipe au Monell Chemical Senses Center de Philadelphie et Madame le Docteur Nathalia Bosak, chercheur dans de cette équipe, je vous adresse toute ma reconnaissance. Vous avez fortement contribué à mon choix de faire un doctorat. Le stage de recherche de 6 mois effectué à vos côtés a été une expérience hors du commun ! Thank you for everything and we keep in touch !

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de pouvoir échanger pour faire avancer cette thèse.

Messieurs les membres de mon comité de suivi de thèse : Monsieur le Docteur Michel Narce et Monsieur le Docteur Philippe Valet. Je tiens sincèrement à vous remercier pour votre implication, votre sympathie et vos conseils lors de nos réunions scientifiques annuelles. Merci d'avoir contribué à faire avancer cette thèse.

Monsieur le Docteur Stéphane Mandard, co-encadrant et aide précieuse au quotidien, je te remercie pour ta présence, tes conseils et ta bonne humeur à toute épreuve.

Les collègues de travail ! Sans vous, la vie au laboratoire aurait été bien différente et surtout bien plus fade ! Valérie Deckert, Stéphanie Lemaire, David Masson, Thomas Gautier, Lil Proukhnitzky, Charlene Magnani, Denis Blache, Thibaut Bourgeois, Naig Le Guern, Anne-Laure Rérole, Louise Ménégaut, Virginie Aires, Alexis Varin, Mathieu Charpenet, Caroline Lalande, Marie Petit, Jean-Paul Pais de Barros, Hélène Choubley, Victoria Bergas, Emilie Charron, Lucile Fuselier, Alexandrine Fraichard, Jérôme Labbé, Charles Thomas, Jérôme Bellenger, Sandrine Bellenger, Danish Patoli, Célia Bidu, vous avez tous contribué à ces travaux de thèse et je vous en remercie. Naig, comment n'écrire qu'une seule phrase ? Je dirai juste que mon passage parmi vous ne peut s'imaginer sans toi. Anne-Laure, ta joie de vivre a égayé mes journées jusqu'à ce que je m'isole pour rédiger. Louise, ah Louise, collègue indispensable mais amie avant tout. Notre relation professionnelle s'arrête mais notre amitié ne fait que commencer. N'oublie pas : la vie c'est comme une piste de ski !

Au cours de ce doctorat j'ai eu l'opportunité d'encadrer des stagiaires : Aloïs Dusuel, Juliette Petot, Alice Beau, Yannick Faure, Marjorie Bon et Margot Vogt, mes remerciements se tournent aussi vers vous. Vous m'avez beaucoup apporté, que ce soit scientifiquement par la réalisation d'un travail de qualité comme professionnellement et personnellement car l'encadrement de stagiaires est un réel travail managérial. Continuez à me donner de vos nouvelles, cela me fait extrêmement plaisir. Margot, je suis ravie d'avoir rangé ma tenue d'encadrante pour définitivement enfiler celle d'amie. Force & courage, telle est la devise !

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et notamment : Salma Amensag et Alexandre Coilliot de la Satt Grand Est, Alexandra Oudot pour l'initiation à l'imagerie préclinique, Corinne Leloup pour la formation à la technique des clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques (merci pour tout !), Daniel J Drucker pour les cellules GLUTag et l'entrevue à l'EASD. Je remercie aussi l'équipe INSERM de Toulouse dirigée par Philippe Valet pour l'investigation du métabolisme musculaire.

Merci également aux personnels des différentes plateformes sans qui ces travaux de thèse ne seraient pas ce qu'ils sont : André Bouchot de la plateforme d'histologie, Serge Monnier de la plateforme de cytométrie, Jean-Paul Pais de Barros de la plateforme de lipidomique, Jean-François Merlin, Guillaume Maquart et Arnaud Bernard de la plateforme d'imagerie du petit animal. Et enfin, comme on dit en anglais « the last but not the least » : je remercie sincèrement tout le personnel de l'animalerie centrale ainsi que sa directrice Valérie Saint-Georgio.

*Je n'oublie pas le pilier de cet aboutissement : les proches. Je ne serais jamais arrivée jusqu'ici sans leur soutien !
L'amour et l'amitié sont les fondements de toute vie et de toute réussite. Merci d'être vous et merci d'être là.*

Je commencerais par l'amitié ! Mes amis de longue date (lycée, DUT ou encore Agrosup) et mes amis d'encore plus longue date (amis de Garche, amis d'enfance). Merci pour tous les bons moments passés ensemble. Je ne peux bien sûr ni tous vous citer, ni faire resurgir tous ces souvenirs (certains seraient d'ailleurs inappropriés !) mais sachez que vous avez contribué à faire de moi ce que je suis. Je vous adore. Pour la plupart vous êtes loin et vous me manquez ! Je ne peux résister au besoin de citer Madame Margaux Simon (ça fait officiel hein !), ma grosse de toujours ! La plus belle preuve d'amitié est de pouvoir compter l'une sur l'autre malgré la distance depuis toutes ces années !

Cette thèse a été l'occasion de faire de belles rencontres que j'espère pouvoir compter dans « mes amis de longue date ». Monsieur le Docteur Heber Rodriguez (je peux officiellement maintenant !), merci pour tout : ta bonne humeur, ta vision de la vie... J'espère sincèrement qu'on restera en contact ! Bientôt je dirai : Brrasiiliaa me voilà ! Madame le future Docteur Elise Thalineau, ma colocataire d'enfer ! Des liens indestructibles se sont tissés au cours de ces trois années de vie commune. Aujourd'hui est une belle journée pour rédiger une thèse et surtout pour te remercier. Quelle belle rencontre à la rentrée des doctorants. Je suis ravie que tu fasses partie de ma vie !

Passons maintenant à l'amour ! Ma famille ! Que serais-je sans vous ? Le socle de ma vie. Je vous remercie pour tout et tout le temps ! Mes parents André et Martine Lebrun, aucun mot et aucun acte ne peuvent égaler ce que vous avez fait pour moi. Mes sœurs Coralie et Sandrine Lebrun, mes modèles de toujours, mes confidentes, quelle merveille que de vous avoir à mes côtés. Mes beaux-frères Cyril Nikiforoff et Laurent Casara, présents à mes côtés depuis mon plus jeune âge vous n'êtes finalement pas si beaux mais presque frères. Mes neveux Quentin et Bastien Casara, vous êtes les petits mecs de ma vie même si vous grandissez trop vite. Mes grands-parents Claude et Josiane Aurifeille, vous êtes la source de cette formidable famille, papy tu es parti trop tôt mais ton absence n'est que physique. Mes tontons, grands-tontons et grandes-tatas, mes cousins et cousines, je vous remercie.

Monsieur Pierre Mourey ! Tout d'abord je tiens à remercier ta famille. Tes parents, Yves et Jacqueline Mourey, merci pour votre gentillesse. Ta sœur et ton frère Charlotte et Louis Mourey, merci pour votre soutien. Et enfin... Toi ! Nous nous sommes connus, nous nous sommes cherchés, nous nous sommes éloignés puis finalement nous nous sommes unis. Cette thèse est aussi un peu la tienne. Tu l'as vécu à mes côtés et tu m'as supporté au quotidien. « Supporter » dans le sens « soutenir » mais aussi dans le sens « endurer » ! J'espère que nous vivrons encore de nombreuses étapes comme nous venons de vivre celle-ci, ensemble, main dans la main. Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans toi et je ne peux envisager la suite sans toi. Merci !

*Petite mention spéciale pour les relecteurs de cette thèse qui se reconnaîtront !
Merci pour votre investissement.*

Résumé

Contexte

La prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 évolue de façon épidémique. Ces pathologies sont caractérisées par un état inflammatoire à bas bruit dont l'origine moléculaire est inconnue. L'une des pistes qui émerge concerne le microbiote intestinal et plus particulièrement des molécules pro-inflammatoires présentes à la surface des bactéries à Gram négatif : les lipopolysaccharides (LPS). Nous avons récemment montré que ces LPS augmentent les taux circulants de glucagon-like peptide 1 (GLP-1), une hormone connue pour stimuler la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, un lien existerait entre qualité nutritionnelle de l'alimentation et taux de LPS sanguins. Ainsi, alimentation, LPS et GLP-1 pourraient être étroitement liés.

Objectifs

Ces travaux de thèse portent sur i) les mécanismes moléculaires reliant les LPS au GLP-1 et ii) les conséquences physiopathologiques d'une endotoxémie expérimentale lors d'un régime obésogène.

Résultats

Nous montrons, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, que les LPS stimulent la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines *via* un mécanisme TLR4-dépendant. Les LPS présents dans l'intestin déclenchent cette sécrétion lors de situations pathologiques de dégradation de la muqueuse, faisant du GLP-1 un potentiel marqueur précoce d'altération de la barrière intestinale. Chez des souris sauvages, une endotoxémie expérimentale n'aggrave pas les conséquences métaboliques généralement observées lors d'un régime obésogène, certains paramètres sont même améliorés. Enfin, des souris présentant un défaut de détoxification des LPS (souris déficientes en protéine plasmatique de transfert des phospholipides) nourries avec un régime obésogène prennent plus de masse corporelle que les souris contrôles. Les origines moléculaires de ces différences sont également recherchées dans cette thèse.

Mots-clés

LPS, GLP-1, barrière intestinale, régime obésogène, endotoxémie, maladies métaboliques

Abstract

Context

Obesity and type 2 diabetes are metabolic diseases which have reached epidemic proportions worldwide. These metabolic disorders are related to a low grade inflammation whose molecular origin is still unknown. Previous studies have highlighted the involvement of the gut microbiota and especially components of the cell wall of Gram negative bacteria: lipopolysaccharides (LPS). We have recently shown that LPS enhance glucagon-like peptide 1 (GLP-1) plasma levels, a hormone which is known to stimulate insulin secretion. Moreover there would be a link between the nutritional qualities of food and LPS plasma levels. Thus diet, LPS and GLP-1 may be closely related.

Objectives

The present work focuses on i) the molecular mechanisms linking LPS to GLP-1 and ii) the pathophysiological consequences of an experimental endotoxemia under obesogenic diet conditions.

Results

In vitro, *ex vivo* and *in vivo* experiments highlight LPS as potent secretagogues of GLP-1. They are able to induce GLP-1 secretion from enteroendocrine cells through a direct TLR4-dependent mechanism. Luminal LPS trigger GLP-1 secretion only under pathological conditions leading to intestinal mucosal damages. Therefore GLP-1 could be a promising early biomarker for diagnosing gut barrier injuries. Experimentally-induced endotoxemia in wild-type mice does not worsen the usually observed metabolic consequences of an obesogenic diet but rather seems to improve some of them. In addition, under high-fat diet, genetically-engineered mice with a defective LPS detoxification process (mice deficient in plasma phospholipid transfer protein) gain more weight than control mice. The purpose of this thesis is also to disentangle the molecular explanation behind this difference.

Key words

LPS, GLP-1, gut barrier, obesogenic diet, endotoxemia, metabolic diseases

Table des matières

Liste des publications, brevets et communications	19
Liste des abréviations	23
Liste des figures et tableaux	27
Avant – propos	31
INTRODUCTION	35
Chapitre 1 : Les lipopolysaccharides	37
I. A propos des endotoxines ou lipopolysaccharides	39
1. Découverte des lipopolysaccharides (Beutler & Rietschel, 2003)	39
2. Lipopolysaccharides et membrane externe des bactéries à Gram négatif.....	41
3. Caractérisation structurale des lipopolysaccharides.....	42
a) Le lipide A.....	43
b) Le noyau.....	44
c) L'antigène O	45
II. Endotoxémie et voies de détection des lipopolysaccharides	46
1. Présentation des lipopolysaccharides au complexe TLR4/MD-2	47
a) Prise en charge des lipopolysaccharides par les protéines LBP et CD14.....	47
b) La formation extracellulaire du complexe TLR4/MD-2/LPS.....	48
c) Voies de signalisations intracellulaires en réponse au complexe TLR4/MD-2/LPS.....	49
d) Activation du récepteur TLR4 et interaction avec les protéines « raft »	50
2. Voie indépendante du complexe TLR4/MD-2 : voie des caspases.....	52
a) Les caspases intracellulaires	52
b) Caspases inflammatoires et lipopolysaccharides	52
c) Le passage intracellulaire des lipopolysaccharides	53
III. Les endotoxines, notions de tolérance et d'«amorçage»	56
1. La tolérance aux endotoxines	56

a)	Notion de tolérance aux endotoxines.....	56
b)	Les acteurs à l'origine de l'installation de la tolérance aux endotoxines.....	57
2.	L'amorçage initié par les endotoxines.....	59
IV.	Inactivation et élimination des lipopolysaccharides circulants.....	60
1.	Neutralisation des LPS circulants par les lipoprotéines.....	60
a)	Les lipoprotéines.....	60
b)	Le métabolisme des lipoprotéines.....	62
c)	L'inactivation des lipopolysaccharides par les lipoprotéines.....	64
d)	Prise en charge par les membres de la famille LT/LBP.....	65
2.	Les voies de détoxification des endotoxines bactériennes.....	67
a)	Transport inverse des lipopolysaccharides, rôle de la voie hépato-biliaire.....	67
b)	Autres voies de neutralisation/détoxification des lipopolysaccharides circulants.....	68
Chapitre 2 :	Le glucagon-like peptide 1.....	69
I.	Le GLP-1, ses origines et sa provenance.....	71
1.	Il était une fois une incrétine.....	71
a)	Mais qu'est-ce qu'une hormone ?.....	71
b)	De la découverte des hormones à celle des incrétones.....	71
c)	L'effet incrétine.....	72
d)	Et les responsables sont.....	73
2.	Un descendant du proglucagon.....	73
3.	Lieu de production principal : les cellules L entéroendocrines.....	74
a)	Les cellules entéroendocrines.....	75
b)	Les cellules entéroendocrines productrices de GLP-1 : les cellules L.....	75
4.	Production de GLP-1 par les cellules α pancréatiques.....	76
II.	La sécrétion du GLP-1, un véritable casse-tête.....	77
1.	Les modèles d'étude cellulaires.....	77
a)	Cultures intestinales de rat fœtal (<i>fetal rat intestinal culture</i>).....	77
b)	Lignées cellulaires intestinales murines : STC-1 et GLUTag.....	77
c)	Cultures primaires de cellules L murines fluorescentes.....	78

d)	Lignée cellulaire intestinale humaine : NCI-H716.....	79
2.	Les différents agents sécrétagogues et leurs récepteurs	79
a)	Régulation nutritionnelle.....	80
b)	Régulations nerveuse et hormonale	82
c)	Régulation par les facteurs de l'inflammation	83
3.	Mécanistique intracellulaire de la sécrétion	84
a)	Cascades de signalisation intracellulaires	84
b)	Processus d'exocytose.....	86
III.	Dégradation et clairance du GLP-1	87
1.	L'activité protéolytique de la DPP-IV	87
a)	La DPP-IV	87
b)	L'inactivation du GLP-1	88
c)	Une voie de dégradation indépendante de DPP-IV : la NEP 24.11.....	90
2.	Une forme inactivée pas si inactive.....	91
3.	La clairance des formes actives et inactives par voie rénale.....	92
IV.	La biologie du GLP-1	94
1.	Le récepteur au GLP-1 et sa distribution physiologique.....	94
2.	Pléiotropie du GLP-1 dans la régulation du métabolisme glucidique.....	94
a)	Une action pancréatique du GLP-1 et son effet incrétine.....	95
b)	Le GLP-1 et son impact sur le système nerveux central	95
c)	Les principaux organes gluco-consommateurs	96
3.	Un rôle anti-inflammatoire : la partie immergée de l'iceberg ?	99
Chapitre 3 : Liens entre LPS et GLP-1	101	
I. Principal lieu de rencontre : l'intestin.....	103	
1.	Physiologie de l'intestin	103
a)	Anatomie de l'intestin.....	103
b)	La muqueuse intestinale et son rôle de barrière	104
c)	Le système nerveux entérique.....	106
d)	Le tissu lymphoïde associé à l'intestin	107

2.	Les habitants de l'intestin : le microbiote intestinal.....	108
a)	Localisation, composition et dynamique du microbiote intestinal.....	109
b)	Les fonctions du microbiote.....	110
c)	La dysbiose de l'écosystème intestinal.....	112
3.	La cohabitation microbiote – hôte.....	112
a)	Mise en sourdine du système immunitaire.....	113
b)	Les TLRs : des détecteurs d'une altération membranaire.....	114
c)	L'axe immuno-endocrine intestinal.....	115
II.	LPS, GLP-1 et maladies métaboliques.....	116
1.	L'épidémie de diabésité.....	116
a)	L'obésité et ses conséquences physiopathologiques.....	116
b)	Le diabète de type 2, sa physiopathologie et le syndrome hyperinsulinémique.....	118
c)	Physiopathologie des principaux organes gluco-consommateurs.....	121
2.	Le GLP-1 et les maladies métaboliques.....	126
a)	GLP-1 et obésité.....	126
b)	GLP-1 et diabète de type 2.....	127
3.	Les maladies métaboliques et l'inflammation à bas bruit.....	127
a)	Le tissu adipeux : point de départ de l'inflammation « stérile ».....	128
b)	Le microbiote et l'endotoxémie métabolique.....	129
c)	La détoxification des LPS par la PLTP et les maladies métaboliques.....	131
d)	L'endotoxémie et l'homéostasie glucidique.....	131
	OBJECTIFS.....	133
	MATERIELS & METHODES.....	137
I.	Expérimentations <i>in vivo</i> chez des volontaires sains.....	139
II.	Expérimentations <i>in vivo</i> sur souris.....	139
1.	Animaux.....	139
2.	Etude des effets d'une administration aiguë de LPS.....	140
3.	Induction d'une colite aiguë par un traitement au DSS.....	140

4.	Modèle d'ischémie/reperfusion mésentérique.....	141
5.	Implantation IP de pompes osmotiques de type Alzet®	141
6.	Tests de tolérance orale au glucose (OGTT) et test de tolérance à l'insuline (ITT) ...	142
7.	Clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques	142
8.	Imagerie préclinique PET/CT : visualisation de la distribution du glucose.....	143
9.	Mesure de la composition corporelle par spectroscopie RMN (EchoMRI®).....	145
10.	Mesure de la dépense énergétique en cages métaboliques	145
11.	Mesure de la sécrétion des VLDL hépatiques et des chylomicrons intestinaux ..	146
12.	Prélèvements de sang, de plasma et d'organes	146
III.	Expérimentations <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	147
1.	Culture cellulaire	147
2.	Etudes de la sécrétion du GLP-1	147
a)	<i>Ex vivo</i> à partir d'explants d'iléon.....	147
b)	<i>In vitro</i> à partir de lignées de cellules L entéroendocrines	148
3.	Signalisation calcique <i>in vitro</i>	148
IV.	Méthodes d'analyses et dosages	149
1.	Microscopie optique	149
2.	PCR en temps réel	149
3.	Analyses biochimiques.....	150
4.	Analyses statistiques	151
RESULTATS	153
Partie 1 : Mécanismes moléculaires	155
I. Introduction	157
II. Résultats expérimentaux	160
1.	Les LPS augmentent le GLP-1 circulant par une stimulation de sa sécrétion	160
2.	<i>In vivo</i> , la sécrétion de GLP-1 induite par les LPS est dépendante de TLR4	162
3.	Une stimulation des cellules L entéroendocrines par les molécules de LPS.....	166

4.	La sécrétion du GLP-1 par les LPS implique une signalisation calcique <i>via</i> TLR4... 169
5.	L'altération de la barrière intestinale entraîne la sécrétion de GLP-1 par les LPS 171
6.	La stimulation du GLP-1 par les LPS est fonctionnelle chez l'Homme 178
III.	Discussion 180
IV.	Perspectives 187
1.	Le GLP-1 pourrait-il être un outil de diagnostic clinique de l'I/R mésentérique ?..... 187
2.	Quel est le rôle du GLP-1 produit en réponse aux LPS ? 188
3.	Les cellules de l'immunité pourraient-elles être une source de GLP-1 ?..... 190
Partie 2 :	Endotoxémie et maladies métaboliques 191
	<i>Contexte général</i> 193
	<i>Quels sont les effets d'une endotoxémie expérimentale lors d'un régime obésogène ?</i> 197
I.	Introduction 197
II.	Résultats expérimentaux 199
1.	L'augmentation de l'endotoxémie entraîne une perte de masse grasse totale 199
2.	Effets des LPS sur le tissu adipeux blanc et le foie 202
a)	Le tissu adipeux péri-épididymaire 202
b)	Le foie 205
3.	L'augmentation de l'endotoxémie réduit l'inactivation du GLP-1 208
4.	Les LPS améliorent le métabolisme du glucose : utilisation musculaire augmentée.. 210
III.	Discussion 214
IV.	Perspectives 221
1.	Les effets observés des LPS sont-ils dépendants du GLP-1 ?..... 221
2.	L'infusion de LPS de 28 jours suffit-elle pour observer les effets « à long terme » ? 222
	<i>Les souris PLTP KO sont-elles plus sensibles aux effets d'un régime obésogène ?</i> 225
I.	Introduction 225

II. Résultats expérimentaux	227
1. La déficience en PLTP est associée à une masse corporelle augmentée sous HF	227
2. La déficience en PLTP est associée à une accumulation de masse grasse.....	230
3. Les souris PLTP KO présentent une homéostasie glucidique perturbée	232
4. Les souris déficientes en PLTP ont un défaut de clairance des triglycérides	235
5. Autres modifications lipidomiques observées chez les souris déficientes en PLTP...	238
6. L'absence de PLTP ne modifie pas l'endotoxémie totale.....	240
III. Discussion	242
IV. Perspectives	247
1. Quelles seraient les perspectives à court terme ?	247
2. Quels seraient les effets d'une infusion de LPS chez des souris PLTP KO ?.....	247
3. La PLTP contribuerait-elle à prévenir les maladies métaboliques ?.....	248
4. Y aurait-il un lien entre PLTP et fonction pancréatique ?.....	251
CONCLUSION	253
BIBLIOGRAPHIE	259
ANNEXES	287
Annexe 1 : Publication scientifique (en préparation)	289
Annexe 2 : Demande de brevet (déposée).....	331

Liste des publications, brevets et communications

Publication scientifique (en préparation – Annexe 1)

« GLP-1 as an early biomarker of gut barrier injuries:
involvement of LPS/TLR4 pathway »

- **Auteurs** : Lorène Lebrun¹, Naig Le Guern¹, Jean-Paul Pais de Barros¹, Jiri Plesnik², Naim Khan², Peter Pickkers³, Stéphane Mandard¹, Valérie Deckert¹, Daniel J. Drucker⁴, Laurent Lagrost^{1,5} and Jacques Grober¹
- **Affiliations** : ¹ INSERM UMR866 – LabEx LipSTIC, UFR Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France; ² INSERM UMR866, Agrosup Dijon, Dijon, France; ³ Department of Intensive Care Medicine, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ⁴ Department of Medicine, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mt. Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ⁵ Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital du Bocage, Dijon, France.
- **Subvention** : ce travail a bénéficié d'une aide de l'Etat gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme « Investissements d'avenir » portant la référence ANR-11-LABX-0021-01- Labex LipSTIC.

Brevet (Annexe 2)

« In vitro method for diagnosing at early stage intestinal ischemia »

- **Inventeurs** : Jacques Grober et Lorène Lebrun
- **Déposants** : Université de Bourgogne et INSERM
- **Cabinet de propriété industrielle** : Pontet Allano & Associés
- **Demande de brevet déposée le** : 20 septembre 2016
- **Numéro de dépôt** : 16306199.7
- **Entreprise mandatée pour la valorisation** : SATT Grand Est

Communications orales scientifiques

- **EOS** (European Obesity Summit), Göteborg, Suède
Juin 2016
- **NSFA** (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), Biarritz, France
Juin 2016
- **AFERO** (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité), Paris, France
Janvier 2016 – Prix + Bourse de déplacement
- **JFN** (Journées Francophones de la Nutrition), Marseille, France
Décembre 2015 – x2
- **EASD** (European Association for the Study of Diabetes), Stockholm, Suède
Septembre 2015
- **FJC** (Forum des Jeunes Chercheurs), Dijon, France
Juin 2015
- **GREMI** (Groupe de Recherche et d'Etude des Médiateurs de l'Inflammation), Paris, France
Mai 2014
- **AFERO** (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité), Dijon, France
Décembre 2013

Communications affichées scientifiques

- **NSFA** (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), Biarritz, France
Juin 2016
- **Printemps de la Cardiologie**, Dijon, France
Avril 2016
- **AFERO** (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité), Paris, France
Janvier 2016
- **NSFA** (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), Biarritz, France
Juin 2015 – Prix poster
- **SFD** (Société Francophone du Diabète), Bordeaux, France
Mars 2015 – Allocations de recherche
- **JFN** (Journées Francophones de la Nutrition), Bruxelles, Belgique
Décembre 2014
- **FJC** (Forum des Jeunes Chercheurs) – Besançon, France
Juin 2014 – Prix poster
- **NSFA** (Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose), Biarritz, France
Juin 2014
- **Vitagora**, Congrès Goût, Nutrition, Santé, Dijon, France
Avril 2014

Communications orales vulgarisées (Expérimentarium)

Intéressant
cela nous montre
que nos bases de connaissances
servent, même à
haut niveau.

Obésité et intestin : quel est le lien ?

→ BIOLOGIE

J'ai bien aimé
tout ce qui m'on
montré

Les découvertes
on est formi-
-dables. ♥



merci ! on se
coudra mains
bête ♥
Lorène

Lorène **LEBRUN** est jeune chercheuse en sciences de l'alimentation au sein du centre de recherche « Lipides – Nutrition – Cancer » de l'INSERM* à Dijon. Elle s'intéresse au développement inquiétant de l'obésité. Il est difficile de déterminer les causes de cette maladie tant les origines peuvent être multiples. Lorène étudie plus précisément le lien entre les bactéries présentes dans notre intestin et l'apparition de l'obésité.

* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, laboratoire d'excellence LipSTIC.

Ç'était
super ! ♥

incite à
une réflexion
intense...
yesss

« L'alimentation est notre « carburant », elle fait fonctionner notre corps. On ne devrait donc pas avoir à se soigner à cause de ce que l'on mange mais plutôt avec ce que l'on mange. »

<http://experimentarium.u-bourgogne.fr>



Ma thèse
c'est pour
bientôt !!

L'obésité a été définie en 1997 comme « une accumulation de graisse corporelle pouvant nuire à la santé ». En France, de plus en plus de personnes sont concernées. Lorène travaille sur une des causes de cette maladie : les modifications de la « flore intestinale ». Il s'agit de bactéries que nous possédons dans notre intestin depuis notre naissance. Elles sont bénéfiques pour nous car elles nous aident, par exemple, à digérer ce que l'on mange. Ces bactéries, indispensables à notre vie, sont 10 fois plus nombreuses que toutes les cellules de notre corps réunies. Cependant, des mauvaises habitudes alimentaires peuvent modifier la composition de cette flore intestinale. Ce sont les conséquences de cette modification qui intéressent Lorène. Elle travaille plus précisément sur une hormone, produite par l'intestin,

appelée GLP-1. Cette petite molécule aide notre corps à contrôler la quantité de sucre que nous avons dans le sang. Quand les bactéries de notre intestin sont modifiées, cela augmente la quantité de GLP-1 et la consommation du sucre par notre corps est alors dérégulée. Ces modifications pourraient donc entraîner une prise de poids plus importante et favoriseraient l'obésité.

Au laboratoire, Lorène démêle le lien qu'il y a entre les bactéries de notre intestin et l'obésité. Pour cela, elle cultive des cellules de l'intestin dans des boîtes spéciales. Elle les utilise ensuite pour comprendre comment les bactéries peuvent modifier la quantité de GLP-1 produite par ces cellules. Elle espère ainsi en découvrir davantage sur le lien entre notre intestin et l'obésité.

Un après-midi
intéressant pour
une réflexion sur
notre avenir.
À la bonne sylvain roche

merci
Tout le
monde
j'ai adoré
Dijon

Les objectifs

- Déterminer comment les bactéries de notre intestin peuvent modifier la production de GLP-1 dans notre corps.
- Évaluer les conséquences de ce dérèglement sur l'obésité.

Bonne chance
pour votre
thèse
...

MERCI
c'était super
j'ai adoré !!
Lorène

merci ! c'est
super on a adoré !!
cool !!!

<http://experimentarium.u-bourgogne.fr>



<http://www.experimentarium.fr/>

Liste des abréviations

3-HM	3-hydroxymyristate
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
AGL	Acides gras libres
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AOAH	Acyloxyacyl hydrolase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATGL	Adipose triglycerides lipase
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
CD	Cluster de différenciation
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein
CM	Chylomicrons
CPT1	Carnitine palmitoyltransférase 1
DAG	Diacylglycérol
DGAT	Diacylglycérol transférase
DPP-IV	Dipeptidyl peptidase IV
DSS	Dextran sodium sulfate
DT2	Diabète de type 2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEC	Cellules entéroendocrines
FAS	Fatty acid synthase
FAT/CD36	Fatty acid translocase/CD36
FATP	Fatty acid transport protein
FIAF	Fasting-induced adipose factor
FID	Fédération Internationale du Diabète
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GALT	Gut-associated lymphoid tissue

GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLP-1R	Récepteur au GLP-1
GLP-1R KO	GLP-1R knockout (souris déficiente en GLP-1R)
GLUT	Transporteur de glucose
HDL	High density lipoproteins
HF	High-fat
HL	Lipase hépatique
HPLC/MS/MS	Chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse
HSL	Lipase hormonosensible
I/R	Ischémie / reperfusion
IDL	Intermediate density lipoproteins
I-FABP	Intestinal fatty acid binding protein
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IP	Intrapéritonéale
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IV	Intraveineuse
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LDL	Low density lipoproteins
LDL-R	Récepteur aux LDL
LF	Low-fat
LIE	Lymphocytes intra-épithéliaux
LPL	Lipoprotéine lipase
LPLi	Inhibiteur de la LPL
LPS	Lipopolysaccharides
LT/LBP	Lipid transfer / LBP
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1

MD-2	Myeloid differentiation factor 2
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
MyD88s	Small MyD88
NEP 24-11	Neutral endopeptidase 24.11
NFκB	Nuclear factor κB
NTS	Noyau du tractus solitaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMVs	Outer membrane vesicles
PC1/3	Prohormone convertase 1/3
PET/CT	Tomoscintigraphie par émission de positons / correction d'atténuation
PLTP	Plasma phospholipid transfer protein
PLTP KO	PLTP knockout (souris déficiente en PLTP)
PYY	Peptide tyrosine-tyrosine
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SEM	Ecart standard à la moyenne
SISG	Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SREBP1c	Sterol regulatory element binding protein 1c
STC-1	Secretin tumor cell 1
TAPE	Tissu adipeux péri-épididymaire
TG	Triglycérides
TLR4	Toll-like receptor 4
TLRs	Toll-like receptors
TNFα	Tumor necrosis factor α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon β
VLDL	Very low density lipoproteins
WT	Wild-type (souris sauvage)

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Connexions entre alimentation, microbiote intestinal et pathologies associées	33
Figure 2 : Historique de la découverte des endotoxines.....	40
Figure 3 : Distinctions entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.....	42
Figure 4 : Représentation schématique de la structure d'une molécule de LPS	43
Figure 5 : Schématisation du lipide A des bactéries de l'espèce Escherichia coli	44
Figure 6 : Représentation schématique du complexe TLR4/MD-2/LPS	48
Figure 7 : L'activation du récepteur TLR4 par les LPS	51
Figure 8 : Observation microscopique des OMVs d'une bactérie E. coli entérotoxique	54
Figure 9 : Activation de la voie des caspases par les LPS	55
Figure 10 : Représentation schématique d'une lipoprotéine circulante	61
Figure 11 : Vue d'ensemble du métabolisme des différentes lipoprotéines.....	63
Figure 12 : Modifications post-traductionnelles du proglucagon	74
Figure 13 : Les voies de signalisation cellulaires à l'origine de la sécrétion de GLP-1	85
Figure 14 : Processus d'exocytose dans les cellules L entéroendocrines	86
Figure 15 : Représentation schématique de la structure de l'enzyme DPP-IV	88
Figure 16 : Les formes actives et inactives du GLP-1	89
Figure 17 : Inactivations intestinale et hépatique du GLP-1	90
Figure 18 : Modèle biologique hypothétique des effets du GLP-1 actif et inactif	92
Figure 19 : Métabolisme des différentes formes du GLP-1	93
Figure 20 : Effets biologiques du GLP-1	98
Figure 21 : Représentation schématique de la paroi intestinale	104
Figure 22 : Epithélium intestinal et illustration des différentes cellules épithéliales	105
Figure 23 : Représentation simplifiée du système nerveux entérique.....	106
Figure 24 : Organisation du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)	108
Figure 25 : Mise en place et évolution du microbiote au cours de la vie	110
Figure 26 : Table de détermination de l'indice de masse corporelle	117
Figure 27 : Les principales étapes de la physiopathologie du diabète de type 2.....	119
Figure 28 : Modèle proposant l'hyperinsulinémie comme le point de départ du DT2.....	121
Figure 29 : Physiologie des principaux organes gluco-consommateurs	125

Figure 30 : Les LPS induisent la sécrétion de GLP-1	161
Figure 31 : La sécrétion du GLP-1 par les LPS est indépendante des voies actuellement identifiées	164
Figure 32 : In vivo la sécrétion de GLP-1 par les LPS est dépendante de TLR4.....	165
Figure 33 : Les LPS stimulent la sécrétion de GLP-1 dans des explants d'iléon et des EEC en culture.....	168
Figure 34 : Les LPS déclenchent des flux calciques intracellulaires	170
Figure 35 : Les EEC répondent aux LPS par un mécanisme dépendant du TLR4	171
Figure 36 : L'administration orale de LPS ne stimule pas la sécrétion de GLP-1	172
Figure 37 : L'administration orale de LPS stimule la sécrétion de GLP-1 après altération de la barrière intestinale	173
Figure 38 : L'ischémie/reperfusion mésentérique entraîne une dégradation de la muqueuse intestinale	175
Figure 39 : L'ischémie/reperfusion mésentérique induit une sécrétion rapide de GLP-1	176
Figure 40 : Les LPS endogènes sont impliqués dans la sécrétion du GLP-1 induite par l'I/R mésentérique	178
Figure 41 : Sécrétion du GLP-1 par les LPS chez l'Homme : modèle hypothétique.....	179
Figure 42 : L'infusion continue de LPS induit une augmentation de l'endotoxémie	200
Figure 43 : L'infusion continue de LPS n'augmente pas la masse corporelle	201
Figure 44 : L'augmentation de l'endotoxémie est associée à une perte de masse grasse	202
Figure 45 : L'infusion continue de LPS : conséquences sur le TAPE	204
Figure 46 : L'infusion continue de LPS : conséquences sur le foie	207
Figure 47 : L'infusion continue de LPS réduit l'inactivation du GLP-1 et ne modifie pas la SISG	209
Figure 48 : L'infusion continue de LPS améliore le métabolisme du glucose.....	211
Figure 49 : Les LPS augmentent l'utilisation musculaire du glucose.....	213
Figure 50 : Les souris PLTP KO ont une masse corporelle plus importante sous HF	228
Figure 51 : La balance énergétique des souris PLTP KO n'est pas altérée sous HF	228
Figure 52 : Les souris PLTP KO ont une meilleure efficacité alimentaire sous régime HF.	229
Figure 53 : Les souris PLTP KO ont plus de masse grasse totale que les WT	230
Figure 54 : Stéatose hépatique et hypertrophie adipocytaire augmentées en l'absence de PLTP	231
Figure 55 : Altération du métabolisme glucidique des souris PLTP KO	234
Figure 56 : Clairance des triglycérides alimentaires diminuée pas la déficience en PLTP...	236

Figure 57 : L'expression génique de la LPL est diminuée dans les tissus
des souris PLTP KO sous LF 237

Figure 58 : La déficience en PLTP ne modifie pas la sécrétion hépatique des VLDL 238

Figure 59 : Lipidome fortement altéré par la déficience en PLTP et le régime HF 240

Figure 60 : La déficience en PLTP ne modifie que très peu le statut inflammatoire
sous HF..... 241

Figure 61 : Le régime HF et l'infusion de LPS n'augmentent pas le GLP-1 actif
en absence de PLTP 248

Figure 62 : L'infusion de LPS augmente l'expression génique et l'activité de la PLTP 249

Figure 63 : Hypothèse d'une activité PLTP protectrice 250

Figure 64 : Vue d'ensemble des résultats de thèse..... 257

Tableau 1 : Récapitulatif des principales caractéristiques des lipoprotéines.....62

Tableau 2 : Fonctions des protéines de la famille LT/LBP dans le métabolisme des LPS.....65

Avant – propos

De formation ingénieure en agroalimentaire, j'ai choisi de compléter ce diplôme par un doctorat en science de l'alimentation car je suis particulièrement sensible à la qualité nutritionnelle des produits alimentaires ainsi qu'à leurs effets sur notre organisme. Comme je le disais régulièrement lors de journées de rencontre entre les chercheurs et le public organisées par l'Expérimentarium de Dijon : « *l'alimentation est notre carburant, elle fait fonctionner notre corps. On ne devrait donc pas avoir à se soigner à cause de ce que l'on mange mais plutôt avec ce que l'on mange* ». Je suis bien sûr consciente que l'alimentation n'est pas un médicament et n'est pas la solution à tous nos problèmes. Elle pourrait néanmoins contribuer à prévenir bon nombre de maladies voire même à amoindrir celles dont elle peut en être la cause. A l'heure actuelle, notre alimentation nous apporte l'énergie, les calories dont notre corps a besoin pour se mettre en route, aller travailler, faire du sport, pour fonctionner au quotidien. Si cette alimentation nous nourrit, malheureusement bien souvent elle ne nous « nutrit » pas suffisamment. Les scientifiques du domaine et nutritionnistes parlent de « calories creuses ou vides ». En effet, nos modes de consommation se montrent de moins en moins efficaces pour nous apporter tous les nutriments dont le corps a besoin pour fonctionner de manière optimale. Si je poursuis ma métaphore du carburant, ce serait un peu comme si nous faisons circuler notre voiture avec de l'huile de friture ; elle démarre, elle roule, elle nous emmène d'un point A à un point B mais elle se fatigue rapidement, s'encrasse et finit par tomber en panne. Il en est de même pour nos organismes.

Mais pourquoi certains des produits que nous consommons ne nous satisfont plus pleinement ? Pour répondre à la demande du marché, les tendances agronomiques et agroalimentaires de ces dernières années ont été à la productivité : produire rapidement, en grosses quantités et avec le prix de revient le plus faible possible. Dans cette course à la productivité agronomique toutes les cartes sont bonnes à jouer : monoculture, sélection variétales, utilisation de produits phytosanitaires dans les cultures, traitements antibiotiques dans les élevages,... En agroalimentaire cela n'est pas beaucoup mieux : achats de matières premières nutritionnellement pauvres car les moins chères du marché, processus de transformation compétents mais agressifs pour le peu de nutriments présents, ajout de pléthore

de conservateurs et d'additifs... Les raisons de tels agissements sont multiples. Les comportements des consommateurs y ont fortement contribué et y contribuent encore avec notamment leurs exigences des prix les plus bas et leurs volontés de produits se conservant plus longtemps. C'est le jeu de l'offre et de la demande. Selon une étude de l'Insee, l'alimentation représentait, en 2014, 20,4 % des dépenses de consommation des Français, contre 34,6 % en 1960. « *La baisse du coût de l'alimentation a bien eu un prix. Ce prix ce sont nos corps qui l'ont payé* », Pierre Weill, ingénieur agronome et co-président de l'association Bleu-Blanc-Cœur, dénonce cette situation dans son livre édité en 2014 « *Mangez, on s'occupe du reste* ». Effectivement, les pathologies en lien avec la qualité de notre alimentation ne peuvent malheureusement pas se compter sur les doigts d'une main et sont en perpétuelle augmentation. Dans les pays développés, nous faisons actuellement face à une situation alimentaire paradoxale : un excès de calories mais une carence en nutriments indispensables. Ce cocktail explosif inquiétant peut malheureusement aboutir à des maladies telles que l'obésité, le diabète de type 2 (DT2), les maladies cardiovasculaires... Et cela ne s'arrête pas là, d'autres pathologies dont la prévalence ne cesse d'augmenter ces dernières années pourraient également être en lien direct avec la qualité de nos assiettes : cancers, intolérances alimentaires (gluten, lactose,...), maladies neuro-dégénératives,... Cela n'est donc plus un secret pour personne, il existe bel et bien une relation indéniable entre notre alimentation et notre santé.

« *La bouche n'est que le vestibule qui s'ouvre sur un monde ou l'être humain fait sien ce qui était autre* », Guilia Enders dans « *Le charme discret de l'intestin* » paru en 2015. En effet, dans notre organisme, celui qui est en première ligne face à notre alimentation et qui est en charge d'absorber celle-ci qu'elle soit bonne ou mauvaise, est l'intestin. Longtemps considéré comme un simple tuyau d'évacuation enroulé dans notre cavité abdominale, l'intestin exerce en fait un certain nombre de fonctions nécessaires à notre existence. Compétiteur dans l'âme, il est du genre à exceller dans tout ce qu'il entreprend et met tout en œuvre pour y parvenir. Cet organe flirte incontestablement avec le superlatif : il représente la plus grande surface d'échange entre l'environnement extérieur et notre monde intérieur, il constitue l'organe endocrine le plus développé de l'organisme, il est aussi l'organe périphérique le plus innervé et dispose même de son propre système nerveux, il possède la masse de tissu lymphoïde la plus conséquente de l'organisme et enfin, il héberge la majeure partie de la population microbienne avec laquelle nous cohabitons quotidiennement. La qualité de notre alimentation

impacte non seulement le fonctionnement de ce super-organe mais impacte aussi ses habitants, le microbiote intestinal. En effet, comme j’avais l’habitude de le dire aux enfants lors des journées d’échange avec le public, les bactéries de notre intestin ne vont pas faire leurs courses et n’ont pas, comme nous, la chance de pouvoir choisir le menu du dîner. Elles mangent ce que nous mangeons et deviennent ce que nous leur imposons de devenir. Notre type d’alimentation peut ainsi fortement modifier cet écosystème microbien intestinal. De plus, de nombreuses études scientifiques soulignent le fait que certaines pathologies telles que l’obésité et le DT2, en partie liées aux défaillances de nos produits alimentaires, sont associées à des remaniements de la composition de cette population microbienne. Toutefois, la route est encore longue avant que les moindres détails de cette association microbiote – alimentation – pathologies ne soient révélés au grand jour. Il existe de façon certaine une infime interconnexion entre ces trois entités mais qui est la poule et qui est l’œuf, la question fait encore débat à l’heure actuelle (Figure 1).

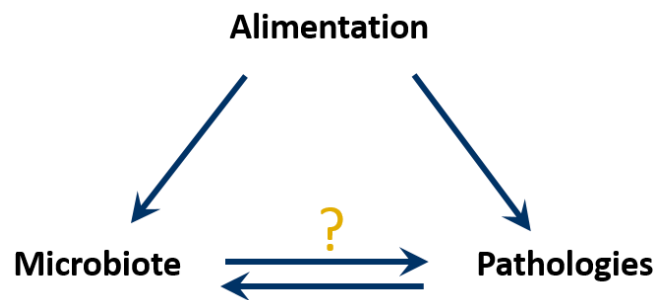


Figure 1

Connexions entre alimentation, microbiote intestinal et pathologies associées

La qualité de notre alimentation influence à la fois la composition de notre microbiote et la prévalence de nombreuses pathologies. Est-ce que ce sont les modifications du microbiote qui favorisent le développement des pathologies et/ou est-ce que ce sont les pathologies qui influent sur le microbiote ? La question reste ouverte.

Les bactéries intestinales vivent en totale synergie avec nous, elles ont besoin de nous comme nous avons besoin d’elles. Nous leur offrons le gîte et le couvert et en contrepartie elles contribuent aux superpouvoirs de l’intestin (les autres organes envieux pourraient donc rétorquer que rien ne sert d’aduler à ce point l’intestin, au final ce n’est pas uniquement lui la star). Elles l’aident dans ses fonctions de digestion et apportent de l’énergie supplémentaire à notre organisme, elles dissuadent les bactéries pathogènes de passage de s’installer dans cette agréable demeure et les incitent à passer leur chemin, elles participent au développement du

système immunitaire intestinal en l’entraînant quotidiennement pour faire de lui une véritable arme de guerre... Bref, la conversation entre nos bactéries et nos cellules est perpétuelle afin de faire en sorte que cette synergie soit la plus profitable possible pour tout le monde. Elles disposent pour cela de différents moyens de communication, qui je pense sont bien loin d’avoir tous été découverts, et dont il serait intéressant d’en comprendre les fondements car ces échanges microbiote – hôte pourraient fortement contribuer aux effets de l’alimentation sur notre santé. Dans cette thèse nous nous sommes justement intéressés à des molécules pouvant potentiellement être à l’origine d’un dialogue entre nous et nos habitants microbiens. D’un côté les endotoxines bactériennes pro-inflammatoires ou lipopolysaccharides (LPS) localisées à la surface de certaines bactéries et donc présentes en quantités pharamineuses au sein de notre intestin et d’un autre côté une des hormones produites par nos cellules endocrines intestinales : le *glucagon-like peptide 1* (GLP-1). Effectivement, ces deux composés, un microbien et un humain, sont connus pour être impliqués dans les maladies métaboliques telles que l’obésité et le DT2 et pour être, de surcroît, connectés l’un à l’autre.

Je vous invite à parcourir les travaux de thèse ci-après présentés pour en savoir plus sur chacune de ces molécules, ensemble ou séparément. Je vous remercie de l’intérêt que vous portez à ce manuscrit et je vous souhaite une bonne lecture.

INTRODUCTION

Chapitre 1

Les lipopolysaccharides

I. A propos des endotoxines ou lipopolysaccharides

1. Découverte des lipopolysaccharides (Beutler & Rietschel, 2003)

Ce premier chapitre de thèse vise à décrire les endotoxines bactériennes, aussi appelées lipopolysaccharides (LPS). Comme toute description scientifique, celle-ci ne saurait démarrer sans un historique en bonne et due forme. Les faits historiques en relation avec la découverte des endotoxines relatés dans le paragraphe ci-dessous sont représentés sur la Figure 2 et ne sont bien sûr pas exhaustifs. Cette chronologie peut être catégorisée en trois phases : la reconnaissance du fait que les infections sont toxiques et potentiellement causées par un « poison », les recherches visant à explorer la nature de ce « poison » et aboutissant à la découverte des endotoxines et enfin leur caractérisation chimique et biologique.

Pour remonter aux prémices de ces découvertes, il faut revenir aux réflexions d’Hippocrate (460-370 av. J.-C.) et de Claude Galien (129-216 ap. J.-C.). Selon eux et d’après les symptômes communs aux intoxications, un « poison » serait à l’origine des maladies létales de l’époque. Il faudra attendre les 18 et 19^{èmes} siècles pour voir se vérifier cette hypothèse du « poison ». Albrecht von Haller (1708-1777) et François Magendie (1783-1855) montrent que l’injection intraveineuse de matières en décomposition (poissons ou viandes) provoque les mêmes symptômes maladiques que ceux causés par le fameux « poison » : fièvre, diarrhée et décès. Toutefois, personne n’expliquait encore comment cela pouvait être si contagieux et causer autant de dégâts. Le pathologiste allemand Jakob Henle (1809-1885) suggère alors que des organismes vivants capables de reproduction en seraient à l’origine. Cette idée révolutionnaire sera confirmée sans l’ombre d’un doute par Louis Pasteur (1822-1895).

Peter Ludwig Panum (1820-1885), un physio-pathologiste danois, fait pour la première fois référence aux endotoxines, sans bien sûr les nommer ainsi. Il purifie ce qu’il appelle le « poison putride » : une molécule solide, soluble dans l’eau, insoluble dans l’alcool, non volatile, résistante à la chaleur et qui se distingue des micro-organismes vivants. Il montre que l’injection de cette molécule à des chiens provoque une forte fièvre et une mort rapide. Sans le savoir, il vient de décrire ce qui par la suite portera le nom d’ « endotoxine ». Quelques années plus tard, suite à des recherches visant à découvrir la nature de ce composé pyrogénique létal,

le terme de « toxine » fait sa première apparition : Ludwig Brieger (1849-1919) témoigne de l'existence d'une substance toxique produite et sécrétée par les germes vivants. Richard Pfeiffer (1858-1945) publie en 1892 que la bactérie responsable du choléra (*Vibrio cholerae*) conserve ses propriétés toxiques même après destruction thermique. Il en déduit l'existence d'une toxine contenue à l'intérieur des cellules bactériennes et introduit ainsi le terme d'« endotoxines » par opposition aux « exotoxines » libérées par les germes vivants. Ce ne sera que dans les années 1930 que les endotoxines seront purifiées et nommées « lipopolysaccharides » du fait de leur composition à la fois lipidique et saccharidique (Hitchcock *et al.*, 1986).

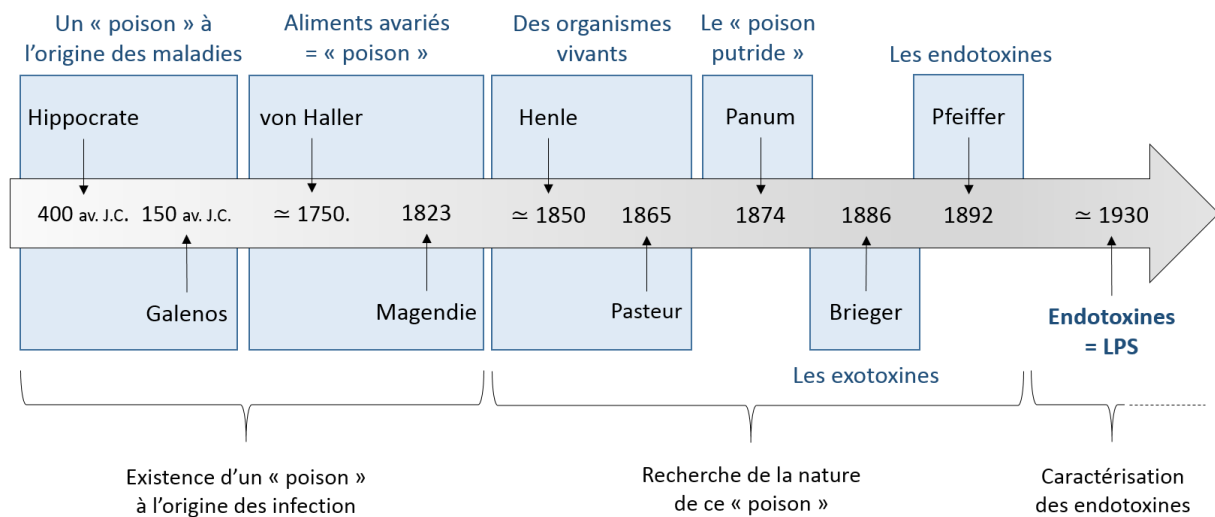


Figure 2

Historique de la découverte des endotoxines

Les noms des personnes à l'origine des différentes découvertes apparaissent sur cette figure. Celles-ci peuvent être classées en trois grandes catégories : i) la reconnaissance de l'existence d'un « poison » qui pourrait être responsable des infections de l'époque, notamment alimentaires ; ii) les différentes recherches visant à découvrir la nature de ce « poison » et aboutissant à la découverte des endotoxines ; iii) la caractérisation biochimique de ces endotoxines en tant que composé lipopolysaccharidique, d'où leur nom de lipopolysaccharides (LPS). Figure adaptée de Beutler & Rietschel, 2003.

2. Lipopolysaccharides et membrane externe des bactéries à Gram négatif

Les LPS sont des composés faisant partie intégrante des cellules bactériennes. L'erreur commise par Richard Pfeiffer fut de croire que ces LPS sont des éléments constitutifs de toutes les cellules bactériennes alors que seules les bactéries à Gram négatif en comportent. La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram (1853-1938) qui l'a mise au point. Elle permet de classer les bactéries en deux catégories selon les propriétés de leur paroi bactérienne : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, se colorant respectivement en violet et en rose (Figure 3A).

La paroi des bactéries à Gram positif est dotée d'une membrane plasmique recouverte d'une couche épaisse de peptidoglycane enchevêtrés d'acides lipotéichoïques (LTA) alors que la paroi des bactéries à Gram négatif apparaît légèrement plus complexe. De l'intérieur vers l'extérieur, celle-ci possède également une membrane plasmique recouverte cette fois d'une faible couche de peptidoglycane sans LTA, puis une deuxième membrane, la membrane externe, dans laquelle sont insérées de nombreuses molécules de LPS (Figure 3B).

La principale différence entre ces deux types de bactéries réside donc dans la présence d'une seconde membrane externe recouverte de LPS chez les bactéries à Gram négatif. Leur membrane interne est une membrane plasmique traditionnelle constituée d'un double feuillet phospholipidique permettant la délimitation du cytoplasme. A l'inverse, la membrane externe est plus singulière. Elle est aussi composée d'un double feuillet lipidique, mais celui-ci n'est pas symétrique. Le feuillet interne est constitué des traditionnels phospholipides alors que dans le feuillet externe, en contact avec l'environnement, tout ou partie des phospholipides sont remplacés par des LPS.

Pour avoir une idée de l'importance numérique de ces LPS, une bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) d'environ $6\mu\text{m}^2$ présente approximativement 1 million de molécules de LPS à sa surface (Raetz & Whitfield, 2002), soit à peu près $170\,000 / \mu\text{m}^2$. Ces LPS contribuent notamment à la régulation de la perméabilité membranaire et confèrent donc une capacité d'adaptation aux bactéries qui en sont porteuses.

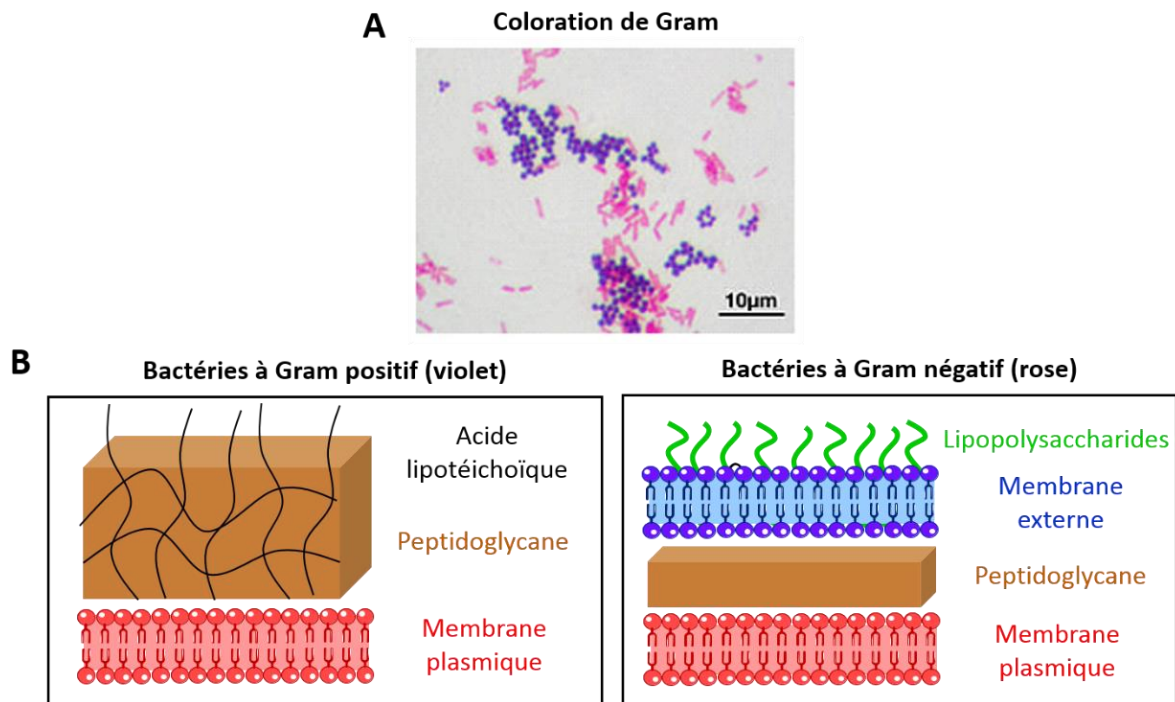


Figure 3

Distinctions entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif

A. Observation microscopique de bactéries colorées avec la technique de la coloration de Gram, les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose. Source : www.labtestonline.fr. **B.** Représentation schématique des constituants de la paroi bactérienne de ces deux types de bactéries, à gauche les bactéries à Gram positif et à droite les bactéries à Gram négatif.

3. Caractérisation structurale des lipopolysaccharides

Comme le schématise la Figure 4, les LPS sont généralement composés de trois parties distinctes : i) le lipide A hydrophobe, ancré dans la membrane externe des bactéries, il constitue la partie proximale des LPS (environ 2,4 nm), ii) l'antigène O (pour « *Ohne Kapsel* » en allemand voulant dire « sans capsule ») de nature saccharidique, hydrophile et présent à la partie distale des LPS en contact avec le milieu extérieur (fréquemment entre 5 et 10 nm) et enfin iii) le noyau faisant le lien entre le lipide A et l'antigène O (environ 2 nm), avec une partie plutôt hydrophobe, le noyau interne, et une partie plutôt hydrophile, le noyau externe. Malgré cette structure biochimique commune, chaque espèce de bactérie exprime un LPS différent, c'est un peu la signature bactérienne : les éléments constitutifs de ces différentes parties peuvent varier d'une espèce bactérienne à une autre et certaines espèces peuvent disposer d'un LPS dépourvu d'antigène O et de noyau externe (Caroff *et al.*, 2002).

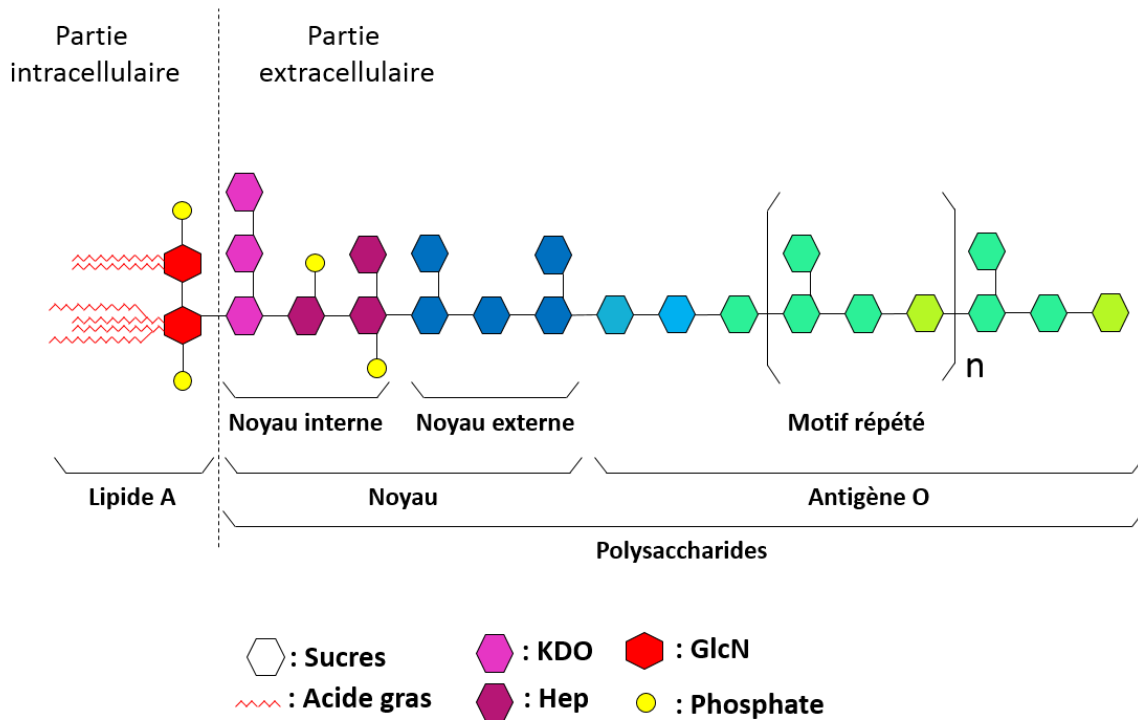


Figure 4

Représentation schématique de la structure d'une molécule de LPS

Chaque molécule de LPS est composée d'une partie lipidique intracellulaire et d'une partie polysaccharidique extracellulaire. La partie lipidique est constituée du lipide A inséré dans la membrane bactérienne. La partie polysaccharidique située en surface de la bactérie comprend le noyau et l'antigène O. Figure adaptée de : <http://www.glycoforum.gr.jp/index.html>.

Abréviations : KDO – acide 3 déoxy-D-manno-octulosonique ou kéto-déoxyoctanate ; Hep – heptose ; GlcN – glucosamine.

a) Le lipide A

La structure du lipide A est fortement conservée parmi l'ensemble des bactéries à Gram négatif, elle est même quasiment identique au sein des bactéries d'une même famille. En s'insérant entre les phospholipides membranaires, il constitue le point d'ancrage des LPS dans la paroi bactérienne. Le lipide A le plus régulièrement décrit est celui d'*E. coli* (Figure 5) : il est constitué d'un disaccharide de glucosamines reliées en β -1,6 et phosphorylées par deux groupes phosphates. Le disaccharide est acylé par quatre acides gras (groupements β -hydroxymyristoyl) sur lesquels viennent se greffer deux autres chaînes d'acides gras (résidus laurate et myristate). Les seules variations de structure du lipide A résident dans la nature des

sucres animés et dans la nature et le nombre d'acides gras. Le lipide A est responsable de la plupart des activités biologiques des LPS. La production d'un lipide A de synthèse dans les années 1980 a permis de montrer que celui-ci était même suffisant pour induire des réponses inflammatoires (Tanamoto *et al.*, 1984).

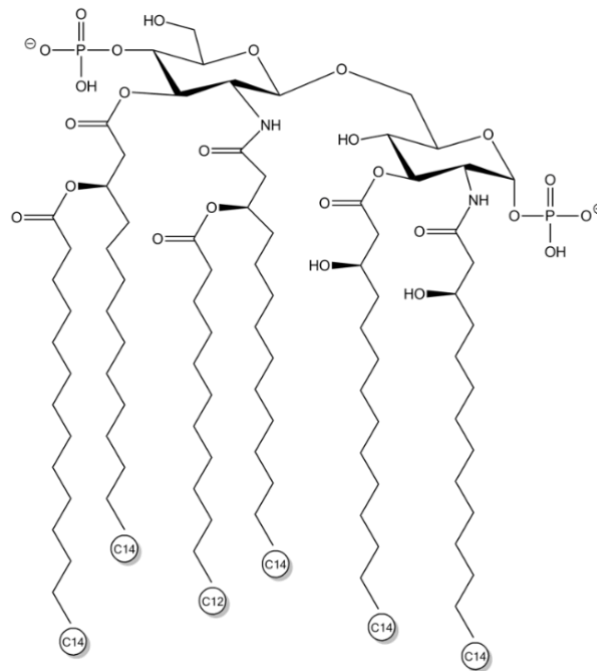


Figure 5

Schématisation du lipide A des bactéries de l'espèce Escherichia coli

Le lipide A fait partie intégrante des molécules de LPS. Celui d'*E. coli* représenté dans cette figure est celui qui est le plus régulièrement décrit. Il comprend deux glucosamines reliées en β-1,6 et phosphorylées par deux groupes phosphates. Le disaccharide est acylé par quatre acides gras (groupements β-hydroxymyristoyl) sur lesquels viennent se greffer deux autres chaînes d'acides gras (résidus laurate et myristate). Source : <http://www.adipogen.com/>.

Abréviations : C12 – acide gras à 12 carbones ; C14 – acide gras à 14 carbones.

b) Le noyau

Le noyau est divisé en deux parties distinctes : le noyau interne et le noyau externe. La partie interne, fortement conservée, est liée de façon covalente au lipide A par l'intermédiaire de l'acide 3 déoxy-D-manno-octulosonique ou kéto-déoxyoctanate (KDO). La présence de ce

résidu KDO sur les molécules de LPS apparaît nécessaire pour la viabilité de la bactérie porteuse mais le nombre de résidus KDO par LPS peut être variable selon les espèces bactériennes. En plus de cette chaîne de KDO, le noyau interne est également composé d'une autre chaîne glucidique comprenant en général trois heptoses dont la conformation peut être modifiée par l'ajout de différents groupements : phosphates, pyrophosphates ou diphosphoéthanolamines. Le noyau externe est beaucoup plus variable. Relié au noyau interne dans la partie proximale et à l'antigène O dans la partie distale, il est généralement composé d'un nombre variable d'hexoses ordinaires comme le D-glucose, le D-galactose ou la D-glucosamine.

c) L'antigène O

L'antigène O est la partie externe non capsulaire des molécules de LPS, l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. Il s'agit de la partie la plus variable des LPS qui caractérise sérologiquement l'espèce bactérienne, d'où le nom « antigène ». D'un point de vue structural, l'antigène O est formé de la répétition (pouvant aller jusqu'à 50 fois) de plusieurs polysaccharides appelés « chaînes O ». Chacune de ces chaînes O est le produit d'assemblage de 1 à 8 monosaccharides dont plus d'une centaine ont été répertoriés jusqu'à présent (homopolymère ou hétéropolymère). La composition en sucres des chaînes O est de ce fait extrêmement variable. Il est également possible de retrouver des sous-unités non glucidiques à la place des monosaccharides tels que des groupements O-acétyle, des acides lactiques ou glycériques...

Ainsi, les antigènes O peuvent différer par leur composition en monosaccharides, leur nombre de chaînes O constitutives ainsi que par le mode de liaison de ces chaînes O les unes aux autres. Cette composition semble être corrélée à l'environnement de la bactérie. Ainsi, l'espèce *E. coli* présente environ 170 sérotypes différents d'antigène O. Quand il est présent l'antigène O agit comme un bouclier protecteur de la bactérie en tenant les potentielles molécules délétères à distance de la membrane (antibiotiques, agents antimicrobiens de l'hôte...). Cette fonction protectrice de l'antigène O explique pourquoi les bactéries qui en sont dépourvues sont moins viables. En effet, certaines bactéries peuvent être porteuses de molécules de LPS dépourvues d'antigène O.

II. Endotoxémie et voies de détection des lipopolysaccharides

Pour diverses raisons les LPS peuvent passer les barrières physiologiques de l'organisme et conduire à une augmentation de l'endotoxémie (niveau sanguin de LPS). Les bactéries ou leurs endotoxines sont directement reconnues comme des substances étrangères et provoquent une réponse inflammatoire, c'est-à-dire un ensemble de réactions biologiques déclenchées par l'organisme comme un mécanisme de défense. Toutefois, une réponse inflammatoire qui s'emballe peut malheureusement devenir pathologique (Cf chapitre 3).

Les LPS déclenchent une inflammation en agissant soit directement au niveau sanguin, soit au niveau cellulaire. Ces deux voies d'activation ne sont bien sûr pas mutuellement exclusives. Pour ce qui est de l'action au niveau sanguin, les LPS peuvent activer la voie alterne du système du complément ou encore entraîner des modifications de l'hémostase, aboutissant à une stimulation de la coagulation (production de thrombine,...). Au niveau cellulaire, les LPS sont bien sûr détectés par les cellules immunitaires. Ils entraînent ainsi la production de nombreuses molécules pro- et anti-inflammatoires telles que les cytokines ou les chimiokines. Néanmoins, ils peuvent aussi être repérés par d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales. La détection cellulaire des LPS étant la seule à être étudiée dans ces travaux de thèse, elle sera également la seule à être détaillée dans cette partie (Deventer *et al.*, 1990).

Pour générer une réponse inflammatoire cellulaire, les LPS doivent donc forcément être détectés par les cellules cibles. Pour cela, il existe principalement deux mécanismes. Le premier est clairement établi et a été largement décrit, il s'agit du mécanisme dépendant du *toll-like receptor 4* (TLR4) et du *myeloid differentiation factor 2* (MD-2). Ces deux protéines forment le complexe de reconnaissance des LPS, le complexe TLR4/MD-2. Le deuxième mécanisme n'a été découvert que plus récemment et concerne l'activation de protéases intracellulaires portant le nom de « caspases ». Les paragraphes ci-dessous ne sont bien sûr pas exhaustifs car les cascades de signalisation engendrées par la détection cellulaire des LPS est d'une très grande complexité.

1. Présentation des lipopolysaccharides au complexe TLR4/MD-2

a) Prise en charge des lipopolysaccharides par les protéines LBP et CD14

Le complexe TLR4/MD-2 ne peut par lui-même détecter les molécules de LPS et requiert que celles-ci lui soient présentées. Cela est d'autant plus vrai que les LPS ne sont que très rarement retrouvées à l'état libre dans la circulation sanguine. En effet, étant amphiphiles mais principalement hydrophobes, les LPS circulants forment des agrégats micellaires ou sont pris en charge par des lipoprotéines. Fort heureusement pour l'hôte, il existe des mécanismes permettant la rencontre entre le complexe TLR4/MD-2 et les LPS. Parmi ces mécanismes, celui faisant intervenir le cluster de différenciation (CD) 14 et la *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) joue un rôle-clé dans la réponse inflammatoire aux LPS (Schumann *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990).

Le CD14 est une glycoprotéine à la fois membranaire (mCD14) et soluble (sCD14). La forme membranaire de 55 kDa est retrouvée à la surface des cellules de l'immunité. Il existe deux types de formes solubles, une de 56 kDa directement sécrétée par les vésicules intracellulaires et une de 48 kDa produite après clivage de la forme membranaire (Labeta *et al.*, 1993). Le CD14 est caractérisé par une conformation en fer à cheval qui constitue une poche hydrophobe pour l'accueil des LPS. Le mCD14 des cellules immunitaires permet une interaction avec les LPS circulants et une présentation de l'endotoxine capturée au complexe TLR4/MD-2. En ce qui concerne les cellules non immunitaires qui ne possèdent pas de mCD14, c'est la forme soluble qui intervient.

La LBP est une protéine plasmatique d'environ 60 kDa. Protéine de la phase aiguë de la réponse inflammatoire, elle est synthétisée et sécrétée par le foie en réponse à des stimulations cytokiniques telles que l'interleukine (IL)-6 et l'IL-1 β (Kirschning *et al.*, 1997). Elle peut aussi être produite par d'autres tissus non hépatiques comme l'intestin (Vreugdenhil *et al.*, 1999). En cas d'infection, ses taux sanguins passent d'environ 5-10 $\mu\text{g/mL}$ à 200 $\mu\text{g/mL}$ en moins de 24 heures (Tobias *et al.*, 1992). La LBP se fixe aux LPS avec une forte affinité (Tobias *et al.*, 1989) et la formation du complexe LBP/LPS permet ensuite aux molécules de LPS de s'associer au CD14 (Hailman *et al.*, 1994). L'albumine joue un rôle prépondérant lors de cet échange. Elle se charge de protéger le lipide A hydrophobe lors de son passage dans la circulation sanguine hydrophile depuis la LBP vers le CD14 (Gioannini *et al.*, 2002).

b) La formation extracellulaire du complexe TLR4/MD-2/LPS

Le récepteur TLR4 fait partie de la grande famille des *toll-like receptors* (TLRs) mise en évidence pour la première fois chez les humains en 1997 (Medzhitov *et al.*, 1997). Les TLRs reconnaissent une variété de composants structuraux microbiens, aussi appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs pour *pathogen-associated molecular patterns*). Une telle reconnaissance par les TLRs entraîne la production de médiateurs de l'inflammation dont le but est d'éradiquer l'infection. Ces TLRs sont spécifiques des PAMPs qu'ils détectent.

Ainsi, le TLR4 est décrit comme le récepteur de reconnaissance des LPS (Poltorak *et al.*, 1998). Il est exprimé à la surface des cellules myéloïdes et d'autres cellules non immunitaires comme les cellules de l'épithélium intestinal ou encore les cellules endothéliales. Comme le montre la Figure 6, le TLR4 est une protéine transmembranaire comprenant trois parties : un domaine extracellulaire en forme de fer à cheval (forme caractéristique des TLRs), une zone transmembranaire et un domaine intracellulaire appelé *toll/IL-1 receptor* (TIR) (Park *et al.*, 2009).

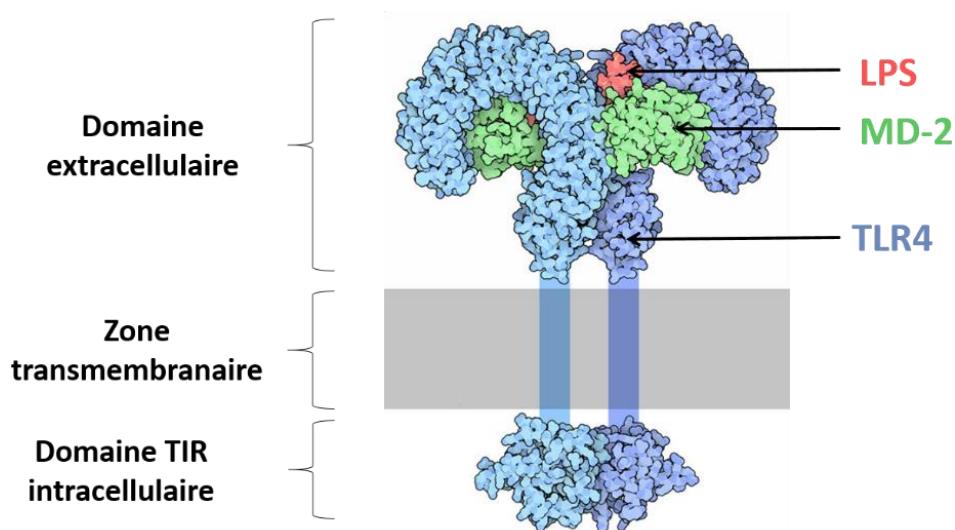


Figure 6

Représentation schématique du complexe TLR4/MD-2/LPS

Représentation schématique du récepteur TLR4 après dimérisation et donc après recrutement de la protéine MD-2 associée à une molécule de LPS. La zone transmembranaire est représentée schématiquement. Figure adaptée de : <http://pdb101.rcsb.org/>, le site internet de « *protein data bank* »

Abréviations : TIR – *toll/IL-1 receptor* ; TLR4 – *toll-like receptor 4* ; MD-2 – *myeloid differentiation factor 2* ; LPS – lipopolysaccharides.

Comme le montre la Figure 7, le scénario typique d'activation du TLR4 par les LPS commence par une fixation de ces LPS sur la LBP circulante. Puis, ces LPS sont transférés au niveau de la poche hydrophobe des protéines CD14. Par la suite, les CD14 présentent les LPS au complexe TLR4/MD-2 avec encore une fois l'intervention nécessaire de l'albumine pour faciliter les échanges (Gioannini *et al.*, 2005).

Pour ce faire, le CD14 s'associe tout d'abord avec la protéine MD-2 qui dispose aussi d'une poche hydrophobe pour accueillir les molécules de LPS. Le complexe MD-2/LPS se fixe ensuite sur le récepteur TLR4 membranaire. (Park *et al.*, 2009). La structure du lipide A peut moduler les interactions avec le complexe TLR4/MD-2 et faire fluctuer la réponse inflammatoire (Ohto *et al.*, 2012). L'association de la molécule de LPS avec MD-2 d'un côté et TLR4 de l'autre provoque une dimérisation du récepteur TLR4 membranaire (Resman *et al.*, 2009) ; cette dimérisation est à l'origine de son activation.

c) Voies de signalisations intracellulaires en réponse au complexe TLR4/MD-2/LPS

Le TLR4 est à l'interface entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. Cette position transmembranaire lui confère un rôle de garde-fou. Son changement de conformation après fixation à des endotoxines bactériennes est un signal d'alerte pour les composants du milieu intracellulaire qui travaillent ensuite en étroite collaboration afin de défendre non seulement leur propre cellule mais également l'ensemble des cellules de l'organisme. En effet, ces cascades de signalisation intracellulaires, décrites dans la Figure 7, aboutissent à la libération de molécules pro- et anti-inflammatoires dont le but est de défendre l'hôte.

La dimérisation du récepteur TLR4 facilite le recrutement de deux protéines sur ses domaines TIR intracellulaires. Il s'agit du *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) et du *TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon β* (TRIF). Pour pouvoir se fixer sur les domaines TIR, les protéines MyD88 et TRIF ont besoin d'adaptateurs spécifiques appelés « protéines adaptatrices ». Il s'agit de *MyD88 adaptor-like protein* (MAL) et de *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM).

La fixation de MyD88 sur le complexe TLR4/MAL déclenche rapidement les recrutements successifs des protéines *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK) (Motshwene *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). S'ensuit alors la mise en route de la cascade de

signalisation du *TNF receptor associated factor* (TRAF) 6. Cette réponse inflammatoire dépendante de MyD88 aboutit rapidement à l'activation des facteurs de transcription *nuclear factor κ B* (NF κ B) et *activator protein-1* (AP-1) via des cascades de phosphorylations dépendantes respectivement d'I κ B kinases (IKK) et de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). NF κ B et AP-1 induisent ensuite l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme le *tumor necrosis factor α* (TNF α), l'IL-1 β ou l'IL-6.

Lorsque la protéine MAL se dissocie du domaine TIR, cela aboutit à l'endocytose du complexe TLR4/MD-2/LPS (Kagan *et al.*, 2008). Cette internalisation permet le recrutement des protéines TRAM et TRIF. La cascade de signalisation dépendante de TRIF aboutit soit à l'activation un peu différée de TRAF6, soit au déclenchement de la voie dépendante de TRAF3. Cette dernière est associée à une translocation intranucléaire du facteur de transcription *interferon regulatory factor 3* (IRF3) qui stimule à son tour la transcription de certains gènes tels que celui codant pour l'IL-10 ou encore ceux inductibles par l'interféron (IFN) de type 1.

d) Activation du récepteur TLR4 et interaction avec les protéines « raft »

Des travaux font référence à un autre facteur important gouvernant l'activation du TLR4 par les LPS ; il s'agit de microdomaines de la membrane plasmique appelés « raft » ou « radeau lipidique » en français. De par leur composition (riches en cholestérol et sphingolipides), ces rafts sont plus rigides que la membrane plasmique, ce qui leur permet de « flotter », d'où leur nom ; une dynamique membranaire qui a notamment pour objectif de faciliter la rencontre des molécules transportées (Lingwood & Simons, 2010).

Une fois activé, TLR4 migre vers les rafts membranaires contenant déjà la protéine CD14 (Triantafilou *et al.*, 2004), ce qui favorise l'endocytose ou macropinocytose du complexe TLR4/MD-2 (Zanoni *et al.*, 2011). D'autres protéines des rafts sont capables d'interagir avec le récepteur TLR4 et sont particulièrement bien décrites par Plóciennikowska et ses collaborateurs (Plóciennikowska *et al.*, 2015).

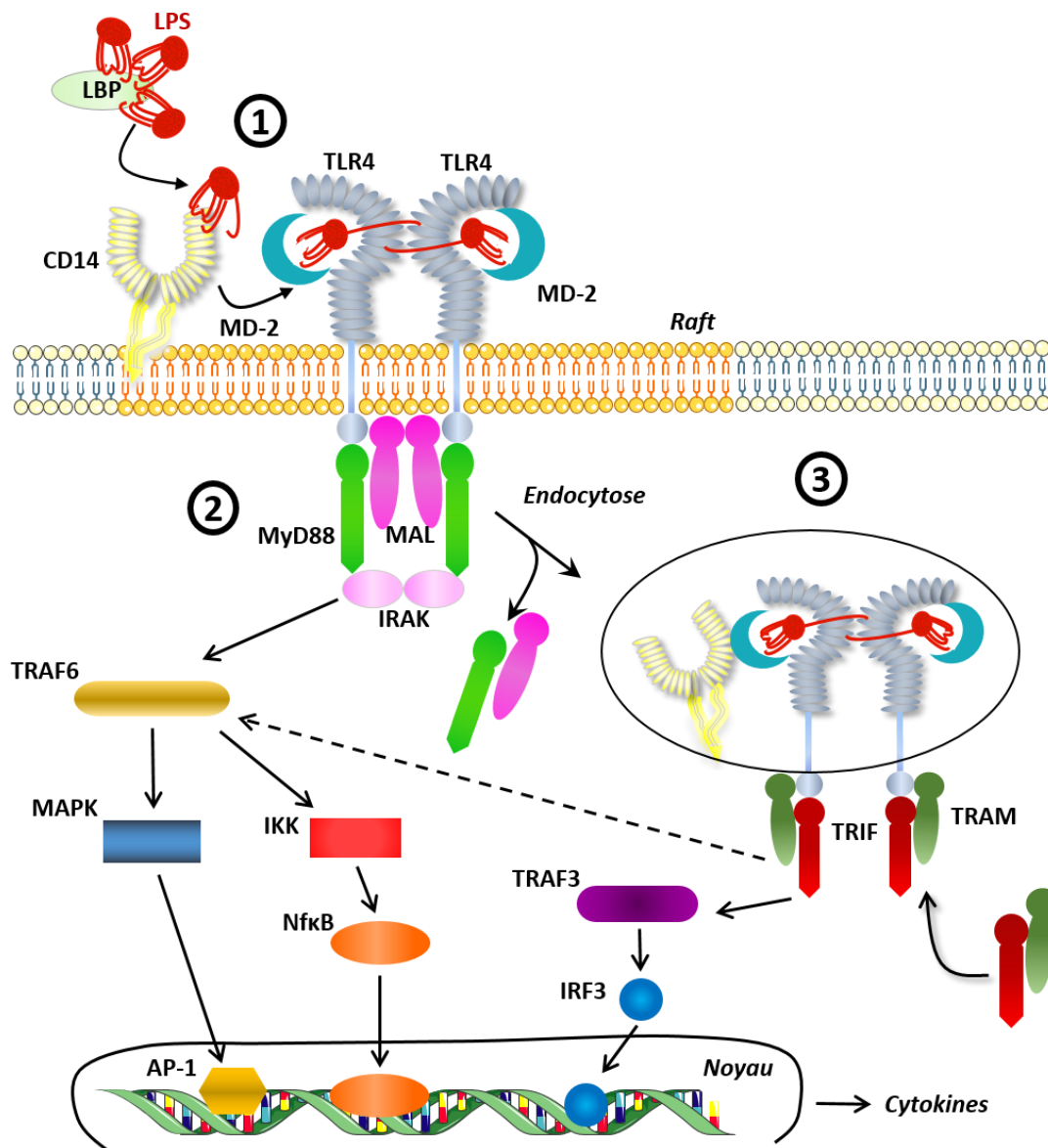


Figure 7

L'activation du récepteur TLR4 par les LPS

1. Formation du complexe extracellulaire TLR4/MD-2/LPS : la LBP se lie aux LPS circulants et les transferts au CD14 membranaire. Les protéines CD14 et MD-2 se rapprochent (intérêt des rafts), s'associent et s'échangent la molécule de LPS. Le complexe MD-2/LPS se fixe sur le récepteur TLR4. **2. Cascade de signalisation dépendante de MyD88** : la dimérisation du récepteur TLR4 permet le recrutement de MAL, MyD88 et IRAK au niveau des domaines TIR intracellulaires, il s'en suit une cascade de signalisation *via* TRAF6. **3. Cascade de signalisation dépendante de TRIF** : l'endocytose du complexe TLR4/MD-2/LPS s'accompagne du recrutement de TRAM et TRIF au niveau des domaines TIR puis l'activation de TRAF3 ou TRAF6. Figure adaptée de : Płóciennikowska *et al.*, 2015.

Abréviations : LPS – lipopolysaccharides ; CD14 – cluster de différenciation 14 ; MD-2 – *myeloid differentiation factor 2* ; TLR4 – *toll-like receptor 4* ; MyD88 – *myeloid differentiation factor 88* ; MAL – *MyD88 adaptor-like protein* ; IRAK – *interleukin-1 receptor-associated kinase* ; TRIF – *TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon β* ; TRAM – *TRIF-related adaptor molecule* ; TRAF6 – *TNF receptor associated factor 6* ; MAPK – *mitogen-activated protein kinase* ; AP-1 – *activator protein-1* ; Nf κ B – *nuclear factor κ B* ; TRAF3 – *TNF receptor associated factor 3* ; IKK – *I κ B kinase* ; IRF3 – *interferon regulatory factor 3*.

2. Voie indépendante du complexe TLR4/MD-2 : voie des caspases

Alors que les LPS étaient considérés comme étant exclusivement détectés au niveau membranaire par le complexe TLR4/MD-2, des études récentes ont prouvé qu'il existe une deuxième voie de détection des endotoxines bactériennes : les caspases.

a) Les caspases intracellulaires

Le terme « caspase » vient de l'anglais « *cysteine-dependent aspartate-specific protease* ». Il désigne un ensemble de protéases à cystéines ayant des fonctions essentielles en terme de régulation de la mort cellulaire et de l'inflammation. Ces enzymes reconnaissent des séquences spécifiques d'acides aminés sur les protéines cibles et les hydrolysent en clivant le côté C-terminal d'un résidu d'acide aspartique.

A l'heure actuelle, 13 caspases numérotées de 1 à 14 ont été identifiées (absence de la caspase 13) dont douze sont exprimées chez l'Homme et onze chez la souris. La caspase 11 murine est l'homologue des caspases 4 et 5 humaines. Ces protéases ont été initialement divisées en deux catégories, celles ayant un rôle dans la mort cellulaire et celles ayant un rôle dans la réponse inflammatoire. Même si de récentes découvertes montrent que la frontière entre ces deux fonctions n'est pas aussi nette, cette classification est encore utilisée à l'heure actuelle (Galluzzi *et al.*, 2016).

b) Caspases inflammatoires et lipopolysaccharides

La détection membranaire des LPS ainsi que la présence dans le compartiment intracellulaire de signaux microbiens tels que des acides nucléiques ou des flagelles entraînent l'assemblage des protéines de l'inflammasome et l'activation de différentes caspases pro- ou anti-inflammatoires par dimérisation. Chez les mammifères il existe cinq caspases inflammatoires : les caspases 1, 4, 5, 11 et 12. Toutes ces protéases disposent d'un *caspase-associated recruitment domains* (CARD) en N-terminal qui favorise leur recrutement et leur activation au sein des inflammasomes (Martinon & Tschopp, 2007).

La réponse inflammatoire déclenchée par l'activation de la caspase 1 est la mieux décrite à l'heure actuelle. Elle permet de convertir les précurseurs cytokiniques, tels que la pro-IL-1 β produite suite à l'activation du récepteur TLR4, en leur homologue biologiquement actif. Il a ainsi été montré que des souris déficientes en caspase 1 présentent un défaut de maturation des cytokines (Li *et al.*, 1995). En ce qui concerne la caspase 12, elle serait anti-inflammatoire *via* notamment des capacités d'inactivation de la caspase 1 (Saleh *et al.*, 2006) et de la voie NF κ B (Labbé *et al.*, 2010).

L'organisme est capable de détecter des molécules de LPS cytosoliques par un mécanisme indépendant du récepteur TLR4 faisant intervenir la caspase 11 ou ses orthologues humains, les caspases 4 et 5 (Hagar *et al.*, 2013; Kayagaki *et al.*, 2013). Les effets pro-inflammatoires de la caspase 11 ressemblent à ceux de la caspase 1 avec notamment une activation des précurseurs cytokiniques tels que l'IL-1 β (Wang *et al.*, 1998) et l'induction de la pyroptose cellulaire. Toutefois, celle-ci présente des caractéristiques supplémentaires étant donné que sa dimérisation et donc son activation peut directement être induite par sa liaison avec les endotoxines bactériennes intracellulaires (Shi *et al.*, 2014).

c) Le passage intracellulaire des lipopolysaccharides

La caspase 11 est donc une voie de détection des LPS indépendante de la détection membranaire par le complexe TLR4/MD-2. Toutefois, cette reconnaissance cytosolique des LPS implique forcément une entrée des endotoxines dans la cellule. Cependant, la plupart des bactéries à Gram négatif montrées comme étant capables d'activer la caspase 11 ne sont pas des bactéries cytosoliques (Rathinam *et al.*, 2012; Kailasan Vanaja *et al.*, 2014). Ainsi, si elles ne pénètrent pas dans la cellule, par quels moyens les LPS présents à leur surface peuvent-ils passer les membranes plasmiques ?

Très récemment, des chercheurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les vésicules présentes à la surface des bactéries seraient un moyen de transport des LPS dans le milieu intracellulaire. La Figure 8 présente une photo de ces vésicules appelées *outer membrane vesicles* (OMVs). Elles ne proviennent pas de la dégradation de la membrane bactérienne mais sont volontairement produites par le micro-organisme (Ellis & Kuehn, 2010) en condition de stress comme c'est le cas dans la circulation sanguine. De plus, ces vésicules sont connues pour être un moyen de communication entre les cellules bactériennes infectieuses et les cellules de

l'hôte infectées. Comme le schématise la Figure 9, les OMVs sont capables de délivrer les molécules de LPS directement dans le cytosol (Kesty *et al.*, 2004). Une diminution de la quantité d'OMVs par modification génétique des bactéries s'accompagne d'une activation moindre de la caspase 11 (Vanaja *et al.*, 2016).

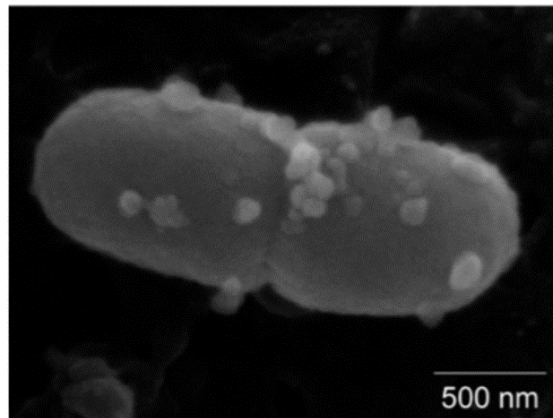


Figure 8

Observation microscopique des OMVs d'une bactérie E. coli entérotoxique

Images obtenues par microscopie électronique deux heures après l'inoculation intra-gastrique de la bactérie chez des souris (Ellis & Kuehn, 2010).

Abréviations : OMVs – *outer membrane vesicles* ; *E. coli* – *Escherichia coli*.

La LBP, largement décrite comme un transporteur des LPS dans la circulation sanguine, peut aussi contribuer au passage des LPS dans le cytoplasme (Figure 9). Des études ont mis en avant une capacité de la LBP à s'intercaler dans la bicouche phospholipidique des membranes plasmiques (Gutsmann *et al.*, 2001). *In vitro*, la fixation de la LBP aux lipides membranaires de macrophages humains est favorisée en présence de LPS et cela indépendamment de la présence du CD14 ou du complexe TLR4/MD-2. La LBP pourrait alors participer à l'activation de la réponse inflammatoire indépendante de TLR4 *via* l'activation des protéines de l'inflammasome. D'autant plus qu'une nette colocalisation cytosolique de la LBP et des LPS a été observée (Kopp *et al.*, 2016).

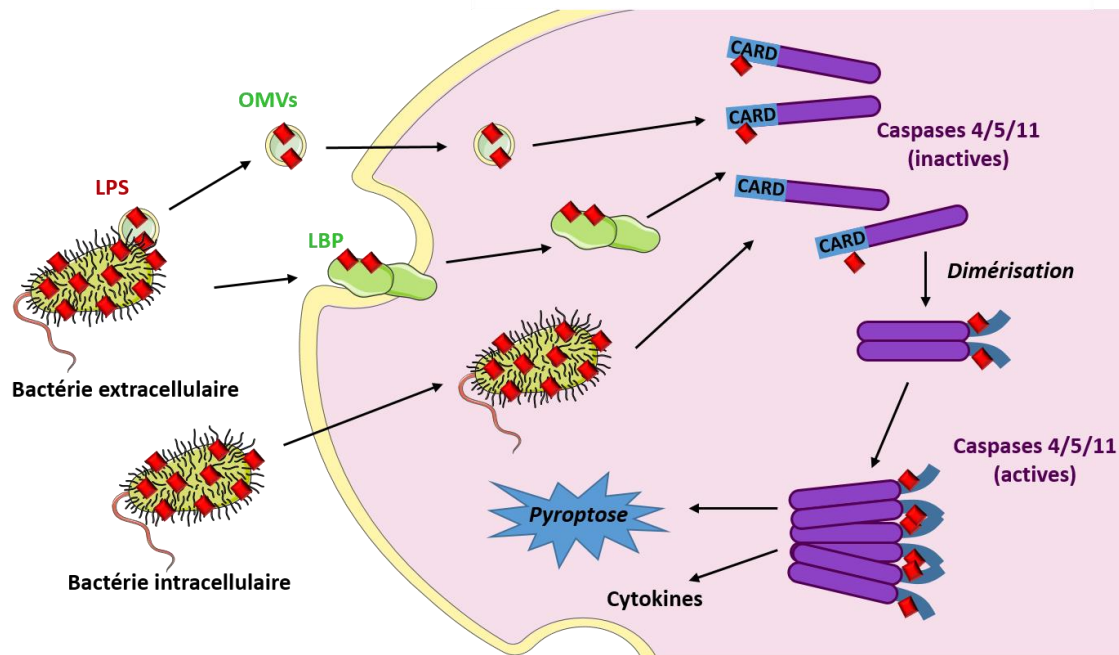


Figure 9

Activation de la voie des caspases par les LPS

S'il s'agit d'une bactérie cytosolique, les LPS peuvent entrer avec la bactérie dans le milieu intracellulaire. Sinon, ils emprunteraient des mécanismes faisant intervenir la LBP ou les OMVs bactériennes. Dans le cytoplasme les LPS seront reconnus par les domaines CARD des caspases 4/5/11 inactives entraînant ainsi leur activation. L'activation des caspases 4/5/11 conduit à la production de cytokines et à la mort cellulaire par pyroptose.

Abréviations : OMVs – *outer membrane vesicles* ; LPS – lipopolysaccharides ; LBP – *LPS binding protein*.

III. Les endotoxines, notions de tolérance et d'«amorçage»

Le système immunitaire est donc capable de détecter la présence de signaux dangereux pour l'hôte, tels que les LPS. L'activation des cellules de l'immunité engendre une réponse inflammatoire vigoureuse et vitale afin de combattre l'infection. Toutefois, ce processus doit absolument être finement régulé car une inflammation incontrôlée entraîne de sérieuses complications cliniques telles que les maladies auto-immunes, le sepsis, le choc septique, une défaillance généralisée des organes et à terme le décès. Parmi les moyens de régulation de la réponse inflammatoire, il y a bien sûr toutes les voies anti-inflammatoires déclenchées en parallèle des voies pro-inflammatoires mais il y a aussi le phénomène de tolérance aux endotoxines. Il faut toutefois rester prudent car la frontière entre la tolérance aux endotoxines et l'effet inverse d'« amorçage » de la réponse inflammatoire est minime.

1. La tolérance aux endotoxines

a) Notion de tolérance aux endotoxines

La notion de tolérance aux endotoxines a été rapportée pour la première fois par Paul Beeson en 1947 (Beeson & Roberts, 1947). Il décrit une diminution progressive de la fièvre induite par l'injection du vaccin typhoïde chez des lapins, au fur et à mesure des injections ; effet qui a tendance à disparaître avec une augmentation du temps d'attente entre les injections. Ce phénomène de tolérance aux endotoxines a également été observé chez des rats infusés de façon continue avec des LPS par voie intraveineuse. Ils montrent que dans les premières heures d'infusion (6 et 30 heures), les endotoxines provoquent une altération du métabolisme glucidique mais que ces effets délétères s'estompent au bout de 54 heures d'infusion (Lang & Spitzer, 1987). Chez l'Homme, une injection IV de LPS tous les jours pendant 5 jours entraîne une atténuation de leurs effets pro- et anti-inflammatoires (Draisma *et al.*, 2009). Finalement, l'installation de la tolérance aux endotoxines est assez répandue en cas de pathologies infectieuses et l'un des exemples les plus marquants est celui du sepsis (López-Collazo & del Fresno, 2013).

Le sepsis est une pathologie extrêmement complexe caractérisée par une inflammation puissante et non contrôlée en réponse à une infection bactérienne. Cette pathologie est qualifiée de biphasique : une phase initiale de sur-inflammation, le syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS, suivie d'une phase au cours de laquelle les cellules de l'immunité deviennent réfractaires à initier une réponse inflammatoire, le syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire ou CARS. Malheureusement, même si ce dernier a pour but de réguler le statut inflammatoire de l'organisme, il est aussi à l'origine de nombreux décès par non détection d'une nouvelle infection (Adib-Conquy & Cavaillon, 2009).

La tolérance aux endotoxines permet donc de canaliser la réponse inflammatoire et de restreindre les dommages physiologiques mais peut aussi finir par représenter un risque non négligeable. Il existe de nombreux modèles précliniques et cliniques à la fois *in vitro* et *in vivo* pour étudier les fondements de l'installation de cette tolérance aux endotoxines (Biswas & Lopez-Collazo, 2009). Cependant, à l'heure actuelle les mécanismes moléculaires sont encore mal connus.

b) Les acteurs à l'origine de l'installation de la tolérance aux endotoxines

Plusieurs acteurs de la réponse inflammatoire participent à l'initiation de cette tolérance aux endotoxines. C'est le cas par exemple du récepteur TLR4. En effet, la stimulation de macrophages murins péritonéaux avec des LPS entraîne une diminution de l'expression du récepteur TLR4 en surface de ces cellules. Il en résulte une production cytokinique moindre lors d'une seconde exposition aux LPS (Nomura *et al.*, 2000). Toutefois, un tel phénomène n'a pas été observé sur des monocytes humains traités avec la même dose de LPS (Medvedev *et al.*, 2002). La protéine MyD88 est elle aussi impliquée. Elle présente deux isoformes de tailles différentes. La forme petite ou *small MyD88* (MyD88s) est capable de se fixer sur le récepteur TLR4 et de recruter les protéines IRAK mais est incapable d'initier les cascades de signalisation. *In vitro*, l'administration de LPS induit MyD88s dans des cellules immunitaires humaines en culture. Toutefois, *in vivo*, les niveaux de MyD88s dans des monocytes circulants de donneurs sains ne sont que très peu induits par un traitement avec des LPS (Janssens *et al.*, 2002; van 't Veer *et al.*, 2007).

Parmi les protéines de la signalisation intracellulaire, les protéines IRAK participent à l'initiation du phénomène de tolérance. Leur perte d'activation liée à la surexpression de

MyD88s dans les cellules tolérantes est de surcroît favorisée par la production de la protéine IRAK-M, qui empêche les cascades de phosphorylation. IRAK-M est uniquement exprimée dans les monocytes/macrophages, sa production est induite par la cytokine pro-inflammatoire TNF α et est positivement corrélée avec la durée de la phase de tolérance aux endotoxines *in vivo* (Kobayashi *et al.*, 2002; van 't Veer *et al.*, 2007). Les cellules immunitaires « tolérantes » présentent une surexpression de la protéine p50 NF κ B et donc une augmentation de l'homodimère p50/p50 inactif, au détriment de l'hétérodimère p50/p65 actif (Ziegler-Heitbrock, 2001). La protéine *SH-2 containing inositol phosphatase* (SHIP) contribue aussi à l'installation de la tolérance aux endotoxines. Il s'agit d'un inhibiteur de la voie de signalisation dépendante de NF κ B. Dans un modèle murin, l'expression de SHIP est induite par l'activation intracellulaire de MyD88 suite à un traitement avec des LPS. De plus, l'induction de son expression intracellulaire est uniquement temporaire. Elle n'est quasiment plus perceptible trois heures après le traitement de monocytes humains avec des LPS. Les niveaux de production de SHIP et la durée de la tolérance aux LPS sont même positivement corrélés chez la souris (Sly *et al.*, 2004; van 't Veer *et al.*, 2007).

Il a été montré que certains micro-ARN ou miR participent à l'installation et à la maintenance de la tolérance aux endotoxines (Quinn *et al.*, 2012). Ces courts acides ribonucléiques (ARN) sont capables de s'apparier à l'ARN messager (ARNm) d'un gène cible entraînant ainsi une répression traductionnelle ou encore la dégradation de cet ARN messager. Ce sont donc des régulateurs post-transcriptionnels. Seul l'exemple de miR-146a sera ici développé. miR-146a est produit par les cellules de l'immunité en réponse à une stimulation par des LPS et a une visée plutôt anti-inflammatoire en inhibant les voies pro-inflammatoires dépendantes d'IRAK et de TRAF6 (Taganov *et al.*, 2006). La restimulation de cellules prétraitées avec des molécules de LPS s'accompagne d'une production encore plus importante de miR-146a en réponse aux LPS. La transfection de monocytes humains en culture avec miR-146a mime les effets d'un état de tolérance et inversement, des cellules déficientes en miR-146a ont une moindre réponse tolérogène à une stimulation par des LPS (Nahid *et al.*, 2009). Il y a bien sûr d'autres données sur ce miR et sur les autres miR pouvant être impliqués dans ce phénomène de tolérance aux LPS, la revue de Quinn et ses collaborateurs en 2012 permet d'en avoir un bon aperçu (Quinn *et al.*, 2012).

2. L'amorçage initié par les endotoxines

Un premier contact avec des LPS peut amoindrir les effets délétères d'un deuxième contact impliquant ainsi une notion de tolérance. Cependant, dans certains cas, et notamment quand la première dose de LPS est très faible, il est possible d'observer l'effet inverse : c'est-à-dire que le premier contact ne va pas atténuer les effets du deuxième mais va au contraire les potentialiser. C'est la notion d'amorçage. Il n'y a eu que très peu d'études sur cet amorçage des endotoxines aussi appelé *Schwartzman-like reaction* (Thomas & Good, 1952). Ainsi, à l'heure actuelle il est encore très difficile de comprendre l'origine de ce phénomène et surtout de comprendre pourquoi une très faible dose de LPS aboutit à cet effet potentialisateur et non à l'effet tolérogène décrit plus haut.

Ce phénomène d'amorçage est notamment mis en évidence dans des modèles murins. Une première injection d'une faible dose de LPS conduit à une très forte production de cytokines pro-inflammatoires lors d'une seconde administration de LPS allant même jusqu'à augmenter significativement la mortalité des animaux (Heremans *et al.*, 1990). La protéine IRAK-1 serait impliquée dans ce phénomène d'amorçage. En effet, en condition de faible endotoxémie, cette protéine n'activerait pas la voie dépendante de NFκB mais une autre cascade de signalisation, celle dépendante de *CCAAT/enhancer-binding protein δ* (C/EBPδ) (Maitra *et al.*, 2011). La principale différence entre les deux voies réside dans le fait que NFκB est capable de stimuler à la fois l'expression de gènes pro- et anti-inflammatoires alors que C/EBPδ est uniquement pro-inflammatoire. Ce phénomène d'amorçage paraît aussi être dépendant des niveaux d'IL-10. En effet, la dose de LPS à injecter pour déclencher ce processus d'amorçage est cent fois plus faible chez des souris déficientes en IL-10. De plus, l'injection d'IL-10 chez des souris déficientes en IL-10 et chez des souris sauvages s'accompagne d'une résistance à l'amorçage (Berg *et al.*, 1995).

Tout cela montre donc que l'ampleur de la réponse inflammatoire engendrée par une entrée de LPS au niveau systémique est pleinement dépendante du statut inflammatoire déjà présent.

IV. Inactivation et élimination des lipopolysaccharides circulants

Fort heureusement pour l'organisme, en plus des mécanismes déclencheurs d'inflammation dont il a été question dans la partie précédente, il existe aussi des voies d'inactivation et d'élimination des LPS. La neutralisation de l'activité pro-inflammatoire des LPS se fait principalement *via* leur transfert et fixation sur les lipoprotéines circulantes. Cependant, les LPS sont des molécules amphiphiles avec une partie hydrophobe non négligeable. Ainsi, comme c'est le cas pour l'activation des voies pro-inflammatoires (TLR4/MD-2 et caspases), l'organisme a besoin de navettes permettant le transport des LPS depuis la circulation sanguine vers la surface des différentes lipoprotéines. C'est là qu'interviennent (ou ré-interviennent) les protéines membres de la famille *lipid transfer / LBP* (LT/LBP). Après avoir été inactivées, les endotoxines bactériennes sont ensuite évacuées et quittent le milieu intérieur au niveau du foie par voie biliaire.

1. Neutralisation des LPS circulants par les lipoprotéines

a) Les lipoprotéines

La Figure 10 représente une lipoprotéine. Ce sont des complexes macromoléculaires qui comme leur nom l'indique ont une structure hétérogène constituée à la fois de composés lipidiques et protéiques. Retrouvées dans la circulation sanguine, le but premier des lipoprotéines est de transporter les composés lipidiques et hydrophobes à travers la circulation sanguine hydrophile. Qu'il s'agisse de composés lipidiques alimentaires provenant de l'absorption intestinale, ceux synthétisés par le foie ou encore ceux libérés par le tissu adipeux, tous ont besoin de navettes sanguines protéiques leur permettant d'être véhiculés entre les différents organes. Parmi ces navettes, les lipoprotéines occupent une place prépondérante et dans ce contexte, les protéines constitutives, aussi appelées apolipoprotéines, ont le rôle indispensable de tensioactifs afin de créer l'émulsion nécessaire à la stabilité de la lipoprotéine.

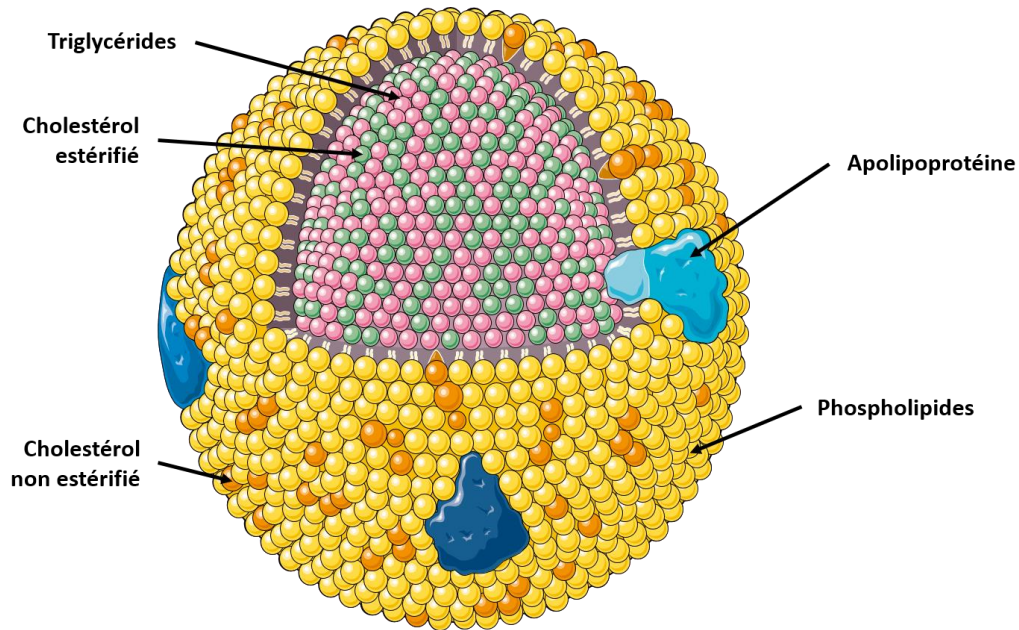


Figure 10

Représentation schématique d'une lipoprotéine circulaire

Toutes les lipoprotéines ont une structure commune, elles sont toutes composées d'un noyau de lipides hydrophobes (triglycérides et esters de cholestérol) entouré d'une coque de protéines (les apolipoprotéines) et de lipides polaires (phospholipides et cholestérol libre). Source : <http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>.

Comme le décrit le Tableau 1, il existe cinq grandes catégories de lipoprotéines qui varient selon leur taille, leur composition en lipides, leurs apolipoprotéines majoritaires, leurs fonctions et leur densité. C'est selon ce dernier critère, la densité, que les différentes lipoprotéines sont généralement classées. Il y a, par ordre croissant, les chylomicrons (CM), les *very low density lipoproteins* (VLDL), les *intermediate density lipoproteins* (IDL), les *low density lipoproteins* (LDL) et les *high density lipoproteins* (HDL). Toutes ces lipoprotéines ont une structure commune, elles sont toutes composées d'un noyau de lipides hydrophobes (triglycérides et esters de cholestérol) entouré d'une coque de protéines et de lipides polaires (phospholipides et cholestérol libre). En plus de participer activement à la stabilité de ce complexe macromoléculaire, les apolipoprotéines contribuent également à son métabolisme. En effet, elles présentent des structures spécifiques pouvant être reconnues par les récepteurs des cellules cibles et facilitent ainsi l'interaction lipoprotéine / cellule.

Tableau 1**Récapitulatif des principales caractéristiques des lipoprotéines**(Thaxton *et al.*, 2016)

Abréviations : VLDL – *very low density lipoproteins* ; IDL – *intermediate density lipoproteins* ; LDL – *low density lipoproteins* ; HDL – *high density lipoproteins*.

Lipoprotéine	Taille (nm)	Apolipoprotéines majeures	Densité	Fonction principale
Chylomicrons	80 - 1200	B-48, A-I, A-II, C, E	< 0,95	Transport des lipides alimentaires
VLDL	35 - 80	B-100, C, E	0,95 – 1,006	Transport des lipides depuis le foie
IDL	27 - 30	B-100, C, E	1,006 – 1,019	Transport des lipides depuis le foie
LDL	22 - 27	B-100	1,019 – 1,063	Distribution des lipides dans les tissus périphériques
HDL	7 - 13	A-I, A-II, C, E	1,063 – 1,25	Récupération du cholestérol dans les tissus périphériques

b) Le métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines est illustré dans la Figure 11. Les CM sont les lipoprotéines les plus larges en taille. Elles sont produites par l'intestin à partir des lipides alimentaires. La formation entérocytaire des CM se fait selon un mécanisme complexe qui ne sera pas détaillé ici (Ramasamy, 2014). Ils transportent les triglycérides (TG) alimentaires depuis l'intestin jusqu'aux différents organes utilisateurs. Au niveau de ces organes, la lipoprotéine lipase (LPL) est l'enzyme responsable de l'hydrolyse des TG présents sur les lipoprotéines afin de permettre leur passage intracellulaire. Les remnants de CM (ce qui reste des CM après hydrolyse des TG constitutifs) ont une demi-vie courte dans la circulation sanguine, de l'ordre de quelques minutes, car ils sont rapidement éliminés au niveau du foie (Cooper, 1992).

Sécrétés par les hépatocytes, les VLDL sont synthétisés principalement à partir des acides gras libres (AGL) présents dans la circulation sanguine et des lipides endogènes issus de la lipogenèse *de novo* hépatique. De même que pour les CM, la production hépatique des VLDL nécessite de nombreuses étapes qui ne seront pas explicitées dans cette étude bibliographique (Ramasamy, 2014). Comme les CM, les VLDL distribuent aussi les TG qu'ils contiennent vers les tissus périphériques sous l'action de la LPL. Plus la proportion de lipides contenus dans une lipoprotéine est faible par rapport à la proportion de protéines, plus la densité de cette

lipoprotéine augmente. Ainsi, les VLDL deviennent des IDL, puis des LDL qui sont ensuite recaptés par le foie où ils sont à nouveau chargés en composés lipidiques.

Les HDL immatures sont formés au niveau des tissus périphériques, acquièrent leur maturité en fixant des composés lipidiques tels que le cholestérol, puis sont captés par le foie. Il s'agit du transport inverse du cholestérol. Au niveau hépatique, le cholestérol contenu dans les HDL est soit redistribué dans les LDL, soit éliminé. Ainsi, à l'inverse des LDL qui distribuent le cholestérol du foie vers les organes périphériques, les HDL ramènent le cholestérol depuis ces organes périphériques vers le foie.

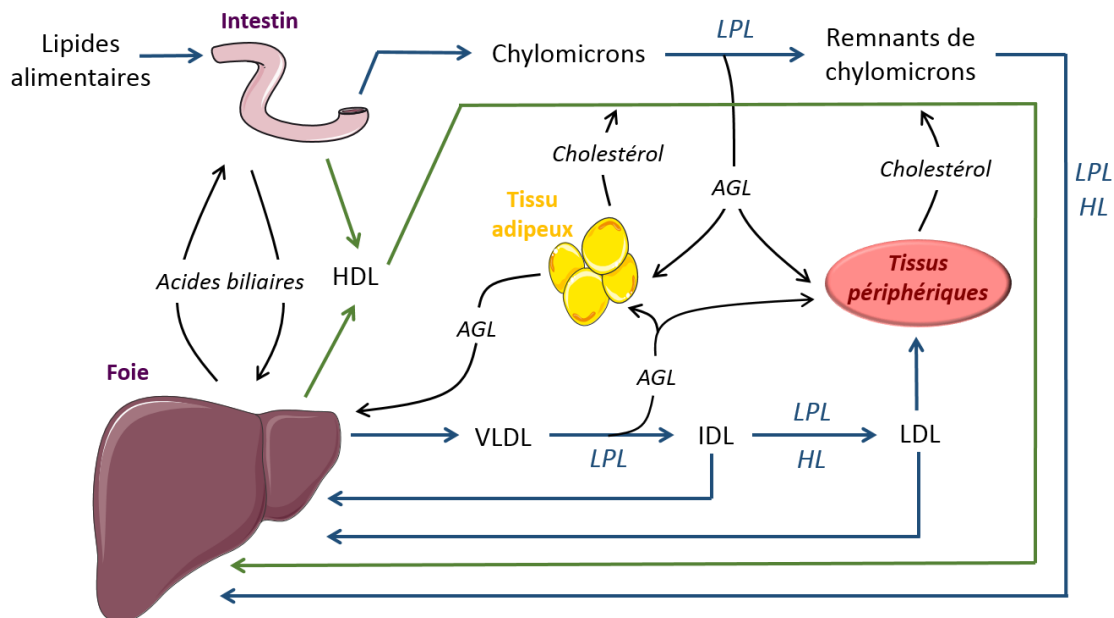


Figure 11

Vue d'ensemble du métabolisme des différentes lipoprotéines

Les chylomicrons produits par l'intestin distribuent les lipides alimentaires dans différents tissus, puis les remnants de chylomicrons sont captés par le foie. Les VLDL produits par le foie contiennent des composés lipidiques (dont le cholestérol alimentaire et synthétisé *de novo*) qu'ils distribuent dans les tissus périphériques, ils deviennent ainsi des IDL, puis des LDL qui repartent dans le foie. Les HDL sont produits dans les tissus, ils se chargent en cholestérol pour le ramener vers le foie. Le cholestérol sera ainsi soit réutilisé, soit éliminé par voie biliaire. C'est le transport inverse du cholestérol. Figure adaptée de : www.accessmedecine.com, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12^{ème} édition.

Abréviations : LPL – lipoprotéine lipase ; HL – lipase hépatique ; AGL – acides gras libres ; VLDL – very low density lipoproteins ; IDL – intermediate density lipoproteins ; LDL – low density lipoproteins ; HDL – high density lipoproteins.

c) L'inactivation des lipopolysaccharides par les lipoprotéines

Des études ont montré que chacune des classes de lipoprotéines est capable de se lier aux LPS et de les neutraliser (Harris *et al.*, 1990; Emancipator *et al.*, 1992). Toutefois, les LPS ne se lient pas à toutes les lipoprotéines avec la même affinité et ont une légère préférence pour les HDL. En effet, l'incubation de LPS avec du sang humain aboutit à une fixation d'environ 60% sur les HDL contre 25% pour les LDL et seulement 12% pour les VLDL (Levels *et al.*, 2001). Cette capacité d'inactivation des molécules de LPS par les lipoprotéines est aussi fonction du type de LPS en présence et notamment de la conformation du lipide A (Sprong *et al.*, 2004). En effet, la capacité d'inactivation des lipoprotéines se fait *via* des modifications structurales de la portion endotoxique des LPS, le lipide A (Brandenburg *et al.*, 2002).

Les LPS associés aux lipoprotéines sont des LPS neutralisés dont le pouvoir pro-inflammatoire est inactivé. En effet, comparés aux LPS libres, les LPS ainsi fixés se lient moins facilement à la surface des cellules de l'immunité (Cavaillon *et al.*, 1990) et leur clairance est augmentée (Sewnath *et al.*, 2000). Cela n'est pas sans conséquence d'un point de vue physiologique. En effet, chez des sujets en sepsis, les concentrations plasmatiques en cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF α sont inversement corrélées avec la concentration plasmatique en HDL (Chien *et al.*, 2005). De plus, les conséquences délétères d'une injection de LPS sont plus marquées chez des sujets avec un faible taux de HDL sanguins (Birjmohun *et al.*, 2007). Cette neutralisation des LPS par les lipoprotéines circulantes s'accompagne aussi d'un meilleur taux de survie chez des souris ayant reçu une injection de LPS (Harris *et al.*, 1990). Il a d'ailleurs été montré que les souris déficientes en récepteur aux LDL (LDL-R), connues pour avoir plus de LDL et IDL circulantes, sont protégées de l'effet létal d'une forte endotoxémie (Netea *et al.*, 1996). Le sepsis fait partie des complications pouvant survenir après une chirurgie cardiaque avec arrêt cardiorespiratoire. Un faible taux de cholestérol préopératoire apparaît comme étant un facteur de risque d'apparition de cette complication mortelle (Lagrost *et al.*, 2014). Ces études témoignent donc d'un lien avéré entre lipoprotéines circulantes et régulation de l'inflammation (Rauchhaus *et al.*, 2000) et remettent en question le rôle originel des lipoprotéines.

d) Prise en charge par les membres de la famille LT/LBP

Les LPS sont des molécules amphiphiles ayant besoin de navettes pour pouvoir se fixer sur les lipoprotéines. Dans la circulation sanguine, ce sont principalement les protéines membres de la famille LT/LBP qui sont en charge d'un tel transfert. Cette famille est constituée de la *bactericidal permeability increasing protein* (BPI), de la LBP, de la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) et de la *plasma phospholipid transfer protein* (PLTP). Les principaux points communs dans cette famille : i) une homologie de structure avec une représentation tridimensionnelle de la protéine en forme de boomerang créant une sorte de poche pour la fixation des lipides (Beamer *et al.*, 1997), ii) une capacité de fixation et de transfert de composés lipidiques ou lipophiles et iii) une implication dans le métabolisme des LPS. Le Tableau 2 ci-dessous résume les fonctions de chacune de ces protéines vis-à-vis des LPS circulants. Parmi ces protéines, seules deux ont une capacité de transfert avérée des LPS sur les lipoprotéines, la LBP et la PLTP. Leur description sera donc davantage détaillée ci-après.

Tableau 2***Fonctions des protéines de la famille LT/LBP dans le métabolisme des LPS***

Tableau réalisé au sein de l'équipe LIPNESS (L. Lagrost) du centre de recherche INSERM UMR866.

Abréviations : LPS – lipopolysaccharides ; CD14 - Cluster de différenciation 14 ; TLR4 – Toll-like receptor 4 ; LBP – Lipopolysaccharide binding protein ; BPI – Bactericidal permeability increasing protein ; CETP – Cholesteryl ester transfer protein ; PLTP – Plasma phospholipid transfer protein.

	Liaison aux LPS	Désagrégation des LPS	Transfert des LPS au CD14 et activation de TLR4	Transfert des LPS aux lipoprotéines	Neutralisation des LPS
LBP	✓	✓	✓	✓	✗
BPI	✓	✗	✗	✗	✓
CETP	✗	✗	✗	✗	✗
PLTP	✓	✓	✗	✓	✓

La BPI est une protéine de 55 kDa majoritairement localisée à la surface des cellules de l'immunité et possédant une activité bactéricide. Elle se lie aux bactéries *via* leurs LPS membranaires, les déstabilise et augmente leur mortalité (Weiss *et al.*, 1984). Il a ainsi été montré que la BPI avait des effets protecteurs vis-à-vis de l'endotoxémie (Alexander *et al.*, 2004). La CETP est une protéine plasmatique d'environ 53 kDa fortement impliquée dans les échanges lipidiques entre les différentes fractions lipoprotéiques (Lagrost, 1994). De tous les membres de la famille LT/LBP, la CETP semble être la protéine la moins impliquée dans le métabolisme des LPS. Si aucune action directe sur les endotoxines n'est établie à l'heure actuelle, elle semble en revanche impacter leur métabolisme de façon détournée, en diminuant la durée de vie des HDL circulants ou en diminuant l'expression de TLR4 (Collet *et al.*, 1999; Venancio *et al.*, 2016). De plus, les souris humanisées pour la CETP sont plus résistantes à une injection de LPS (Cazita *et al.*, 2008). La LBP a déjà été décrite dans la partie précédente pour sa capacité à présenter les LPS au CD14 et donc pour son activité pro-inflammatoire. Toutefois, la LBP peut également exercer une fonction anti-inflammatoire en favorisant le transfert des LPS circulants sur les lipoprotéines. Gutschmann et ses collaborateurs ont montré en 2001 que la concentration plasmatique en LBP était le critère déterminant de son type d'activité ; à faible concentration, elle est plutôt pro-inflammatoire et inversement (Gutschmann *et al.*, 2001). Ainsi, l'induction de sa production hépatique en cas d'infection est associée à une prépondérance de son activité anti-inflammatoire (Schumann *et al.*, 1996).

La PLTP est une protéine ubiquitaire de 81 kDa initialement décrite pour sa capacité à transférer les phospholipides depuis les lipoprotéines riches en TG (CM, VLDL, IDL et LDL) vers les HDL. Elle modifie ainsi la composition, la structure et de ce fait les propriétés biologiques des HDL (Lagrost *et al.*, 1998). Elle a été largement étudiée dans un contexte d'athérosclérose et de maladies cardio-vasculaires. Toutefois, en plus de transférer des phospholipides, la PLTP sert également de navette à toute une panoplie de composés amphipathiques tels que les diacylglycérol (DAG) (Rao *et al.*, 1997), la vitamine E (Desrumaux *et al.*, 1999) ou encore les LPS. *In vitro* la PLTP et la LBP sont toutes deux capables de transférer les LPS vers les lipoprotéines, toutefois la PLTP n'est pas capable de présenter les LPS au CD14 et n'a donc pas de versant pro-inflammatoire (Hailman *et al.*, 1996; Vesny *et al.*, 2000). De plus, des souris déficientes en PLTP (PLTP *knockout* ou PLTP KO) sont davantage sensibles à une injection de LPS : moindre association des LPS aux HDL, clairance ralentie des

LPS, production accrue de cytokines pro-inflammatoires et augmentation significative de la mortalité (Gautier *et al.*, 2008). Les souris déficientes en PLTP présentent donc une neutralisation moindre des endotoxines bactériennes au niveau circulant.

2. Les voies de détoxification des endotoxines bactériennes

a) Transport inverse des lipopolysaccharides, rôle de la voie hépato-biliaire

Des études assez anciennes montrent que l'inactivation plasmatique des LPS est réversible (Rudbach *et al.*, 1966; Rudbach & Johnson, 1966). Il paraît donc indispensable d'éliminer de la circulation sanguine les LPS même inactivés. La clairance des LPS de l'organisme présente de nombreuses similitudes avec celle du cholestérol : implication de la PLTP et de la CETP, prise en charge par les HDL circulants, élimination par le foie... Ainsi, par analogie avec le transport inverse du cholestérol, les voies d'élimination des LPS peuvent être nommées « transport inverse des LPS » (Gautier & Lagrost, 2011). Les lipoprotéines se chargent en LPS et les transportent ensuite vers le foie (Mathison & Ulevitch, 1979) où ils subissent des modifications de structure avant d'être éliminés par voie biliaire. Chez les rats, des LPS injectés par voie intraveineuse atteignent rapidement le foie : d'abord les cellules de Kupffer (les macrophages résidents du foie), puis les hépatocytes et enfin la bile (Freudenberg *et al.*, 1982; Mimura *et al.*, 1995). Il s'agit donc d'une élimination hépato-biliaire. A l'heure actuelle, les mécanismes permettant le retour des complexes lipoprotéines-LPS ainsi que le devenir exact des LPS dans les cellules hépatiques sont encore mal connus et il reste beaucoup de questions auxquelles il faut encore trouver des réponses.

La clairance des complexes CM-LPS fait intervenir le LDL-R et le *LDL-R related protein* (LRP). L'augmentation de l'expression du LDL-R entraîne une augmentation de LPS radio-marqués dans les endosomes hépatiques alors que l'augmentation de l'expression de LRP induit une plus forte excrétion biliaire des LPS radio-marquées (Harris *et al.*, 2002). Lorsque les LPS arrivent dans les cellules de Kupffer, leurs lipides A sont déacylés par l'*acyloxyacyl hydrolase* (AOAH), ce qui réduit leur pouvoir endotoxique (Shao *et al.*, 2007). Les LPS déacylés sont ensuite excrétés *via* la bile dans la lumière intestinale (Maitra *et al.*, 1981). *In vitro*, les acides biliaires exercent une forte action détergente sur les LPS. Ils modifient leur

conformation structurale de façon dose dépendante et suppriment ainsi la majeure partie de leur capacité pro-inflammatoire (Stéphane Mandard, communication personnelle).

b) Autres voies de neutralisation/détoxification des lipopolysaccharides circulants

Dans l'organisme, la voie de détoxification majoritaire des LPS circulants est celle qualifiée de « transport inverse des LPS », cependant il existe également d'autres voies moins prépondérantes. L'enzyme AOAH n'est pas seulement exprimée dans les cellules de Kupffer hépatiques. Elle est aussi retrouvée au niveau plasmatique dans les cellules de l'immunité et peut ainsi réduire le pouvoir endotoxique des LPS présents dans la circulation (Lu & Munford, 2011). Ce processus de déacylation ne semble pas être dépendant du récepteur TLR4 *in vitro* (Munford & Hall, 1985) mais cela est plus controversé *in vivo* étant donné que la déacylation des LPS circulants est plus lente chez des souris déficientes en TLR4 (Lu & Munford, 2011). Une autre enzyme, la phosphatase alcaline intestinale (IAP), a été décrite comme jouant un rôle prépondérant dans la neutralisation des LPS (Bates *et al.*, 2007). D'un point de vue mécanistique, elle inactive les LPS en déphosphorylant le lipide A (Poelstra *et al.*, 1997). D'autres protéines telles que la *serum amyloid A*, les collectines ou la BPI sont aussi des protéines capables de se fixer aux LPS et de les neutraliser (Chaby, 2004).

Chapitre 2

Le glucagon-like peptide 1

I. Le GLP-1, ses origines et sa provenance

1. Il était une fois une incrétine

Dans le monde des découvertes scientifiques médicales, c'est bien souvent la réalisation d'un constat biologique qui suscite l'intérêt général et déclenche toute une panoplie de recherches visant à expliciter ce constat. La découverte du GLP-1 n'a pas dérogré à cette règle. En effet, le GLP-1 est une hormone principalement produite par l'intestin dont les effets biologiques ont été décrits avant même de savoir que le GLP-1 en était à l'origine ; il s'agit de l'effet « incrétine ». Avant de rentrer dans le vif du sujet, qu'en est-il du contexte historique ?

a) Mais qu'est-ce qu'une hormone ?

La découverte de la première hormone et par là même l'introduction du terme « hormone » remonte au tout début du 20^{ème} siècle avec les recherches des physiologistes anglais W.M. Bayliss (1860-1924) et E.H. Starling (1866-1927) mettant en évidence la « sécrétine » (Bayliss & Starling, 1902). Ils montrent que l'infusion de composés acides dans une anse jéjunale isolée et dénervée d'un chien anesthésié aboutit à des sécrétions exocrines par le pancréas préalablement dénervé. Ces deux organes n'étant reliés au reste de l'organisme que par les vaisseaux sanguins, ils en déduisent l'existence d'un phénomène chimique « *Then it must be a chemical reflex* », Starling, 1902. Ce composé chimique en provenance de l'intestin est capable d'agir sur le pancréas *via* la circulation sanguine. C'est ainsi que le terme d'« hormone » sera pour la première fois introduit en 1905 par E.H. Starling. Provenant du grec « *ὁρμῶν* » et signifiant « mettre en mouvement, diriger, exciter », les hormones sont premièrement définies comme des messagers chimiques devant être transportés par le biais de la circulation sanguine depuis l'organe où ils sont produits jusqu'à l'organe qu'ils affectent (Hirst, 2004).

b) De la découverte des hormones à celle des incrétones

Inspirés par cette découverte, le biochimiste anglais B. Moore (1867-1922) et ses collaborateurs préparent, à partir d'intestins de cochons, ce qu'ils appellent « l'extrait de

membrane duodénale ». Ils constatent que l'administration par voie orale de cette mixture induit une diminution de la glucosurie chez trois patients diabétiques. Ils font ainsi l'hypothèse que, comme le pancréas exocrine, le pancréas endocrine peut possiblement lui aussi être régulé par une hormone intestinale (Moore, 1906). Cette étude préliminaire a été confirmée en 1929 par Zunz et La Barre. Ces derniers relient la veine pancréatique d'un chien « donneur » à la veine jugulaire d'un chien « receveur ». Ils injectent « l'extrait intestinal » au chien « donneur » et observent une forte diminution de la glycémie du chien « receveur ». Celui-ci ne recevant que le contenu de la veine pancréatique du chien « donneur », ils en déduisent une action de « l'extrait intestinal » sur le pancréas endocrine. Une année plus tard, en 1930, La Barre et Still affirment avoir réussi à isoler un composé responsable de la diminution de la glycémie *via* une action sur le pancréas endocrine et font l'hypothèse que cette action consiste en une augmentation de la sécrétion d'insuline. C'est ainsi que La Barre introduit pour la première fois le nom d'« incrétine » en 1932 pour « *IN*testine *seCRET*ion *INS*ulin ». Selon lui, l'incrétine serait donc le composé de « l'extrait intestinal » capable d'induire une diminution de la glycémie sans agir sur le pancréas exocrine (Creutzfeldt, 2005).

c) L'effet incrétine

Les recherches sur les incrétones se sont arrêtées pendant plus de 20 ans du fait du contexte de guerre et d'une remise en question scientifique quant à l'existence de ces molécules. Les progrès en biochimie des peptides des années 1960 (techniques de purification et dosages par radio-immunologie) ont ravivé l'engouement pour les incrétones. La première découverte qui en a découlé a été faite presque simultanément par deux équipes de recherche et portera le nom d'« effet incrétine » : une dose de glucose administrée par voie orale stimule davantage la sécrétion d'insuline que la même dose de glucose administrée par voie intraveineuse (Mcintyre *et al.*, 1964; Elrick *et al.*, 1964). Certains ont même estimé que les facteurs gastro-intestinaux expliqueraient 50 % de l'insuline sécrétée après une administration orale de glucose (Perley & Kipnis, 1967). Une incrétine est définie selon trois critères : i) hormone produite par les cellules entéroendocrines (EEC) intestinales après l'ingestion de nutriments et en particulier de glucose, ii) hormone circulante stimulant la sécrétion d'insuline à une concentration physiologique et enfin, iii) hormone stimulant la sécrétion d'insuline uniquement en présence de glucose (Creutzfeldt, 2005).

d) Et les responsables sont...

L'effet incrétine a donc été prouvé, quantifié et précisément défini, toutefois il faudra attendre les années 1970 pour découvrir les hormones qui en sont responsables. La première hormone décrite comme répondant à tous les critères a été le *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP) (Dupre *et al.*, 1973). Même si le GIP était le candidat parfait, il s'est avéré que l'effet incrétine de « l'extrait intestinal » persistait même en l'absence de GIP, suggérant ainsi l'existence d'une deuxième incrétine (Ebert *et al.*, 1983). C'est ainsi que le GLP-1 et sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline ont vu le jour en 1985 (Schmidt *et al.*, 1985). Ce peptide intestinal a été identifié par clonage et caractérisation du gène codant pour le proglucagon. Son homologie de séquence et de régulation avec une autre hormone également codée par ce gène, le glucagon, lui a d'ailleurs valu le nom de *glucagon-like peptide*. Plusieurs équipes de recherche ont ensuite confirmé l'effet insulintropique de cette hormone (Drucker *et al.*, 1987; Kreyman *et al.*, 1987), marquant ainsi la naissance de nombreux traitements antidiabétiques novateurs basés sur le fonctionnement biologique de cette nouvelle incrétine, le GLP-1.

2. Un descendant du proglucagon

Le GLP-1 et le glucagon sont codés par le même gène *Gcg* dans les cellules L intestinales et les cellules α pancréatiques respectivement. Le gène *Gcg* donne naissance au même ARN messager dans les deux types cellulaires, il code pour un peptide appelé préproglucagon (Figure 12) qui, après retrait du peptide signal (PS) devient le proglucagon (160 acides aminés). Les modifications post-traductionnelles du proglucagon aboutissent à la production de différents peptides actifs comprenant notamment le glucagon et le GLP-1 (Mojsov *et al.*, 1986). A la même période, il est découvert que le gène *Gcg* et le GLP-1 sont retrouvés dans une moindre mesure au niveau de cellules cérébrales (Han *et al.*, 1986). Comme le montre la Figure 12, la maturation protéolytique du proglucagon dépend de l'enzyme majoritairement active dans l'organe considéré. Dans le cerveau et les cellules L intestinales, la prohormone convertase 1/3 (PC1/3) domine et conduit à la formation du GLP-1, du *glucagon-like peptide 2* (GLP-2), de l'oxyntomoduline, de l'*intervening peptide 2* (IP2) et de la glicentine. Dans les cellules α pancréatiques, l'activité protéolytique de la PC2 domine et donne naissance au glucagon, au *glicentin-related pancreatic polypeptide* (GRPP), à l'*intervening peptide 1*

(IP1) et au *major proglucagon fragment* (MPGF). Dans certaines conditions, le fragment MPGF pancréatique peut être clivé et aboutir à une production pancréatique de GLP-1. La régulation transcriptionnelle du gène *Gcg* dépend aussi de l'organe considéré (Sandoval & D'Alessio, 2015).

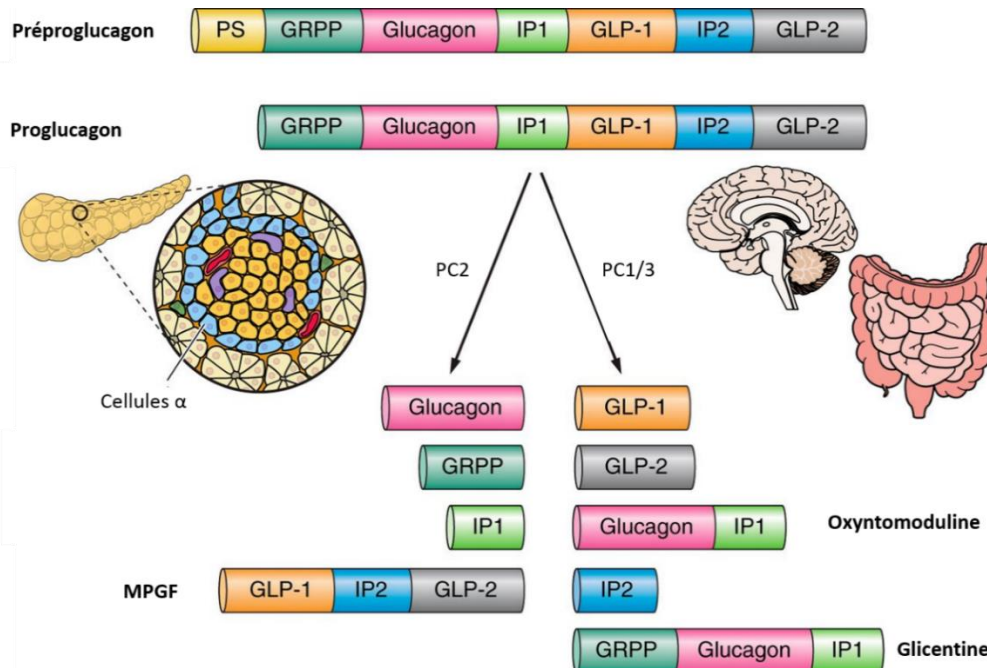


Figure 12

Modifications post-traductionnelles du proglucagon

Le gène préproglucagon code pour le peptide du même nom hydrolysé en proglucagon, un peptide de 160 acides aminés. La maturation protéolytique du proglucagon est différente selon les organes et l'enzyme protéolytique dominante. Dans les cellules α pancréatiques, PC2 donne naissance au glucagon, au GRPP, à l'IP1 et au MPGF. Dans les cellules L intestinales et dans les neurones du système nerveux central, l'activité de PC1/3 domine, elle clive le proglucagon en GLP-1, GLP-2, oxyntomoduline, glicentine et IP2 (Sandoval & D'Alessio, 2015).

Abréviations : PC2 – *prohormone convertase 2* ; GRPP – *glicentin-related pancreatic polypeptide* ; IP – *intervening peptide* ; MPGF – *major proglucagon fragment* ; PC1/3 – *prohormone convertase 1/3* ; GLP – *glucagon-like peptide*.

3. Lieu de production principal : les cellules L entéroendocrines

Le GLP-1 est une hormone majoritairement produite et sécrétée par l'intestin mais étant également retrouvée dans les cellules α pancréatiques et dans le cerveau. Ces travaux de thèse ne portant pas sur l'axe cérébral, la production de GLP-1 dans le cerveau ne sera pas détaillée ci-dessous.

a) Les cellules entéroendocrines

L'intestin est considéré comme l'organe endocrine le plus important de l'organisme du fait de la grande quantité et diversité d'hormones qu'il produit. Les cellules productrices, les EEC, sont dispersées au sein de l'épithélium intestinal et ne représentent que 1% de la population cellulaire de cet épithélium. Il en existe plusieurs sous-types différents nommés et classés en fonction de leur morphologie et des hormones synthétisées (Sjölund *et al.*, 1983). Toutes ces cellules dérivent des mêmes cellules souches intestinales et se différencient ensuite (Schonhoff *et al.*, 2004). Toutefois, il semblerait que les frontières entre les différents sous-types ne soient pas aussi bien délimitées que cela l'a été initialement présumé. En effet, une étude de 2003 réalisée sur des intestins de rats, de porcs et d'humains, démontre par immunohistochimie que le GLP-1 est cellulièrement colocalisé dans 92% des cas avec une autre hormone gastro-intestinale, soit le GIP, soit le peptide tyrosine-tyrosine (PYY). Dans l'intestin grêle, 55 à 75% des cellules marquées présentent le double marquage GIP / GLP-1 (Mortensen *et al.*, 2003). Une étude plus récente met en avant un fort chevauchement phénotypique des EEC présentes dans la partie proximale de l'intestin. La plupart des cellules L de cette zone contiennent une autre hormone en plus du GLP-1 : cholécystokinine, GIP ou PYY (Habib *et al.*, 2012).

b) Les cellules entéroendocrines productrices de GLP-1 : les cellules L

Les cellules L entéroendocrines sont directement concernées par ces travaux de thèse dans la mesure où elles sont à l'origine de la production intestinale du GLP-1. Elles sont disséminées selon un gradient ascendant le long de l'intestin et sont donc principalement présentes dans la partie distale (Eissele *et al.*, 1992). Le nom de cellules « L » n'est pas dû à leur forme qui pourrait être assimilée à un « L » mais à la taille de leurs vésicules de sécrétion : « large ». Localisées au sein de l'épithélium intestinal, la morphologie de ces cellules varie en fonction de leur localisation. Elles présentent d'une manière générale une forme de flasque (triangulaire) sauf dans le côlon où leur forme devient un peu plus sigmoïdale. Elles disposent d'un long pseudopode cytoplasmique au niveau basal qui s'insère en dessous des cellules épithéliales avoisinantes, comme pour directement détecter les nutriments absorbés. Au niveau apical, le contact avec la lumière intestinale est faible mais elles disposent de villosités leur permettant de détecter le contenu de la lumière intestinale (Bohórquez *et al.*, 2011).

4. Production de GLP-1 par les cellules α pancréatiques

Dans les cellules α pancréatiques, c'est l'enzyme PC2 qui prend le relais de la PC1/3 intestinale pour cliver le proglucagon et aboutir à la formation du glucagon. Il est ainsi clairement établi que le clivage du proglucagon pancréatique n'engendre pas la formation de l'incrétine GLP-1. Toutefois, la protéase PC1/3 est exprimée dans les cellules α pancréatiques. Même si son expression est considérablement plus faible que celle de PC2, cela laisse présumer une possible production de GLP-1. De plus, une sécrétion de ce dernier par des cellules α pancréatiques en culture a déjà été observée en réponse à une stimulation avec du glucose (Whalley *et al.*, 2011). Ces travaux *in vitro* sur des lignées de cellules immortalisées ont été confirmés par l'utilisation d'îlots de Langerhans isolés à la fois humains et murins (Hansen *et al.*, 2011a; Marchetti *et al.*, 2012).

L'expression de PC1/3 dans les cellules α serait stimulée lors d'un stress ou d'un besoin de régénération des cellules β productrices d'insuline (Kilimnik *et al.*, 2010; Whalley *et al.*, 2011). En effet, le GLP-1 produit dans les cellules α pancréatiques est capable d'exercer un effet insulinothrompique paracrine (Marchetti *et al.*, 2012), de stimuler la prolifération et la régénération des cellules β (Kilimnik *et al.*, 2010) ainsi que de promouvoir leur survie en cas de dommages et stress inflammatoire par exemple (Huang *et al.*, 2015). Cette augmentation locale de GLP-1 dans les cellules α viendrait donc promouvoir la fonctionnalité des cellules β lorsque cela s'avère nécessaire ; une sorte de système adaptatif de protection en réponse à des conditions environnementales difficiles pour les cellules (Fava *et al.*, 2016).

II. La sécrétion du GLP-1, un véritable casse-tête

Etudier les voies de sécrétion du GLP-1, en connaître les agents sécrétagogues, découvrir les mécanismes moléculaires qui en sont à l'origine... Ce sont tous d'intéressants challenges à relever, d'une part du point de vue de la curiosité scientifique mais surtout d'un point de vue clinique et thérapeutique. En tant qu'incrétine, le GLP-1 dispose de propriétés insulinothrompiques et suscite un intérêt majeur dans le domaine de la diabétologie. Les cellules L entéroendocrines ne représentent qu'un faible pourcentage de la masse cellulaire de l'épithélium intestinal et sont donc relativement difficiles à étudier spécifiquement, que ce soit *in vivo* comme *ex vivo*. Ainsi, des modèles d'étude *in vitro* ont été développés ces dernières années afin d'explorer le fonctionnement de ces cellules L intestinales. Ces modèles ont certes permis de grandes avancées mais il reste encore du chemin à faire avant que le fonctionnement des cellules L ne soit plus un secret pour la communauté scientifique.

1. Les modèles d'étude cellulaires

a) Cultures intestinales de rat fœtal (*fetal rat intestinal culture*)

Le premier modèle d'étude *in vitro* a été développé en 1987, soit à peine deux ans après la découverte du GLP-1 : il s'agit du modèle appelé *Fetal Rat Intestinal Culture* (FRIC) (Brubaker & Vranic, 1987). Cette technique consiste à prélever le tissu intestinal de rat fœtal et à le mettre en culture après avoir réalisé une dispersion des cellules par digestion enzymatique. Ce système est capable de faire sécréter du GLP-1 par les EEC présentes (Jackson Huang & Brubaker, 1995). Même si ce modèle a permis certaines avancées, il n'en reste pas moins non spécifique des cellules L.

b) Lignées cellulaires intestinales murines : STC-1 et GLUTag

Par la suite ont été développées des lignées de cellules immortalisées exprimant le gène *Gcg* et capables de synthétiser et sécréter du GLP-1. La lignée appelée *secretin tumor cell 1* (STC-1) a été la première à voir le jour en 1990 (Rindi *et al.*, 1990). Elle provient de tumeurs

entéroendocrines duodénales développées chez des souris doubles transgéniques. Celles-ci sont porteuses d'un promoteur à l'insuline de rat relié aux versions longues et courtes de l'antigène T du *Simian virus 40* (SV40). Cette lignée possède de nombreuses caractéristiques similaires à des EEC non différenciées. Elles sont capables de synthétiser et sécréter toute une panoplie d'hormones gastro-intestinales telles que la cholécystokinine (Mangel *et al.*, 1994) ou le GLP-1 (Hirasawa *et al.*, 2005).

La deuxième lignée d'EEC immortalisées est apparue à peine quatre ans après la précédente, en 1994 (Drucker *et al.*, 1994) : les cellules GLUTag. Cette lignée a été isolée de tumeurs d'EEC développées chez des souris transgéniques ayant reçu l'antigène T du virus SV40 au niveau du gène codant pour le proglucagon (Lee *et al.*, 1992). Les cellules GLUTag sont relativement différenciées, expriment fortement le gène *Gcg* et sont capables de sécréter des peptides dérivés du proglucagon tels que le GLP-1. Ainsi, ces cellules ont largement contribué à l'état actuel des connaissances sur la régulation transcriptionnelle du gène *Gcg*, les maturations protéolytiques du proglucagon ou encore sur les agents sécrétagogues du GLP-1 (Drucker *et al.*, 1994; Brubaker *et al.*, 1998; Dhanvantari *et al.*, 2001).

c) Cultures primaires de cellules L murines fluorescentes

Reimann et ses collègues ont généré des cellules L fluorescentes à partir de souris transgéniques : les cellules exprimant le gène *Gcg* apparaissent marquées par une sonde protéique fluorescente jaune appelée *Venus* (Reimann *et al.*, 2008). La cytométrie en flux permet de trier et d'isoler les cellules positives pour la sonde. Ces cellules primaires sont électriquement excitables et sont donc adaptées pour de l'imagerie calcique ou encore de l'électrophysiologie (Rogers *et al.*, 2011). Un autre modèle de souris transgéniques a été mis au point : toutes les cellules exprimant le PYY (les cellules L) apparaissent fluorescentes grâce à l'expression concomitante de la protéine *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Bohórquez *et al.*, 2011). Pour finir, il a récemment été montré que les EEC disposent de leur propre protéine de jonction : la claudine 4 (Nagatake *et al.*, 2014). Elles peuvent donc être isolées par cytométrie en flux en utilisant un anticorps spécifique de cette protéine.

d) Lignée cellulaire intestinale humaine : NCI-H716

Il existe une lignée de cellules intestinales immortalisées humaines, les NCI-H716. Celles-ci ont été isolées depuis le liquide d'ascite d'un patient masculin caucasien âgé de 33 ans et diagnostiqué pour un adénocarcinome du côlon peu différencié (de Bruïne *et al.*, 1992). Elles expriment le gène *Gcg* et sont capables, après différenciation, de sécréter du GLP-1 en réponse à des agents sécrétagogues. Cette lignée cellulaire a déjà été utilisée pour étudier les voies de signalisation aboutissant à la sécrétion du GLP-1 (Reimer *et al.*, 2001). Néanmoins, il apparaît que la transcription du gène *Gcg* se fait de façon aberrante (Cao *et al.*, 2003), si bien que leur pertinence en tant que modèle d'étude a fortement été remise en cause.

2. Les différents agents sécrétagogues et leurs récepteurs

La sécrétion intestinale du GLP-1 est connue comme étant principalement stimulée en phase postprandiale afin de réguler la hausse de glycémie liée à la prise alimentaire. C'est ainsi que les niveaux de GLP-1 plasmatiques passent de 5 à 10pM en étant à jeun à des valeurs deux à trois fois supérieures après un repas. Le pic de GLP-1 plasmatique apparaît généralement 20 à 30 minutes après un repas, temps de latence pouvant être modulé par la taille et la composition nutritionnelle du repas (Vilsbøll *et al.*, 2001; Alsalim *et al.*, 2015).

Il est généralement accepté dans la littérature scientifique de catégoriser les voies de stimulation de sécrétion du GLP-1 en deux groupes : i) les voies « directes » pour la stimulation des cellules L directement par les nutriments de la lumière intestinale et ii) les voies « indirectes » lorsque la présence de nutriments dans l'organisme stimule les cellules L de façon indirecte. Toutefois, cette classification n'a pas été celle choisie ici et en voici les raisons. Premièrement, même si les nutriments utilisent des intermédiaires pour déclencher la sécrétion de GLP-1 et donc que l'action des nutriments en elle-même est indirecte, la stimulation des cellules, elle, reste bien directe *via* des récepteurs spécifiques (Figure 13). Deuxièmement, la stimulation de la sécrétion du GLP-1 peut aussi être indépendante des nutriments et donc de la prise alimentaire : les molécules intermédiaires peuvent devenir les agents sécrétagogues.

La sécrétion du GLP-1 est un phénomène complexe impliquant de nombreuses voies de stimulation dont toutes ne sont pas encore découvertes. Cette étude bibliographique dresse un état des lieux mais n'est cependant pas exhaustive. La sécrétion de GLP-1 en réponse à des composés pharmacologiques ne sera pas abordée ici (Wang *et al.*, 2015).

a) Régulation nutritionnelle

Les nutriments présents dans la lumière intestinale sont détectés par les prolongements cytoplasmiques des cellules L. Chaque nutriment est détecté de façon différente et conduit à une intensité de sécrétion qui lui est propre.

Les sucres

Le glucose est l'agent sécrétagogue historique du GLP-1 ayant permis la découverte de l'effet incrétine (Mcintyre *et al.*, 1964). Au niveau des cellules GLUTag, l'effet du glucose passe par son absorption intracellulaire *via* les récepteurs membranaires *sodium-glucose linked transporter* (SGLT) 1 et 3 (Gribble *et al.*, 2003). L'utilisation de souris déficientes en SGLT1 inhibe la sécrétion de GLP-1 (Gorboulev *et al.*, 2012). Le transporteur de glucose (GLUT) 2 est aussi impliqué dans la réponse des EEC au glucose, à la fois *ex vivo* et *in vivo* chez des souris (Cani *et al.*, 2007b; Mace *et al.*, 2012). Finalement, les récepteurs à l'origine de la perception du goût sucré, les *type 1 taste G-protein coupled receptors* (T1Rs) participent *in vitro* et *in vivo* aux effets sécrétagogues des composés sucrés (Jang *et al.*, 2007; Kokrashvili *et al.*, 2009). Le fructose (sucre contenu dans les fruits, le miel) et l'isomaltulose (miel, sucre de canne) sont aussi capables de stimuler la sécrétion de GLP-1 (Gribble *et al.*, 2003; Hira *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent donc l'existence d'un autre mécanisme de détection des sucres : le GLUT5.

Concernant les édulcorants, la littérature scientifique est assez controversée. Une étude de 2012 réalisée sur des volontaires sains montre que le remplacement du sucrose d'un repas par des édulcorants tels que l'aspartame ou l'erythritol ne compense pas l'effet sécrétagogue du sucrose sur le GLP-1 (Sakurai *et al.*, 2012). Cependant, une étude récente de 2016 montre qu'au contraire le xylitol et l'erythritol sont capables d'induire une augmentation du GLP-1 plasmatique chez des sujets volontaires (Wölnerhanssen *et al.*, 2016). Toutefois, dans cette dernière étude, les édulcorants ne sont pas incorporés dans un repas mais sont administrés purs

(dissolution dans de l'eau). De plus, même s'ils induisent une sécrétion de GLP-1, celle-ci est presque deux fois inférieure à celle induite par le glucose et ne module que très peu l'insulinémie et la glycémie.

Les lipides

Les lipides exercent leurs effets *via* des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG ou GPR pour *G protein-coupled receptor*). Les acides gras longues chaînes mono-insaturés et polyinsaturés activent les GPR120 et GPR40 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur des modèles murins (Hirasawa *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2013). Les acides gras à chaînes courtes sont majoritairement issus de la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal. Ils induisent une sécrétion de GLP-1 *via* leurs récepteurs GPR41 et GPR43 (Nøhr *et al.*, 2013). D'autres composés lipidiques, tels que les 2-monoacylglycérols issus de la digestion des TG alimentaires, sont des ligands reconnus de GPR119. Or, l'activation du GPR119 des cellules L conduit à une sécrétion de GLP-1 *in vitro* (Moss *et al.*, 2016) et *in vivo* chez l'Homme (Hansen *et al.*, 2011b). Hormis les RCPG, le récepteur *fatty acid transport protein* (FATP) 4 joue un rôle clé dans l'absorption intracellulaire de l'acide oléique ainsi que dans son effet sécrétagogue *in vitro* et *in vivo* (Poreba *et al.*, 2012).

Les protéines et les acides aminés

Les composés protéiques stimulent la sécrétion de GLP-1 *in vitro* et *ex vivo* (Cordier-Bussat *et al.*, 1998), cependant les mécanismes de détection sont loin d'être clairement établis. Le récepteur GPRC6A est exprimé dans les cellules GLUTag et induit une sécrétion de GLP-1 en réponse à de la L-ornithine (Oya *et al.*, 2013). La détection des composés protéiques ferait aussi intervenir le récepteur *peptide transporter 1* (PEPT1). Ce co-transporteur à protons connu pour l'absorption des peptides au niveau entérocytaire est aussi exprimé dans les cellules L (Diakogiannaki *et al.*, 2013). La glutamine a un fort pouvoir sécrétagogue (plus conséquent que celui du glucose) *in vitro* sur les cellules GLUTag (Reimann *et al.*, 2004) et *in vivo* chez des volontaires sains, obèses ou diabétiques de type 2 (Greenfield *et al.*, 2009).

Autres données en rapport avec l'alimentation

Les acides biliaires auraient des effets contradictoires sur la régulation du GLP-1. Ils induisent sa sécrétion *via* leur récepteur TGR5 *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Katsuma *et al.*, 2005; Brighton *et al.*, 2015). Toutefois, le récepteur nucléaire *farnesoid X receptor* (FXR), un autre récepteur connu des acides biliaires, exerce un rôle d'inhibition de la production du GLP-1 (Trabelsi *et al.*, 2015). Deux polyphénols végétaux, la curcumine (Takikawa *et al.*, 2013) et l'anthocyane (Kato *et al.*, 2015), sont des agents sécrétagogues des cellules L en culture. La margose sauvage, une plante de la famille des *Cucurbitaceae* cultivée pour son fruit amer est aussi un agent sécrétagogue du GLP-1, ce qui expliquerait d'ailleurs ses effets thérapeutiques hypoglycémiants (Huang *et al.*, 2013).

b) Régulations nerveuse et hormonale

La densité la plus forte de cellules L est localisée au niveau de l'iléon et du côlon (Eissele *et al.*, 1992). La sécrétion postprandiale de GLP-1 provient donc principalement de l'intestin distal. Toutefois, les taux plasmatiques de GLP-1 augmentent rapidement après un repas, avant même que les nutriments ne soient arrivés au niveau des cellules L (Borgstrom *et al.*, 1957). Cette disparité temporelle laisse suggérer l'implication d'autres mécanismes faisant potentiellement intervenir des voies nerveuses, hormonales ou bien même paracrines (Hansen & Holst, 2002; Lim & Brubaker, 2006).

La stimulation nerveuse

L'implication du nerf vague dans la sécrétion du GLP-1 a été démontrée sur un modèle d'intestin murin isolé après vagotomie sous-diaphragmatique (Rocca & Brubaker, 1999). Les récepteurs cholinergiques stimulent la sécrétion de GLP-1 par les cellules L (Reimer *et al.*, 2001; Anini *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, seuls les récepteurs muscariniques sont connus pour être exprimés sur les EEC murines et humaines (Anini *et al.*, 2002; Anini & Brubaker, 2003a). Chez l'Homme, l'implication de ces récepteurs a été confirmée par l'administration d'un antagoniste, l'atropine (Balks *et al.*, 1997). Concernant les récepteurs adrénérgiques, leurs effets sont controversés (Claustre *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2015). Le neuropeptide *gastrin-releasing peptide* (GRP), produit par les neurones GRPergiques du système nerveux entérique, stimule la sécrétion de GLP-1 *in vitro* sur des cellules humaines en culture et *in vivo* dans un

modèle murin (Persson *et al.*, 2000; Reimer *et al.*, 2001). L'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine sont deux autres neurotransmetteurs capables d'induire une sécrétion de GLP-1 *in vitro* (Gameiro *et al.*, 2005).

La stimulation hormonale

Le GIP produit par les EEC de type K proximales est capable, *in vitro*, d'induire une sécrétion de GLP-1 par les cellules L distales murines (Brubaker *et al.*, 1998). Etant donné la fréquente colocalisation cellulaire de cette hormone avec le GLP-1, un effet paracrine peut être envisagé (Mortensen *et al.*, 2003). Toutefois, le récepteur au GIP n'a pas encore été montré comme étant exprimé par les cellules L. Cette sécrétion de GLP-1 dépendante de GIP ferait probablement intervenir les voies nerveuses précédemment décrites (Rocca & Brubaker, 1999).

D'autres hormones peuvent aussi réguler la sécrétion de GLP-1 par les cellules L. L'insuline et la leptine sont des agents sécrétagogues pouvant potentiellement agir directement *via* leur récepteur spécifique exprimé par les cellules L murines et humaines (Anini & Brubaker, 2003b; Lim *et al.*, 2009). La somatostatine inhiberait la sécrétion de GLP-1 *via* son récepteur *somatostatin receptor type 5* (SSTR5) (Chisholm & Greenberg, 2002). Le GLP-1 étant capable de stimuler la sécrétion de somatostatine, il pourrait s'agir d'une boucle de rétrocontrôle (Brubaker *et al.*, 1997). Pour finir, la sécrétion de GLP-1 par les EEC est aussi stimulée par l'activation de son récepteur spécifique le récepteur au GLP-1 (GLP-1R) (Kappe *et al.*, 2013). Le GLP-1 pourrait donc s'autocontrôler.

c) Régulation par les facteurs de l'inflammation

Certains médiateurs de l'inflammation modulent aussi les taux plasmatiques de GLP-1. L'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, augmente *in vivo* la sécrétion d'insuline *via* une induction de la synthèse et de la sécrétion de GLP-1 au niveau intestinal (Ellingsgaard *et al.*, 2011). Cette cytokine peut soit directement stimuler la sécrétion de GLP-1 par les cellules GLUTag, soit les sensibiliser. La pré-incubation des cellules avec de l'IL-6 améliore leur réponse lors d'une stimulation au glucose.

Les LPS, qui ont fait l'objet du premier chapitre de cette thèse, sont capables de potentialiser la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (SISG) *via* une augmentation des

taux circulants de GLP-1. Ces effets insulino-tropiques des LPS disparaissent lorsque les animaux sont traités avec des antagonistes du GLP-1R ou lorsque des souris déficientes en GLP-1R (GLP-1R *knockout* ou GLP-1R KO) sont utilisées (Nguyen *et al.*, 2014). Même si cette étude témoigne d'une augmentation du GLP-1 circulant en réponse aux LPS, les mécanismes moléculaires reliant LPS et GLP-1 sont encore inconnus. Une autre équipe de recherche confirme cette cascade LPS / GLP-1 / insuline et propose un mécanisme dépendant de l'IL-6 pour expliquer la hausse de GLP-1 en réponse aux LPS (Kahles *et al.*, 2014).

3. Mécanistique intracellulaire de la sécrétion

a) Cascades de signalisation intracellulaires

La Figure 13 schématise ce qui est connu à l'heure actuelle concernant les cascades de signalisation intracellulaires aboutissant à la sécrétion de GLP-1. Elle a été réalisée en se basant sur les références citées dans la partie précédente ainsi que sur les informations contenues dans deux revues scientifiques (Lim & Brubaker, 2006; Tian & Jin, 2016). Cette figure met en avant des cascades de signalisation différentes mais qui finalement se recoupent assez régulièrement.

La détection membranaire d'un agent sécrétagogue aboutit souvent à une dépolarisation associée à une augmentation du calcium intracellulaire. La dépolarisation peut être la conséquence : i) d'une augmentation du sodium ou du potassium intracellulaire comme c'est le cas pour le glucose et le fructose, ii) d'une activation de la phospholipase C (PLC) telle que rencontrée après une stimulation des récepteurs muscariniques ou encore, iii) d'un efflux d'ions chlorure en cas d'activation des récepteurs GABA_A. Outre les voies de signalisation dépendantes du calcium, les cellules L entéroendocrines peuvent aussi répondre *via* une augmentation des taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Lim & Brubaker, 2006; Tian & Jin, 2016).

Ainsi, comme pour la sécrétion d'insuline, la sécrétion du GLP-1 est majoritairement dépendante des taux de calcium et d'AMPc intracellulaires ; ces deux voies de signalisation sont largement connues pour être impliquées dans les processus d'exocytose (Seino & Shibasaki, 2005). Les découvertes scientifiques de ces dernières années apportent des pièces au puzzle « sécrétion du GLP-1 ». Cependant, pour le moment peu d'études se sont intéressées aux mécanismes pouvant relier calcium, AMPc et exocytose dans les EEC.

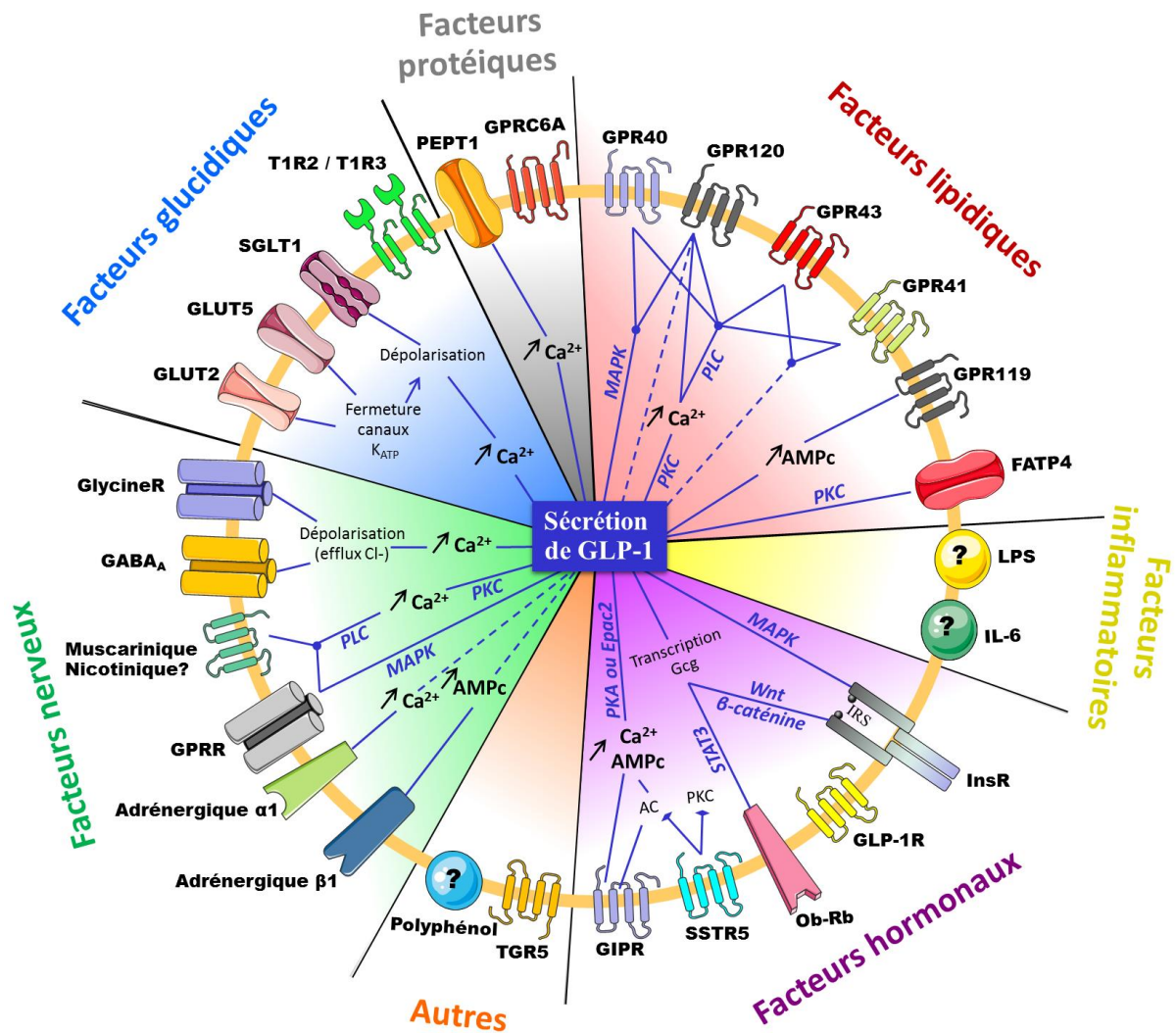


Figure 13

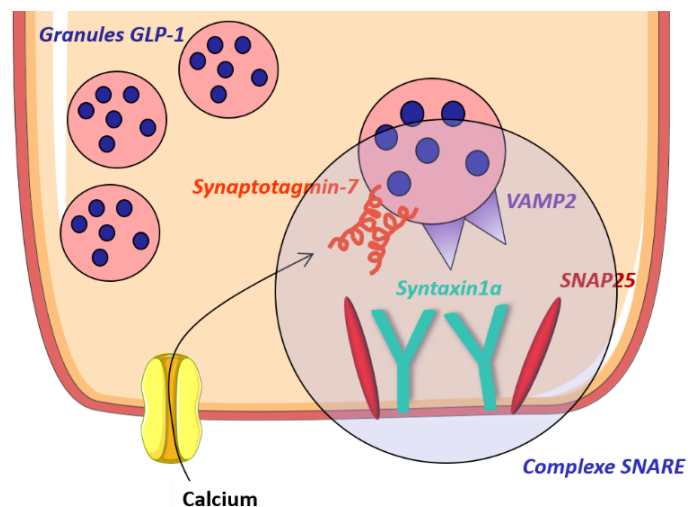
Les voies de signalisation cellulaires à l'origine de la sécrétion de GLP-1

La sécrétion de GLP-1 par les cellules L peut être stimulée par différents facteurs : nerveux (vert), glucidiques (bleu), protéiques (gris), lipidiques (rouge), inflammatoires (jaune), hormonaux (violet) et autres (orange). Chacune de ces voies fait intervenir différents récepteurs selon les molécules mises en jeu. Les noms de ces récepteurs apparaissent sur la figure sauf pour les LPS, l'IL-6 et les polyphénols, car à ce jour les mécanismes sécrétagogues ne sont pas encore connus.

Abréviations : LPS – lipopolysaccharides ; IL-6 – interleukine 6 ; GLP-1 – *glucagon-like peptide 1* ; GLUT – transporteur de glucose ; SGLT1 – *sodium glucose linked transporter 1* ; T1R - *type 1 taste G-protein coupled receptors* ; PEPT1 – *peptide transporter 1* ; GPRC6A - *G protein-coupled receptor family c group 6 subtype A* ; GPR – *G protein coupled receptor* ; FATP4 – *fatty acid transport protein 4* ; InsR – récepteur à l'insuline ; GLP-1R – récepteur au GLP-1 ; Ob-Rb – récepteur à la leptine ; SSTR5 – *somatostatin receptor type 5* ; GIPR – récepteur au *glucose-dependent insulintropic polypeptide* ; TGR5 – récepteurs aux acides biliaires ; GPRR – récepteur au *gastrin-releasing peptide* ; GABA_A – récepteur à l'acide γ -aminobutyrique ; Glycine R – récepteur à la glycine ; PK – protéine kinase ; MAPK – *mitogen-activated protein kinase* ; PLC – phospholipase C ; AMPc - adénosine monophosphate cyclique ; Epac2 – *exchange protein activated by cAMP 2*.

b) Processus d'exocytose

La protéine synaptotagmin-7, capable de détecter le calcium intracellulaire et d'induire l'exocytose de l'insuline, a été décrite *in vitro* et *in vivo* comme nécessaire à la sécrétion du GLP-1 (Gustavsson *et al.*, 2011). Les cellules L disposent d'une réserve de GLP-1 directement mobilisable et stockée dans des granules intracellulaires basales (Bohórquez *et al.*, 2011). Une étude s'est intéressée à l'exocytose de ces granules dans les cellules GLUTag : ils démontrent l'expression des protéines de la superfamille des protéines *soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors* (SNAREs) dont la *vesicle-associated membrane protein 2* (VAMP2), la syntaxin1a et la *synaptosomal-associated protein 25* (SNAP25) (Li *et al.*, 2014). Les protéines transmembranaires SNAREs fournissent l'énergie nécessaire au rapprochement granules/membrane qui normalement s'évitent (forces répulsives). Lorsque les membranes sont assez proches, le calcium intracellulaire aide à la fusion (Figure 14). La protéine VAMP2 est localisée au niveau des granules sécrétoires et peut interagir avec les protéines membranaires syntaxin1a et SNAP25 pour former un complexe de fusion SNARE. L'administration d'une molécule empêchant ces interactions diminue la sécrétion de GLP-1 (Li *et al.*, 2014).

**Figure 14*****Processus d'exocytose dans les cellules L entéroendocrines***

L'augmentation de calcium intracellulaire est détectée par la protéine synaptotagmin-7 des granules de GLP-1 et facilite le processus de fusion des membranes (la granulaire et la cytoplasmique). L'énergie nécessaire à ce rapprochement est apportée par les protéines du complexe de fusion SNARE : syntaxin1a et SNAP25 de la membrane cellulaire ainsi que VAMP2 de la granule.

Abréviations : GLP-1 – glucagon-like peptide 1 ; VAMP2 – *vesicle-associated membrane protein 2* ; SNAP25 – *synaptosomal-associated protein 25* ; SNARE – *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*.

III. Dégradation et clairance du GLP-1

1. L'activité protéolytique de la DPP-IV

a) La DPP-IV

La DPP-IV pour *dipeptidyl peptidase IV*, aussi connue sous le nom de cluster de différenciation 26 (CD26) est une serine peptidase appartenant à la famille des prolyloligopeptidases. Cette protéine de 766 acides aminés et 110 kDa (Misumi *et al.*, 1992) est majoritairement membranaire même si une forme soluble a aussi été retrouvée au niveau sanguin (Iwaki-Egawa *et al.*, 1998). En ce qui concerne sa structure (Figure 15), elle possède un large domaine extracellulaire constitué d'une région fortement glycosylée proche de la membrane plasmique, puis d'une région riche en cystéines et enfin la région catalytique. Cet imposant domaine extracellulaire est relié par une tige souple au domaine transmembranaire hydrophobe, qui lui est relié à la partie intracellulaire N-terminale de seulement 6 acides aminés ; il s'agit donc d'une protéine principalement extracellulaire. La forme soluble de la DPP-IV est dépourvue de cette région cytoplasmique.

La DPP-IV est une enzyme ubiquitaire exprimée dans de nombreux tissus comme le foie, l'intestin, les lymphocytes ou encore les cellules endothéliales et épithéliales. En ce qui concerne son activité biologique, elle clive la partie N-terminal de peptides ayant une proline ou une alanine en deuxième position et entraîne ainsi la libération d'un dipeptide. De nombreux neuropeptides, cytokines ou encore hormones gastro-intestinales telles que le GLP-1 et le GIP sont les substrats de cette peptidase. L'activité protéolytique de la DPP-IV permet soit l'activation biologique de certains précurseurs, soit l'inactivation du peptide clivé comme c'est le cas notamment pour GLP-1. Cette capacité d'inactivation des incrétines lui confère d'ailleurs un rôle majeur dans l'homéostasie glucidique. C'est une des raisons pour lesquelles elle suscite l'intérêt des communautés scientifiques, médicales et pharmaceutiques : ils la considèrent comme un formidable outil thérapeutique permettant de moduler les taux de GLP-1 et donc d'aider à la prise en charge du diabète de type 2 (DT2) (Lambeir *et al.*, 2003).

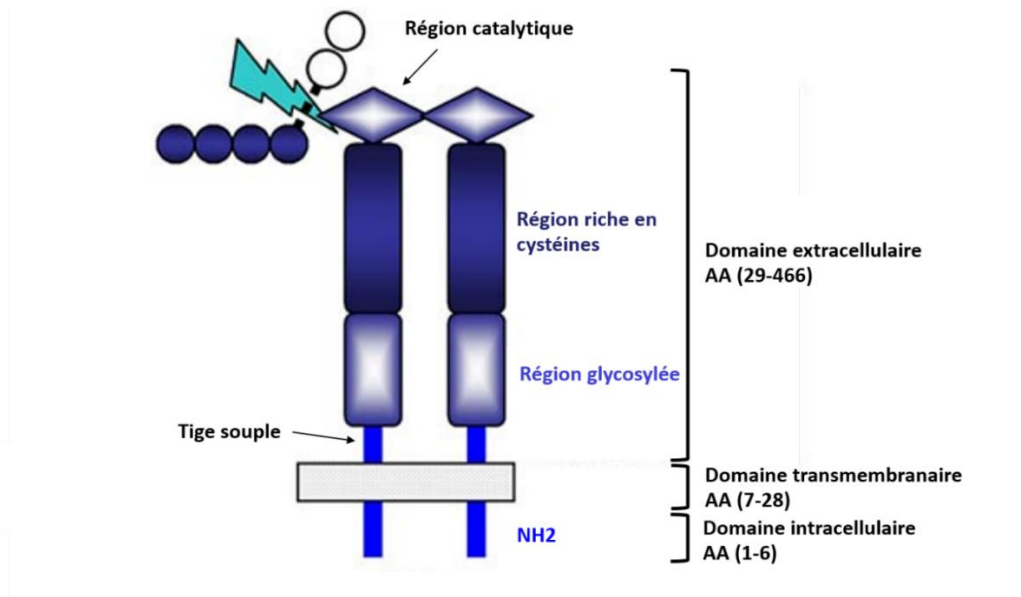


Figure 15

Représentation schématique de la structure de l'enzyme DPP-IV

Le dimère de DPP-IV membranaire est principalement extracellulaire. Le domaine intracellulaire très court comprend la partie N-terminale (NH2). Le domaine transmembranaire est relié par une tige souple à l'imposant domaine extracellulaire divisé en trois régions : une fortement glycosylée, une riche en cystéines et enfin la région catalytique permettant l'hydrolyse des différents substrats peptidiques (Ohnuma *et al.*, 2008).

Abréviations : AA – acides aminés.

b) L'inactivation du GLP-1

Le GLP-1 obtenu suite à la maturation protéolytique du proglucagon par l'enzyme PC1/3 est un peptide inactif de 37 acides aminés référencé comme le GLP-1 (1-37). Les 6 premiers aminoacides de la partie N-terminale sont retirés pour former le GLP-1 (7-36) et le GLP-1 (7-37) actifs (Figure 16). Ces derniers peuvent ensuite recevoir un groupement amide au niveau de leur partie C-terminale sous l'action de l'enzyme *peptide-amidating monooxygenase* (PAM). Chez la souris et chez l'Homme, la quasi-totalité du GLP-1 sécrété est un GLP-1 amide (Orskov *et al.*, 1994; Kuhre *et al.*, 2014). La forme active du GLP-1 est donc un peptide de 31 ou 30 acides aminés extrêmement sensible à l'activité catalytique de la DPP-IV. Cette enzyme clive la partie N-terminale de la forme active du GLP-1 au niveau de l'alanine, libérant ainsi un dipeptide et un GLP-1 (9-37) ou (9-36) amide biologiquement inactif (Deacon *et al.*, 1998; Vahl *et al.*, 2003).

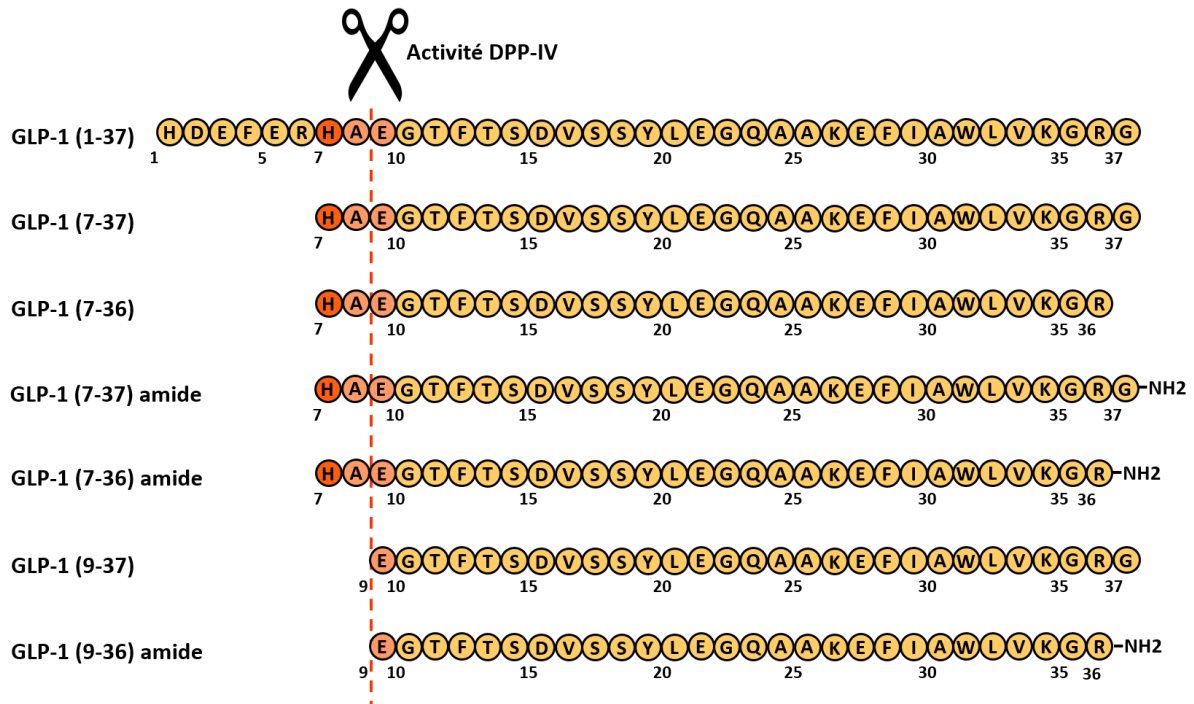


Figure 16

Les formes actives et inactives du GLP-1

Le GLP-1 (1-37) issu de la maturation protéolytique du proglucagon comporte 37 acides aminés. Le clivage des 6 premiers acides aminés produit les formes actives du GLP-1 : GLP-1 (7-36) et GLP-1 (7-37) présentant ou non un groupement amide en C-terminal. L'amidation est réalisée par la *peptide-amidating monooxygenase* (PAM). Les séquences d'acides aminés sont indiquées sur le schéma. Le site de clivage de la DPP-IV est indiqué par le trait pointillé orange et conduit à la production des formes GLP-1 (9-37) et (9-36) amide inactives (Cantini *et al.*, 2016).

Abréviations : GLP-1 – *glucagon-like peptide 1* ; DPP-IV – *dipeptidyl peptidase-IV*.

Des études *ex vivo* réalisées sur des iléons perfusés de cochons ont montré que la majorité du GLP-1 arrivant dans la circulation sanguine est déjà sous une forme inactivée (Figure 17). La DPP-IV présente dans l'endothélium des vaisseaux drainant la muqueuse intestinale inactive une bonne partie du GLP-1 dès son entrée dans les capillaires sanguins (Hansen *et al.*, 1999). Il a ainsi été estimé que moins de 25 % du GLP-1 sécrété par les cellules L intestinales quitte les méandres de l'intestin sous une forme active. Une autre vague de dégradation a lieu dans le foie. A ce niveau, c'est environ 40 à 50 % des 25 % restants qui sont inactivés. En conclusion, seulement 10 à 15 % du GLP-1 sécrété par l'intestin arrive dans la circulation systémique sous une forme active (Holst, 2007). De plus, ces faibles quantités systémiques de GLP-1 actif sont très rapidement désactivées par la version soluble de la DPP-IV. C'est ainsi que la demi-vie plasmatique du GLP-1 actif a été estimée à seulement 1 ou 2 minutes (Vilsbøll *et al.*, 2003).

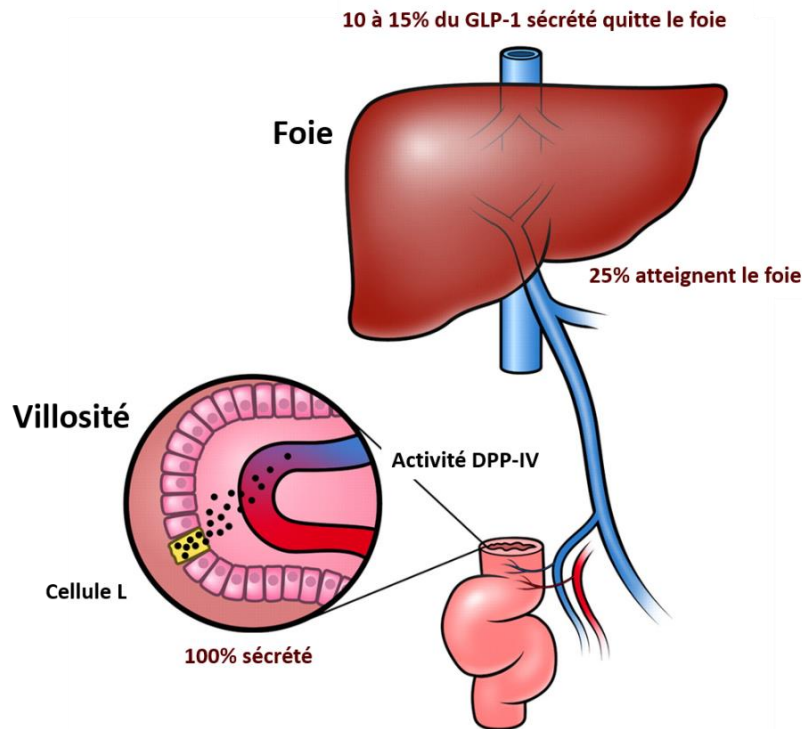


Figure 17

Inactivations intestinale et hépatique du GLP-1

La sécrétion du GLP-1 est stimulée au niveau des cellules L entéroendocrines des villosités intestinales. Le GLP-1 diffuse à travers la lame basale pour rejoindre la *lamina propria* puis les capillaires sanguins. Il est rapidement dégradé par la DPP-IV des cellules endothéliales. Si bien que seulement 25% du GLP-1 sécrété arrive dans la circulation portale. Dans le foie, de nouveau 40 à 50% du GLP-1 restant est inactivé par la DPP-IV hépatique. Au final, seulement 10 à 15% du GLP-1 sécrété initialement par l'intestin arrive dans la circulation systémique sous une forme active. La DPP-IV soluble plasmatique est en charge de la dégradation du GLP-1 restant (Holst, 2007).

Abréviations : GLP-1 – *glucagon-like peptide 1* ; DPP-IV – *dipeptidyl peptidase IV*.

c) Une voie de dégradation indépendante de DPP-IV : la NEP 24.11

Une étude de 1997 montre que le GLP-1 peut aussi être le substrat d'une autre enzyme, la *neutral endopeptidase 24.11* (NEP 24.11), aussi connue sous le nom de neprilysine. Son activité protéolytique génère des formes plus courtes du GLP-1 telles que les GLP-1 (28-37) et (28-36) amide (Hupe-Sodmann *et al.*, 1995). Dans ce sens, il a été montré que l'inhibition de cette enzyme diminue la dégradation du GLP-1 plasmatique (Plamboeck *et al.*, 2005). Il s'agit d'une endopeptidase principalement membranaire exprimée dans de nombreux tissus comme les reins, le système nerveux central (SNC), les hépatocytes... Elle présente une large spécificité de substrats.

2. Une forme inactivée pas si inactive

Les GLP-1 (9-37) ou (9-36) amide sont les formes de GLP-1 majoritairement retrouvées dans la circulation sanguine, elles représentent entre 60 et 80 % du GLP-1 total. Inactivées par la DPP-IV, elles ont été montrées comme n'ayant quasiment aucune affinité pour le GLP-1R et donc une activité biologique quasiment nulle (Knudsen & Pridal, 1996). Et si ce n'était pas réellement le cas ? Ce n'est pas l'affinité pour le GLP-1R qui est remise en question mais plutôt la perte d'activité biologique de ces formes « inactives ».

Des données de la littérature suggèrent que le GLP-1 pourrait exercer certaines de ses actions biologiques par des voies indépendantes du GLP-1R. Au niveau cardiaque, le GLP-1 agirait selon un double mécanisme : la voie canonique *via* le GLP-1R et une voie non canonique, indépendante du GLP-1R, activée par les formes « inactives » du GLP-1. Cette voie indépendante du GLP-1R serait d'ailleurs à l'origine de la récupération des fonctions cardiaques suite à des lésions ischémiques (Ban *et al.*, 2008). Ces données sur le système cardiovasculaire suggèrent donc l'existence de récepteurs encore inconnus et capables de détecter les métabolites inactifs du GLP-1. En plus des effets cardiovasculaires, une étude réalisée chez l'Homme a montré que l'administration de GLP-1 (9-36) à des patients obèses et résistants à l'insuline diminue la production hépatique de glucose de plus de 50% (Elahi *et al.*, 2008).

Il a récemment été montré que les formes courtes du GLP-1, produites par l'action de la NEP 24.11, sont capables d'entrer dans le milieu intracellulaire d'hépatocytes indépendamment du GLP-1R et d'exercer des effets biologiques au niveau des mitochondries : inhibition de la gluconéogenèse et diminution du stress oxydant (Tomas *et al.*, 2011a). De plus, l'administration de ces métabolites du GLP-1 à des souris sous régime obésogène mime les actions de l'insuline en prévenant la prise de masse corporelle, le diabète et la stéatose hépatique (Tomas *et al.*, 2011b). Le GLP-1 (28-36) a même été décrit comme ayant des propriétés de protection des cellules β pancréatiques (Liu *et al.*, 2012). Ainsi, comme le résume la Figure 18, les formes clivées du GLP-1 générées par la DPP-IV et la NEP 24.11 présentent des effets biologiques indépendants du GLP-1R. Cela pose alors la question de la pertinence clinique des inhibiteurs de la DPP-IV largement prescrits dans le cadre du DT2. En effet, ces derniers pourraient paradoxalement aboutir à une diminution des effets biologiques du GLP-1.

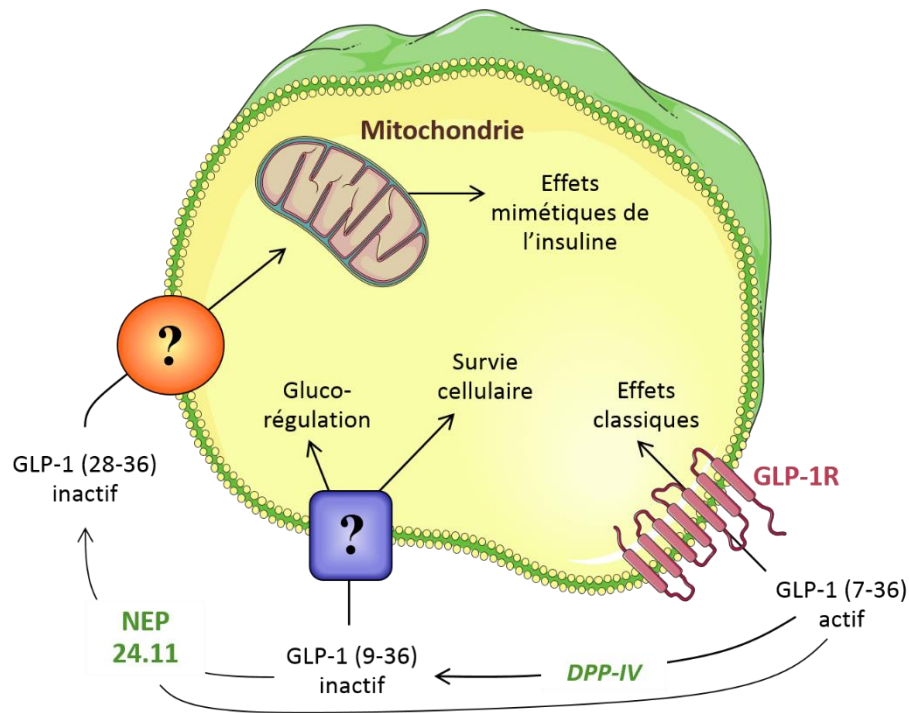


Figure 18

Modèle biologique hypothétique des effets du GLP-1 actif et inactif

Pour simplifier la figure, les formes (?-37) et (?-36) amide sont inscrites sous forme (?-36) uniquement. Le GLP-1 (7-36) actif peut exercer ses effets biologiques connus *via* le récepteur GLP-1 classique ou être clivé par la DPP-IV pour donner naissance au GLP-1 (9-36) inactif. Celui-ci améliore la survie cellulaire au niveau du système cardiovasculaire et a des effets gluco-régulateurs chez des patients obèses et résistants à l'insuline. Le récepteur du GLP-1 (9-36) n'est pas encore connu. L'endopeptidase NEP 24.11 dégrade soit le GLP-1 (7-36) soit son métabolite le GLP-1 (9-36) et conduit à la formation du GLP-1 (28-36). Ce dernier est transporté en intracellulaire par un mécanisme encore inconnu et exerce des effets mimétiques de l'insuline *via* notamment une action des mitochondries.

Abréviations : GLP-1 – *glucagon-like peptide 1* ; GLP-1R – récepteur au GLP-1 ; DPP-IV – *dipeptidyl peptidase IV* ; NEP 24.11 – *neutral endopeptidase 24.11*.

3. La clairance des formes actives et inactives par voie rénale

Les métabolites (9-37) et (9-36) amide du GLP-1 ont une demi-vie légèrement plus longue que celle de la forme active mais tout de même très courte : 4 à 5 minutes suffisent pour que leur concentration sanguine diminue de moitié (Vilsbøll *et al.*, 2003). Cette clairance rapide du GLP-1 et de ses métabolites est expliquée par une élimination par voie rénale efficace. En effet, il a été décrit *in vivo* chez le rat que la clairance du GLP-1 est largement ralentie suite à une néphrectomie bilatérale (Ruiz-Grande *et al.*, 1990). Ces observations ont été confirmées

chez l'Homme : des patients atteints d'insuffisance rénale chronique présentent un retard de clairance du GLP-1 (Meier *et al.*, 2004). Une étude utilisant du GLP-1 radio-marqué montre que le rein élimine les métabolites du GLP-1 ainsi que du GLP-1 actif (Hassan *et al.*, 1999). Comme le montre la Figure 19, le GLP-1 actif sécrété par l'intestin peut suivre trois voies différentes : i) exercer son activité biologique *via* le GLP-1R, ii) être clivé par la DPP-IV ou la NEP 24.11 et iii) être directement éliminé par voie rénale. En ce qui concerne ses métabolites résultant des activités protéolytiques de la DPP-IV et de la NEP 24.11, ils peuvent soit exercer leurs effets biologiques soit directement être éliminés par voie rénale.

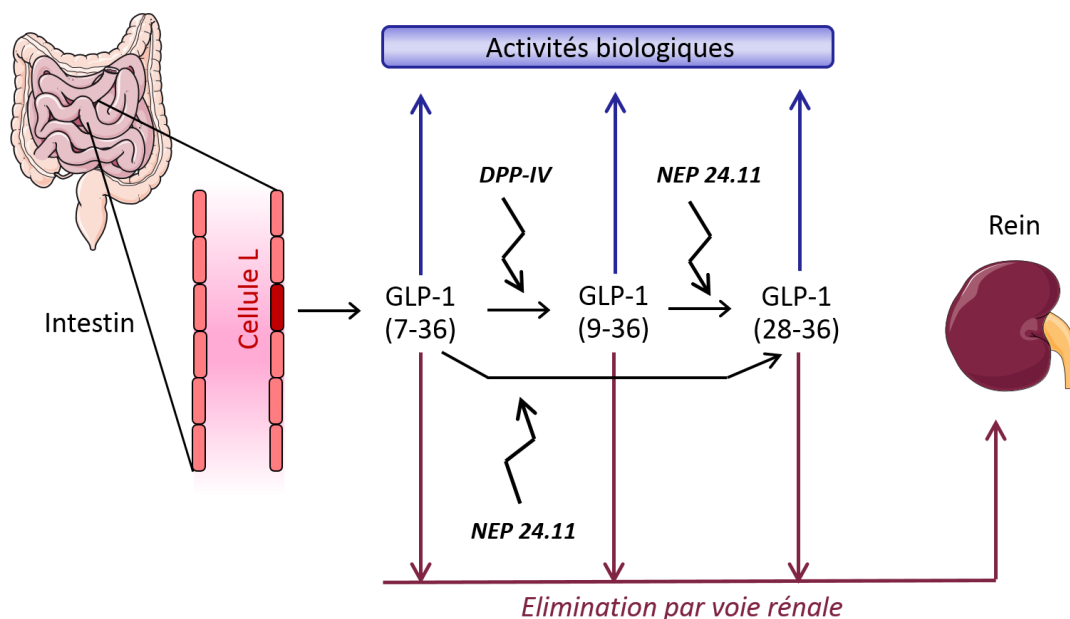


Figure 19

Métabolisme des différentes formes du GLP-1

Pour simplifier la figure, les formes (?-37) et (?-36) amide sont inscrites sous forme (?-36) uniquement. Le GLP-1 (7-36) actif est dégradé par la DPP-IV pour donner naissance au GLP-1 (9-36). Ce dernier est ensuite clivé en un plus petit peptide, le GLP-1 (28-36), par l'activité protéolytique de la NEP 24.11. Ces trois formes de GLP-1 peuvent exercer leurs activités biologiques ou être éliminées par voie rénale.

Abréviations : GLP-1 – glucagon-like peptide 1 ; DPP-IV – dipeptidyl peptidase IV ; NEP 24.11 - neutral endopeptidase 24.11.

IV. La biologie du GLP-1

1. Le récepteur au GLP-1 et sa distribution physiologique

Un nombre croissant d'études suggère l'existence de plusieurs récepteurs au GLP-1. Toutefois, à ce jour un seul a été identifié comme tel : le GLP-1R (Thorens, 1992). C'est par l'intermédiaire de ce récepteur transmembranaire de la famille B des RCPG que le GLP-1 actif exerce ses fonctions biologiques. Cette protéine de 463 acides aminés est capable de reconnaître des peptides dérivés du proglucagon endogènes, tels que le GLP-1, l'oxyntomoduline ainsi que des molécules pharmacologiques exogènes analogues du GLP-1 comme l'exendine 4. Comme tous les membres de sa famille, le GLP-1R possède un long domaine N-terminal extracellulaire capable de reconnaître ses peptides cibles ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire. Entre les deux, la partie centrale est composée de sept domaines transmembranaires. C'est donc au niveau de la partie N-terminale que se fait la reconnaissance du GLP-1 (Wilmen *et al.*, 1996). Outre les îlots du pancréas, l'ARNm codant pour le GLP-1R a été retrouvé dans d'autres tissus tels que les poumons, le cœur, le cerveau, les reins et le tube digestif (Wei & Mojsov, 1995). Ses fonctions dans ces différents organes ne sont pas encore toutes élucidées. L'expression et le rôle du GLP-1R sont encore controversés dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique, organes dans lesquels le GLP-1 exerce d'importantes fonctions biologiques.

2. Pléiotropie du GLP-1 dans la régulation du métabolisme glucidique

Mis à part son rôle originel d'incrétine, les fonctions du GLP-1 concernent plus globalement la régulation de l'homéostasie glucidique en général : synthèse d'insuline, régulation de la prise alimentaire, diminution de la vidange gastrique,... Pour cela, le GLP-1 et ses analogues peuvent influencer sur le fonctionnement de différents organes dont le pancréas, le SNC et d'autres organes consommateurs de glucose que sont le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux (Figure 20).

a) Une action pancréatique du GLP-1 et son effet incrétine

Le GLP-1 a initialement été découvert et décrit par et pour son effet incrétine, c'est-à-dire sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline en réponse à l'absorption orale de glucose. Cet effet exercé au niveau des cellules β pancréatiques induit donc une diminution rapide de la glycémie. Plus tard, des études montrent que le GLP-1 induit aussi la synthèse de l'insuline en augmentant la transcription de son gène et en stabilisant son ARNm afin d'éviter un épuisement des réserves en insuline (Drucker *et al.*, 1987). De plus, l'utilisation d'analogues du GLP-1 et donc l'activation pharmacologique du GLP-1R induit la prolifération des cellules β et diminue leur susceptibilité à l'apoptose (Xu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003).

En plus de cette action insulinothropique, le GLP-1 est aussi connu pour inhiber la production du glucagon hyperglycémiant par les cellules α pancréatiques. Les mécanismes à l'origine d'une telle inhibition ne sont pas encore complètement élucidés et l'expression du GLP-1R dans les cellules α est encore débattue (Drucker, 2006; Richards *et al.*, 2014).

Ces actions du GLP-1 sur le pancréas endocrine sont primordiales dans la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, la restauration de l'expression du GLP-1R spécifiquement dans le pancréas de souris GLP-1R KO est suffisante pour rétablir une normoglycémie chez ces souris normalement hyperglycémiques (Lamont *et al.*, 2012).

b) Le GLP-1 et son impact sur le système nerveux central

Les interactions du GLP-1 avec le SNC lui confèrent ses propriétés satiétogènes et de régulation de la prise alimentaire (Turton *et al.*, 1996). En effet, il a été montré que le GLP-1R était exprimé dans différentes zones du cerveau impliquées notamment dans la régulation de la prise alimentaire (Merchenthaler *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2014). Le GLP-1 produit par les cellules L intestinales et certains de ses analogues pharmacologiques peuvent passer la barrière hémato-encéphalique pour rejoindre des zones bien spécifiques du SNC (Kastin *et al.*, 2002; Hunter & Hölscher, 2012). Il est aussi directement produit localement par des neurones du noyau du tractus solitaire (NTS) (Larsen *et al.*, 1997). En plus de cette stimulation centrale des GLP-1R, les effets anorexigènes du GLP-1 périphérique peuvent aussi être relayés par le GLP-1R des terminaisons nerveuses afférentes du nerf vague (Kanoski *et al.*, 2011).

Cependant, l'implication du SNC dans la capacité du GLP-1 à réguler le métabolisme glucidique semble être encore controversée. Une étude récente suggère que le GLP-1R des voies nerveuses périphériques et centrales est certes impliqué dans les effets anorexigènes du GLP-1 mais n'a pas d'influence sur ses fonctions d'incrétines (Sisley *et al.*, 2014). Toutefois, l'administration intragastrique de faibles doses de glucose stimule l'utilisation périphérique du glucose et la glycogénogenèse musculaire sans que la glycémie systémique ne soit augmentée. Ces effets sont de plus réduits par l'administration centrale d'un antagoniste du GLP-1R (Knauf *et al.*, 2008). En conditions hyperglycémiques, l'infusion intracérébroventriculaire d'un agoniste du GLP-1R augmente la sécrétion d'insuline et le stockage hépatique de glycogène (Knauf *et al.*, 2005). De plus, le blocage de l'activité du GLP-1 central par inhibition de sa production ou par antagonisation du GLP-1R conduit au développement d'une intolérance au glucose (Barrera *et al.*, 2011). D'autres fonctions du GLP-1 semblent aussi être dépendantes des voies nerveuses. En effet, la capacité du GLP-1 à inhiber les sécrétions gastriques est abolie suite à une vagotomie (Wettergren *et al.*, 1997) et une signalisation vagale du GLP-1 serait impliquée dans sa capacité à ralentir le péristaltisme intestinal et la vidange gastrique (Schirra *et al.*, 2000, 2002). Ces capacités du GLP-1 à ralentir les processus d'ingestion et de digestion des aliments lui ont valu le surnom de « frein iléal ».

c) Les principaux organes gluco-consommateurs

Le foie

Les effets hépatiques du GLP-1 sont principalement dépendants de la stimulation ou inhibition préalables de l'insuline et du glucagon respectivement (Larsson *et al.*, 1997). Le GLP-1 peut aussi directement agir au niveau de cet organe anatomiquement propice à une sensibilité au GLP-1. Situé à la sortie de la veine porte, le foie est l'organe de l'organisme en contact avec la plus grande quantité de GLP-1 actif, après les intestins bien sûr. *In vitro*, sur des hépatocytes en culture, le GLP-1 mime l'action de l'insuline en inhibant la glycogénolyse induite par le glucagon (Ikezawa *et al.*, 2003) et stimule l'accumulation de glycogène (Valverde *et al.*, 1994). De plus, le fait de traiter des souris ob/ob (phénotype de souris obèses) avec du

GLP-1 ou de l'exendine 4 améliore non seulement la sensibilité à l'insuline mais aussi la stéatose hépatique (Ding *et al.*, 2006).

Les muscles squelettiques

Le GLP-1 est capable de stimuler l'absorption et le métabolisme du glucose dans des myocytes humains en culture, indépendamment de l'insuline (Luque *et al.*, 2002). Récemment, une étude a confirmé ces résultats et démontre en plus que l'absorption accrue de glucose se fait par une augmentation de l'expression protéique de GLUT4. Le GLP-1 induit aussi la synthèse de glycogène intracellulaire *via* un mécanisme dépendant de la *phosphoinositide 3 kinase* (PI3K) (Green *et al.*, 2012). Toutefois, il a également été montré que l'activation pharmacologique du GLP-1R cérébral provoque une insulino-résistance musculaire. Inversement, le blocage pharmacologique de ces récepteurs centraux conduit à une augmentation de l'utilisation musculaire du glucose (Knauf *et al.*, 2005). Une étude de 2014 démontre cependant que l'infusion périphérique de GLP-1, chez des rats insulino-résistants, améliore considérablement l'action de l'insuline au niveau musculaire (Chai *et al.*, 2014).

Le tissu adipeux

L'administration d'analogues pharmacologiques du GLP-1 entraîne une perte de masse corporelle des patients obèses ou en surpoids (Monami *et al.*, 2012; Pi-Sunyer *et al.*, 2015). Il reste cependant à savoir si ces observations sont les conséquences des effets du GLP-1 sur le SNC (satiété et régulation de la prise alimentaire) ou si le GLP-1 peut agir directement au niveau du tissu adipeux, cela doit encore être déterminé.

In vitro, le traitement d'adipocytes en culture avec du GLP-1 ou un de ses analogues confirme les effets bénéfiques du GLP-1 : i) augmentation de la sensibilité à l'insuline *via* une induction de l'expression de GLUT4 et de la phosphorylation du récepteur à l'insuline et de l'*insulin receptor substrate 1* (IRS-1) (Gao *et al.*, 2007) et ii) induction de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine (Kim Chung *et al.*, 2009). Concernant la prolifération et de la différenciation adipocytaire, le GLP-1 exerce des effets mais les conclusions sont encore controversées (Challa *et al.*, 2012; Cantini *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent donc une action

directe du GLP-1 sur le tissu adipeux. De plus, il a récemment été montré que l'administration quotidienne d'un agoniste du GLP-1R (exénatide) pendant 8 semaines à des souris nourries avec un régime riche en graisses conduit à une réduction de l'adiposité viscérale. L'exénatide favoriserait un « brunissement » adipocytaire *via* un mécanisme qui pourrait être dépendant de la sirtuine 1 (SIRT1) : augmentation de la lipolyse, de l'oxydation des acides gras ou encore de la biogenèse mitochondriale (Xu *et al.*, 2016).

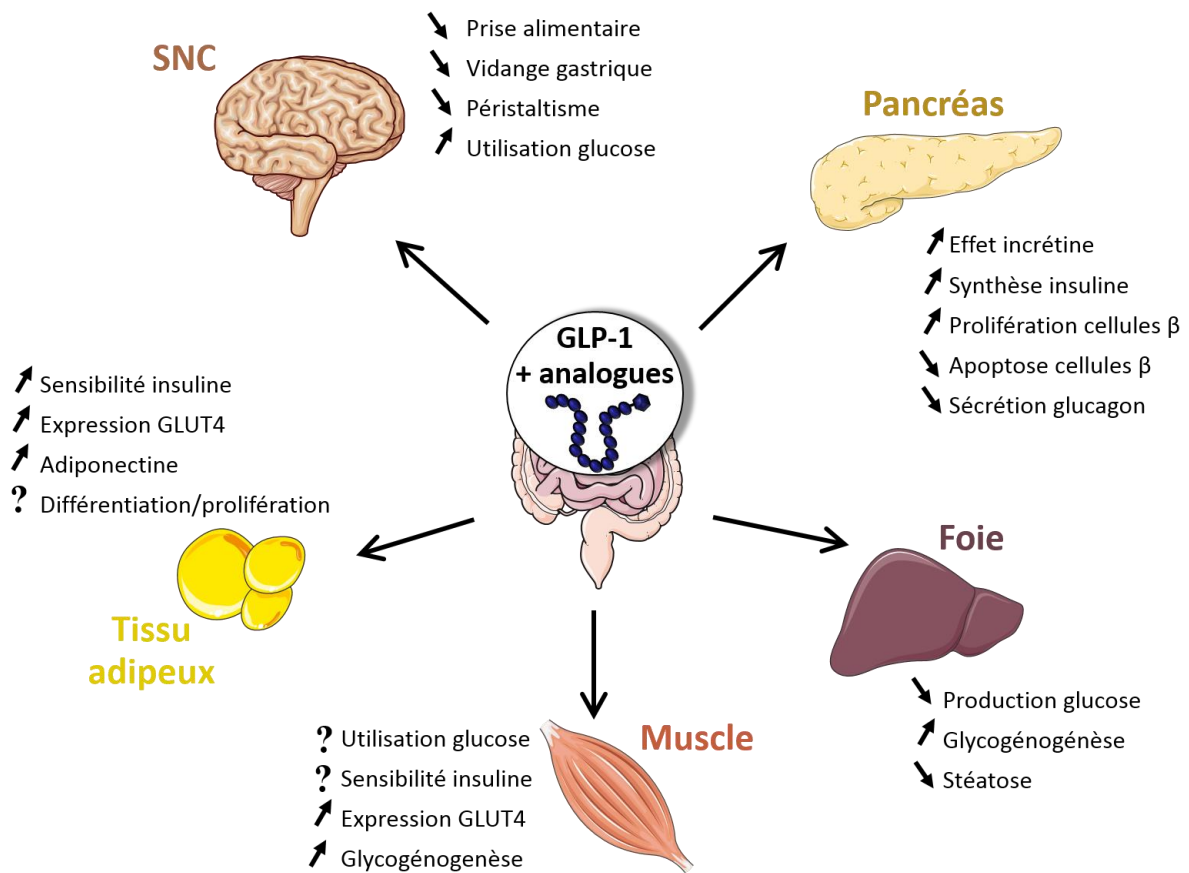


Figure 20

Effets biologiques du GLP-1

Le GLP-1 et ses analogues exercent leurs effets sur différents organes périphériques : le SNC, le pancréas, le tissu adipeux, le muscle et le foie. Toutes ces actions ont pour but de réguler le métabolisme du glucose. Figure inspirée de celle présente dans la revue de Drucker en 2006 (Drucker, 2006) à laquelle ont été ajoutées les données mentionnées dans la partie « Pléiotropie du GLP-1 dans la régulation du métabolisme glucidique ».

Abréviations : GLP-1 – *glucagon-like peptide 1* ; SNC – système nerveux central ; GLUT4 – *glucose transporter type 4*.

3. Un rôle anti-inflammatoire : la partie immergée de l'iceberg ?

Tout au long de ce chapitre, le GLP-1 a été décrit comme une hormone capable de réguler le métabolisme glucidique. Et si ce n'était là qu'une seule face de cette hormone intestinale ? Et si faire rimer GLP-1 avec homéostasie glucidique était faire abstraction de tout un versant de ses propriétés réelles ? La position distale des cellules L entéroendocrines, la quantité très faible de GLP-1 actif circulant ainsi que l'ubiquité de son récepteur spécifique, ce sont toutes des observations ayant conduit certains auteurs à remettre en question la fonction originelle du GLP-1 (Nauck, 1999; Lee & Jun, 2016). Et si le GLP-1 était aussi et surtout une hormone anti-inflammatoire ?

L'administration orale chronique d'un inhibiteur de la DPP-IV, la sitagliptine, réduit l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux et diminue l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires dans les îlots pancréatiques et le tissu adipeux de souris obèses (Dobrian *et al.*, 2011). Toujours dans le tissu adipeux, ces capacités du GLP-1 à diminuer l'infiltration macrophagique et l'expression cytokinique ont aussi été observées dans un autre modèle animal : des souris ob/ob préalablement traitées avec un adénovirus recombinant capable de produire du GLP-1 (Lee *et al.*, 2012). Les macrophages sont connus pour exprimer le GLP-1R à leur surface et le traitement *in vitro* de macrophages humains avec du GLP-1 ou un de ses analogues conduit à une polarisation des macrophages vers un profil de type M2 anti-inflammatoire (Shiraishi *et al.*, 2012). Le GLP-1 a récemment été décrit comme ayant des propriétés anti-inflammatoires dans d'autres organes tels que le cerveau (Parthasarathy & Hölscher, 2013), les reins (Marques *et al.*, 2014), le foie (Wang *et al.*, 2014) ou bien même directement dans l'organe à l'origine de sa production, l'intestin (Yusta *et al.*, 2015; Anbazhagan *et al.*, 2016).

Les propriétés anti-inflammatoires du GLP-1 pourraient aussi être en lien avec sa fonction originelle d'incrétine. De par son effet insulino-tropique, le GLP-1 favorise la clairance du glucose et préviendrait ainsi les conséquences délétères et notamment pro-inflammatoires d'une hyperglycémie (Esposito *et al.*, 2002). De plus, l'insuline elle-même exerce des actions anti-inflammatoires (Sun *et al.*, 2014).

L'existence de cette face cachée anti-inflammatoire du GLP-1 est aussi confortée par le fait que les taux de GLP-1 circulants sont augmentés chez des patients hospitalisés gravement

malades (Kahles *et al.*, 2014), suggérant ainsi une corrélation entre l'inflammation systémique et l'activité sécrétoire des cellules L. De plus, la quantité plasmatique de GLP-1 peut être modulée par des facteurs de l'inflammation. La cytokine pro-inflammatoire IL-6, notamment produite en réponse à une infection bactérienne, est capable de stimuler la sécrétion de GLP-1 (Ellingsgaard *et al.*, 2011). Pour finir, l'augmentation de l'endotoxémie est associée avec une augmentation des taux de GLP-1 circulants (Nguyen *et al.*, 2014). L'IL-6 serait l'agent sécrétagogue intermédiaire entre les LPS et le GLP-1 (Kahles *et al.*, 2014). Toutefois à l'heure actuelle, les mécanismes reliant LPS et GLP-1 sont encore très peu connus

Chapitre 3

Liens entre LPS et GLP-1

Les LPS peuvent se retrouver dans la circulation sanguine en traversant les barrières biologiques. Dans l'organisme, la principale source de LPS est située dans le tube digestif et plus précisément au sein du microbiote intestinal. L'intestin est donc l'organe dans lequel la quantité de LPS et la production de GLP-1 sont maximales. De plus, de nombreux travaux suggèrent que les LPS circulants contribueraient à l'apparition des maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) ; maladies qui s'avèrent être intimement liées avec le fonctionnement du GLP-1 intestinal. Serait-ce le reflet d'un lien entre LPS et GLP-1 ?

I. Principal lieu de rencontre : l'intestin

Les principales fonctions de l'intestin sont la digestion des aliments et l'absorption des nutriments qu'ils contiennent. *In fine*, ces nutriments apportent l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Afin d'optimiser cette absorption et de préparer les autres organes à une arrivée d'énergie, l'intestin produit et sécrète de multiples hormones, faisant de lui le plus grand organe endocrine de l'organisme. Il dispose aussi de son propre système nerveux, le système nerveux entérique (SNE), jouant un peu le rôle de chef d'orchestre. De par sa principale fonction absorptive, l'intestin constitue la plus vaste surface d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Il a donc également la très grande responsabilité de protéger l'organisme des agressions extérieures et de constituer une barrière à l'entrée de molécules étrangères, tout en laissant cependant l'accès aux nutriments. Cela est renforcé par le fait que l'intestin héberge des milliards de micro-organismes constituant ce qui est plus communément appelé le microbiote intestinal. Afin de pallier ce besoin de protection, l'intestin a développé son propre tissu lymphoïde, le *gut-associated lymphoid tissue* (GALT). Celui-ci travaillerait en étroite collaboration avec les EEC productrices de GLP-1.

1. Physiologie de l'intestin

a) Anatomie de l'intestin

L'intestin grêle se divise en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Il est précédé de l'estomac et suivi du côlon. Chez l'Homme, sa longueur peut varier de 4 à 7m et

son diamètre est d'environ 0,5cm. Son importante surface d'échange représente 300 à 400m² (l'équivalent de deux terrains de tennis) et s'explique par la présence de replis, de villosités au sein des replis et d'une multitude de microvillosités au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. La Figure 21 schématise la paroi intestinale. Elle s'organise autour de quatre couches qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : i) la muqueuse intestinale constituée de l'épithélium, de la *lamina propria* et de la *muscularis mucosae*, ii) la sous-muqueuse composée d'un tissu conjonctif et d'un réseau développé de vaisseaux sanguins et lymphatiques, iii) la musculature caractérisée par le présence de deux couches de fibres musculaires lisses (une longitudinale externe et une circulaire interne) et enfin, iv) la séreuse formée de cellules endothéliales (le mésothélium) et reposant sur une couche de tissu conjonctif permettant d'optimiser les mouvements du tube digestif.

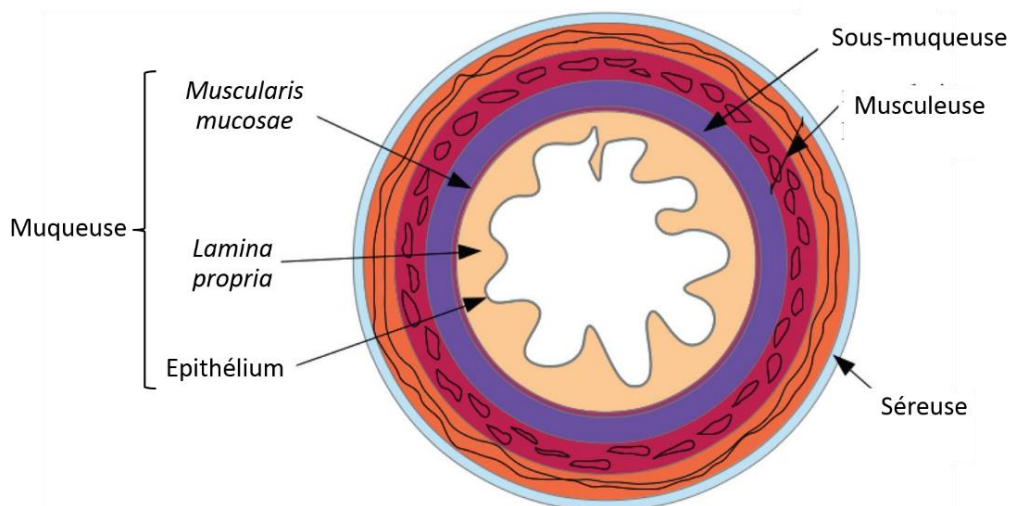


Figure 21

Représentation schématique de la paroi intestinale

Cette coupe transversale schématique de l'intestin grêle représente les différentes couches de la paroi intestinale. La muqueuse est la couche au contact de la lumière intestinale par l'intermédiaire de son épithélium constitué de villosités. La muqueuse est recouverte de la sous-muqueuse, puis de la musculature et enfin de la séreuse. Figure adaptée de Balbi & Ciarletta, 2013.

b) La muqueuse intestinale et son rôle de barrière

L'épithélium intestinal est caractérisé par la présence de cryptes et de villosités principalement constituées de quatre types cellulaires (Figure 22). Les villosités comportent : i) les cellules absorbantes ou entérocytes (90 % des cellules totales), ii) les EEC disséminées

sur toute la longueur de l'intestin (moins de 1% des cellules de l'épithélium) et iii) les cellules caliciformes productrices de mucus. Les cryptes sont quant à elles caractérisées par la présence : i) de cellules de Paneth sécrétant notamment le lysozyme (enzyme antibactérienne) et ii) de cellules souches se divisant et se différenciant le long de l'axe crypto-villositaire pour donner naissance aux quatre types cellulaires venant d'être cités. La muqueuse intestinale se renouvelle rapidement, tous les 5 jours chez l'Homme sain et tous les 3 jours chez la souris (Leblond & Messier, 1958).

La muqueuse intestinale constitue une réelle barrière physique aux agents pathogènes. Les cellules épithéliales sont reliées les unes aux autres par trois types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires ou adhérentes et les desmosomes (Farquhar & Palade, 1963). A cela s'ajoute une barrière glycoprotéique située en surface de la muqueuse intestinale : le mucus. Perméable aux nutriments, il évite le contact entre l'épithélium et le contenu de la lumière intestinale (Johansson *et al.*, 2011).

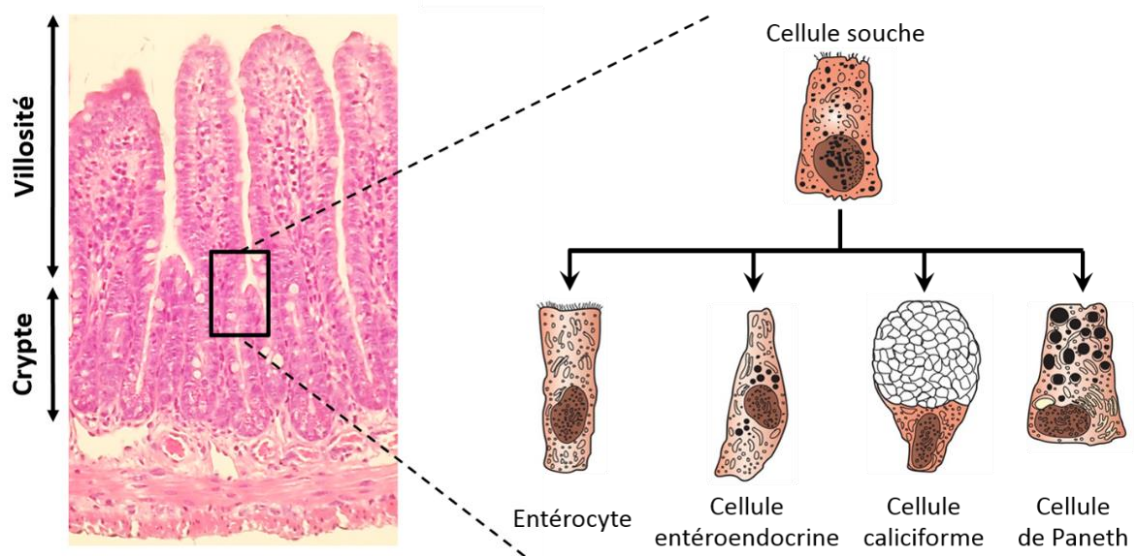


Figure 22

Epithélium intestinal et illustration des différentes cellules épithéliales

Les cellules souches situées à mi-chemin entre les villosités et les cryptes se différencient en entérocytes, cellules entéroendocrines et cellules caliciformes en migrant vers la lumière intestinale et en cellules de Paneth en migrant vers le fond des cryptes. Les illustrations de cellules ont été reprises de l'article de Gelberg en 2014 (Gelberg, 2014).

c) Le système nerveux entérique

Le tube digestif dispose de son propre système nerveux. Présent dans la paroi intestinale, le SNE a un rôle clé dans la coordination des activités sensibles, motrices, absorbatives, sécrétoires et immunitaires de l'intestin. Parmi les trois divisions du système nerveux autonome, le SNE est la partie la plus conséquente. Il dispose de ses propres circuits intrinsèques lui permettant d'agir indépendamment du SNC. Il est composé de plus de 100 millions de neurones, ce qui égale le nombre de neurones de la moelle épinière, et il possède un éventail de neurotransmetteurs comparable à celui du SNC. Ce système nerveux est tellement développé que l'intestin est parfois assimilé à un deuxième cerveau. Le SNE est constitué de deux plexus ganglionnés : le plexus sous-muqueux de Meissner et le plexus myentérique d'Auerbach localisé entre les deux couches de la musculature (Figure 23) (Sasselli *et al.*, 2012). Dans le chapitre précédent, une importante communication entre le SNE et les EEC a été décrite : cette voie neuroendocrine de stimulation régule notamment la sécrétion de GLP-1.

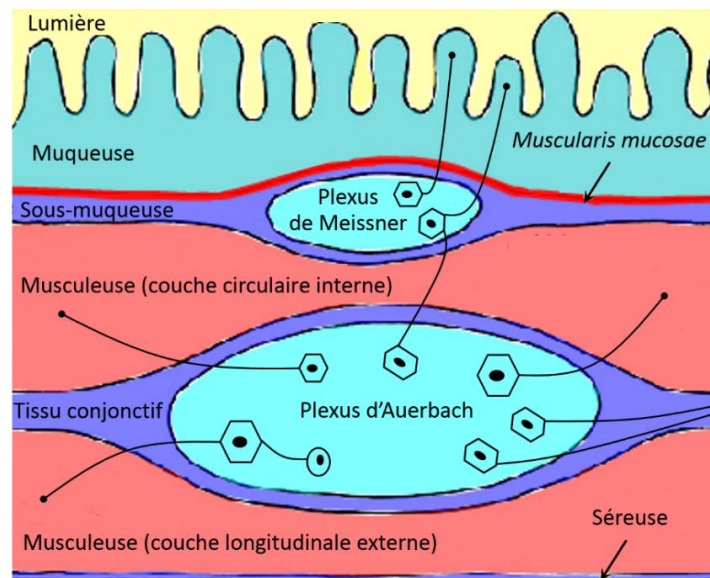


Figure 23

Représentation simplifiée du système nerveux entérique

Les constituants du système nerveux entérique sont localisés dans la paroi intestinale. Les ganglions du plexus de Meissner sont localisés dans la sous-muqueuse. Ceux du plexus d'Auerbach sont logés entre les deux couches de la musculature dans du tissu conjonctif. Les neurones représentés sur ce schéma ne sont bien sûr ni à l'échelle ni représentatifs du nombre réel de neurones, de leur diversité ou encore des différentes connections. Figure adaptée de : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.1.2.1.3.html>.

d) Le tissu lymphoïde associé à l'intestin

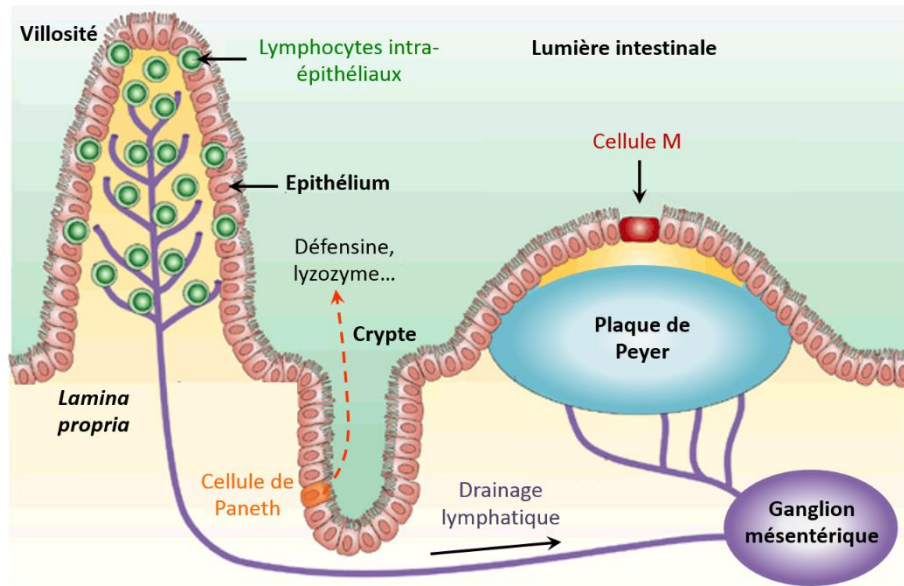
L'intestin dispose d'un système immunitaire associé à sa muqueuse dont la fonction première est de protéger l'organisme, le GALT. Il doit différencier les molécules étrangères pathogènes et nocives des molécules nutritives également étrangères mais bénéfiques. Des dérèglements du GALT peuvent être à l'origine d'une inflammation localisée ou bien même systémique. Il contribue donc fortement à toutes les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et intolérances alimentaires dont la prévalence ne cesse d'augmenter ces dernières années. La Figure 24 schématise les différents éléments constitutifs du GALT.

Les plaques de Peyer riches en lymphocytes B et T sont distribuées sur toute la longueur de l'intestin. L'épithélium intestinal qui les recouvre est infiltré d'un grand nombre de cellules immunitaires. Les entérocytes qui le composent se différencient en cellules M dépourvues de microvillosités apicales et capables de transporter des bactéries entières.

Les ganglions mésentériques sont disposés en chapelet autour des vaisseaux drainant le tube digestif et constituent les plus grands ganglions lymphatiques de l'organisme.

En plus de constituer une barrière physique, l'épithélium représente aussi une barrière immunologique contribuant activement au GALT. Les cellules de Paneth sont capables de sécréter des agents antimicrobiens tels que les défensines et les lysozymes (Elphick & Mahida, 2005). Les cellules épithéliales expriment des protéines leur permettant d'interagir avec les cellules hématopoïétiques de la *lamina propria* (Bleicher *et al.*, 1990). Elles sont ainsi capables de moduler la réponse inflammatoire en sécrétant différentes cytokines (Rodriguez-Juan *et al.*, 2001). L'épithélium comporte aussi des lymphocytes T spécifiques, les lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) (Bonneville *et al.*, 1988).

La *lamina propria* est également fortement impliquée dans le GALT du fait des nombreuses cellules immunitaires qu'elle contient (cellules dendritiques, macrophages ou encore lymphocytes T).

**Figure 24*****Organisation du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT)***

Les plaques de Peyer, les ganglions méésentériques et la *lamina propria* sont riches en cellules immunitaires. Les cellules M des plaques de Peyer permettent le transport de bactéries entières pour les présenter aux constituants du système immunitaire. Au niveau des cryptes, l'épithélium dispose des cellules de Paneth capables de sécréter des molécules antimicrobiennes. Dans les villosités, les cellules épithéliales cohabitent avec des lymphocytes intra-épithéliaux. Figure adaptée de la revue de Mowat en 2003 (Mowat, 2003).

2. Les habitants de l'intestin : le microbiote intestinal

Et si le corps humain était finalement plus bactérien qu'humain ?

Voilà une question philosophique dont la réponse ne sera bien sûr pas apportée dans le paragraphe qui va suivre. Toutefois cette question est belle et bien fondée. L'être humain vit en synergie avec des milliards de micro-organismes disséminés partout sur et dans son corps. L'intestin est l'hôte d'une importante population de bactéries, si importante qu'elle dépasserait même le nombre de cellules humaines : l'intestin renfermerait environ 10 fois plus de bactéries que le corps entier ne comporte de cellules humaines. Même si ce rapport a récemment été revu à la baisse et que finalement le ratio cellules humaines / cellules bactériennes ne serait « plus que » de 1 : 1 (Sender *et al.*, 2016), il y a bien de quoi se poser des questions existentielles. Qui est réellement l'hôte de qui ? Cet écosystème intestinal est si conséquent qu'il pèserait même plus que le cerveau humain : 2kg de bactéries contre 1,5kg de cellules cérébrales. Si autrefois,

pour désigner ces populations microbiennes, le terme de « flore » était utilisé, celui-ci faisant référence au règne végétal, il est actuellement d'usage d'employer le terme de « microbiote », qui signifie littéralement « petit vivant ».

a) Localisation, composition et dynamique du microbiote intestinal

La bouche, l'iléon et le côlon sont habités par de nombreuses bactéries. Seul l'estomac en comporte très peu du fait de son environnement acide hostile. La partie proximale de l'intestin reçoit des sécrétions gastriques ainsi que des acides biliaires et n'est donc pas non plus appréciée des bactéries, il ne contient « que » 10^3 bactéries par gramme de contenu. Leur quantité est croissante tout au long de l'intestin (10^4 et 10^7 dans le jéjunum et l'iléon respectivement) et atteint son paroxysme dans le côlon avec 10^{14} bactéries par gramme de contenu luminal. Les bactéries sont réparties entre la lumière intestinale et la couche de mucus recouvrant l'épithélium.

Ces dernières années, le développement du séquençage haut débit du matériel génétique a permis de faire un bond en avant en terme d'étude du microbiote. L'étude MétaHIT lancée en 2008 a révélé au grand jour l'extrême richesse du microbiote intestinal (Qin *et al.*, 2010). Cette étude réalisée sur les selles de 124 personnes a mis en évidence plus de 3,3 millions de gènes différents appartenant à plus de 1000 espèces bactériennes bien distinctes. Il ressort également de cette étude que le microbiote de chaque individu est constitué d'en moyenne 160 espèces. Si chaque individu comporte 160 espèces et que 124 individus en comportent 1000, cela implique donc une forte variabilité interindividuelle. Effectivement, même s'il existe un socle commun d'environ 20 à 30 espèces bactériennes, chaque individu dispose de son propre microbiote, un peu comme une empreinte non pas digitale mais intestinale : empreinte, qui, à l'inverse de l'empreinte digitale, peut être modulée en fonction du milieu environnant. Le microbiote humain est principalement constitué des bactéries suivantes : *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Proteobacteria* (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Le microbiote intestinal colonise son hôte dès ses premières années de vie et évolue avec lui au rythme de son développement (Figure 25). Au cours d'une vie, il y a principalement trois grandes étapes entraînant des modifications de la composition du microbiote : le sevrage, le passage à une alimentation solide et le vieillissement (Greenhalgh *et al.*, 2016). Entre ces principales étapes, d'autres facteurs tels que les traitements thérapeutiques, les pathologies ou

encore l'alimentation peuvent moduler la composition de cet écosystème microbien. Un changement dans les habitudes alimentaires impacte très rapidement la composition du microbiote intestinal : à peine un jour après que les aliments aient atteint l'intestin distal, que ce soit chez la souris ou chez l'Homme. L'inverse est également vrai, c'est-à-dire que le microbiote retrouve rapidement sa composition originelle (David *et al.*, 2014).

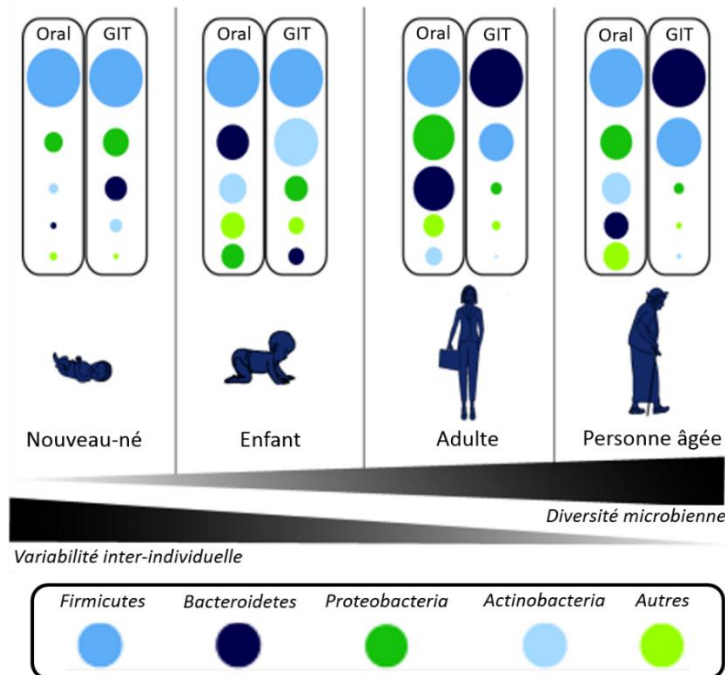


Figure 25

Mise en place et évolution du microbiote au cours de la vie

Le microbiote intestinal prend place très rapidement dans le tube digestif de son hôte et évolue avec lui au cours des différentes étapes de sa vie. La diversité microbienne et la variabilité interindividuelle varient en sens inverse : la diversité augmente avec l'âge alors que la variabilité diminue. Figure adaptée de la revue de Greenhalgh en 2016 (Greenhalgh *et al.*, 2016).

b) Les fonctions du microbiote

Très souvent, le mot « bactérie » rime avec les mots « pathogène » et « danger ». Si c'est le cas pour certaines bactéries de passage, les bactéries résidentes du microbiote, elles, sont bénéfiques pour leur hôte. Le cas contraire serait forcément la conséquence d'un dérèglement physiologique. Il a pendant longtemps été coutume de croire que le nouveau-né acquiert son microbiote dès la rupture des membranes fœtales. Or, la stérilité utérine a été remise en question

(Goldenberg *et al.*, 2000) et les récentes avancées biotechnologiques apportent des arguments allant dans ce sens, en montrant notamment une grande diversité microbienne dans le liquide amniotique (DiGiulio *et al.*, 2008). Ainsi, en plus de contribuer à notre vie « terrestre », ce microbiote participerait aussi au développement fœtal *in utero* (Romano-Keeler & Weitkamp, 2015). Toutefois, cette découverte est encore controversée et des études restent nécessaires pour pouvoir statuer quant à l'existence ou non d'une colonisation microbienne *in utero*.

Du fait de ses diverses fonctions vitales pour l'hôte (digestives, immunitaires, neurologiques et métaboliques), le microbiote a déjà été assimilé à un « organe oublié » (O'Hara & Shanahan, 2006). Les bactéries intestinales participent notamment à l'intégrité de l'épithélium en modulant les taux de renouvellement, de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales (Abrams *et al.*, 1963). Les bactéries du microbiote se nourrissent à la fois de l'hôte en lui-même (desquamation cellulaire, enzymes digestives, mucines) et de son alimentation. Elles assurent de ce fait une fonction de digestion qui s'avère être source d'énergie pour l'hôte notamment *via* la production de vitamines et d'acides gras à courtes chaînes. Chez les ruminants et les rongeurs coprophages, c'est la digestion bactérienne de l'herbe et des excréments respectivement qui permet cet apport nutritionnel. Qu'en est-il de l'Homme pour qui ces denrées ne font pas partie du menu ? Ce sont notamment les fibres alimentaires et les sucres complexes (cellulose, pectine...) issus des fruits et légumes et indigestes pour l'Homme qui assurent cette fonction (Flint *et al.*, 2012).

Ces bactéries symbiotiques ont également un rôle en terme de protection et d'immunité. Premièrement, elles constituent une troisième ligne de défense physique (en plus du mucus et de la muqueuse) contre les pathogènes, en empêchant notamment leur prolifération. Deuxièmement, elles communiquent avec le système immunitaire de leur hôte et cela dès son plus jeune âge. Elles participent au développement de celui-ci en interagissant avec les cellules du GALT. C'est le cas par exemple des cellules dendritiques de la *lamina propria*. Leurs prolongements atteignent la lumière intestinale, détectent les bactéries et communiquent l'information aux cellules du système immunitaire adaptatif (Rescigno *et al.*, 2001). Dès 1989, D. Strachan, professeur en épidémiologie, suggérait que la diminution du contact hôte – microbes due à un excès d'hygiène des modes de vie de l'époque (qui ont d'ailleurs continué dans ce sens) pouvait être la cause de l'augmentation des maladies auto-immunes ; ainsi est née la « théorie hygiéniste » ou « hypothèse de l'hygiène » (Strachan, 1989).

c) La dysbiose de l'écosystème intestinal

Il est désormais connu que la dysbiose, c'est à dire le déséquilibre du microbiote intestinal peut contribuer ou même être à l'origine de certaines pathologies. C'est le cas par exemple pour certaines allergies ou encore pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comprenant la maladie de Crohn et la rectocolite ulcéro-hémorragique. Dans ces dernières, le déséquilibre du microbiote commensal génère une réponse immunitaire inadaptée de la part du GALT. Certains troubles comportementaux comme l'autisme et la maladie d'Alzheimer peuvent aussi être associés à une dysbiose intestinale (Ghaisas *et al.*, 2016).

Pour finir, ce déséquilibre de la population microbienne intestinale accompagne également les maladies métaboliques telles que l'obésité et le DT2, dont il sera question dans la deuxième et dernière partie de ce chapitre. Les techniques de métagénomique récemment développées contribuent à faire des associations microbiote – pathologies. Certains y voient même à terme un puissant outil de diagnostic permettant d'identifier, dans le microbiote intestinal, des germes spécifiques biomarqueurs de pathologies. Si ce ne sont là que des corrélations et que le lien de causalité n'a pas encore été démontré, cela ouvre quand même de belles perspectives en terme de médecine préventive *via* l'alimentation et en terme de thérapeutique *via* par exemple le transfert fécal. Initialement utilisée pour combattre les infections bactériennes résistantes aux antibiothérapies, comme c'est le cas de *Clostridium difficile*, la transplantation fécale est de plus en plus utilisée pour traiter d'autres troubles intestinaux comme les inflammations chroniques de l'intestin (Colman & Rubin, 2014).

3. La cohabitation microbiote – hôte

La relation du microbiote avec son hôte est donc une totale synergie. L'hôte apporte de l'alimentation exogène et endogène à son microbiote qui en retour lui apporte l'énergie et les vitamines issues de la dégradation de certains composés indigestes pour l'Homme. L'hôte héberge son microbiote et en contrepartie celui-ci l'aide à combattre les potentiels pathogènes présents dans le tube digestif... Toutefois, commensales ou pathogènes, des bactéries restent des bactéries. Comment se fait-il que le système immunitaire de l'organisme humain accepte de vivre avec autant de micro-organismes potentiellement dangereux pour lui ? Effectivement, si soudainement la barrière intestinale physique venait à devenir perméable, voire même à se

rompre, le microbiote intestinal héberge assez de bactéries et notamment assez de LPS pour rapidement entraîner le décès de son hôte. C'est d'ailleurs sûrement la raison pour laquelle l'intestin, de par son GALT, est aussi le plus important organe lymphoïde de l'organisme. La colonisation bactérienne du tube digestif contribue grandement au développement de ce système immunitaire compétent. Microbiote et GALT communiquent en permanence, que ce soit pour faire face aux agressions extérieures ou pour faire en sorte que le GALT tolère la présence du microbiote. Ce phénomène de tolérance fait intervenir de nombreux acteurs et notamment les EEC.

a) Mise en sourdine du système immunitaire

Les bactéries et leurs composants sont reconnus par des récepteurs spécifiques des cellules de l'hôte permettant ainsi l'initiation d'une réponse immunitaire. Ces récepteurs font principalement partie de deux familles : i) les récepteurs membranaires TLRs dont le TLR4 est en charge de la détection des LPS bactériens et ii) les récepteurs intracellulaires de type *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* ou *NOD-like receptors* (NLRs). Les TLRs sont exprimés par les cellules épithéliales de l'intestin (Cario *et al.*, 2000) et les molécules bactériennes détectées par les TLRs ne sont pas spécifiques des bactéries pathogènes, ainsi comment se fait-il que la présence du microbiote résidant n'induit pas de réponse inflammatoire ?

Au niveau de l'épithélium intestinal, l'expression des TLRs ainsi que ses cascades de signalisation intracellulaires sont régulées à la baisse par la présence en continu de composés bactériens et donc par la colonisation microbienne du tube digestif (Otte *et al.*, 2004; Shibolet & Podolsky, 2007). Il a été montré que la mise en contact de façon répétée ou continue de cellules épithéliales intestinales avec des composés pro-inflammatoires bactériens, tels que les LPS ou le LTA, s'accompagne : i) d'une diminution de la réponse inflammatoire, ii) d'une réduction de l'expression des TLRs membranaires et iii) d'une inhibition des cascades de signalisation pro-inflammatoires intracellulaires (Otte *et al.*, 2004). Une souche commensale du microbiote intestinal a été décrite comme capable de réguler à la baisse la voie de signalisation pro-inflammatoire dépendante de NFκB en stimulant son export du noyau (Kelly *et al.*, 2004). Ainsi, en temps normal, une faible expression du récepteur TLR4 membranaire sur les cellules épithéliales rend la muqueuse intestinale très peu sensible à la présence de

composés bactériens comme les LPS (Abreu *et al.*, 2001). Ce serait notamment cette tolérance de l'intestin envers son propre microbiote qui serait altérée dans les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin. En effet, il a été décrit une plus forte expression de TLR4 et de la protéine MD-2, indispensable à son activation, au niveau des cellules épithéliales de l'intestin chez des patients atteints par ce type de pathologies (Cario & Podolsky, 2000; Vamadevan *et al.*, 2010).

b) Les TLRs : des détecteurs d'une altération membranaire

Les TLRs pourraient aussi être impliqués dans certains des effets bénéfiques du microbiote, comme le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et la prolifération des cellules épithéliales (Pull *et al.*, 2005).

L'ischémie mésentérique correspond à une diminution totale ou partielle du flux sanguin au niveau intestinal. Si l'ischémie mésentérique en elle-même est délétère pour l'intestin, la reperfusion des tissus peut l'être encore plus. Cette pathologie se caractérise donc par une forte dégradation de la barrière intestinale. Il a été montré que le microbiote commensal ainsi que la présence d'un récepteur TLR4 fonctionnel protègent la muqueuse intestinale des dommages induits pas un traitement d'ischémie / reperfusion chez la souris (Chen *et al.*, 2008; Tatum *et al.*, 2010).

L'altération de l'épithélium intestinal de souris par un traitement au dextran sodium sulfate (DSS) s'accompagne d'une forte augmentation de la perméabilité intestinale (Kitajima *et al.*, 1999). Les capacités de réparation de la muqueuse intestinale suite à un traitement au DSS sont réduites par l'antagonisation du récepteur TLR4 (Ungaro *et al.*, 2009). De plus, les souris déficientes en TLR4 ou en MyD88 sont plus sensibles à ce traitement au DSS et présentent une translocation bactérienne plus importante que les souris sauvages (Fukata *et al.*, 2005). D'autres études ont décrit ce récepteur comme capable d'activer la réparation de l'épithélium intestinal *via* l'induction de la cyclo-oxygénase 2 (Fukata *et al.*, 2006).

Ainsi, le récepteur TLR4 serait en mesure de détecter le passage de bactéries luminales dans la muqueuse altérée et déclencherait des cascades de signalisation permettant de faire face à cette dégradation épithéliale.

c) L'axe immuno-endocrine intestinal

Les EEC participeraient elles aussi au dialogue entre les bactéries (pathogènes ou commensales) et le système immunitaire intestinal de l'hôte. Pour rappel, ces cellules représentent seulement 1% de l'épithélium intestinal mais y sont essentielles car elles produisent et sécrètent de nombreuses hormones. Leur fonction principale est de détecter les aliments au niveau de la lumière intestinale et d'optimiser les conditions d'absorption et d'utilisation par l'organisme.

Le vaste système immunitaire intestinal et les cellules qui le composent expriment une large gamme de récepteurs aux peptides produits par les EEC (Genton & Kudsk, 2003). Cette observation suggère donc un dialogue moléculaire entre système endocrine et système immunitaire. En effet, un certain nombre d'études témoignent d'une action des hormones entérales sur le système immunitaire : la ghréline augmente l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Lee *et al.*, 2014), la cholécystokinine stimule la production d'acétylcholine par les lymphocytes B et a ainsi un effet sur le recrutement des neutrophiles (Reardon *et al.*, 2013). Il a de plus été décrit dans le chapitre 2 que le GLP-1 présente de nombreuses propriétés anti-inflammatoires à la fois systémiques et locales au niveau de l'intestin.

Une autre donnée confirmant le lien entre les EEC et le GALT est le fait que certaines maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à une augmentation du nombre de ces cellules au niveau iléal ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de leurs hormones comme le GLP-1 (Harrison *et al.*, 2013). De plus, des études à la fois *in vitro* et *in vivo* démontrent que, comme les cellules de l'épithélium intestinal « classiques », les EEC expriment elles aussi certains TLRs dont un récepteur TLR4 fonctionnel (Palazzo *et al.*, 2007; Bogunovic *et al.*, 2007).

Toutes ces informations suggèrent donc l'existence d'un axe immuno-endocrine permettant un dialogue entre ces deux systèmes intestinaux (Worthington, 2015). Comme les cellules épithéliales de l'intestin exprimant le TLR4, les EEC pourraient elles aussi percevoir une dégradation de la perméabilité membranaire *via* ce récepteur et ainsi participer à une régulation de la réponse inflammatoire.

II. LPS, GLP-1 et maladies métaboliques

1. L'épidémie de diabésité

Obésité et DT2 sont des maladies métaboliques dont la prévalence ne cesse d'augmenter. En 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qualifiait l'obésité de première « épidémie » non infectieuse de l'Histoire. Selon cette même institution, il y avait en 2014 environ 1,9 milliard d'adultes (âgés de 18 ans et plus) en surpoids, dont au moins 600 millions d'obèses. En France, les chiffres sont également inquiétants : en 2012, l'étude Obépi estimait à près de 7 millions le nombre de personnes obèses, soit environ 15% de la population. Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), dans le monde, une personne meurt du diabète toutes les 7 secondes. C'est plus que le sida et la malaria réunis. Parmi les 422 millions de diabétiques (données de 2014 – OMS), 90% présentent un DT2 dont le facteur de risque majeur est l'obésité. En effet, près de 80% des diabétiques de type 2 sont obèses ou en surpoids, mais « seuls » 25 à 30 % des obèses sont diabétiques. DT2 et obésité sont étroitement liés, si bien qu'un nouveau terme est apparu dans la littérature scientifique, celui de « diabésité ».

a) L'obésité et ses conséquences physiopathologiques

Depuis 1997, l'obésité est considérée par l'OMS comme une véritable pathologie caractérisée par « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé ». Elle peut être d'origine génétique et/ou physiopathologique mais peut également résulter d'un déséquilibre de la balance énergétique : apports caloriques de la prise alimentaire supérieurs à la dépense énergétique (Bleich *et al.*, 2008).

Bien souvent l'avancement de la maladie est évalué par la détermination de l'indice de masse corporelle (IMC). Il se calcule en faisant le rapport de la masse de l'individu (en kg) sur sa taille (en m²) : surpoids quand l'IMC est supérieur à 25kg/m² et obésité si cela dépasse les 30kg/m² (Figure 26). Toutefois, l'utilisation de cet indice est de plus en plus controversée car il ne tient pas compte de la composition corporelle de l'individu, c'est-à-dire de ses proportions de masse grasse et de masse maigre, ainsi que de la distribution physiologique du tissu adipeux. Or, il est maintenant communément admis que l'excès de tissu adipeux viscéral est le plus

délétère en terme de comorbidités associées à l'obésité. Il a par exemple été observé que des sujets obèses avec peu de tissu adipeux viscéral ont une tolérance au glucose similaire à des individus de masse normale (Pouliot *et al.*, 1992). Le tour de taille est donc un paramètre anthropométrique reflétant davantage l'accumulation de graisse abdominale, toutefois il ne permet pas de faire la distinction entre tissus adipeux viscéral et sous-cutané.

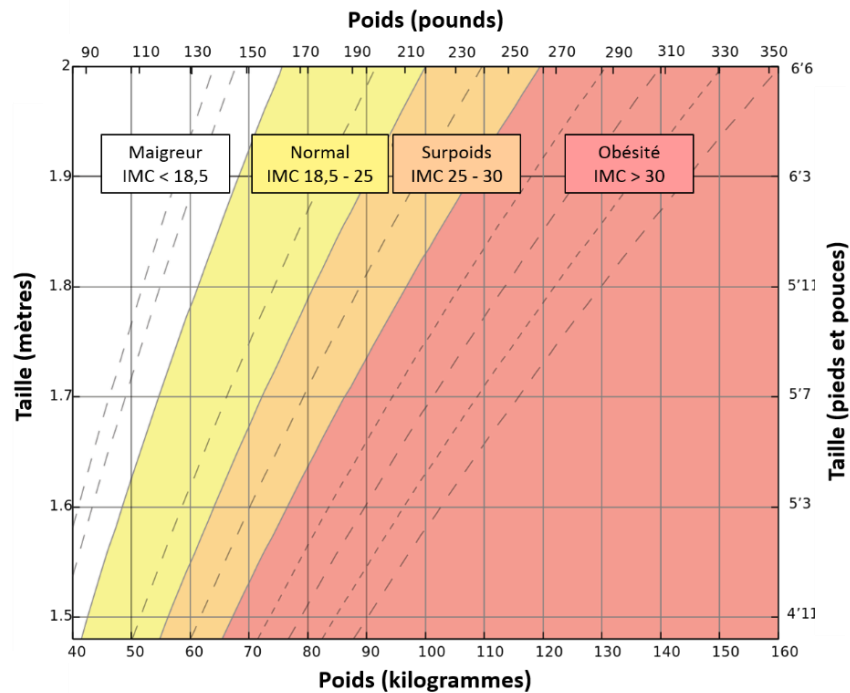


Figure 26

Table de détermination de l'indice de masse corporelle

Cette table prend en compte la taille et la masse d'un individu afin de déterminer son indice de masse corporelle. Les classes majeures sont représentées par des couleurs différentes au sein desquelles sont indiquées des sous-classes à l'aide de lignes en pointillés. Figure adaptée de : *Global Database on Body Mass Index*, WHO, 2006.

Avec la glycémie, la triglycéridémie, le taux de HDL circulants et la tension artérielle, le périmètre abdominal est un des critères d'évaluation du « syndrome métabolique ». Ce dernier regroupe un ensemble de dérèglements métaboliques pouvant contribuer au développement de pathologies telles que le DT2. La définition du syndrome métabolique a souvent été remise en question. La dernière a été proposée par la FID en 2005. Elle se voulait consensuelle mais fait finalement l'objet de nombreuses critiques, notamment de la part des associations européennes et américaines du diabète (*American Diabetes Association* ou ADA et *European Association for the Study of Diabetes* ou EASD), jugeant les critères de définition

ambigus. Quel que soit le seuil fixé, la surcharge pondérale fait partie de ces critères d'évaluation. En effet, l'obésité est un facteur de risque avéré pour plusieurs complications métaboliques telles que : i) la résistance à l'insuline et le DT2, ii) la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et la stéatohépatite (NASH), iii) le développement de certains types de cancers (sein, côlon, œsophage...) ou encore iv) les pathologies cardiovasculaires (Poirier *et al.*, 2006; Yki-Järvinen, 2014; Lauby-Secretan *et al.*, 2016).

Est-ce que l'obésité est réellement une maladie ou est-elle « juste » un facteur de risque pour de nombreuses pathologies ? La question fait actuellement débat (Hofmann, 2016). L'OMS a statué en 1997 et l'a confirmé en 2003, l'obésité est une maladie. L'*American Medical Association* et le Parlement Européen considèrent eux aussi l'obésité comme une réelle pathologie. Une enquête réalisée auprès de 1118 adultes recrutés dans le *Survey Sampling International* (SSI) montre des avis plutôt mitigés. En moyenne, seulement 51% des répondants classent l'obésité dans la catégorie des pathologies (Puhl & Liu, 2015). Finalement, le consensus actuel est inspiré de *The Obesity Society* (TOS) et serait de cataloguer l'obésité comme une pathologie non pas au sens scientifique du terme, mais plutôt au sens normatif afin de pouvoir solliciter toutes les ressources nécessaires pour la combattre : prévention, traitement, recherche médicale... (Allison *et al.*, 2008).

b) Le diabète de type 2, sa physiopathologie et le syndrome hyperinsulinémique

Le DT2 et sa physiopathologie

Selon l'OMS, le diabète est « une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie) ». Le lien entre le diabète et le pancréas a été fait pour la première fois à Strasbourg en 1889 : le médecin allemand O. Minkowski et son assistant J. Mering constatent que, suite à une pancréatectomie, les urines des chiens attirent les mouches du fait de leur teneur élevée en sucres. L'hormone impliquée est nommée « insuline » du fait de sa localisation histologique dans les îlots de Langerhans. Il existe principalement deux formes de diabète : le diabète de type 1 (DT1) et le DT2. Le DT1, ou diabète insulino-dépendant, provient d'une

destruction auto-immune des cellules β du pancréas et ne sera pas davantage détaillé ici. Par opposition au DT1, le DT2 est aussi appelé diabète non insulino-dépendant.

La pathogenèse du DT2 démarre par une perte de sensibilité à cette hormone des tissus cibles, il s'agit de la résistance à l'insuline. Normalement, l'action hypoglycémiante de l'insuline passe par : i) une augmentation de l'entrée du glucose aux niveaux musculaire, hépatique et adipocytaire et ii) une inhibition du déstockage du glycogène hépatique et de la synthèse de glucose *de novo*. En cas de résistance, la capacité de cette hormone à diminuer la glycémie est altérée et l'organisme compense en augmentant sa sécrétion. Il en résulte alors une hyperinsulinémie afin de maintenir une glycémie physiologique. Cependant, sur le long terme, les cellules β du pancréas peuvent s'épuiser et ainsi conduire *in fine* à un défaut de sécrétion d'insuline, ou insulinopénie (Figure 27).

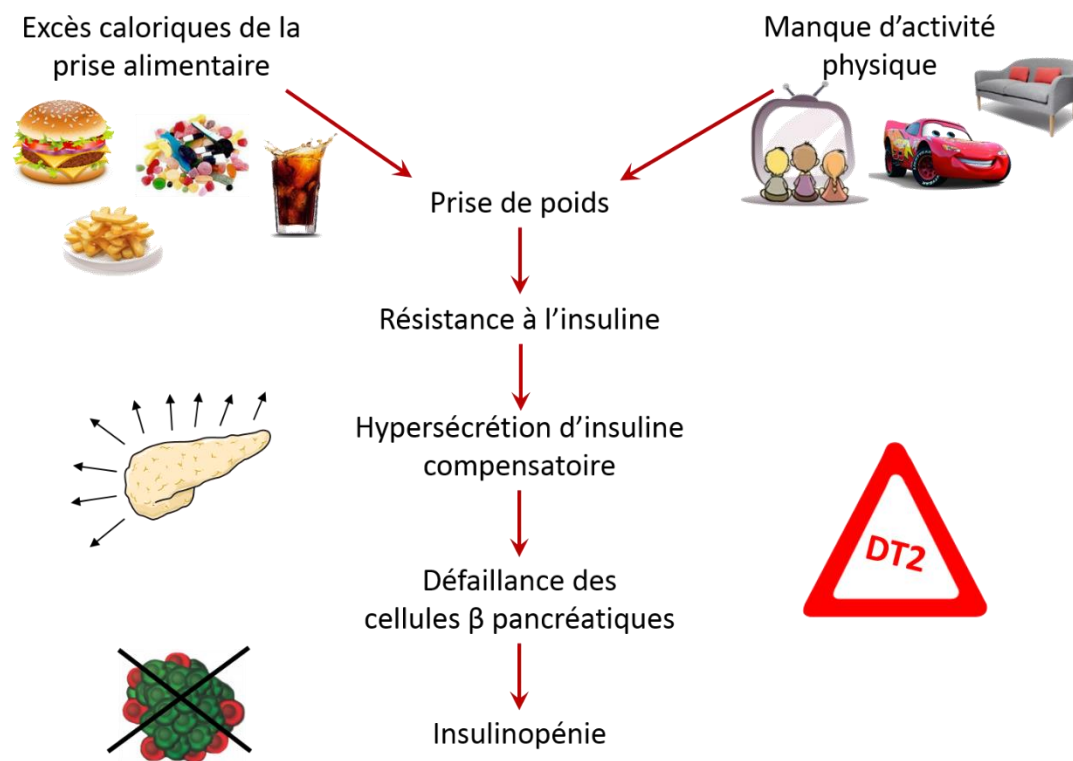


Figure 27

Les principales étapes de la physiopathologie du diabète de type 2

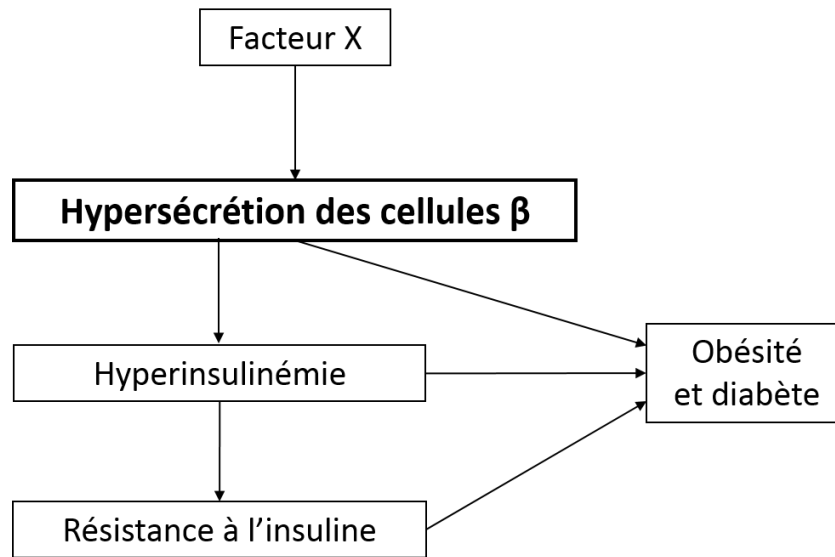
Le déséquilibre de la balance énergétique contribue activement à la prise de masse grasse. Celle-ci est directement associée au développement de la résistance à l'insuline. Lorsque les tissus cibles de l'insuline ne sont plus sensibles à cette hormone alors l'organisme compense en sécrétant davantage d'insuline pour permettre la régulation de la glycémie. Toutefois, cette hypersécrétion peut conduire à une défaillance des cellules β pancréatiques qui à terme ne produisent plus d'insuline. L'insulinopénie est la dernière étape dans la physiopathologie du diabète de type 2.

Le syndrome hyperinsulinémique

Actuellement, il est donc clairement établi que la résistance à l'insuline entraîne une augmentation de la sécrétion de cette hormone justement pour compenser la perte de sensibilité. Cependant, des travaux récents suggèrent que cette hypersécrétion d'insuline pourrait en fait être la cause et non la conséquence (Figure 28). La résistance à l'insuline ne serait donc qu'une réponse secondaire à des quantités trop importantes de cette hormone.

Cette hypothèse récente et innovante est née d'observations faites chez des patients obèses diabétiques ayant été opérés d'une chirurgie de l'obésité. En effet, ces opérations basées sur un court-circuit gastro-intestinal du trajet des aliments corrigent l'hypersécrétion d'insuline et ce, malgré une persistance de la résistance à l'insuline (Reed *et al.*, 2011). Ceci suggère donc que l'hyperinsulinémie ne serait pas la conséquence de la résistance à cette hormone. D'après Kelly *et al.*, cet excès d'insuline pourrait être le point de départ commun aux maladies telles que DT2, obésité, hypertension... Ces auteurs introduisent alors le terme de « syndrome hyperinsulinémique » (Kelly *et al.*, 2014).

Si cette nouvelle hypothèse est séduisante, l'origine de cette hypersécrétion est actuellement inconnue (Corkey, 2012). Certains auteurs suggèrent l'implication d'un signal provenant de l'intestin (Pories & Dohm, 2012). En effet, la chirurgie de l'obésité, évoquée ci-dessus, normalise la sécrétion d'insuline alors qu'elle ne consiste « qu'à exclure » une partie de l'intestin. Cela suggère fortement un lien étroit entre intestin et hypersécrétion d'insuline. Si effectivement l'hypersécrétion d'insuline est la cause et non la conséquence de la résistance à l'insuline, alors la pertinence de certaines thérapies actuelles basées sur une augmentation pharmacologique de cette hormone pourrait être remise en question.

**Figure 28*****Modèle proposant l'hyperinsulinémie comme le point de départ du DT2***

Dans ce modèle, l'hypersecrétion d'insuline ne serait pas la conséquence de la résistance à l'insuline mais plutôt la cause. L'hyperinsulinémie répétée contribuerait au développement d'une résistance à l'insuline. Toutefois, l'origine de cette hypersecrétion d'insuline (facteur X) n'est pas encore connue à l'heure actuelle (Corkey, 2012).

c) Physiopathologie des principaux organes gluco-consommateurs

L'obésité et le surpoids sont les principaux facteurs de risque de l'apparition du DT2. Il est clairement établi aujourd'hui que la probabilité de développement de cette pathologie augmente avec l'IMC (Guh *et al.*, 2009) et diminue avec la perte de masse corporelle (Diabetes Prevention Program Research Group *et al.*, 2009). L'expansion du tissu adipeux et sa dysfonction jouent un rôle majeur dans cette perte de sensibilité à l'insuline tout d'abord locale puis systémique. De plus, l'accumulation de graisses ectopiques au niveau des principaux organes gluco-consommateurs périphériques, à savoir le foie et les muscles squelettiques, contribuent fortement à une perte de sensibilité à l'insuline de ces tissus et donc à l'apparition de la résistance à l'insuline, il s'agit de la lipotoxicité (Samuel & Shulman, 2012). Au niveau de ces organes, le métabolisme des composés lipidiques (Figure 29) est considéré comme pouvant être une cause non négligeable de l'altération du métabolisme glucidique *via* l'installation de l'insulino-résistance. Il a notamment été montré que l'accumulation de dérivés lipidiques comme les diacylglycérols (DAG) et les céramides régule de façon négative l'action de l'insuline (Erion & Shulman, 2010; Chavez & Summers, 2012). D'autres organes tels que le

cœur, les reins, les os ou encore le pancréas, avec sa perte de fonction des cellules β , sont aussi impactés par la lipotoxicité mais ne seront pas abordés dans cette étude.

Le tissu adipeux blanc

Les TG contenus dans les VLDL hépatiques et dans les CM intestinaux en période postprandiale sont hydrolysés en AGL par la LPL. Ces AGL sont captés par le tissu adipeux soit par diffusion passive, quand le gradient de concentration le permet, soit par transport actif impliquant différentes protéines telles que la *fatty acid translocase/CD36* (FAT/CD36) et la FATP1 (Coburn *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006). Certains AGL restent cependant dans la circulation sanguine et constituent ainsi un pool d'AGL disponibles pour les autres tissus. Dans le tissu adipeux, l'activité de la LPL est stimulée par l'insuline (Sadur & Eckel, 1982). L'*angiopoietin-like protein 4* (ANGPTL4) aussi appelé *fasting-induced adipose factor* (FIAF) est quant à lui un inhibiteur de la LPL (Sukonina *et al.*, 2006). La *fatty acid synthase* (FAS) et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) sont les enzymes clés de la lipogénèse, c'est-à-dire de la synthèse des TG. L'énergie ainsi stockée dans des gouttelettes lipidiques reste bien sûr mobilisable par les autres tissus tels que le foie ou les muscles squelettiques : il s'agit de la lipolyse. Celle-ci fait principalement intervenir l'*adipose triglycerides lipase* (ATGL), la lipase hormonosensible (HSL) et la monoacylglycérol lipase (MGL). L'insuline est un puissant inhibiteur de la lipolyse (Fain *et al.*, 1965).

Lors d'un dérèglement de la balance énergétique, le tissu adipeux subit des réarrangements afin de pouvoir stocker l'énergie excédentaire : tout d'abord une hypertrophie (augmentation de la taille) suivie d'une hyperplasie (augmentation du nombre) adipocytaires (Krotkiewski *et al.*, 1983). Ainsi, dans un premier temps, ce tissu jouerait un rôle protecteur vis-à-vis des autres organes en emmagasinant l'excès énergétique de l'alimentation. L'atteinte de la limite d'expansion favoriserait l'apparition des complications métaboliques associées à l'obésité (Kim *et al.*, 2014). Les adipocytes hypertrophiés sont moins insulino-sensibles (Kim *et al.*, 2015) et cette perte de fonction de l'insuline pourrait contribuer à : i) l'augmentation de la lipolyse basale observée chez des sujets obèses (Arner & Langin, 2014) et ii) le défaut de stockage des TG alimentaires associé à l'obésité. La lipolyse du tissu adipeux provoque une libération d'AGL et de glycérol pouvant contribuer à un dépôt de graisses ectopiques et une

augmentation de la gluconéogenèse hépatique et donc favoriser l'hyperglycémie. De plus, l'autophagie est augmentée dans le tissu adipeux de patients obèses résistants à l'insuline (Kosacka *et al.*, 2015). Il pourrait s'agir d'une lipophagie, c'est-à-dire une autophagie des gouttelettes lipidiques augmentant ainsi les AGL disponibles (Wang, 2016). Le tissu adipeux est de plus un organe endocrine. Son expansion modifie la production d'adipokines et de lipokines connues pour participer à la régulation du métabolisme gluco-lipidique en interagissant avec d'autres organes (Cao *et al.*, 2008; Galic *et al.*, 2010). Le moindre captage des AGL, l'intensification de la lipolyse et la dysfonction sécrétoire du tissu adipeux blanc participent donc au dérèglement du métabolisme des organes périphériques.

Le foie

Au niveau du foie, la LPL et la lipase hépatique (HL) sont en charge de la dégradation des TG. Elles favorisent ainsi le captage des AGL par les hépatocytes grâce à différents transporteurs membranaires tels que FATP2, FATP5 ou encore FAT/CD36 (Doege *et al.*, 2006; Koonen *et al.*, 2007; Falcon *et al.*, 2010). Comme dans le tissu adipeux, les acides gras des hépatocytes sont aussi stockés sous forme de TG dans des gouttelettes lipidiques. L'augmentation de l'insulinémie est associée à une lipogenèse *de novo* qui consiste à transformer les composés sucrés en acides gras et faisant intervenir diverses enzymes comme l'ACC, la FAS ou encore la diacylglycérol transférase (DGAT). Le glucose et l'insuline régulent l'action de ces enzymes lipogéniques par l'intermédiaire de deux protéines : respectivement *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP) et *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP1c). En ce qui concerne l'élimination des lipides hépatiques, cela peut se faire *via* la sécrétion des VLDL chargés de TG ou *via* l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. Cette dernière fait intervenir différentes protéines telles que la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) (Sanders & Griffin, 2016).

L'obésité est associée à une accumulation de lipides dans le foie, principalement sous forme de TG : il s'agit de la NAFLD. Cela s'explique par un déséquilibre entre l'apport de lipides (*via* la circulation sanguine ou la synthèse *de novo*) et leur élimination (sécrétion des VLDL ou oxydation des acides gras). L'activité de l'HL et donc le captage des AGL est augmentée chez les patients obèses et atteints de NAFLD (Pardina *et al.*, 2009). Cette activité

enzymatique accrue couplée à l'augmentation du pool d'AGL, du fait de l'alimentation et de la souffrance du tissu adipeux, participe au développement de la NAFLD. Les gouttelettes lipidiques hépatiques contribuent à l'installation de l'insulino-résistance qui est sélective dans cet organe : l'insuline n'inhibe plus la gluconéogenèse par contre elle stimule davantage la lipogenèse *de novo* : il en résulte une hypertriglycémie ainsi qu'une hyperglycémie (Brown & Goldstein, 2008).

Les muscles squelettiques

A eux seuls, les muscles squelettiques expliquent 80% de la clairance du glucose chez l'Homme (DeFronzo *et al.*, 1981). Ils captent le glucose *via* le récepteur GLUT4 et le stockent sous forme de glycogène après l'avoir transformé en glucose-6-phosphate (G6P), sous l'action de l'hexokinase. Les muscles sont aussi capables, *via* leur LPL, de capter des AGL. A l'inverse du tissu adipeux et du foie, chez l'Homme, la LPL musculaire est inhibée par une infusion d'insuline (Farese *et al.*, 1991) et par le FIAF (Robciuc *et al.*, 2012). Les AGL s'infiltrent dans la cellule musculaire par diffusion passive ou par l'intermédiaire de transporteurs membranaires tels que FAT/CD36 (Coburn *et al.*, 2000).

L'IL-6 est une myokine dont l'expression et la sécrétion sont augmentées lors d'un exercice physique, quand la sensibilité à l'insuline est augmentée (Ostrowski *et al.*, 1998). Cette myokine augmente le métabolisme musculaire en induisant notamment l'oxydation des acides gras (Kelly *et al.*, 2009). L'obésité et le DT2 sont associés à une diminution des récepteurs à l'IL-6 au niveau musculaire (Scheele *et al.*, 2012). Ces pathologies entraînent également une diminution de l'oxydation des acides gras musculaires et donc une accumulation des TG (He *et al.*, 2001). Or, les TG musculaires participent à une perte de sensibilité à l'insuline des muscles squelettiques (Roden *et al.*, 1996). En plus des TG, les métabolites bioactifs tels que les DAG et les céramides sont aussi délétères pour la sensibilité à l'insuline (Strackowski *et al.*, 2007). La capacité de cette hormone à induire l'entrée du glucose dans les cellules musculaires est fortement diminuée en cas de DT2 (Cline *et al.*, 1999).

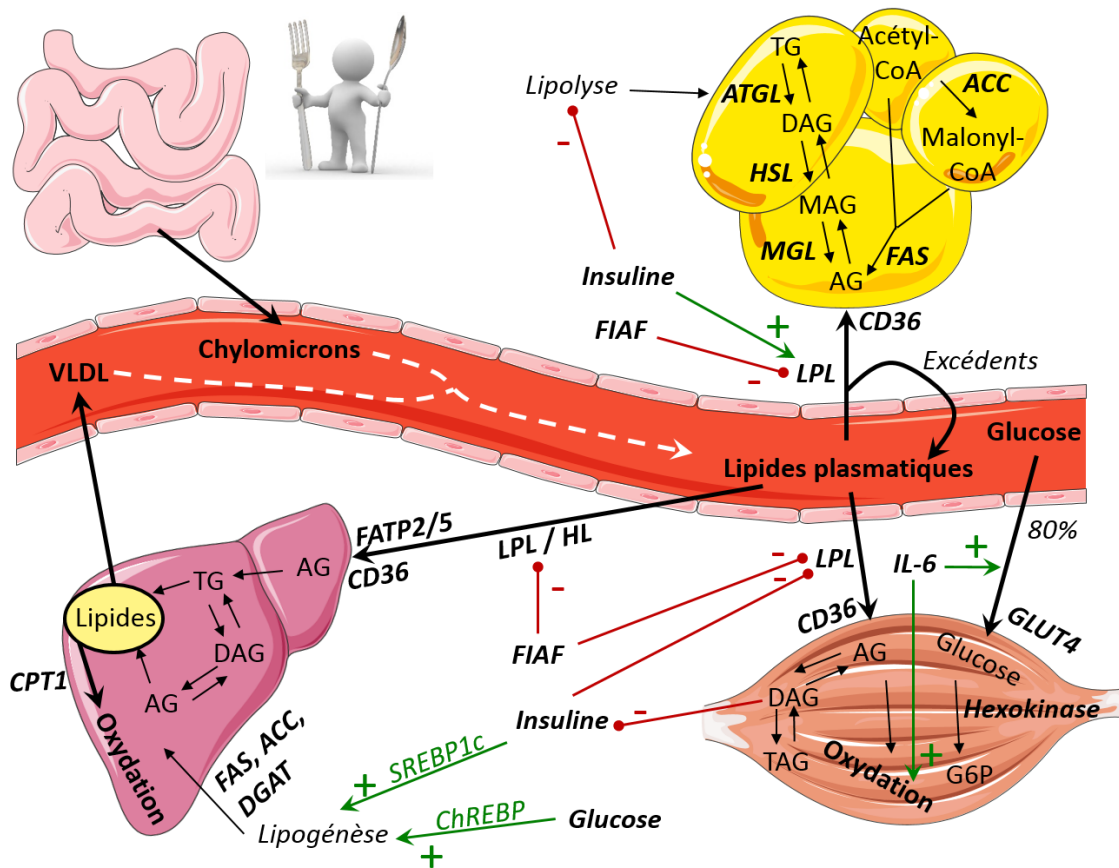


Figure 29

Physiologie des principaux organes gluco-consommateurs périphériques

Le tissu adipeux blanc (en haut à droite), le foie (en bas à gauche) et les muscles squelettiques (en bas à droite) sont les principaux organes gluco-consommateurs. Ils participent au développement de l'insulino-résistance globale et sont les premiers impactés par ce manque de sensibilité à l'insuline. Les lipides alimentaires (chylomicrons) et hépatiques (VLDL) peuvent être captés par ces trois organes grâce à la LPL. L'expansion du tissu adipeux permet de faire face à un excès de lipides plasmatiques. Il en résulte une perte de sensibilité à l'insuline de ce tissu, une hausse de la lipolyse et un moindre captage lipidique. Les lipides excédentaires plasmatiques peuvent s'accumuler dans les autres organes comme les muscles et le foie. Cela entraîne une perte de sensibilité à l'insuline entretenue par le développement de la stéatose hépatique. Il en résulte une hausse de la sécrétion des VLDL et donc une hausse des lipides plasmatiques.

Abréviations : VLDL – *very low density lipoprotein* ; FIAF – *fasting-induced adipose factor* ; LPL – lipoprotéine lipase ; AG – acide gras ; MAG – monoacylglycérol ; DAG – diacylglycérol ; TG – triglycérides ; ATGL – *adipose triglycerides lipase* ; HSL – lipase hormonosensible ; MGL – monoacylglycérol lipase ; ACC – acétyl-CoA carboxylase ; FAS – *fatty acid synthase* ; IL-6 – interleukine 6 ; G6P – glucose 6 phosphate ; HL – lipase hépatique ; FATP – *fatty acid transport protein* ; CPT1 – carnitine palmitoyltransférase 1 ; SCD1 – stéaroyl-CoA désaturase ; DGAT – diacylglycérol transférase ; ChREBP – *carbohydrate responsive element binding protein* ; SREBP1c – *sterol regulatory element binding protein 1c*.

2. Le GLP-1 et les maladies métaboliques

Du fait de ses fonctions d'incrétine, de contrôle de la prise alimentaire, de régulation de l'adipogenèse..., il n'est pas surprenant que le GLP-1 soit étroitement associé à l'étiologie des maladies métaboliques que sont l'obésité et le DT2.

a) GLP-1 et obésité

Certaines études montrent une diminution de la sécrétion de GLP-1 stimulée par du glucose chez les patients obèses (Muscelli *et al.*, 2008), alors que d'autres ne perçoivent aucune modification (Knop *et al.*, 2012). Dans les cas où la sécrétion de GLP-1 est effectivement diminuée, plusieurs mécanismes reliés à l'obésité pourraient y contribuer. C'est le cas par exemple du développement de la résistance à la leptine et à l'insuline. En effet, ces deux hormones sont connues pour être des agents sécrétagogues du GLP-1 (Anini & Brubaker, 2003b; Lim *et al.*, 2009) ; leur perte de fonction pourrait donc être associée à une diminution de la sécrétion du GLP-1.

La perturbation de l'effet incrétine par le surpoids et l'obésité est un sujet encore soumis à controverse. En 2008, une étude conclut que : i) l'efficacité de l'effet incrétine est inversement corrélée avec l'IMC des sujets et que ii) l'obésité et l'intolérance au glucose sont deux facteurs indépendants l'un de l'autre conduisant à un défaut d'effet incrétine (Muscelli *et al.*, 2008). Une étude menée récemment chez des adolescents obèses et/ou diabétiques montre également un défaut d'effet incrétine chez les sujets obèses ayant une tolérance au glucose normale. Toutefois, ils concluent qu'il ne s'agit que d'un artefact et que les calculs sont faussés par une forte SISG chez ces sujets (Aulinger *et al.*, 2016).

Cette potentielle perte de fonction de l'effet incrétine en cas d'obésité pourrait avoir plusieurs origines : i) une diminution des taux plasmatiques des incrétones, le GLP-1 et/ou le GIP et ii) une réduction de leurs capacités insulino-tropiques. Quoi qu'il en soit, une perte d'efficacité du GLP-1 pourrait également avoir des effets délétères sur la vitesse de la vidange gastrique et les effets satiétogènes d'un repas. Ainsi, si la prise de masse corporelle entraîne un défaut de GLP-1 et que le défaut de GLP-1 entraîne une prise de masse, il pourrait s'agir ici d'un cercle vicieux dont il est laborieux de sortir et expliquant, entre autres, pourquoi il est difficile de réduire sa masse corporelle.

b) GLP-1 et diabète de type 2

Le DT2 est une pathologie associée à une forte altération de l'effet incrétine. Cette observation réalisée pour la première fois en 1986 a été citée de nombreuses fois et récemment confirmée (Nauck *et al.*, 1986; Muscelli *et al.*, 2008; Aulinger *et al.*, 2016). L'origine de ce dysfonctionnement des incrétones est controversée. Des études montrent une diminution de la sécrétion de GLP-1 chez les patients atteints de DT2 (Muscelli *et al.*, 2008), d'autres n'observent aucun changement en terme de quantité de GLP-1 sécrétée (Vollmer *et al.*, 2008) et d'autres encore montrent une augmentation du GLP-1 total chez des sujets diabétiques de type 2 et obèses par rapport à des patients obèses non diabétiques (Aulinger *et al.*, 2016). Une méta-analyse sur ce sujet conclut à la nécessité d'une étude de cohorte longitudinale, afin de pouvoir réellement statuer sur l'éventuelle diminution de sécrétion de GLP-1 en cas de DT2 (Nauck *et al.*, 2011).

En plus d'une modification des quantités de GLP-1 produites, un amenuisement de son effet insulinothrompique pourrait aussi contribuer à l'altération de l'effet incrétine. A ce sujet aussi, les données scientifiques sont contradictoires. L'infusion de GLP-1 à une dose physiologique est capable d'induire une sécrétion d'insuline chez des sujets sains mais est complètement inefficace chez des sujets diabétiques de type 2 (Højberg *et al.*, 2009). Toutefois, une étude légèrement plus ancienne montre : i) qu'une infusion physiologique de GLP-1 rétablit la sécrétion d'insuline en cas de DT2 mais ii) que les doses supra-physiologiques sont beaucoup plus efficaces chez les sujets sains que chez les sujets diabétiques (Kjems *et al.*, 2003). Cette disparité pourrait s'expliquer par l'état d'avancement du DT2 ainsi que par sa prise en charge médicale. La conservation des effets insulinothrompiques du GLP-1 à fortes doses est la base de la plupart des traitements thérapeutiques en diabétologie : agonistes du GLP-1R, analogues du GLP-1, inhibiteurs de l'enzyme DPP-IV...

3. Les maladies métaboliques et l'inflammation à bas bruit

L'obésité et le DT2 sont associés à un dérèglement de la réponse inflammatoire de l'organisme qui se caractérise par le développement d'une inflammation chronique de faible intensité, aussi appelée inflammation à « bas bruit ». L'origine moléculaire de cet état inflammatoire ainsi que sa causalité sur l'étiologie des maladies métaboliques sont le sujet

d'actives recherches. Cette inflammation à bas bruit serait initiée et nourrie par deux composantes : i) une composante « stérile » initiée par un excès énergétique dans les différents tissus et principalement dans le tissu adipeux blanc et ii) une composante « infectieuse » à laquelle contribueraient les molécules de LPS issues du microbiote intestinal.

a) Le tissu adipeux : point de départ de l'inflammation « stérile »

Le tissu adipeux blanc est hétérogène dans sa composition, il est constitué de deux fractions principales : i) les adipocytes représentent la majorité des cellules et permettent le stockage/déstockage des composés lipidiques ; ii) la fraction stroma-vasculaire contient principalement les précurseurs des adipocytes, les cellules endothéliales des capillaires, les fibroblastes et enfin les cellules de l'immunité dont les macrophages. En cas de surpoids et d'obésité, les changements architecturaux de ce tissu contribuent fortement aux dysfonctions métaboliques telles que l'inflammation (Martinez-Santibañez *et al.*, 2014). En effet, l'expansion adipocytaire (hyperplasie et hypertrophie) provoque un stress cellulaire inflammatoire pouvant être généré par l'hypoxie ou encore la mort des adipocytes (Cinti *et al.*, 2005; O'Rourke *et al.*, 2011). L'état inflammatoire se traduit par : i) un recrutement de cellules immunitaires et notamment de macrophages, ii) une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, le TNF α et un facteur impliqué dans le chimiotactisme des cellules immunitaires, la protéine *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) (Skurk *et al.*, 2007) ou encore iii) une diminution de la production de l'adiponectine, une adipokine anti-inflammatoire favorisant de plus la sensibilité à l'insuline (Hu *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 2001; Ouchi & Walsh, 2007).

L'inflammation associée à l'obésité est aussi caractérisée par une activation de certaines protéines de l'inflammasome telles que *NLR family pyrin domain-containing 3* (NLRP3), qui active à son tour la caspase 1. Cette dernière est responsable de la production de l'IL-1 β pro-inflammatoire. En cas d'obésité, NLRP3 est activée par les céramides et contribue ainsi à la perturbation de l'homéostasie métabolique du tissu adipeux blanc, du foie ou encore des muscles (Vandanmagsar *et al.*, 2011).

Le récepteur TLR4 contribue aussi à l'état inflammatoire de ces organes. En effet, présent à la surface des cellules constitutives et des macrophages, il peut être activé par les acides gras saturés. Son activation dans le tissu adipeux blanc est augmentée par

l'administration d'un régime riche en graisses saturées. La déficience en TRIF et MyD88 protège les souris de l'inflammation du tissu adipeux blanc et de l'altération de la sensibilité à l'insuline provoquées par un régime riche en graisses (Lee *et al.*, 2001; Caesar *et al.*, 2015).

L'excès d'énergie apportée par l'alimentation conduit à un stress métabolique général et à une activation continue des voies inflammatoires au sein de différents tissus. Du fait de sa fonction primaire de stockage de l'excédent, le tissu adipeux semble être le premier impacté par une alimentation trop riche. Dans les autres organes tels que le foie et les muscles squelettiques, le stress métabolique est induit non seulement par l'excès alimentaire, mais aussi par le relargage d'acides gras et de molécules pro-inflammatoires du tissu adipeux en souffrance. Toutefois, la lipolyse du tissu adipeux, plus que son inflammation, semble être à l'origine de l'insulino-résistance (Morigny *et al.*, 2016).

b) Le microbiote et l'endotoxémie métabolique

Des travaux de recherche utilisant des souris axéniques ont montré que le microbiote intestinal exerce un rôle non négligeable dans le développement de l'obésité, de la stéatose hépatique ou encore de la résistance à l'insuline (Bäckhed *et al.*, 2004, 2007; Rabot *et al.*, 2010; Le Roy *et al.*, 2013). De plus, une étude de 2013 met en avant un lien entre la richesse du microbiote (d'un point de vue diversité génétique et donc quantité d'espèces bactériennes présentes) et le statut métabolique des individus. Les personnes avec une richesse bactérienne faible se caractérisent par une adiposité plus marquée, un statut inflammatoire plus prononcé ou encore une résistance à l'insuline plus développée (Le Chatelier *et al.*, 2013). Cependant, à l'heure actuelle il est encore difficile de dire si ces modifications du microbiote sont la cause ou la conséquence de ces désordres métaboliques. Un nombre croissant d'études scientifiques suggère que le microbiote et ses composés pro-inflammatoires peuvent contribuer à l'étiologie des maladies métaboliques en favorisant le développement de l'inflammation à bas bruit.

L'obésité et les régimes riches en graisses sont associés à une altération de la perméabilité intestinale chez des souris obèses (Brun *et al.*, 2007). Les molécules de LPS luminales peuvent ainsi plus facilement passer la barrière intestinale et se retrouver dans la circulation sanguine. Des études menées chez l'animal ont montré qu'effectivement l'administration d'un régime riche en graisses s'accompagne d'une augmentation modérée des taux de LPS plasmatiques (Cani *et al.*, 2007a, 2007c). C'est ainsi qu'est né le concept

d'« endotoxémie métabolique » pour désigner cette légère augmentation continue des LPS plasmatiques. La notion d'endotoxémie métabolique a ensuite été étendue à des études chez l'Homme (Erridge *et al.*, 2007; Pussinen *et al.*, 2011; Pendyala *et al.*, 2012). Les LPS étant des molécules avec un fort potentiel pro-inflammatoire, l'endotoxémie métabolique générée par les régimes riches en graisses pourrait contribuer à l'installation et à la maintenance de l'inflammation à bas bruit associée aux maladies métaboliques.

Il a par exemple été montré que l'induction expérimentale d'une endotoxémie métabolique, par une diffusion continue de faibles doses de LPS, favorise la prolifération de précurseurs adipocytaires, l'accumulation de masse grasse et le développement de la résistance à l'insuline (Cani *et al.*, 2007a; Luche *et al.*, 2013). Les effets délétères des régimes riches en graisses sur la perméabilité intestinale et sur l'apparition de l'endotoxémie métabolique sont de plus diminués par le traitement antibiotique des souris. En plus d'une réduction des taux de LPS plasmatiques, les souris traitées aux antibiotiques présentent également une diminution de la masse grasse, une expression moindre des marqueurs d'une infiltration macrophagique dans le tissu adipeux ainsi qu'une meilleure tolérance au glucose (Cani *et al.*, 2008).

Toutefois, l'augmentation de l'endotoxémie induite par l'administration d'un régime riche en graisses et l'implication de ces LPS plasmatiques dans l'apparition des maladies métaboliques sont deux faits scientifiques encore controversés et remis en question à l'heure actuelle. Il a par exemple été montré que : i) chez la souris et chez l'Homme, les régimes riches en graisses ne sont pas toujours associés à une augmentation basale de l'endotoxémie, ii) les LPS plasmatiques ne sont pas forcément nécessaires pour expliquer les effets du microbiote sur l'adiposité et le métabolisme glucidique, iii) chez des rats, l'infusion continue de faibles doses de LPS en intrapéritonéal ou par voie portale, pendant 60 et 28 jours respectivement, n'altère pas leur sensibilité à l'insuline et iv) toujours chez des rats, l'administration continue d'une faible dose de LPS pendant 90 jours ne modifie pas la masse corporelle des animaux (Smith *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Caesar *et al.*, 2012; Dudele *et al.*, 2015; Janssen & Kersten, 2016). Des études sont donc encore nécessaires pour conclure quant à l'existence d'un lien entre LPS et maladies métaboliques et, le cas échéant, pour comprendre la nature de ce lien.

c) La détoxification des LPS par la PLTP et les maladies métaboliques

Pour rappel, la PLTP est impliquée dans la détoxification des LPS par voie biliaire en favorisant la fixation de ces LPS sur les lipoprotéines circulantes. Les animaux déficients en PLTP sont donc plus sensibles à ces molécules de LPS en cas de choc endotoxique (Gautier *et al.*, 2008). De plus, la capacité des LPS à induire le GLP-1 et la SISG est également exacerbée chez ces animaux (Nguyen *et al.*, 2014). Les souris PLTP KO pourraient donc être un bon modèle pour étudier les effets d'une endotoxémie métabolique prolongée.

Plusieurs données de la littérature démontrent un lien entre activité PLTP et désordres métaboliques, même si celui-ci n'est pas encore clairement établi. En effet, différentes études cliniques montrent une augmentation des niveaux plasmatiques de PLTP chez les sujets obèses ainsi qu'une association positive avec des paramètres de l'insulino-résistance (Dullaart *et al.*, 1994; Murdoch *et al.*, 2000; Kaser *et al.*, 2001). Chez des patients diabétiques de type 2, une augmentation de l'activité de la PLTP plasmatique a été retrouvée (Dullaart *et al.*, 2007). Si toutes ces études suggèrent que la PLTP pourrait être impliquée dans le développement du DT2, une seule étude vient de mettre en évidence qu'une augmentation de l'activité PLTP plasmatique pourrait prédire un risque accru de développer cette pathologie (Abbasi *et al.*, 2015). L'activité PLTP est donc considérée comme un facteur contribuant à l'apparition des désordres métaboliques et non l'inverse. Toutefois, des travaux de 2005 montrent qu'au contraire, la perte de fonction de la PLTP pourrait favoriser le développement des maladies métaboliques. En effet, chez l'Homme, le polymorphisme du gène codant pour la PLTP humaine est associé à un tour de taille augmenté et un risque accru de devenir obèse (Bossé *et al.*, 2005).

Des études sont donc encore nécessaires pour réellement comprendre les relations entre PLTP et désordres métaboliques ainsi que pour déterminer si cela est en lien avec la capacité de cette protéine à neutraliser les LPS.

d) L'endotoxémie et l'homéostasie glucidique

D'une manière générale, lorsque les LPS pénètrent dans la circulation sanguine, de profondes modifications des métabolismes lipidiques, protéiques et glucidiques peuvent se produire (Fong *et al.*, 1990). Parmi elles, les perturbations du métabolisme glucidique sont

étudiées depuis de nombreuses années (Zeckwer & Goodell, 1925) et sont particulièrement complexes car les effets des LPS varient notamment en fonction de la durée d'exposition et de la dose administrée.

Les patients en soins intensifs atteints d'un sepsis (très fortes concentrations plasmatiques de LPS en continu) présentent une hyperglycémie au court terme mais sont propices à une hypoglycémie sur le long terme (Miller *et al.*, 1980; Hirasawa *et al.*, 2009). Chez l'Homme sain, une endotoxémie expérimentale s'accompagne d'une augmentation de l'insulino-sensibilité 2 heures après l'injection de LPS alors qu'une insulino-résistance est observée après 7 heures et 24 heures (Agwunobi *et al.*, 2000; Mehta *et al.*, 2010). L'administration de LPS lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez des volontaires sains conduit à une amélioration de l'insulino-sensibilité périphérique et hépatique (van der Crabben *et al.*, 2009).

L'administration aiguë ou continue de faibles doses de LPS s'accompagne d'une amélioration de la clairance du glucose (van der Crabben *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2014). Ces effets peuvent être expliqués : i) par la capacité des LPS à stimuler la sécrétion d'insuline au niveau du pancréas (Vives-Pi *et al.*, 2003) ou encore ii) par le fait que l'administration de faibles doses de LPS entraîne une augmentation des taux de GLP-1 circulants associée à une induction de la SISG (Nguyen *et al.*, 2014). Dans cette dernière étude, l'utilisation de souris déficientes en GLP-1R ou encore le traitement pharmacologique des animaux avec un antagoniste du GLP-1R annule les effets des LPS sur l'insuline. Ces données suggèrent donc un rôle important du GLP-1 en tant que médiateur dans les effets des LPS sur le métabolisme glucidique.

De façon surprenante, dans ce contexte, la hausse de l'endotoxémie semble avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme glucidique en induisant les taux plasmatiques d'hormones responsables de la régulation de la glycémie que sont l'insuline et le GLP-1. Ces hormones présentent également des propriétés anti-inflammatoires. Leur induction dépendante des LPS pourrait, à première vue, être une réponse physiologique afin de réduire les effets délétères d'une inflammation induite par les LPS. Toutefois, sur le long terme, la stimulation prolongée d'insuline pourrait contribuer au syndrome hyperinsulinémique et ainsi participer à l'apparition de la résistance à l'insuline et des maladies métaboliques.

OBJECTIFS

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le contexte scientifique ayant été décrit au travers des trois chapitres de l'étude bibliographique. Deux projets de recherche bien distincts ont été menés au cours de ce doctorat. Ils ont eu pour but d'étudier les liens entre LPS et GLP-1 et cela à deux échelles différentes : moléculaire et physiologique.

**Lipopolysaccharides et glucagon-like peptide 1 :
des mécanismes moléculaires à la physiopathologie**

PARTIE 1

Quels sont les mécanismes moléculaires reliant les LPS au GLP-1 et quelles en sont les conséquences physiologiques ?

Il a récemment été montré dans notre laboratoire que les endotoxines bactériennes sont capables d'augmenter les taux circulants de GLP-1 actif (Nguyen *et al.*, 2014). L'objectif de ce projet de recherche est d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de cette induction du GLP-1 actif par les LPS. Pour cela, nous avons voulu répondre aux questions suivantes :

- S'agit-il d'une augmentation de sa sécrétion et/ou d'une diminution de sa dégradation ?
- Les LPS peuvent-ils agir au niveau des EEC de type L productrices de GLP-1 ?
Si oui, par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) ?
- Cette cascade LPS / GLP-1 découverte chez les souris est-elle fonctionnelle chez l'Homme ?
Si oui, quelle est sa pertinence physiologique ?

PARTIE 2

Quelles sont les conséquences physiopathologiques d'une augmentation de l'endotoxémie et de la cascade LPS / GLP-1 / insuline dans le développement des maladies métaboliques telles que l'obésité et le DT2 ?

Les régimes hyperlipidiques augmenteraient les taux de LPS plasmatiques. Cette endotoxémie qualifiée de « métabolique » contribuerait à l'inflammation à bas bruit associée aux pathologies telles que l'obésité et le DT2 et en favoriserait ainsi le développement. De plus, les LPS sont capables de stimuler la sécrétion d'insuline *via* la cascade LPS / GLP-1 / insuline décrite récemment (Nguyen *et al.*, 2014). L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de cette cascade en conditions obésogéniques. Dans ce contexte, nous nous sommes posé les questions suivantes :

- Quelles sont les conséquences d'une endotoxémie métabolique expérimentale lorsque celle-ci est couplée à l'administration d'un régime riche en graisses ?
- La PLTP étant impliquée dans la détoxification des LPS, les souris déficientes en PLTP sont plus sensibles aux LPS. Sont-elles également plus sensibles au développement des maladies métaboliques lors d'un régime riche en graisses ?

MATERIELS & METHODES

I. Expérimentations *in vivo* chez des volontaires sains

En collaboration avec le Docteur P. Pickkers (Université de Radboud, Nimègue, Pays-Bas), une endotoxémie expérimentale a été induite chez des volontaires sains. Les sujets sont des hommes de 18 à 35 ans, sans antécédents médicaux et / ou prise de traitement médical particulier. La solution de LPS (LPS purifié d'*E. coli* ; US Standard Reference Endotoxin *E. coli* O:113 ; Pharmaceutical Development Section of the National Institutes of Health, Bethesda, USA) a été administrée à 15 sujets par voie intraveineuse (IV) sous forme d'un bolus de 2ng/kg. Le groupe Placebo est également constitué de 15 sujets ayant aussi reçu un bolus en IV mais ne contenant pas de LPS. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant ainsi que 3 et 6 heures après le bolus. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une canule artérielle. Les tubes de sang ont été centrifugés dans les 10 minutes suivant le prélèvement à 2000 g pendant 10 minutes et à 4°C. Le plasma récupéré a été initialement stocké à -20°C durant 24 heures maximum avant d'être stocké à -80°C (plasma collecté sur tubes EDTA et Lithium Héparine).

II. Expérimentations *in vivo* sur souris

1. Animaux

Les animaux utilisés pour ces travaux de thèse étaient des souris mâles C57BL6/J sauvages (*wild-type* ou WT) ou génétiquement modifiées âgées de 8 à 12 semaines au début des expérimentations. Les souris WT provenaient de l'élevage de l'animalerie centrale de l'Université de Bourgogne ou de l'élevage Charles River, les souris déficientes en PLTP (PLTP KO) et les souris déficientes en TLR4/2 (TLR4/2 KO) sont issues de l'élevage de l'animalerie centrale de l'Université de Bourgogne et enfin les souris déficientes en IL-6 (IL-6 KO) proviennent de l'I2MC à Toulouse (don du Docteur V. Douin). Tous les animaux étaient logés dans un environnement contrôlé en température et en humidité avec un cycle jour/nuit de 12 heures (allumage à 7 heures). Selon les expériences, ils étaient soit nourris avec un régime standard (régime A03, Safe), soit avec un régime obésogène riche en graisses saturées (*high-*

fat ou HF ; S9572-E020, D12492, 60% kJ de graisses saturées, Ssniff), soit avec le régime contrôle correspondant au régime HF (*low-fat* ou LF ; E157453-04, D12450J, 10% kJ de graisses saturées, Ssniff). La nourriture et l'eau étaient en accès libre dans les cages. La masse corporelle et la prise alimentaire des animaux nourris avec les régimes HF et LF ont été régulièrement mesurées. Toutes les expérimentations impliquant des animaux ont été effectuées conformément aux directives institutionnelles et approuvées par le Comité d'Ethique de l'Université de Bourgogne (protocole numéro 5459).

2. Etude des effets d'une administration aiguë de LPS

Les LPS étaient de la souche *Escherichia coli* 055:B5 (L2880, Sigma). La solubilisation des LPS dépendait des voies d'administration : i) solubilisation dans du sérum physiologique 0,9% (NaCl ; Versol®, Aguetant) stérile quand l'administration des LPS se faisait par voies intrapéritonéale (IP) et intraveineuse ou ii) solubilisation dans de l'eau de boisson quand l'administration des LPS se faisait par un gavage oral. Dans tous les cas la préparation des solutions de LPS nécessite un protocole précis afin d'obtenir une reproductibilité maximale entre les différentes expérimentations car la qualité de la solubilisation et donc les effets biologiques des LPS en dépendent : vortex 1 minute, sonicateur 30 secondes puis à nouveau vortex pendant 1 minute. L'atropine (4301196, Aguetant) a été préparée dans du NaCl stérile et a été injectée en IP à raison de 1mg/kg 10 minutes avant et 90 minutes après l'injection IP de LPS. Le glucose (2mg/kg dans de l'eau de boisson ; G8270, Sigma) et l'huile de maïs (500µL/souris ; C8267, Sigma) ont été administrés par voie orale respectivement 15 minutes et 30 minutes avant l'injection IP de LPS. Les prélèvements sanguins ont été réalisés à différents temps après l'administration des LPS : 3, 6, 12 et/ou 24 heures.

3. Induction d'une colite aiguë par un traitement au DSS

La colite aiguë a été générée par l'administration de dextran sodium sulfate (DSS ; 40kDa ; 42867, Sigma) dans de l'eau de boisson à raison de 2,5% (m/v) pendant 7 jours. L'eau du biberon contenant ou non le DSS était changée tous les jours pour éviter une éventuelle contamination microbienne. Les souris étaient pesées tous les jours pour évaluer les effets du DSS. Après le traitement au DSS, du LPS a été administré par voie orale (5mg/souris). Les

prélèvements sanguins pour les dosages des LPS et du GLP-1 ont été réalisés par voie rétro-orbitaire avant, 3 heures et 6 heures après l'administration de LPS.

4. Modèle d'ischémie/reperfusion mésentérique

Les souris ont été divisées en deux groupes : opération contrôle (sham) et opération d'ischémie/reperfusion (I/R). Les souris sham ont reçu exactement la même procédure chirurgicale que les souris I/R sauf que l'artère n'a pas été clampée. Les animaux ont été anesthésiés par une inhalation d'isoflurane et allongés sur le dos sur des plaques chauffantes permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. Une laparotomie médiane a été réalisée et l'artère mésentérique supérieure a été isolée. L'ischémie a été induite par la pose d'un clamp sur l'artère mésentérique afin de bloquer la circulation sanguine pendant 5, 10, 15 ou 20 minutes. L'ischémie était suivie d'une reperfusion pendant 15, 30, 45, 60, 120 ou 360 minutes (retrait du clamp). L'ischémie intestinale était confirmée visuellement par un changement de couleur de l'intestin et des vaisseaux sanguins qui l'entourent et la reperfusion par le retour des pulsations et de la couleur rosée/rouge. L'antagoniste TLR4 (TAK-242, 614316, Millipore) a été solubilisé dans une émulsion eau/huile (50/50 v/v) et a été injecté en IP à 10mg/kg 3 heures avant l'expérience d'I/R. La polymyxine B Sulfate (P0972, Sigma) a été administrée à 0,2mg/mL dans de l'eau de boisson pendant 14 jours avant l'I/R. Les prélèvements sanguins (circulations systémique et portale) ont été réalisés pour doser le GLP-1 et les LPS. La partie distale de l'intestin (iléon) a été prélevée et directement fixée dans du formol (10%) pour des analyses histologiques. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

5. Implantation IP de pompes osmotiques de type Alzet®

Les souris ont été acclimatées au régime obésogène 7 jours avant l'implantation des pompes osmotiques (model 1004, Alzet®). Le modérateur de débit métallique des pompes a été remplacé par un modérateur de débit plastique (*peek micro medical tubing*, 0002612, Alzet) 24 heures avant le remplissage afin de pouvoir par la suite utiliser la technologie EchoMRI®. Les pompes ont été remplies 48 heures avant l'implantation avec du NaCl stérile ou une solution de LPS provenant de la souche *Escherichia coli* 055:B5 (LPS B5 Ultrapure, tlr1-pb5lps,

Invivogen) et ont été placées dans du NaCl stérile à 37°C pendant 48 heures. La solution de LPS a été réalisée dans du NaCl stérile et la concentration a été calculée en fonction de la masse moyenne des animaux et du débit exact des pompes osmotiques de façon à obtenir un débit de diffusion de 300µg/kg/jour ou de 10µg/kg/jour selon les expérimentations. Pour l'implantation IP, les animaux ont été anesthésiés par une inhalation d'isoflurane et allongés sur le dos sur des plaques chauffantes permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. Une laparotomie médiane a été réalisée, de taille suffisante pour pouvoir insérer la pompe osmotique dans la cavité péritonéale. La paroi abdominale a ensuite été suturée et la peau agrafée. La masse corporelle et la prise alimentaire sont suivies régulièrement au cours des 28 jours d'infusion de NaCl ou de LPS.

6. Tests de tolérance orale au glucose (OGTT) et test de tolérance à l'insuline (ITT)

Les animaux ont été placés sur des grilles de mise à jeun et leur nourriture a été retirée 6 heures avant le début des expériences. Une solution de glucose (150 ou 200g/L dans de l'eau de boisson ; G8270, Sigma) ou une solution d'insuline (0,03 ou 0,05u/mL dans du NaCl ; Humalog 100UI/mL, Lispro, Lilly) sont préparées. Le glucose ou l'insuline sont administrés à raison de 1,5 ou 2g/kg pour le glucose (OGTT) et 0,3 ou 0,5u/kg pour l'insuline (ITT). Le glucose est administré par voie orale à l'aide d'une canule de gavage et l'insuline est injectée en IP. La glycémie est mesurée au cours du temps par la veine caudale et grâce à un lecteur de glycémie (OneTouchUltra, Lifescan). Pour l'OGTT, les mesures se font avant ainsi que 15, 30, 60, 90, 120 et 210 minutes après le gavage. Pour l'ITT, les mesures se font avant ainsi que 30, 60, 90, 120 et 150 minutes après l'injection.

7. Clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques

Les clamps ont été réalisés sur des souris nourries avec un régime obésogène et ayant reçu une infusion continue de NaCl ou de LPS à 300µg/kg/jour pendant 28 jours. La nourriture a été restreinte la veille de l'expérimentation (environ 15 heures avant). Les animaux ont été anesthésiés par une injection IP de pentobarbital sodique à 50mg/kg. Une chirurgie a ensuite été réalisée afin d'isoler et de cathétériser la veine jugulaire droite de l'animal. Pour le clamp, la solution d'insuline (Novorapid, Novo Nordisk) contenant le traceur radioactif (glucose tritié,

[3-³H] glucose, Perkin Elmer) a été préparée de façon à ce que les souris reçoivent 8mU/kg/min. Le débit de perfusion du glucose 15% (G-20, 12606029_1215, B. Braun) a été modulé de façon à obtenir une stabilisation de la glycémie. Les animaux anesthésiés ont été installés sur des coussins chauffants. La glycémie a été suivie par la veine caudale grâce à un lecteur de glycémie toutes les 10 minutes pendant minimum 2 heures et jusqu'à stabilisation. Des échantillons de sang (10µL) ont été prélevés à 10 minutes d'intervalle pendant les 30 dernières minutes (glycémie stabilisée) afin de doser le [3-³H] glucose ; prélèvements réalisés par la veine caudale dans des tubes EDTA. Les taux d'apparition (Ra) et de disparition (Rd) du glucose ont été calculés par le rapport du débit de perfusion du [3-³H] glucose sur l'activité spécifique retrouvée dans les échantillons de plasma des 30 dernières minutes. Ce calcul prend aussi en compte la masse de l'animal ainsi que la glycémie de stabilisation. La production hépatique de glucose (HGP) a été calculée en retirant le taux de perfusion du glucose (GIR) à la vitesse d'apparition du glucose Ra. D'autres échantillons de sang ont été prélevés (sur tubes EDTA) afin de mesurer l'insulinémie avant et à la fin du clamp. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

8. Imagerie préclinique PET/CT : visualisation de la distribution du glucose

Imagerie PET

L'imagerie préclinique, tomoscintigraphie par émission de positons (PET), a été réalisée au Centre Georges François Leclerc de Dijon (CGFL) sur des animaux nourris avec un régime obésogène et ayant reçu une infusion continue de NaCl ou de LPS à 300µg/kg/jour pendant 28 jours. Les souris ont été mises à jeun (retrait de la nourriture) pendant 6 heures avant le début de l'expérience. Les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (4% pour l'induction puis 2%) et placés sur une plaque chauffante. Un cathéter (PE10) muni d'un port d'injection (volume mort de 8 µL) a été implanté au niveau de la veine caudale latérale afin de pouvoir ultérieurement injecter le fluorodésoxyglucose (¹⁸F-FDG). Les animaux maintenus sous anesthésie ont été placés sur le lit d'imagerie chauffé de l'appareil BioPET/CT (Bioscan). Le bout du cathéter a été relié à une seringue contenant 15-20 MBq de ¹⁸F-FDG. L'injection de ¹⁸F-FDG a été réalisée et a tout de suite été suivie d'une injection de sérum physiologique pour nettoyer le cathéter de toute trace de ¹⁸F-FDG. L'acquisition de 45 minutes a été lancée (acquisition dynamique, mode liste, 46 mm axial FOV, 250-700 keV) simultanément avec le début de l'injection. La largeur du champ d'acquisition ne nous permettait pas d'avoir l'animal

dans sa globalité, les pattes arrière (muscles squelettiques) ont été privilégiées au détriment du cerveau. Un scanner CT de la même région a ensuite été réalisé (150 μ A, 45 kV, 360 projections, 2 coups/projection). A la fin de l'acquisition, les souris ont été euthanasiées par injection IP d'une surdose de pentobarbital sodique.

Reconstruction des images PET/CT

La technique de tomoscintigraphie par émission de positons couplée à la correction d'atténuation (PET/CT) a donc été utilisée. Les traitements d'images sont réalisés à l'aide du logiciel VivoquantTM (Invicro, Boston, USA). Deux types de reconstructions ont été réalisés. La première a consisté à extraire 45 coupes de 1 minute de l'acquisition de 45 minutes afin de construire les courbes d'activité en fonction du temps. La deuxième a consisté en une reconstruction statique en se basant sur les 45 minutes d'acquisition pour pouvoir déterminer les contours des organes d'intérêts et évaluer le métabolisme du glucose dans chaque organe.

Analyses

Les contours des organes ont été tracés sur toutes les coupes et un volume d'intérêt (VOI) a été obtenu en additionnant les résultats de chacune des coupes. Puis, les VOI ont été superposées sur les images PET obtenues à la fois à partir des reconstructions dynamiques de 1 minute et à la fois à partir des reconstructions statiques correspondant aux 5 dernières minutes d'acquisition. Le SUV max correspond à la valeur maximale des SUV de l'organe d'intérêt. Les SUV sont calculés d'après la formule suivante :

$$\text{SUV} = \frac{(\text{activité en cps/cc dans ROI})(\text{facteur de calibration en Bq/cps})(1 \times 10^6)}{(\text{Scantime dose en MBq}) / \text{poids de l'animal en g}}$$

Avec :

- Activité en cps/cc dans ROI : déterminé après la délimitation de la région d'intérêt (ROI), activité maximale pour SUV max.
- Facteur de calibration en Bq/cps : déterminé par un contrôle qualité standard de la procédure PET

- La *Scantime* dose en MBq : calculée à partir de la dose injectée (activité totale de la seringue avant l'injection – activité restante dans la seringue après l'injection en prenant en compte la décroissance radioactive entre les deux mesures) ajustée à la durée de l'imagerie PET.

9. Mesure de la composition corporelle par spectroscopie RMN (EchoMRI®)

L'EchoMRI® est une procédure qui utilise un spectroscope par résonance magnétique nucléaire (RMN) permettant de déterminer la composition corporelle de l'animal (masse grasse, masse maigre et eau libre). Les animaux sont dans un premier temps pesés, puis placés vigiles dans un tube de contention spécifique à l'appareil (EchoMRI 500T ; EchoMRI, Houston, USA). Le tube est ensuite inséré dans l'appareil. La séquence de mesure est lancée et dure trois minutes.

10. Mesure de la dépense énergétique en cages métaboliques

L'étude de la dépense énergétique a été réalisée par calorimétrie indirecte. Les mesures ont été réalisées sur un système CLAMS à circuit ouvert contrôlé par ordinateur (Oxymax Comprehensive Lab Animal Monitoring System ; Columbus Instruments). Afin de limiter les effets du stress dû à la modification de leur environnement, les souris ont été acclimatées au protocole de test (cage de calorimétrie, ventilation,...) pendant 48 heures avant l'expérience. La mesure de la dépense énergétique a été réalisée pendant 24 heures en respectant le cycle jour / nuit et avec un débit d'air de 0,6 L/min. Les gaz évacués des chambres ont été échantillonnés pendant 45 secondes toutes les 20 minutes après une période de purge de 90 secondes. Les volumes d'oxygène (V_{O_2}) consommés et de dioxyde de carbone (V_{CO_2}) produits ont été quantifiés par l'analyse des gaz échantillonnés au travers du détecteur à oxygène et dioxyde de carbone. Avant le début de l'expérimentation, une calibration des détecteurs a été réalisée grâce à un mélange de calibration spécifique contenant à la fois de l'oxygène, du dioxyde de carbone et de l'azote (Air Liquide). Une prise de référence grâce à l'air ambiant a été réalisée toutes les 8 mesures. Le ratio de la production de dioxyde de carbone et la consommation d'oxygène a été calculé (QR : quotient respiratoire ou RER : *respiratory exchange ratio* au choix). A la fin de l'expérimentation les données de composition corporelle mesurées au préalable par

EchoMRI® ont permis l'ajustement de la dépense énergétique [production de chaleur : $(3,815 + 1,232 \times QR) \times V_{O_2}$] à la masse métaboliquement active des animaux selon la procédure décrite par Even et Nadkarni 2012 (Masse maigre + 0,2 Masse grasse) (Even & Nadkarni, 2012). Au cours de l'expérimentation, les déplacements des animaux à l'intérieur de la cage ont été mesurés ainsi que la consommation d'eau et de nourriture en temps réel.

11. Mesure de la sécrétion des VLDL hépatiques et des chylomicrons intestinaux

Une solution de poloxamer-407 (Lutrol® F 127, 51632903, BASF), un inhibiteur de la LPL, a été préparée la veille des expériences à 75mg/mL dans du PBS stérile (DPBS, BE17-512F, Lonza) préalablement refroidi. La préparation de la solution nécessite de vortexer la préparation régulièrement (toutes les 15 minutes environ) et vigoureusement pendant 2 heures puis de la laisser toute la nuit à 4°C sous agitation douce. Le poloxamer-407 est injecté en IP à raison de 1g/kg. Les animaux ont été mis sur grilles de mise à jeun avec retrait de la nourriture 4 heures avant l'injection de poloxamer-407. Pour l'évaluation de la sécrétion des VLDL hépatiques, du sang a été prélevé (tubes EDTA) par la veine caudale avant puis 30 minutes, 1 et 2 heures après l'injection de poloxamer-407 afin de doser les TG circulants. Pour l'évaluation de la sécrétion des CM intestinaux, un gavage avec de l'huile de maïs (C8267, Sigma) à raison de 500µL/animal a été réalisé 1 heure après l'injection de poloxamer-407 ; du sang a été prélevé (tube EDTA) par la veine caudale avant puis 1, 2 et 4 heures après le gavage avec de l'huile afin de doser les TG circulants.

12. Prélèvements de sang, de plasma et d'organes

Le sang a été prélevé dans des tubes spécifiques revêtus avec de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (BD Vacutainer® K2E Tubes, 365975, Odil ; Microvette®, CB300K2E, 16.444, Sarstedt) afin de prévenir la coagulation. Les prélèvements ont été effectués dans les circulations systémique (voies rétro-orbitaire et caudale ou ponction cardiaque sur animaux anesthésiés) et/ou portale (veine porte). Si nécessaire, le plasma a été séparé par centrifugation à 8000rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les organes sont prélevés le plus rapidement et le plus proprement possible. Ils sont pesés et directement placés dans de l'azote liquide. Tous ces prélèvements ont été réalisés sur des animaux anesthésiés, sauf les prélèvements par voies

caudales et rétro-orbitaires qui peuvent se faire sur animaux vigiles. Les échantillons de sang, de plasma et les organes ont été congelés à -20°C et -80°C pour des analyses ultérieures. Dans certains cas les organes n'ont pas été placés dans l'azote liquide puis congelés, mais ont été immergés dans une solution de formol (10%) pour des examens histologiques.

III. Expérimentations *ex vivo* et *in vitro*

1. Culture cellulaire

Les lignées d'EEC murines utilisées étaient les GLUTag (don du Docteur D.J. Drucker, University of Toronto, Toronto, Canada) et les STC-1 (don du Docteur G. Rindi, Istituto di Anatomia Patologica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma, Italy). Elles ont été cultivées dans du milieu de culture *Dulbecco's modified Eagle's medium* GlutaMAX™ (21885-025, Gibco) contenant 5,6mM de glucose et supplémenté à 10% (v/v) avec du sérum de veau fœtal (10270, Gibco) et à 1% (v/v) avec un cocktail d'antibiotiques comprenant pénicilline et streptomycine (PenStrep, 15140-122, Gibco). Les cellules en culture ont été conservées dans une étuve réglée à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture était changé tous les trois jours. Les cellules étaient décollées à la trypsine (TrypLE™ Express, 12605-028, Gibco) puis repiquées quand elles atteignaient 70-80% de confluence dans la boîte de culture (environ une fois par semaine). Les deux lignées cellulaires utilisées sont connues pour être des modèles fiables d'étude de la sécrétion du GLP-1.

2. Etudes de la sécrétion du GLP-1

a) Ex vivo à partir d'explants d'iléon

Les animaux ont été anesthésiés par une inhalation d'isoflurane et allongés sur le dos sur des plaques chauffantes permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. Une laparotomie médiane a été réalisée et l'intégralité de l'intestin grêle a été retirée. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Seule la partie distale de l'intestin a été conservée pour les expériences du fait de sa forte capacité à sécréter du GLP-1 (8cm pour le profil de sécrétion et 3cm pour les autres expériences). Des morceaux d'intestin de 1cm ont été coupés,

ligaturés d'un côté, remplis avec du NaCl, du glucose 3g/L ou du LPS à différentes concentrations (75, 500 et 1000ng/mL), ligaturés de l'autre côté et incubés dans du milieu de sécrétion à 37°C pendant 1 heure. Le glucose (G8270, Sigma) et les LPS (L2880, Sigma) ont été solubilisés dans du NaCl. Le milieu de sécrétion est un tampon bicarbonate Krebs-Ringer (138mM NaCl, 5,6mM KCl, 2,6mM CaCl₂, 1,2mM MgCl₂, 4,2mM NaHCO₃, 1,2mM NaH₂PO₄ et 10mM hépès) ne contenant pas de glucose, supplémenté avec 0,5% (m/v) d'albumine de sérum bovin (A1595, Sigma) et ajusté à pH 7,4. A la fin de l'incubation, le milieu de sécrétion est prélevé, centrifugé à 800g pendant 5 minutes à 4°C pour retirer les éventuelles particules flottantes, et congelé à -20°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

b) *In vitro* à partir de lignées de cellules L entéroendocrines

Les cellules étaient repiquées dans des plaques 24 puits deux jours avant les expériences afin qu'elles adhèrent correctement au fond de la plaque et qu'elles atteignent 60-80% de confluence. Les cellules étaient lavées le jour de l'expérience avec 500µL de milieu de sécrétion (cellules GLUTag) ou 500µL de milieu de culture (cellules STC-1). Le milieu de sécrétion est le même tampon bicarbonate Krebs-Ringer que celui utilisé pour les explants d'iléon. Les solutions de réactifs à tester ont été incorporées dans du milieu de sécrétion ou du milieu de culture selon les cellules. Les expériences ont été réalisées en incubant les cellules avec 500µL de solution de réactif dans une étude à 37°C et 5% de CO₂. Le glucose (G8270, Sigma) et les LPS (L2880, Sigma) ont été solubilisés dans du NaCl. Une solution stock d'antagoniste TLR4 (TAK-242, 614316, Millipore) a été préparée à 2,8mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; D8418, Sigma). A la fin de l'incubation, le milieu de sécrétion est prélevé, centrifugé à 800g pendant 5 minutes à 4°C pour retirer les éventuelles particules flottantes, et congelé à -20°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

3. Signalisation calcique *in vitro*

Les cellules STC-1 et GLUTag ont été suspendues dans du milieu *Iscove's modified Dulbecco's medium* (12440053, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (10270, Gibco) et repiquées en plaque à 2x10⁵/puits (Willico-Dish). Les modifications intracellulaires des concentrations en calcium (F_{340}/F_{380}) ont été enregistrées avec un microscope Nikon (TiU) équipé avec une caméra EM-CCD (Lucas) pour un enregistrement en temps réel : images 16-

bit digital et objectif sous immersion d'huile S-fluor 40x. Les différents plans ont été pris en suivant des intervalles Z de 0.3µm et le logiciel NIS-Elements a été utilisé pour analyser les images. Les changements intracellulaires de calcium ont été exprimés sous forme de F_{340}/F_{380} . Les données ont été moyennées à partir de plusieurs cellules individualisées (20 à 40 cellules par cycle, entre 3 et 9 répétitions incluant à chaque fois au moins trois préparations cellulaires différentes). Pour les expériences dans du milieu ne contenant pas de calcium, le CaCl_2 a été remplacé par de l'EGTA (2mM). Les expériences ont été réalisées en incubant les cellules avec les différents réactifs : le glucose (G8270, Sigma), les LPS (L2880, Sigma) et l'antagoniste TLR4 (LPS-RS Ultrapure, tlr1-prslps ; Invivogen) ont été solubilisés dans du NaCl.

IV. Méthodes d'analyses et dosages

1. Microscopie optique

Les modifications morphologiques dues au régime obésogène, aux infusions continues de LPS ou encore aux expériences d'I/R ont été examinées dans l'iléon, le tissu adipeux péri-épididymaire (TAPE) et le foie par microscopie optique (x50, x100 et x200 ; Axiovert 25, Zeiss). Les organes ont été fixés pendant 48 heures à température ambiante dans une solution de formaline neutre à 10%. Ils ont ensuite été déshydratés à l'éthanol avant d'être fixés dans de la paraffine pour les analyses histologiques. Les tissus ont été sectionnés (épaisseur de 5µm), déparaffinés avec du xylène et colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine pour les échantillons d'iléon et de TAPE ou avec une coloration Oil Red O pour les échantillons de foie.

2. PCR en temps réel

Les ARN totaux ont été extraits des différents tissus (iléon, muscle, TAPE et foie) en utilisant des kits d'extraction d'ARN RNeasy Mini Kit et en se fiant aux instructions du fabricant : soit le classique pour l'iléon et le foie (74106, Qiagen), soit celui préconisé pour les tissus fibreux pour le muscle (74704, Qiagen), soit celui optimisé pour les tissus gras tels que le TAPE (74804, Qiagen). L'extraction d'ARN a été réalisée avec l'étape de traitement à la DNase pour éliminer les traces éventuelles d'ADN génomique. Les ARN extraits ont été

quantifiés en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) et 500ng d'ARN de chaque échantillon a été transcrit en ADNc en utilisant le kit de transcription inverse High-Capacity cDNA (Multiscribe® reverse transcriptase, 4368813, Applied Biosystems) conformément aux recommandations du fabricant. Les PCR quantitatives ont été réalisées avec l'appareil StepOnePlus (Real-Time PCR System, Applied Biosystems), les technologies SYBRGreen® (4367659, Applied Biosystems) ou TaqMan® (4440040, Applied Biosystems) et des amorces spécifiques des gènes étudiés (séquences disponibles sur demande sauf pour les sondes Taqman®, propriétés de Applied Biosystems). Les niveaux d'expression des ARN messagers (ARNm) des gènes cibles ont été normalisés par rapport aux niveaux d'expression des ARNm de la 36B4. L'expression relative des gènes d'intérêts a été calculée en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. Analyses biochimiques

Les concentrations de LPS ont été mesurées dans le plasma ou dans le sang total provenant des circulations systémique et/ou portale par la quantification du 3-hydroxymyristate (3-HM) en chromatographie liquide à haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (HPLC/MS/MS) en utilisant la procédure précédemment décrite (Pais de Barros *et al.*, 2015). Les lipides totaux dans les fécès ont été extraits par la technique Folch (Folch *et al.*, 1957). Les profils de phospholipides et sphingolipides ont été déterminés selon la méthode précédemment décrite (Anjani *et al.*, 2015). Les kits ELISA suivants ont été utilisés pour réaliser les dosages ci-après à partir de plasma : GLP-1 total (EZGLP1T-36K, Millipore), GLP-1 actif (EGLP-35K, Millipore), GIP (EZRMGIP-55K, Millipore), insuline (80-INSMR-CH10, Alpc) et *intestinal fatty acid binding protein* (I-FABP) (E-EL-M0735, Elabscience). Les cytokines plasmatiques (IL-1 β , IL-6, IL-10 et TNF α) ont été mesurées par Milliplex® Map Kit (MCYTOMAG-70K, Millipore). La lecture a été effectuée sur un appareil LuminexR (Bio-Plex 200, Bio-Rad). Dans l'expérience sur souris IL-6 KO, les niveaux plasmatiques d'IL-6 ont été évalués en utilisant un kit ELISA (EZMIL6, Millipore). Le dosage des TG circulants se fait par méthode enzymatique (Triglycerides FS, Diasys). Tous les kits ont été utilisés conformément aux instructions des fabricants.

4. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant soit le test ANOVA à deux facteurs, soit le test de Student apparié, soit le test non paramétrique de Mann-Whitney selon la normalité des échantillons. De la même manière, l'analyse des corrélations entre deux populations a été effectuée soit avec le test de Pearson paramétrique, soit avec le test de Spearman non paramétrique. Le test d'Agostino's a été utilisé pour tester la normalité des différents groupes. Une correction statistique a été apportée si les variances étaient différentes entre les groupes. Une valeur de $P < 0,05$ était considérée comme statistiquement différente.

RESULTATS

Partie 1

Mécanismes moléculaires

I. Introduction

La principale fonction du tube digestif est d'absorber les nutriments de l'alimentation afin de fournir de l'énergie à l'ensemble de l'organisme. De cette fonction résulte l'existence au niveau intestinal de la plus grande surface d'échange entre l'environnement externe et le milieu intérieur. Le tube digestif dispose de ce fait de mécanismes de défense immunitaires afin de faire face à cette forte vulnérabilité. Au-delà de ses fonctions d'absorption et immunologiques, l'intestin est aussi considéré comme l'organe endocrine le plus conséquent de l'organisme du fait de la présence de nombreuses EEC capables de sécréter diverses hormones. Parmi toutes les hormones intestinales, le GIP et le GLP-1 ont été largement étudiés pour leur effet incrétine (Baggio & Drucker, 2007).

Le GLP-1 est produit par les cellules L entéroendocrines principalement localisées dans l'intestin grêle distal (iléon) et le côlon (Eissele *et al.*, 1992). Ces cellules intestinales expriment le gène codant pour le proglucagon ainsi que l'enzyme spécifique PC1/3 capable d'hydrolyser le proglucagon en plusieurs peptides dérivés dont le GLP-1 (Rouillé *et al.*, 1997). Ces dernières années, le GLP-1 a suscité et suscite toujours un intérêt clinique considérable dans le traitement du DT2, du fait de sa forte implication dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Baggio & Drucker, 2007). Initialement décrit pour son rôle d'incrétine et donc sa capacité insulinothropique au niveau des cellules β du pancréas (Kreymann *et al.*, 1987), le GLP-1 s'est par la suite avéré avoir bien d'autres fonctions dans le métabolisme du glucose. En effet, cette hormone intestinale est aussi capable de stimuler la biosynthèse d'insuline (Drucker *et al.*, 1987), d'inhiber la production de glucagon (Kreymann *et al.*, 1987), de ralentir la vidange gastrique (Nauck *et al.*, 1997) ou encore d'induire une sensation de satiété et donc de réduire la prise alimentaire (Turton *et al.*, 1996). La sécrétion de GLP-1 au niveau des cellules L est principalement stimulée par l'ingestion de nutriments et fait intervenir des mécanismes moléculaires divers et complexes (Lim & Brubaker, 2006; Tian & Jin, 2016). Glucides, lipides et protéines peuvent chacun stimuler la sécrétion de GLP-1 *via* une interaction directe avec leurs récepteurs spécifiques présents sur la membrane apicale des EEC. Cependant la densité la plus élevée de cellules L se situe dans la partie distale de l'intestin et le GLP-1 plasmatique est rapidement induit après un repas, avant même que les nutriments n'aient eu le temps d'atteindre

ces cellules (Borgstrom *et al.*, 1957). Cette disparité temporelle physiologique implique l'existence d'autres voies de contrôle de la sécrétion de GLP-1. C'est ainsi que plusieurs études ont mis en avant des mécanismes de sécrétion hormonaux, neuronaux ou encore neuro-hormonaux faisant intervenir le GIP ou encore le nerf vague et ses récepteurs cholinergiques (Lim & Brubaker, 2006). L'IL-6, une des principales cytokines pro-inflammatoires est également capable de stimuler directement la sécrétion de GLP-1 au niveau des cellules L entéroendocrines (Ellingsgaard *et al.*, 2011).

Le tube digestif est colonisé par des milliards de bactéries jouant un rôle central dans le maintien de la santé humaine. Aussi connu sous le nom de microbiote intestinal, cette communauté bactérienne confère une aide non négligeable à l'intestin dans l'exercice de ses fonctions (Greenhalgh *et al.*, 2016). Parmi ces bactéries se trouvent des bactéries à Gram négatif présentant des molécules de LPS à leur surface. Ces LPS sont de puissantes molécules pro-inflammatoires qui participent à l'immunité intestinale (Otte *et al.*, 2004), et qui sont également capables de stimuler la sécrétion de certaines hormones intestinales (Palazzo *et al.*, 2007; Bogunovic *et al.*, 2007). Les LPS agissent principalement *via* l'activation du récepteur TLR4 (Poltorak *et al.*, 1998). Toutefois des études récentes ont mis en évidence l'existence d'autres voies de signalisation des LPS, les caspases intracellulaires (Hagar *et al.*, 2013; Kayagaki *et al.*, 2013). Nous avons récemment montré au laboratoire et cela a été confirmé par la suite que l'administration de LPS en IP entraîne une augmentation des taux circulants de GLP-1 actif chez des souris (Nguyen *et al.*, 2014; Kahles *et al.*, 2014). Cependant les mécanismes moléculaires à l'origine de cette induction ne sont pas encore élucidés. Le GLP-1 est libéré par les EEC sous une forme active mais est rapidement dégradé par l'enzyme protéolytique DPP-IV. Sa demi-vie plasmatique est très courte, de l'ordre de 1 à 2 minutes seulement (Vilsbøll *et al.*, 2003; Holst, 2007). Ainsi, l'action des LPS sur les taux circulants de GLP-1 actif pourrait se situer au niveau soit de sa sécrétion soit de sa dégradation.

Les LPS sont présents en grandes quantités dans la lumière intestinale et le récepteur TLR4 s'avère être exprimé au niveau des EEC murines (Palazzo *et al.*, 2007; Bogunovic *et al.*, 2007). Par conséquent, il est possible d'envisager une reconnaissance directe des LPS par les cellules L intestinales. De plus, l'importante promiscuité entre les molécules de LPS luminales et les cellules productrices de GLP-1 pose la question de la pertinence physiologique d'une telle relation LPS / GLP-1 et ouvre celle d'un rôle éventuel en conditions physiopathologiques.

Effectivement, il est aisé d'imaginer que des lésions intestinales, qui altèrent l'intégrité de la barrière, pourraient rendre les cellules intestinales plus accessibles aux composés présents dans la lumière de l'intestin tels que les LPS.

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que les LPS sont directement capables d'induire une sécrétion de GLP-1, par l'intermédiaire d'une interaction avec les récepteurs TLR4 des cellules L entéroendocrines. De plus, nous montrons que des molécules de LPS luminales sont capables d'induire une sécrétion de GLP-1 lorsque l'intégrité de la barrière intestinale est altérée. L'ischémie / reperfusion (I/R) mésentérique provoque une stimulation très rapide de la sécrétion de GLP-1. De manière surprenante, nous avons constaté que de courtes I/R permettent d'augmenter de manière significative le GLP-1 plasmatique faisant de cette hormone un potentiel biomarqueur précoce d'une dégradation de la muqueuse intestinale. De plus, nous montrons que cette cascade LPS / GLP-1 initialement découverte chez la souris est aussi fonctionnelle chez l'Homme. Nos résultats ouvrent donc de véritables perspectives en terme de diagnostic et de prise en charge cliniques des pathologies impliquant une altération de la barrière intestinale.

II. Résultats expérimentaux

1. Les LPS augmentent le GLP-1 circulant par une stimulation de sa sécrétion

Nous avons récemment montré au laboratoire que les molécules de LPS sont capables d'induire les taux plasmatiques de GLP-1 actif (Nguyen *et al.*, 2014). Afin de clarifier les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous avons approfondi *in vivo* les effets des molécules de LPS sur le métabolisme du GLP-1. Pour cela, des souris ont été injectées en IP avec une solution de LPS, puis différents paramètres métaboliques ont été suivis sur une période de 24 heures (Figure 30).

Les niveaux plasmatiques de 3-HM (reflétant les niveaux de LPS) sont considérablement induits suite à l'injection IP de LPS, confirmant ainsi l'augmentation aiguë de l'endotoxémie (Figure 30A). L'injection de LPS s'accompagne également d'une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour le proglucagon et l'enzyme protéolytique PC1/3 dans l'iléon (Figures 30B et 30C respectivement). Le GLP-1 étant un peptide dérivé de la maturation protéolytique du proglucagon et l'enzyme responsable étant la PC1/3, ces résultats suggèrent que l'injection IP de LPS est associée à une augmentation de la biosynthèse du GLP-1 au niveau de l'iléon. Nous retrouvons les résultats récemment publiés (Nguyen *et al.*, 2014), à savoir que l'administration aiguë de LPS augmente le GLP-1 actif circulant (Figure 30D). Nous constatons de plus que le GLP-1 total est lui aussi induit par l'élévation de l'endotoxémie (Figure 30E). Le GLP-1 total comprend les formes actives et inactives de l'hormone intestinale. Le dosage du GLP-1 total permet donc d'évaluer les niveaux de sécrétion de GLP-1. Ces résultats indiquent donc que les LPS administrés en aigu sont capables de stimuler la sécrétion de GLP-1. En calculant l'indice d'inactivation du GLP-1 (déterminé comme étant le rapport du GLP-1 total sur le GLP-1 actif), nous remarquons que celui-ci est aussi induit par l'administration de LPS (Figure 30F). Les LPS entraînent donc aussi une augmentation de la dégradation du GLP-1. Pour finir, des corrélations positives entre les niveaux plasmatiques de 3-HM et les paramètres relatifs au GLP-1 (Figures 30G, 30H et 30I) confirment l'existence d'un lien entre endotoxémie et sécrétion de GLP-1.

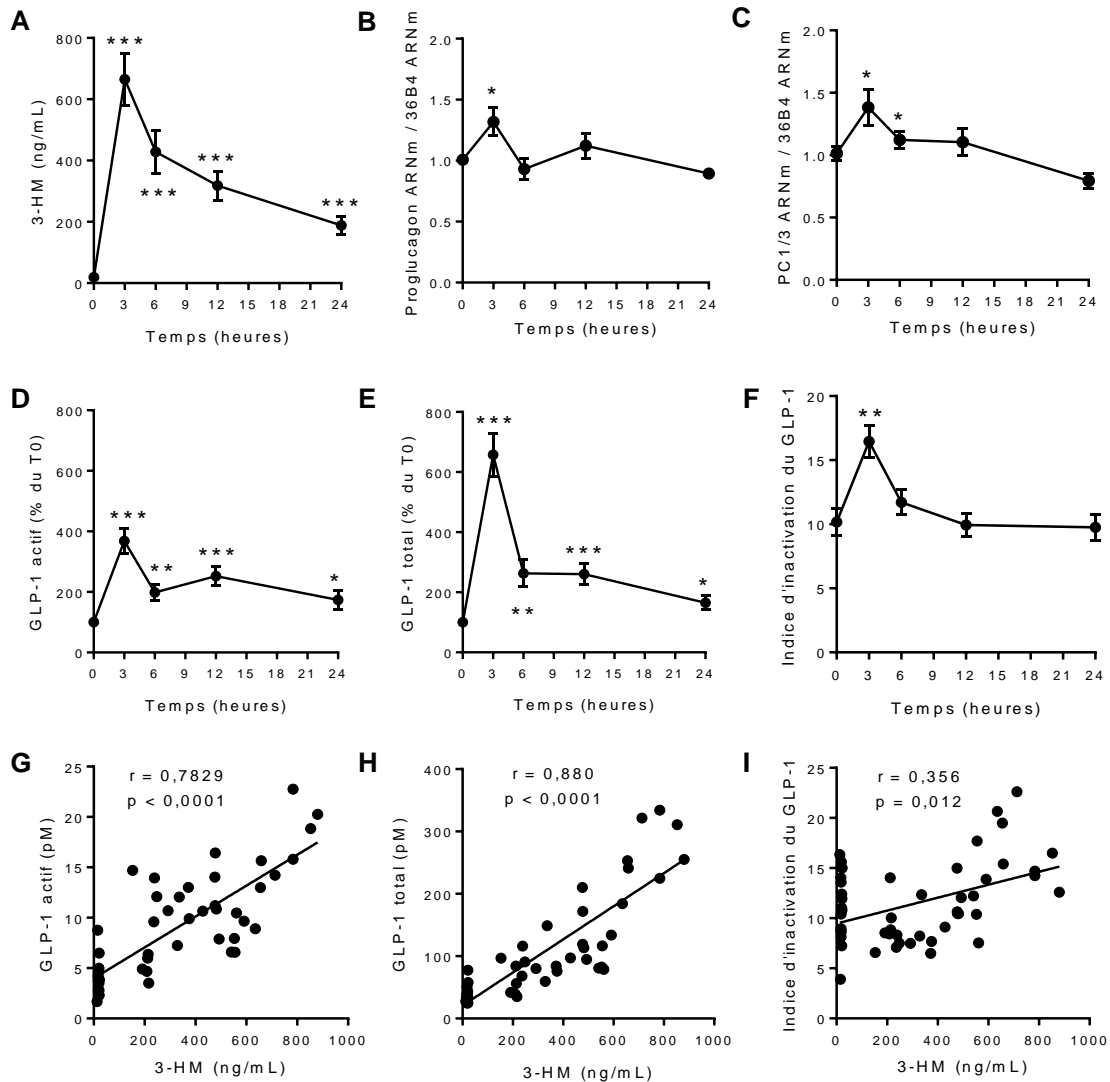


Figure 30

Les LPS induisent la sécrétion de GLP-1

Quantification de paramètres métaboliques à différents temps (T0, 3, 6, 12 et 24 heures) après une injection IP de LPS à 1mg/kg chez des souris (n=9-10). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié et du test de corrélation de Spearman, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A.** Niveaux de LPS plasmatiques évalués par la quantification du 3-HM (ng/mL) par HPLC/MS/MS. **B & C.** Expressions relatives (par rapport à la 36B4) dans l'iléon des ARNm codant pour le proglucagon et la PC1/3 respectivement. **D & E.** Niveaux plasmatiques de GLP-1 actif et total respectivement (% du T0). **F.** Indice d'inactivation du GLP-1 calculé de la manière suivante : GLP-1 total (pM) / GLP-1 actif (pM). **G.** Corrélation entre le GLP-1 actif (pM) et le 3-HM (ng/mL). **H.** Corrélation entre le GLP-1 total (pM) et le 3-HM (ng/mL). **I.** Corrélation entre l'indice d'inactivation du GLP-1 et le 3-HM (ng/mL).

2. *In vivo*, la sécrétion de GLP-1 induite par les LPS est dépendante de TLR4

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires pouvant relier les LPS au GLP-1 et ainsi comprendre comment les molécules de LPS peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1, l'effet sécrétagogue des LPS a été évalué dans différentes conditions (Figure 31).

Les LPS sont des composés moléculaires hétérogènes, constitués d'une partie lipidique et d'une partie saccharidique. Nous pouvons donc imaginer que leur capacité à induire la sécrétion de GLP-1 se fasse *via* les mêmes voies de sécrétion que celles décrites pour les composés glucidiques et lipidiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons administré des LPS à des animaux préalablement gavés avec soit une solution de glucose, soit de l'huile, soit de l'eau de boisson en contrôle. Nous avons ensuite comparé la capacité sécrétagogue des LPS en présence ou en absence de ces différents composés. Nous remarquons que l'administration de glucose ou d'huile de maïs par voie orale, avant l'injection de LPS, n'a aucune influence sur la capacité des LPS à stimuler la sécrétion de GLP-1 (Figures 31A et 31B respectivement). L'effet sécrétagogue des LPS semble donc emprunter des voies de signalisation différentes de celles décrites pour les composés glucidiques et lipidiques.

La cytokine pro-inflammatoire IL-6 est décrite comme étant un intermédiaire nécessaire entre les LPS et le GLP-1 (Ellingsgaard *et al.*, 2011; Kahles *et al.*, 2014). Afin de vérifier qu'il n'existe pas d'autres mécanismes moléculaires pouvant expliquer l'effet sécrétagogue des LPS, nous avons injecté des LPS en IP à des souris déficientes en IL-6 (IL-6 KO) ou à des souris sauvages en contrôle. La Figure 31C permet de confirmer le modèle génétique de déficience en IL-6 utilisé. En effet, les taux plasmatiques d'IL-6 sont significativement augmentés chez les animaux sauvages 3 heures après l'injection IP de LPS, mais ne sont pas du tout modulés chez les souris IL-6 KO. Par contre, nous constatons sur la Figure 31D que l'injection de LPS entraîne une sécrétion de GLP-1 même chez les souris déficientes en IL-6. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les effets sécrétagogues des LPS subsistent, tout en étant moindres, même en l'absence d'IL-6.

La sécrétion de GLP-1 est un phénomène complexe pouvant aussi faire intervenir des voies neurales, hormonales ou encore neuro-hormonales. Par exemple, le GIP est aussi capable de stimuler la sécrétion de GLP-1 soit directement par un effet paracrine, soit par l'intermédiaire du nerf vague (Lim & Brubaker, 2006). Afin de déterminer si la capacité des LPS à induire la sécrétion de GLP-1 fait intervenir le GIP, nous avons dosé les taux plasmatiques de GIP suite à une injection IP de LPS. Nous constatons que l'administration de LPS ne modifie pas la sécrétion de GIP et nous en concluons donc que cette hormone n'est pas un intermédiaire entre les LPS et l'augmentation de la sécrétion de GLP-1 (Figure 31E). Par ailleurs, les voies nerveuses et notamment muscariniques sont connues comme capables de moduler l'action des LPS (Fuentes *et al.*, 2008). Ainsi, dans le but de tester l'implication des voies nerveuses muscariniques dans les effets sécrétagogues des LPS, nous les avons bloquées avec un antagoniste pharmacologique spécifique : l'atropine. La Figure 31F montre premièrement que le prétraitement des souris avec de l'atropine réduit la sécrétion basale de GLP-1. Cela confirme l'implication de ces voies dans la sécrétion de GLP-1 et cela valide également notre modèle expérimental. Deuxièmement, nous remarquons que le prétraitement à l'atropine n'influence pas l'effet sécrétagogue des LPS, celui-ci n'est donc pas dépendant des voies nerveuses muscariniques.

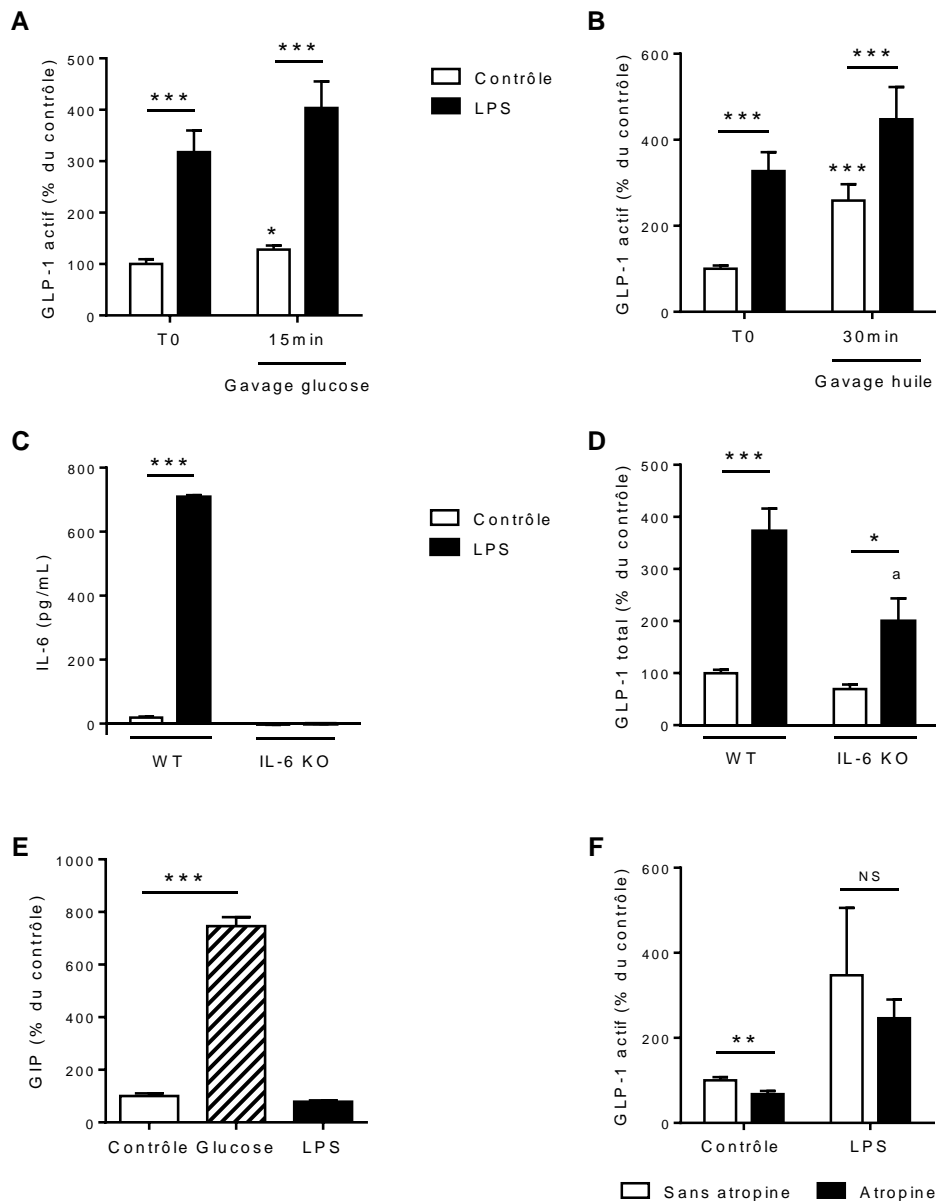


Figure 31

La sécrétion du GLP-1 par les LPS est indépendante des voies actuellement identifiées

Injection de LPS en IP à 1mg/kg ou de NaCl en contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, NS : non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ^a $p < 0,01$ comparé aux souris WT injectées avec du LPS. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A & B.** GLP-1 actif plasmatique (% du groupe contrôle à T0, n=11) 3 heures après une injection de LPS en condition basale (T0) ou 15 et 30 minutes après un gavage avec du glucose (2g/kg) ou avec des lipides (huile de maïs, 500 μ L/souris) respectivement. **C & D.** Niveaux plasmatiques d'IL-6 (pg/mL) et de GLP-1 total (% du contrôle des WT) respectivement, 3 heures après une injection de LPS à des souris WT (n=10) et IL-6 KO (n=8). **E.** Niveaux plasmatiques de GIP (% du groupe contrôle, n=11) 15 minutes après un gavage au glucose (2g/kg) ou 3 heures après une injection de LPS. **F.** GLP-1 actif plasmatique (% du contrôle; n=4-6) 3 heures après une injection de LPS en absence ou en présence d'atropine injectée à 1mg/kg 10 minutes avant et 90 minutes après l'injection de LPS.

Dans l'organisme, les LPS peuvent être reconnus et exercer leurs propriétés pro-inflammatoires par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts : i) au niveau des membranes cellulaires *via* le récepteur TLR4 et ii) au niveau cytoplasmique *via* une activation de la voie des caspases. Le TLR4 étant connu pour être exprimé et fonctionnel dans les EEC (Palazzo *et al.*, 2007; Bogunovic *et al.*, 2007), nous avons recherché son implication dans la capacité des LPS à stimuler la sécrétion de GLP-1. Pour ce faire, des souris déficientes en ce récepteur et des souris sauvages ont été injectées en IP avec du LPS (Figure 32). Nous constatons que la déficience en TLR4 réduit considérablement la réponse cytokinique et donc l'effet pro-inflammatoire des LPS (Figures 32A, 32B, 32C et 32D). L'absence de TLR4 ne semble pas avoir de conséquences sur la sécrétion basale de GLP-1. Par contre, en condition stimulée par les LPS, nous observons que la sécrétion de GLP-1 est totalement abolie chez les souris déficientes en TLR4. Cela suggère ainsi qu'*in vivo* seule la voie TLR4 est impliquée dans l'effet sécrétagogue des LPS (Figure 32E).

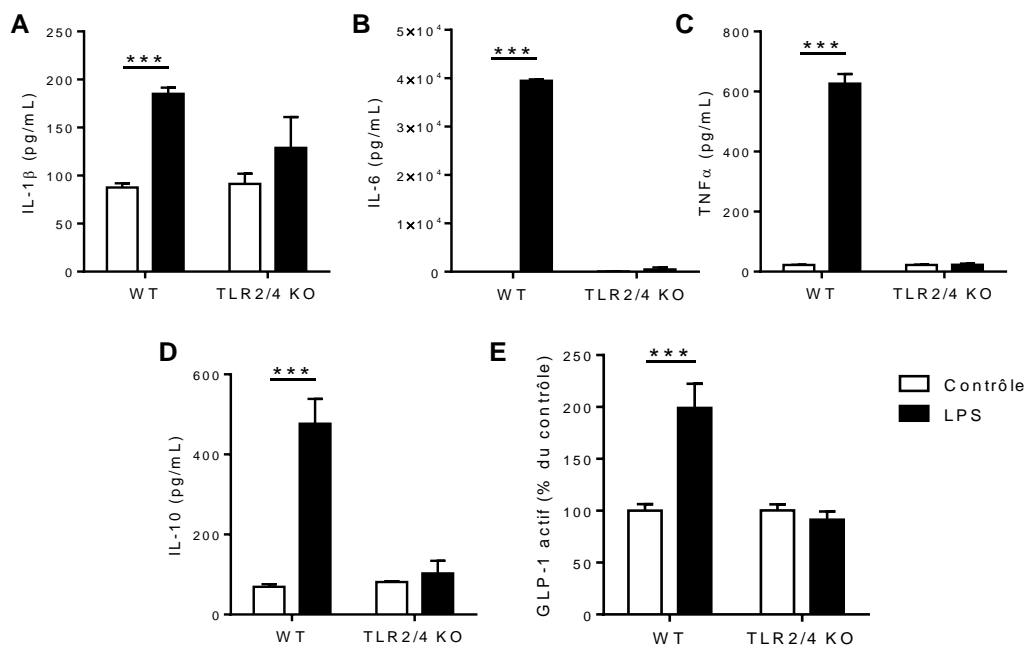


Figure 32

***In vivo* la sécrétion de GLP-1 par les LPS est dépendante de TLR4**

Effets sécrétagogues des LPS chez des souris WT et TLR2/4 KO. Les LPS ont été injectés en IP à 1mg/kg et du NaCl a été injecté en contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A, B, C & D.** Quantification des cytokines plasmatiques (pg/mL ; $n=6-7$) 3 heures après une injection de LPS chez des souris WT et TLR4/2 KO : respectivement IL-1 β , IL-6, TNF α et IL-10. **E.** GLP-1 actif plasmatique (% du contrôle ; $n=11-12$) 3 heures après l'injection de LPS.

3. Une stimulation des cellules L entéroendocrines par les molécules de LPS

Dans l'organisme, le GLP-1 est principalement produit et sécrété par les EEC de type L. Afin de déterminer si les LPS peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1 en interagissant directement avec le récepteur TLR4 des EEC, nous avons réalisé des expérimentations *ex vivo* sur des explants intestinaux et *in vitro* sur deux lignées cellulaires entéroendocrines productrices de GLP-1 : les cellules GLUTag et les cellules STC-1 (Figure 33).

Ex vivo, les explants ont été réalisés à partir de l'iléon car les EEC de type L sont majoritairement localisées dans la partie distale de l'intestin (Eissele *et al.*, 1992). Dans un premier temps, afin de connaître le profil de sécrétion de GLP-1 le long de l'iléon, ce dernier a été découpé en plusieurs segments d'environ 1cm de longueur. Ces morceaux ont ensuite été placés séparément dans une solution glucosée. La Figure 33A témoigne d'une production de GLP-1 plus conséquente par les segments d'intestin issus de la partie distale de l'iléon. Ce sont donc les trois derniers centimètres qui ont été utilisés pour la réalisation des explants. Le modèle expérimental consiste à ligaturer de part et d'autre un segment iléal d'environ 1,5cm, après avoir incorporé la solution à tester au niveau de la lumière iléale. Afin de valider ces explants comme modèle permettant d'étudier la sécrétion de GLP-1, nous les avons testés avec du glucose. Les explants ont été remplis avec une solution de glucose, ligaturés puis placés dans un milieu de sécrétion, dans lequel nous avons par la suite dosé le GLP-1 produit. Comme le montre la Figure 33B, lorsque le glucose est infusé seul dans la lumière iléale, cela induit une sécrétion significative de GLP-1, validant ainsi notre modèle expérimental. Nous observons que l'infusion de LPS dans ces explants iléaux, en absence de glucose, entraîne elle aussi une augmentation de la sécrétion de GLP-1. De plus, cette augmentation est dose-dépendante, démontrant ainsi la spécificité des LPS.

Le modèle des explants permet de préciser les mécanismes moléculaires pouvant relier les LPS au GLP-1. Toutefois, l'épithélium intestinal est constitué de différents types cellulaires et les EEC ne représentent qu'1% de l'ensemble des cellules présentes. Ainsi, pour confirmer l'existence d'un effet direct des LPS sur les EEC, nous avons utilisé deux lignées cellulaires distinctes : les GLUTag et les STC-1. En présence d'une concentration croissante de LPS dans le milieu de culture, les cellules GLUTag ont une sécrétion de GLP-1 augmentée, certes modeste mais néanmoins significative (Figure 33C). Une expérience de cinétique de sécrétion

en réponse aux LPS a ensuite été réalisée. Nous observons une augmentation significative de GLP-1 dès le temps 10 minutes. Ainsi, cette rapidité de réponse des cellules GLUTag renforce fortement l'hypothèse d'une action directe des LPS sur la sécrétion (Figure 33D). Les expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires établies peuvent parfois aboutir à des résultats différents en fonction de la lignée utilisée. Nous avons voulu confirmer les résultats obtenus avec les cellules GLUTag en utilisant une autre source d'EEC, les cellules STC-1. Ici aussi, la stimulation de ces cellules avec des LPS s'accompagne d'une très nette augmentation de la sécrétion de GLP-1 (Figure 33E). Cette lignée cellulaire est bien plus sensible aux LPS que ne le sont les cellules GLUTag. En effet, alors que les concentrations de LPS sont vingt fois plus faibles, le taux de sécrétion des cellules STC-1 est plus important que celui des cellules GLUTag. Des tests de cytotoxicité nous ont permis d'écarter l'hypothèse selon laquelle cette libération du GLP-1 par les cellules était la conséquence d'une action cytotoxique des doses de LPS utilisées (données non présentées).

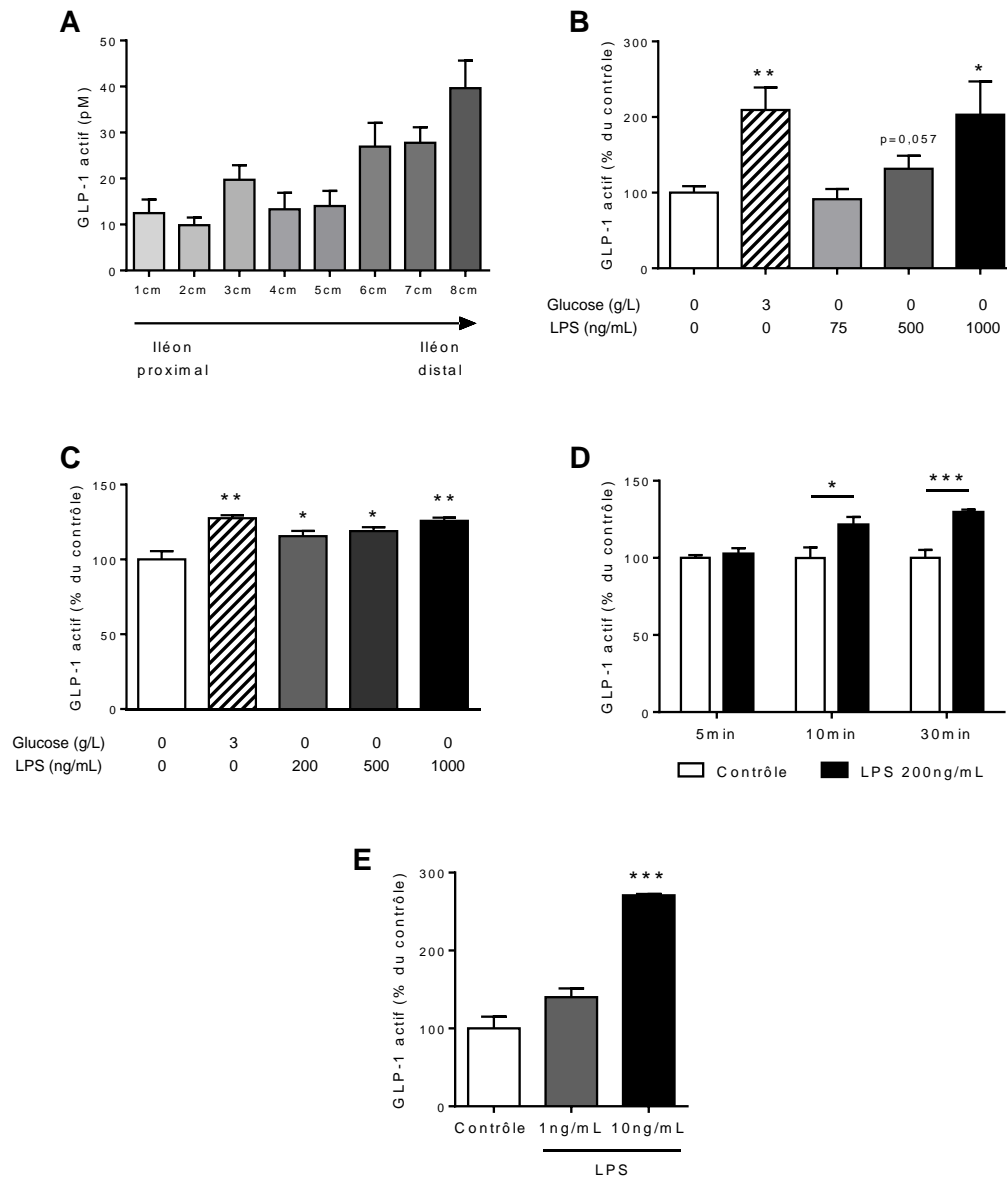


Figure 33

Les LPS stimulent la sécrétion de GLP-1 dans des explants d'iléon et des EEC en culture

Sécrétion de GLP-1 à partir d'explants d'iléon ou de cellules GLUTag et STC-1 en réponse à une stimulation par du glucose ou des LPS. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A.** Profil de sécrétion du GLP-1 dans l'iléon après 1 heure de stimulation avec du glucose à 3g/L (pM ; $n=10$). **B.** Réponse de l'iléon distal à une stimulation pendant 1 heure avec du glucose (3g/L) ou avec des LPS à différentes concentrations (75, 500 et 1000ng/mL) et placés dans la lumière iléale (% du contrôle ; $n=11-16$). **C.** Réponse des cellules GLUTag à une stimulation avec du glucose (3g/L) ou des LPS à différentes concentrations (200, 500 et 1000ng/mL) pendant 90 minutes (% du contrôle ; $n=6$). **D.** Sécrétion de GLP-1 par les cellules GLUTag stimulées pendant 5, 10 et 30 minutes avec des LPS à 200ng/mL (% du contrôle ; $n=4-5$). **E.** Réponse des cellules STC-1 à une stimulation avec différentes concentrations de LPS (1 et 10ng/mL) pendant 90 minutes (% du contrôle ; $n=4$).

4. La sécrétion du GLP-1 par les LPS implique une signalisation calcique *via* TLR4

Comme pour la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, l'augmentation des concentrations calciques dans les cellules L est capable de déclencher le processus d'exocytose et donc la sécrétion de GLP-1. Ainsi, afin de comprendre par quels mécanismes les LPS induisent une sécrétion de GLP-1, les flux calciques intracellulaires ont été mesurés après une stimulation des cellules en culture avec des LPS (Figure 34). Quelle que soit la lignée cellulaire étudiée, la stimulation des cellules avec des LPS conduit à une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire. Nous retrouvons l'observation faite précédemment, à savoir que les cellules STC-1 sont plus sensibles aux LPS. En effet, à dose de LPS identique, le flux calcique (exprimé par le ratio F_{340}/F_{380}) est presque trois fois supérieur dans les cellules STC-1 (Figure 34A). L'origine intra ou extracellulaire du calcium a été recherchée. Lorsque la même expérience est réalisée dans un tampon ne contenant pas de calcium, alors nous n'observons pas de flux calcique, suggérant ainsi que le calcium extracellulaire est nécessaire lors de la réponse aux LPS (Figure 34B).

Nous avons montré ci-dessus que : i) *in vivo*, la capacité des LPS à stimuler la sécrétion de GLP-1 est TLR4-dépendante et que ii) les LPS sont capables d'induire une sécrétion de GLP-1 en stimulant directement les EEC en culture. Ainsi, afin de confirmer l'implication du récepteur TLR4 dans l'interaction directe entre les LPS et les EEC, nous avons stimulé les cellules GLUTag et STC-1 avec simultanément des LPS et un antagoniste du récepteur TLR4 (Figure 35). Premièrement, nous remarquons que le blocage pharmacologique du récepteur TLR4 prévient complètement l'effet sécrétagogue des LPS, que ce soit dans les cellules GLUTag (Figure 35A) comme dans les cellules STC-1 (Figure 35B). Deuxièmement, l'incorporation d'un antagoniste TLR4 dans le milieu de culture bloque également la signalisation calcique induite par les LPS (Figure 35C). C'est donc la détection des LPS par le récepteur TLR4 des EEC qui permet de provoquer une entrée de calcium intracellulaire pouvant ensuite contribuer à la sécrétion de GLP-1.

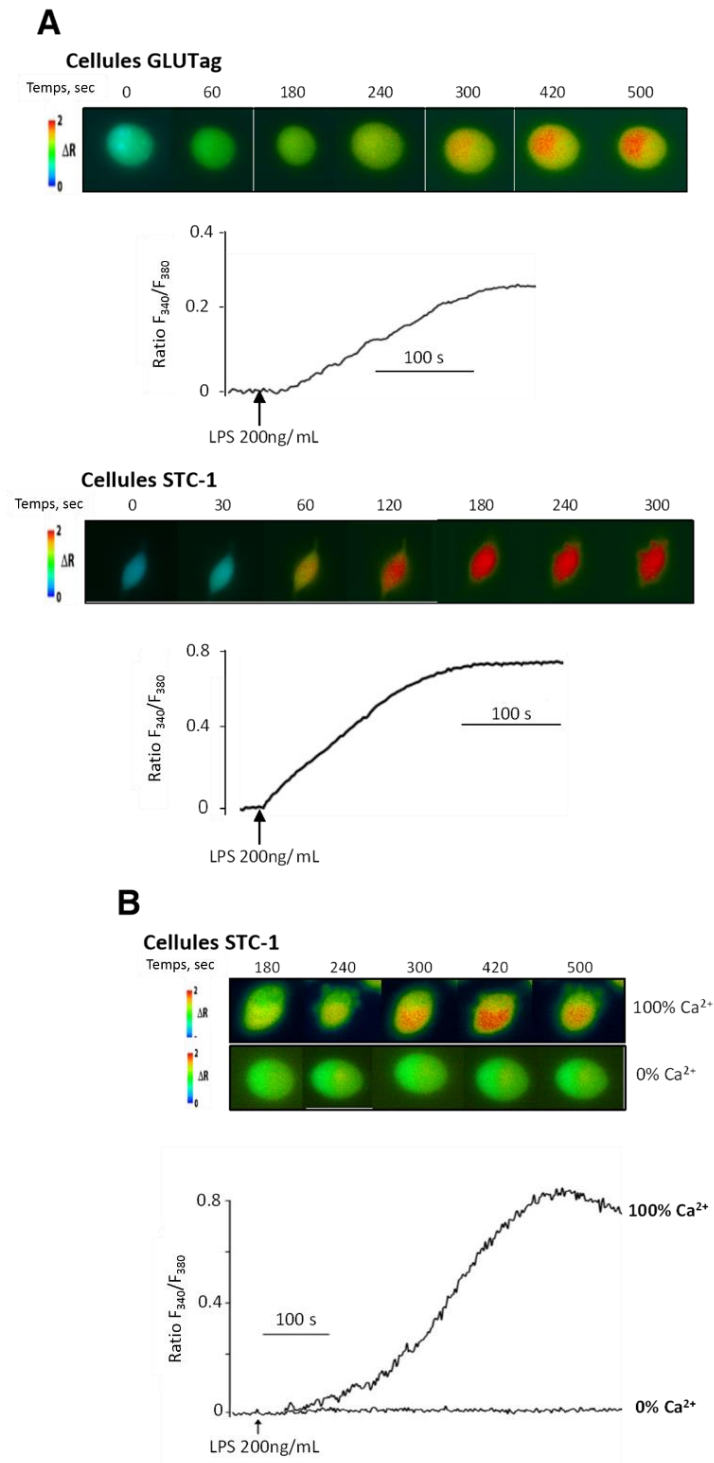


Figure 34

Les LPS déclenchent des flux calciques intracellulaires

Les résultats sont exprimés sous forme du ratio F_{340}/F_{380} . **A.** Signalisation calcique pendant 500 et 300 secondes dans les cellules GLUTag et STC-1 respectivement après une stimulation avec des LPS à 200ng/mL. **B.** Signalisation calcique des cellules STC-1 pendant 500 secondes après une stimulation avec des LPS à 200ng/mL, le tout dans un tampon contenant 0% ou 100% de calcium.

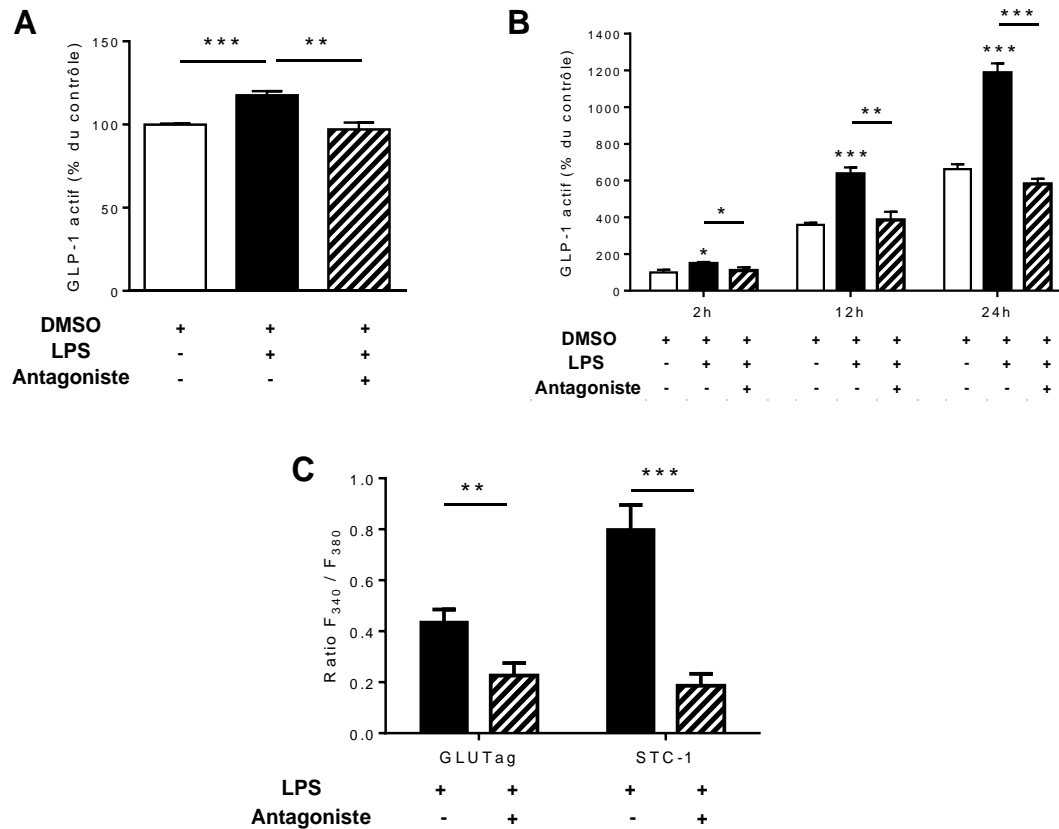


Figure 35

Les EEC répondent aux LPS par un mécanisme dépendant du TLR4

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A & B.** Respectivement réponse des cellules GLUTag à une stimulation de 90 minutes avec des LPS à 200ng/mL (% du contrôle ; $n=5$) et réponse des cellules STC-1 à une stimulation de 2, 12 e 24 heures avec des LPS à 10ng/mL (% du contrôle à 2 heures ; $n= 4-6$) en absence ou en présence d'un antagoniste TLR4 (TAK242, 5 μ M) dans le milieu de culture. **C.** Signalisation calcique dans les cellules GLUTag et STC-1 après une stimulation avec des LPS à 200ng/mL en présence ou en absence d'un antagoniste TLR4 (LPS-RS, 0,5 μ g/mL), résultats exprimés sous forme du ratio F₃₄₀/F₃₈₀.

5. L'altération de la barrière intestinale entraîne la sécrétion de GLP-1 par les LPS

Dans l'organisme, la majorité des molécules de LPS est issue des bactéries à Gram négatif présentes dans l'intestin. Dans quelles conditions ces molécules vont-elles être en capacité de stimuler la sécrétion de GLP-1 ? Nous avons testé trois voies différentes

d'administration de LPS (Figure 36). Lorsque les LPS sont injectés en IP ou en IV, nous observons effectivement une augmentation des taux circulants de GLP-1 (Figures 36A et 36B). Par contre, aucun effet n'est observé lorsque ceux-ci sont administrés par voie orale (Figure 36C). Ces résultats suggèrent que les molécules de LPS purifiées, injectées en IP et en IV, agiraient au niveau basolatéral des EEC. En conditions physiologiques, les LPS administrés par voie orale dans la lumière de l'intestin ne traversent que très peu la barrière intestinale et ne pénètrent quasiment pas dans la circulation sanguine.

Ces résultats *in vivo* peuvent paraître surprenants compte tenu des résultats obtenus *ex vivo* sur les explants d'iléon montrant que l'administration de LPS dans la lumière iléale stimule la sécrétion de GLP-1 (Figure 33B). Toutefois, les explants sont des segments d'intestin sectionnés de part et d'autre et ne sont donc plus irrigués. Nous pouvons alors imaginer que dans de telles conditions, la perméabilité de la muqueuse intestinale soit altérée, laissant alors passer les molécules de LPS à travers cette barrière normalement infranchissable, ou très peu. Nous avons donc fait l'hypothèse que l'intégrité de la barrière de l'intestin était un facteur déterminant dans l'action sécrétagogue des LPS présents dans la lumière intestinale. Afin de tester cette hypothèse, nous avons recherché des modèles d'études *in vivo* dans lesquels la fonction barrière de l'intestin pourrait être dégradée.

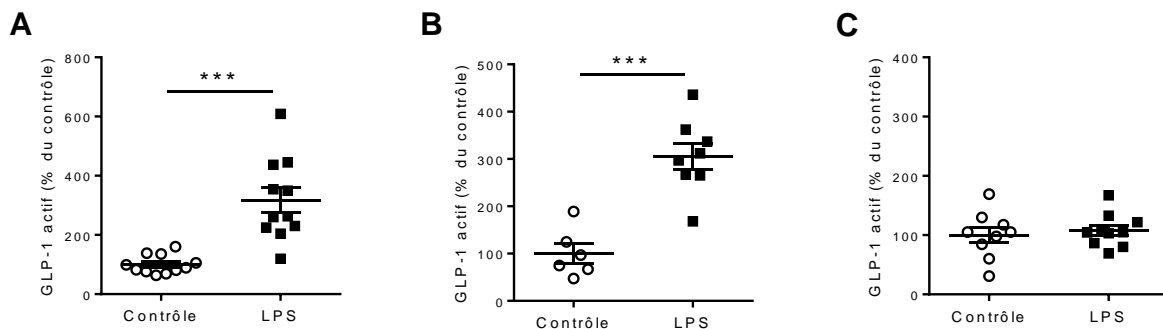


Figure 36

L'administration orale de LPS ne stimule pas la sécrétion de GLP-1

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. Le NaCl est utilisé en contrôle. Niveaux plasmatiques de GLP-1 actif 3 heures après une injection IP de LPS à 1mg/kg (n=11) (A), ou après une injection IV de LPS à 1mg/kg (n=6-8) (B) ou encore après un gavage avec des LPS à 1mg/souris (n=9-10) (C).

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec le modèle du dextran sodium sulfate (DSS). Chez des souris, un traitement chronique au DSS est décrit pour induire une colite aiguë et dégrader la perméabilité membranaire intestinale (Kitajima *et al.*, 1999). Ainsi, deux lots de souris ont été étudiés, un lot dans lequel du DSS a été administré dans l'eau de boisson pendant 7 jours et un lot contrôle. A l'issue de ce traitement, les animaux des deux lots ont été gavés avec une solution contenant des LPS (Figure 37). La Figure 37A suggère que le traitement DSS a bien perturbé la perméabilité intestinale après 7 jours de traitement. En effet, la mesure des concentrations de LPS dans la circulation sanguine portale (pour s'affranchir de l'extraction hépatique des LPS) montre que seules les souris ayant été traitées au DSS présentent une augmentation de leur endotoxémie au cours des 6 heures qui suivent le gavage aux LPS. Le GLP-1 plasmatique a également été dosé en parallèle. Alors que chez les souris contrôles, le gavage aux LPS n'a aucun effet sur les niveaux de GLP-1 (confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment (Figure 36C)), un traitement au DSS de 7 jours permet aux LPS administrés par voie orale d'induire significativement les taux plasmatiques de GLP-1 (Figure 37B). Enfin, une corrélation positive entre teneurs en LPS et taux de GLP-1 suggère fortement que les molécules de LPS injectées sont bien responsables de l'augmentation des taux de GLP-1 (Figure 37C).

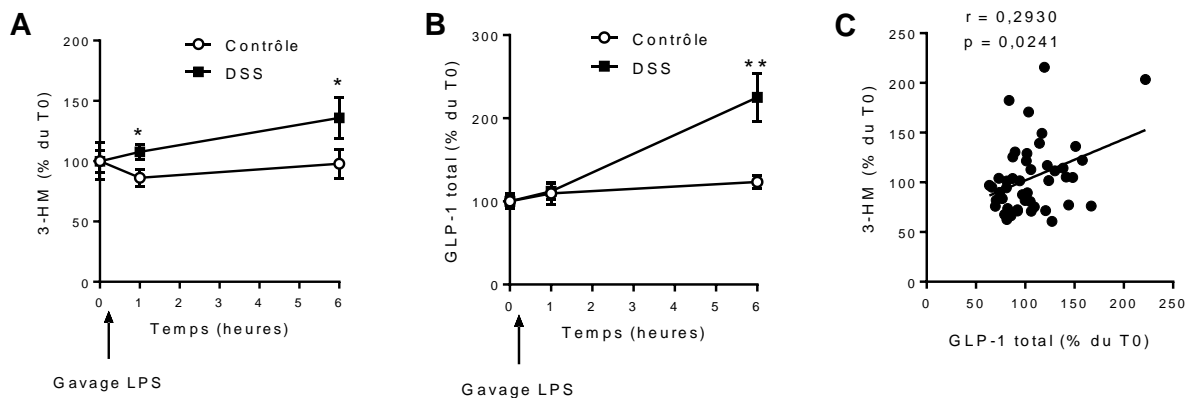


Figure 37

L'administration orale de LPS stimule la sécrétion de GLP-1 après altération de la barrière intestinale

Quantification des LPS et du GLP-1 avant (T0) et à différents temps (1 et 6 heures) après un gavage avec des LPS (5mg/souris) de souris traitées avec du DSS (n=8-10) et de souris contrôles (n=8-10). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié ou d'un test de corrélation de Spearman, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A.** Niveaux de LPS évalués dans le sang portal par la quantification du 3-HM en HPLC/MS/MS (% du T0). **B.** Niveaux plasmatiques de GLP-1 total (% du T0). **C.** Corrélation entre le GLP-1 total (% du T0) et le 3-HM portal (% du T0).

Nous avons ensuite tenu à confirmer ces résultats en utilisant cette fois un modèle plus physiologique d'altération de la membrane intestinale. Notre choix s'est porté sur le modèle de l'ischémie/reperfusion (I/R) mésentérique. Dans nos conditions, nous confirmons que ces expériences d'I/R altèrent profondément la structure morphologique de l'épithélium intestinal (Figure 38). De courtes périodes d'I/R sont suffisantes pour endommager considérablement les villosités intestinales (Figures 38A et 38B). Ces dommages sont accentués par la durée de l'I/R (Figure 38C).

Nous avons pu constater que l'I/R mésentérique s'accompagne d'une élévation rapide des taux de GLP-1 total circulants (Figure 39). Comme le montre la Figure 39A, 20 minutes d'ischémie suivies de 2 heures de reperfusion entraînent une augmentation de la sécrétion de GLP-1, augmentation qui devient significative dès 15 minutes de reperfusion. Nous avons ensuite modifié et raccourci les durées d'ischémie en conservant un temps de reperfusion de 15 minutes. De façon très intéressante, nous observons que des temps d'ischémie très courts (10 minutes) sont suffisants pour induire une augmentation des taux de GLP-1 (Figure 39B). Ces dernières années, plusieurs études envisagent la protéine I-FABP comme le biomarqueur le plus prometteur pour diagnostiquer précocement l'I/R mésentérique (Khadaroo *et al.*, 2014). Cependant, nos résultats démontrent que la sécrétion de GLP-1 suite à l'induction d'une I/R précède celle de l'I-FABP et est de surcroît quantitativement plus importante (Figure 39C). Une I/R de courte durée (20/15 minutes) est suffisante pour induire significativement les taux plasmatiques de GLP-1 mais n'a pas d'influence sur ceux d'I-FABP. Dans ces conditions expérimentales, nous avons mesuré les taux plasmatiques de LPS et constatons de façon très surprenante que cette courte I/R induit la sécrétion de GLP-1 alors même que les taux circulants de LPS ne sont pas augmentés (Figure 39D). Seule une durée de reperfusion plus longue (6 heures) nous permet de détecter une augmentation significative de l'endotoxémie (Figure 39E). Ces résultats originaux suggèrent que les molécules de LPS endogènes sont capables de faire sécréter du GLP-1 alors qu'elles ne sont pas encore passées en quantité suffisante dans la circulation sanguine pour pouvoir être détectées. La technique de dosage chromatographique utilisée étant relativement sensible, cela implique une interaction directe entre les LPS et les EEC de l'épithélium intestinal et/ou une très forte sensibilité du GLP-1.

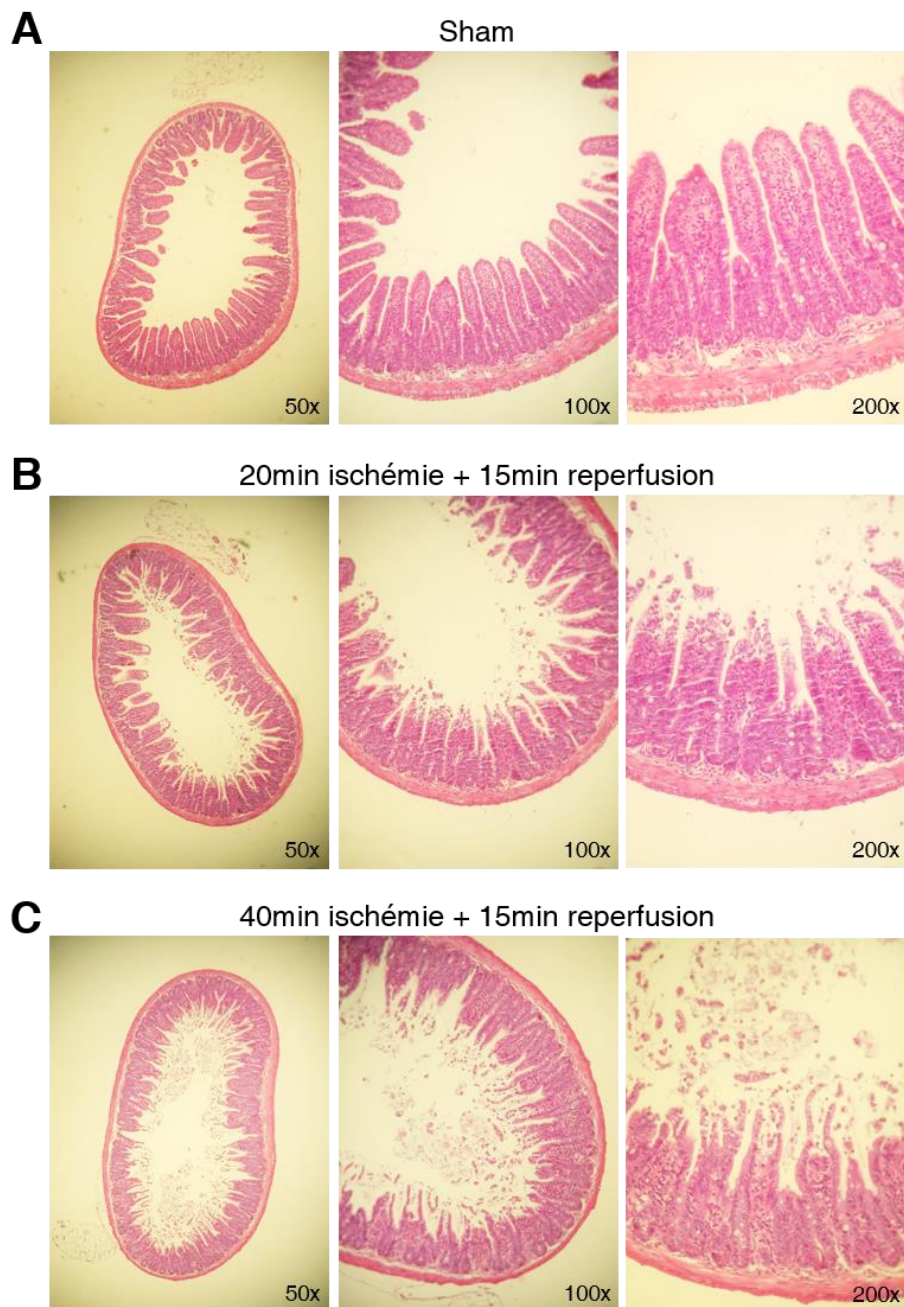


Figure 38

L'ischémie/reperfusion mésentérique entraîne une dégradation de la muqueuse intestinale

Coupes histologiques d'iléon colorées à l'hématoxyline/éosine après un traitement contrôle Sham (A), 20 minutes d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion (B) et 40 minutes d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion (C).

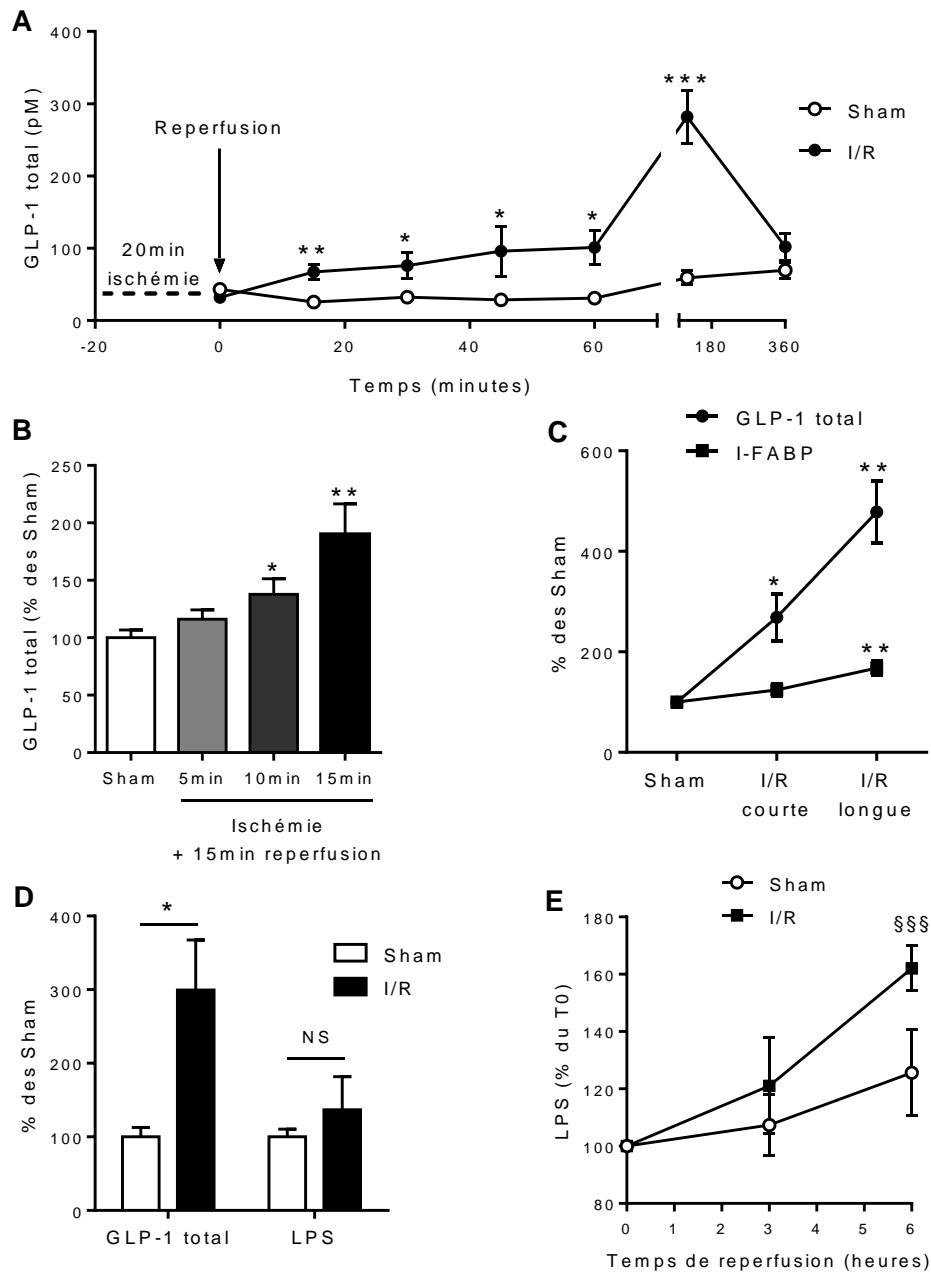


Figure 39

L'ischémie/reperfusion mésentérique induit une sécrétion rapide de GLP-1

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, les différences par rapport aux souris contrôles Sham (*) et par rapport au T0 (§) sont indiquées : */§p<0,05, **/§§p<0,01, ***/§§§p<0,001 et NS : non statistique. Les valeurs sont les moyennes ± SEM. **A.** GLP-1 total plasmatique (pM ; n=5) après 20 minutes d'ischémie suivies de 15, 30, 45, 60, 120 et 360 minutes de reperfusion. **B.** GLP-1 total plasmatique (% des Sham ; n=5) après 5, 10 et 15 minutes d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion. **C.** Niveaux plasmatiques de GLP-1 total et d'I-FABP (% des Sham ; n=6) après un traitement ischémie/reperfusion (I/R) court et long (20 minutes d'ischémie et 15 minutes ou 2 heures de reperfusion respectivement). **D.** GLP-1 total plasmatique et LPS sanguins (% des Sham ; n=5) après 20 minutes d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion. **E.** Evolution des niveaux sanguins de LPS au cours de la reperfusion après 20 minutes d'ischémie (% du T0 ; n=5-6).

Afin de confirmer que les molécules de LPS présentes naturellement dans la lumière intestinale peuvent contribuer à l'effet sécrétagogue observé dans les expériences d'I/R, nous avons essayé de moduler soit la quantité de LPS, soit leur action. Nous espérons ainsi moduler les niveaux de sécrétion de GLP-1 lors de ces manipulations d'I/R (Figure 40).

Dans une première approche, nous avons utilisé un antibiotique spécifique des bactéries à Gram négatif : la polymyxine B. Cette dernière bloque les effets des LPS en se fixant au lipide A, la partie toxique de la molécule de LPS. La polymyxine B est généralement utilisée pour éliminer les effets des contaminations aux LPS, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Tsuzuki *et al.*, 2001; Cutuli *et al.*, 2016). Ainsi, un traitement des souris par voie orale pendant 14 jours avec de la polymyxine B devrait en théorie réduire la quantité de LPS biologiquement actifs dans l'intestin. Comme le montrent les Figures 40A et 40B, la sécrétion de GLP-1 induite par l'I/R est plus faible chez les animaux traités à la polymyxine B. Cela suggère ainsi qu'une moindre quantité de LPS intestinaux se traduit par une moindre induction de la sécrétion de GLP-1. La seconde approche a été de moduler l'action des molécules de LPS. Pour cela, un antagoniste du récepteur TLR4 a été injecté en IP aux souris 3 heures avant l'induction de l'I/R. Comme précédemment, le taux d'induction de la sécrétion de GLP-1 est ici aussi diminué chez les animaux prétraités avec l'antagoniste (Figures 40C et 40D). Ces résultats montrent donc que les molécules responsables de la sécrétion de GLP-1 lors d'une I/R exercent en partie leurs effets par le récepteur TLR4. De nouveau, cela suggère un rôle des LPS présents dans la lumière intestinale dans la sécrétion de GLP-1 observée lors d'une I/R mésentérique.

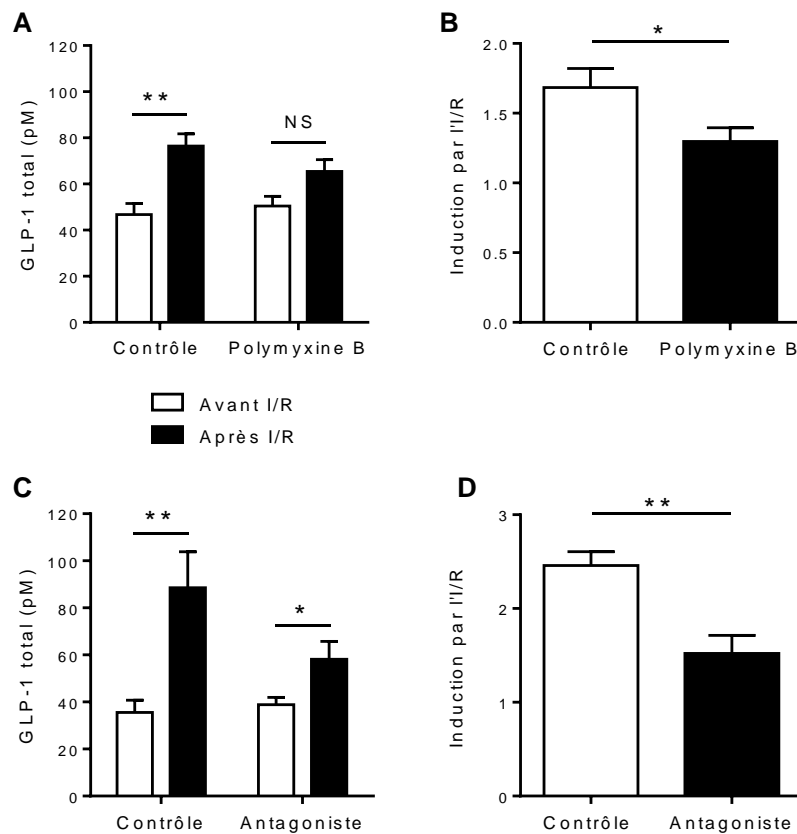


Figure 40

Les LPS endogènes sont impliqués dans la sécrétion du GLP-1 induite par l'I/R mésentérique

Evolution du GLP-1 total après une ischémie de 20 minutes suivie de 15 minutes de reperfusion. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, NS : non statistique, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A & B.** Niveaux plasmatiques de GLP-1 total (pM) avant et après I/R chez des animaux contrôles ou traités avec de la polymyxine B et calcul de l'induction du GLP-1 total causée par l'I/R chez ces animaux. **C & D.** Niveaux plasmatiques de GLP-1 (pM) avant et après I/R chez des animaux contrôles ou traités avec un antagoniste TLR4 et calcul de l'induction du GLP-1 total causée par l'I/R chez ces animaux.

6. La stimulation du GLP-1 par les LPS est fonctionnelle chez l'Homme

Pour pouvoir envisager le GLP-1 comme un marqueur d'altération de la barrière intestinale humaine, il faudrait que cet effet sécrétagogue des LPS sur le GLP-1 se confirme chez l'Homme (Figure 41). Pour cela, en collaboration avec le Docteur P. Pickkers (Nimègue, Pays-Bas), un bolus de LPS (2ng/kg) ou de sérum physiologique a été administré en IV à des

volontaires sains. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant, 3 heures et 6 heures après le bolus. Le dosage du GLP-1 total plasmatique montre que l'administration de LPS entraîne une augmentation significative de la sécrétion de GLP-1 alors que le taux de GLP-1 reste constant chez les individus ayant reçu le sérum physiologique (Figure 41A). La Figure 41B illustre et résume le mécanisme. En cas d'altération de la barrière intestinale, certains composés présents dans la lumière de l'intestin, dont les LPS, pourraient alors pénétrer la muqueuse intestinale dégradée et stimuler les cellules L entéroendocrines *via* leur récepteur TLR4. Cela provoquerait une sécrétion rapide de GLP-1 et cette hormone pourrait ainsi être utilisée comme un marqueur précoce d'altération de la membrane intestinale. Au-delà du contexte de l'intestin, le GLP-1 pourrait tout simplement être un marqueur d'inflammation, de surcroît facile à doser et très sensible étant donné que d'infimes quantités de LPS suffisent pour stimuler sa sécrétion.

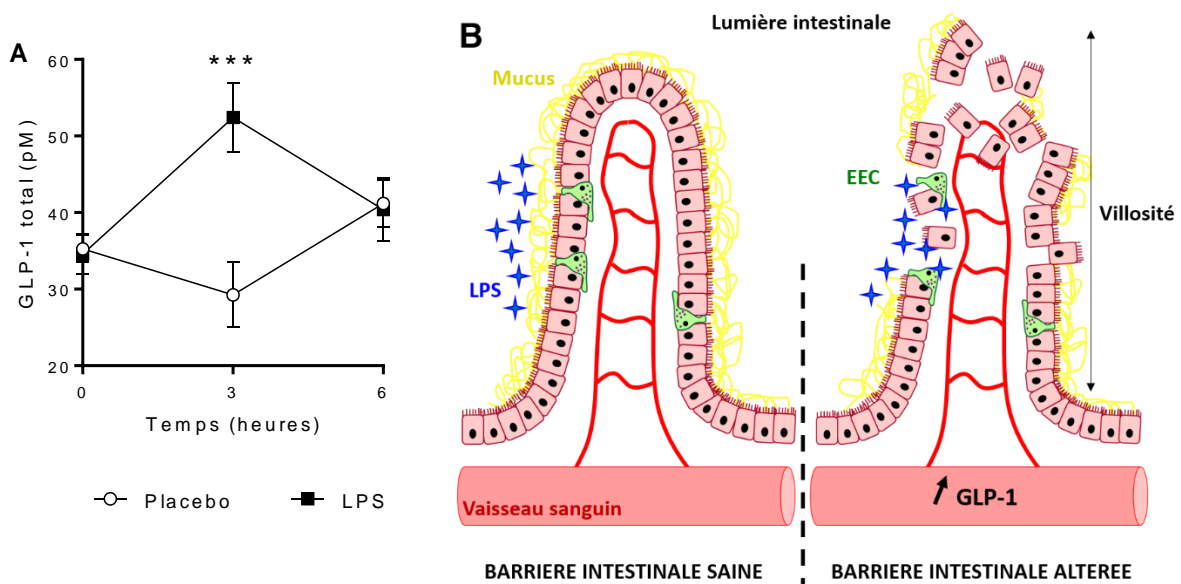


Figure 41

Sécrétion du GLP-1 par les LPS chez l'Homme : modèle hypothétique

A. Dosage du GLP-1 total plasmatique chez des patients injectés avec un bolus de LPS à 2ng/kg et chez des patients Placebo (injection de sérum physiologique) : T0, 3 et 6 heures (pM). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **B.** Modèle hypothétique de cette cascade intestinale LPS / GLP-1 : la dégradation de la muqueuse intestinale permet une infiltration des LPS de la lumière intestinale, une stimulation des cellules entéroendocrines par leur récepteur TLR4 et une sécrétion rapide de GLP-1. Le GLP-1 serait ainsi un marqueur précoce de dégradation de la perméabilité intestinale.

III. Discussion

Nous montrons dans cette étude que les LPS entraînent la sécrétion de GLP-1 *via* les cellules L entéroendocrines. Cette sécrétion est directe et est initiée par l'activation du récepteur TLR4. De façon très originale, nos résultats mettent en évidence que ce phénomène est observé lorsque la barrière intestinale est altérée. Dans ces conditions, l'extrême rapidité de la sécrétion de GLP-1 fait de cette hormone un potentiel biomarqueur précoce d'une atteinte de la barrière intestinale. Ces résultats, principalement obtenus chez la souris, pourraient être transposés à l'Homme.

Nous avons récemment montré au laboratoire que les molécules de LPS sont capables d'augmenter les taux plasmatiques de GLP-1 actif (Nguyen *et al.*, 2014) ; résultats qui ont ensuite été confirmés par une autre équipe de recherche (Kahles *et al.*, 2014). Cette augmentation de GLP-1 actif peut résulter i) d'une stimulation de sa production et/ou ii) d'une inhibition de sa dégradation. Nous avons montré dans cette étude que les LPS induiraient à la fois la synthèse et la sécrétion du GLP-1. En effet, l'administration IP de LPS entraîne une augmentation de l'expression des gènes codant pour le proglucagon et pour l'enzyme protéolytique PC1/3 dans l'iléon. Cela suggère ainsi une augmentation de la biosynthèse du GLP-1 en réponse aux LPS dans ce tissu. L'injection de LPS conduit également à une augmentation des taux circulants de GLP-1 total, c'est-à-dire des formes actives et inactives de l'hormone. Cela témoigne donc d'une augmentation de la sécrétion du GLP-1 en réponse aux LPS. Les LPS, déjà connus comme étant capables de stimuler la sécrétion d'une autre hormone intestinale, la cholécystokinine (Palazzo *et al.*, 2007; Bogunovic *et al.*, 2007), sont également capables de stimuler celle de GLP-1. Pour évaluer la voie de dégradation, nous avons calculé son indice d'inactivation (GLP-1 total / GLP-1 actif). Nous pensons que, par rapport à la détermination classique de l'activité DPP-IV plasmatique, ce ratio est plus représentatif de la dégradation du GLP-1 et cela pour deux raisons : i) une partie de la dégradation du GLP-1 peut être indépendante de l'enzyme protéolytique DPP-IV (Ruiz-Grande *et al.*, 1990; Hassan *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2004) et ii) la détermination de l'activité de l'enzyme plasmatique n'est pas forcément un bon marqueur de l'activité DPP-IV totale, car la quasi-totalité de l'inactivation du GLP-1 réalisée par cette enzyme a lieu au niveau membranaire (Hansen *et al.*, 1999; Holst,

2007). L'indice d'inactivation du GLP-1 donne quant à lui un aperçu global de la dégradation protéolytique du GLP-1. Nous constatons de façon intéressante qu'en plus de stimuler la sécrétion et de potentiellement induire la synthèse du GLP-1, l'injection de LPS s'accompagne aussi d'une augmentation du taux d'inactivation de cette hormone. Toutefois, à l'heure actuelle nous ne savons pas s'il s'agit ici d'un effet compensatoire dont le but serait de contrer l'effet sécrétagogue des molécules de LPS et ainsi d'éviter au système de s'emballer. Des études complémentaires, en particulier de type cinétique, seraient nécessaires.

La régulation de la sécrétion du GLP-1 est un phénomène complexe car sous le contrôle de plusieurs mécanismes moléculaires selon les agents sécrétagogues (Lim & Brubaker, 2006; Tian & Jin, 2016). Dans des conditions d'exercice physique, de faibles niveaux d'IL-6 peuvent stimuler directement les cellules L intestinales et conduire à la sécrétion de GLP-1 (Ellingsgaard *et al.*, 2011). Kahles et ses collaborateurs ont montré que chez des souris déficientes en IL-6, l'injection de LPS n'augmente pas les taux plasmatiques de GLP-1 ; ils rapportent donc l'IL-6 comme étant l'intermédiaire entre les LPS et le GLP-1 (Kahles *et al.*, 2014). Néanmoins, nous obtenons dans cette étude des résultats contradictoires puisque dans nos conditions, l'injection IP de LPS à des souris déficientes en IL-6 s'accompagne d'une augmentation significative de la sécrétion du GLP-1. Ces différences pourraient s'expliquer notamment par les caractéristiques des LPS utilisés. En effet, à la fois le sérotype bactérien et la dose injectée varient entre les deux études : ils utilisent des LPS provenant d'*E. coli* O111:B4 à la dose de 0,1mg/kg alors que nous travaillons avec les LPS d'*E. coli* O55:B5 à la dose 10 fois plus forte de 1mg/kg. Or, les effets physiologiques des molécules de LPS diffèrent justement en fonction de ces deux paramètres (Ohto *et al.*, 2012; Maitra *et al.*, 2012). Il est connu que la sécrétion du GLP-1 par les nutriments peut se faire de façon directe auprès des cellules L mais aussi de façon indirecte en faisant intervenir des intermédiaires tels que le GIP. Cette incrétine, sécrétée par les cellules K entéroendocrines, est capable d'induire la sécrétion de GLP-1 (Brubaker *et al.*, 1998; Mortensen *et al.*, 2003). Nous avons donc envisagé le GIP comme un intermédiaire plausible entre les LPS et le GLP-1. Toutefois, nos résultats montrent que l'injection de LPS ne modifie pas les taux plasmatiques de GIP et rendent donc peu probable le rôle du GIP comme intermédiaire. La voie nerveuse a également été identifiée comme étant une cible intéressante. En effet, l'activation des récepteurs muscariniques des cellules L induit une sécrétion de GLP-1 (Balks *et al.*, 1997; Rocca & Brubaker, 1999) et ceux-ci sont connus pour être étroitement

liés aux effets pro-inflammatoires des molécules de LPS (Fuentes *et al.*, 2008). Cependant, dans notre étude, même si l'antagonisation pharmacologique des récepteurs muscariniques avec de l'atropine réduit effectivement la sécrétion basale de GLP-1, cela n'a aucune influence sur l'effet sécrétagogue des LPS. Ainsi, les voies indirectes classiquement décrites dans la littérature ne semblent pas être impliquées dans le cas présent.

Finalement, nous mettons en évidence dans cette étude que l'effet sécrétagogue des LPS est initié par une de ses voies de détection : le récepteur TLR4. Jusqu'à très récemment, le TLR4 était connu comme étant la seule voie de détection pro-inflammatoire des LPS dans l'organisme. Cependant, il a été montré que les endotoxines bactériennes peuvent aussi exercer leur potentiel pro-inflammatoire *via* une reconnaissance intracellulaire par la caspase 11 ou ses orthologues humaines, les caspases 4 et 5 (Hagar *et al.*, 2013; Kayagaki *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous avons utilisé des souris déficientes en TLR4 afin de tester cette voie de détection des LPS. Nous avons remarqué que l'effet sécrétagogue des LPS nécessite un récepteur TLR4 fonctionnel. En effet, l'injection de LPS à des souris déficientes en TLR4 n'a aucun effet sur les niveaux de sécrétion du GLP-1. Les EEC murines et humaines étant connues pour exprimer un récepteur TLR4 fonctionnel (Palazzo *et al.*, 2007; Bogunovic *et al.*, 2007), nous avons stimulé des EEC en culture avec des LPS. Comme cela a déjà été décrit dans la littérature, nous confirmons que les EEC sont sensibles aux LPS et que ces derniers induisent des flux calciques intracellulaires. Nous montrons de plus dans cette étude que la présence de LPS dans le milieu de culture provoque une augmentation de la sécrétion du GLP-1. Nos expériences montrent également que ces effets sont atténués, voire complètement supprimés lorsque les cellules sont cultivées avec un antagoniste TLR4.

Les LPS sont présents en grandes quantités dans le tube digestif. En effet, si les membranes physiologiques venaient à se rompre, le microbiote intestinal comporte assez d'endotoxines bactériennes pour rapidement conduire au décès de l'hôte. Nos expériences montrent qu'en conditions normales, même une charge orale en molécules de LPS purifiées (donc certainement plus diffusables que les LPS présents sur les bactéries ou fragments bactériens) ne provoque ni augmentation de l'endotoxémie, ni augmentation de la sécrétion du GLP-1. *A contrario*, nous avons aussi observé qu'*ex vivo*, l'incorporation de LPS dans la lumière d'explants iléaux s'accompagne, elle, d'une stimulation de la sécrétion de GLP-1. Cette disparité entre les résultats obtenus *in vivo* et *ex vivo* pourrait être expliquée par le fait que les

explants ne sont plus irrigués et donc que la barrière intestinale y est altérée. En effet, dans un modèle pharmacologique de dégradation de la barrière intestinale (traitement DSS), la charge orale en LPS est cette fois associée à une augmentation non seulement de l'endotoxémie mais aussi de la sécrétion de GLP-1. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que les molécules de LPS luminales sont en mesure de stimuler les EEC et donc la sécrétion de GLP-1, uniquement quand la perméabilité de la muqueuse intestinale est augmentée.

Afin de tester cette hypothèse, comme dans les explants, nous avons généré une altération de la perméabilité intestinale par arrêt de l'irrigation mais cette fois *in vivo*, en utilisant le modèle d'I/R mésentérique. Nous avons ainsi mis en évidence que l'I/R mésentérique est associée à une sécrétion rapide de GLP-1. Pour confirmer l'implication des LPS dans ces observations, nous avons associé l'I/R à deux modèles pharmacologiques : i) diminution des quantités de LPS luminales en prétraitant oralement les souris avec un antibiotique spécifique des LPS, la polymyxine B et ii) antagonisation des effets des LPS en injectant au préalable un antagoniste TLR4 aux souris. Dans les deux cas, nous avons effectivement observé une induction moindre de la sécrétion de GLP-1 provoquée par l'I/R mésentérique. De manière surprenante, cette sécrétion de GLP-1 est stimulée avant même que les LPS ne soient détectés au niveau sanguin ; ce qui suggère donc une stimulation rapide des EEC par les LPS de la lumière intestinale. Ces LPS stimuleraient la sécrétion de GLP-1 alors qu'ils ne se situent encore que dans la proximité immédiate des EEC. Chez les souris, les EEC participent d'ailleurs activement à la réponse immunitaire intestinale en interagissant avec différents motifs microbiens (Palazzo *et al.*, 2007). Un axe immuno-endocrine intestinal a même été décrit. Les EEC joueraient un rôle clé dans la réponse immunitaire, que ce soit celle induite par les agents pathogènes ou celle provoquée par les bactéries commensales (Worthington, 2015).

Au vu des résultats précédemment énoncés quant à la capacité des LPS à stimuler la sécrétion de GLP-1, nous pouvons nous poser la question de la localisation du récepteur TLR4 sur les EEC. Ces dernières sont localisées assez profondément dans l'épithélium mais ont tout de même une surface apicale en contact avec la lumière intestinale (Bohórquez *et al.*, 2011) ; un positionnement basolatéral du récepteur TLR4 serait donc plus probable. En effet, cela expliquerait la stimulation de la sécrétion de GLP-1 par les LPS systémiques administrés en IV ou en IP ainsi que par les molécules de LPS luminales, uniquement quand la barrière intestinale

est altérée. Cela éviterait de plus, en conditions physiologiques, une stimulation quasi permanente par les endotoxines bactériennes. Seule une situation physiopathologique, comme une infection par des bactéries pathogènes ou une dégradation membranaire, pourrait permettre une stimulation du TLR4 basolatéral par les LPS. Dans ce dernier cas, cela expliquerait la sécrétion rapide de GLP-1 en réponse à une I/R mésentérique. En effet, selon nos coupes histologiques d'iléon, l'altération de la muqueuse intestinale se produit dans les minutes qui suivent l'initiation de l'I/R, rendant ainsi les EEC plus accessibles pour les LPS de la lumière intestinale. De plus, une étude de 2010 a montré que l'altération morphologique induite par l'I/R mésentérique est telle qu'elle est capable d'inverser l'orientation cellulaire et de faire passer le côté basal des entérocytes vers le côté luminal (Grootjans *et al.*, 2010). Dans notre étude, nous observons que 3 heures après la reperfusion des tissus, la sécrétion de GLP-1 n'est plus stimulée. La capacité de réparation de la muqueuse intestinale pourrait en être à l'origine (Ikeda *et al.*, 1998). En effet, la reconstitution de l'épithélium pourrait à nouveau rendre la partie basolatérale des cellules et donc les récepteurs TLR4 inaccessibles. Une telle stimulation basolatérale des récepteurs TLR4 par les LPS a d'ailleurs déjà été démontrée *in vitro* pour les cellules intestinales épithéliales : seule la stimulation basolatérale de ces cellules en culture avec des LPS conduit à une activation du facteur de transcription NfκB (Vamadevan *et al.*, 2010). De plus, les EEC sont elles aussi capables de détecter certains composés au niveau basolatéral. C'est le cas pour les acides biliaires et leur récepteur TGR5 (Brighton *et al.*, 2015) ainsi que pour les acides gras longues chaînes et leur récepteur GPR40 (Christensen *et al.*, 2015). L'idéal serait de faire des analyses histologiques de sections d'intestin avec un double marquage fluorescent. Une sonde pour le GLP-1 afin de cibler les cellules L et une sonde pour le TLR4 dans le but de visualiser son positionnement cellulaire. Des essais sont actuellement en cours au laboratoire mais des difficultés de spécificité des anticorps sont rencontrées.

Les pathologies intestinales telles que l'I/R mésentérique sont associées à une hausse de la perméabilité épithéliale, une infiltration des LPS, une activation des voies pro-inflammatoires, une défaillance multi-organes et *in fine* le décès. Malgré les dernières avancées médicales, les importants taux de mortalité associés à cette pathologie n'ont pas changé depuis les années 1940 : ils varient de 60 à 80% (Schoots *et al.*, 2004). Du fait de son évolution très rapide, le pronostic vital de l'I/R mésentérique dépend en grande partie de la rapidité de son diagnostic. L'absence de biomarqueurs sensibles et spécifiques permettant de détecter

rapidement les dommages gastro-intestinaux est sans doute à l'origine de ces forts taux de mortalité. Un grand nombre d'études précliniques et cliniques aspirent à trouver un tel biomarqueur. A ce jour, la protéine cytoplasmique I-FABP semble être la plus prometteuse (Khadaroo *et al.*, 2014). Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois que la sécrétion de GLP-1 induite par une I/R mésentérique expérimentale survient plus précocement et de façon plus marquée que l'augmentation plasmatique d'I-FABP. Cette rapidité de sécrétion du GLP-1 pourrait avoir plusieurs explications. Premièrement, contrairement à l'I-FABP, la hausse du GLP-1 plasmatique en réponse à une I/R mésentérique n'est pas la conséquence d'une souffrance et d'une mort cellulaire conduisant à la libération de la protéine. Elle est la réponse physiologique d'une cellule encore fonctionnelle stimulée par des composés normalement tenus à distance ; le phénomène est donc plus précoce et surtout plus sensible. Deuxièmement, l'I/R mésentérique provoque : i) une induction de l'expression du récepteur TLR4 intestinal (Yoshiya *et al.*, 2011) et ii) une hypoxie tissulaire provoquant à la fois une hausse du calcium intracellulaire et à la fois une augmentation de la quantité d'endotoxines lumineales (Sykes *et al.*, 1976; Grace, 1994) . Ces hausses des LPS, du récepteur TLR4 et du calcium intracellulaire pourraient ainsi être en faveur d'une production rapide de GLP-1 lors d'une I/R mésentérique.

La sécrétion de GLP-1 induite par l'altération de la muqueuse pourrait alors être une réponse directe des cellules L entéroendocrines à une invasion de molécules pro-inflammatoires. Le GLP-1 est essentiel dans le maintien de l'homéostasie glucidique. Toutefois, sa fonction d'incrétine en tant que fonction originelle a été remise en question à plusieurs reprises pour laisser place à un rôle anti-inflammatoire (Nauck, 1999; Lee & Jun, 2016). Et si cette capacité du GLP-1 à stimuler la sécrétion d'insuline avait déjà pour but de réguler l'inflammation ? En effet, l'insuline est connue pour avoir des propriétés anti-inflammatoires (Sun *et al.*, 2014). De plus, l'excès de glucose sanguin est inflammatoire en soi (Esposito *et al.*, 2002) ; la capacité du GLP-1 à réguler la glycémie pourrait donc avoir pour principal objectif le contrôle du statut inflammatoire. De nombreuses études ont d'ailleurs mis en évidence des fonctions anti-inflammatoires du GLP-1, que ce soit dans des organes périphériques autres que l'intestin (Dobrian *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Parthasarathy & Hölscher, 2013; Marques *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Lee & Jun, 2016) ou directement au sein de l'épithélium intestinal (Yusta *et al.*, 2015). Il a par exemple été montré que le GLP-1 est capable de réduire les effets pyrogènes des LPS (Rinaman & Comer, 2000) ou encore que

les souris déficientes en GLP-1R sont plus sensibles aux conséquences délétères d'un traitement au DSS (Yusta *et al.*, 2015). Des données obtenues au laboratoire mais non publiées montrent qu'une injection aiguë d'une dose modérée (2mg/kg) de LPS à des souris GLP-1R KO entraîne la mort de 100% des animaux (n=12) dans les 24 heures, alors que les souris sauvages étaient encore en vie 7 jours après l'injection. Nous montrons de plus dans cette étude que la cascade LPS / GLP-1 est fonctionnelle chez des volontaires humains traités avec des LPS, ce qui confirmerait la pertinence physiologique d'un GLP-1 anti-inflammatoire en réponse aux LPS chez l'Homme.

Pour résumer, notre étude démontre que les LPS sont capables de directement stimuler les cellules L entéroendocrines *via* leur récepteur TLR4 et que cela provoque la synthèse et la sécrétion de GLP-1. Nous considérons donc le GLP-1 sous son profil anti-inflammatoire et nous l'envisageons comme une molécule rapidement sécrétée en réponse à une stimulation des EEC par des LPS bactériens. Qu'il s'agisse ou non d'un mécanisme de défense, cela reste encore à être élucidé. Toutefois, cela place le GLP-1 comme un biomarqueur précoce d'altération de la barrière intestinale et donc d'I/R mésentérique. Ces perspectives de diagnostic clinique sont d'autant plus prometteuses que la cascade LPS / GLP-1, initialement découverte chez la souris, est également fonctionnelle chez l'Homme. Des études sont néanmoins nécessaires et sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer si, chez l'Homme, une altération de la barrière intestinale s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de GLP-1.

IV. Perspectives

L'article scientifique en rapport avec ce projet est en cours de finalisation et a été incorporé à la fin de cette thèse (Annexe 1). Il ne s'agit à ce stade que d'une version « brouillon » car le journal n'a pas encore été ciblé. Il le sera en fonction des derniers résultats attendus. Il devrait être néanmoins soumis à la date de la soutenance orale. Le dosage du GLP-1 en tant que méthode de diagnostic clinique et précoce de l'I/R mésentérique a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet également insérée à la fin de cette thèse (Annexe 2).

1. Le GLP-1 pourrait-il être un outil de diagnostic clinique de l'I/R mésentérique ?

Nous avons démontré que le GLP-1 pourrait être un biomarqueur précoce et prometteur d'une perturbation de la fonction barrière intestinale telle qu'elle est observée par exemple lors d'une I/R mésentérique. Effectivement, le GLP-1 répond à tous les critères nécessaires pour être un marqueur optimal d'une souffrance intestinale : i) il est produit par des cellules de la muqueuse intestinale, ii) s'agissant du GLP-1 total (actif et inactif), l'action protéolytique hépatique est insignifiante et iii) il est donc détectable et quantifiable au niveau de la circulation systémique. Cette découverte pourrait aider à répondre au cruel manque de biomarqueurs cliniques, permettant de diagnostiquer précocement et donc de prendre en charge efficacement l'I/R mésentérique. Le GLP-1 pourrait ainsi faire partie d'un panel de biomarqueurs et pourrait contribuer à réduire les taux de mortalité élevés de cette pathologie. De plus, en clinique et dans l'urgence, le dosage du GLP-1 serait facilement réalisable à condition d'automatiser le kit ELISA déjà sur le marché. Cela a d'ailleurs par exemple déjà été réalisé pour le dosage de l'insuline et du peptide C (chimiluminescence).

Toutefois, ces résultats ayant été obtenus chez la souris, la transposition à l'échelle clinique nécessite tout d'abord que nous confirmions ces résultats chez l'Homme. Dans ce cadre, nous avons établi une collaboration avec une équipe Néerlandaise. Ils réalisent des expériences d'I/R chez des patients devant subir ensuite une ablation d'une partie de l'intestin. Ces résultats seront inclus dans la publication en cours de rédaction et de leur nature dépendra le journal ciblé. Puis, si ces résultats s'avèrent probants et montrent effectivement le GLP-1

comme une hormone rapidement produite par l'intestin humain lors d'une I/R, alors il nous faudra encore définir, chez l'Homme, les capacités du GLP-1 à diagnostiquer cette pathologie : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives ou encore le rapport de vraisemblance pour différentes valeurs seuils. Il faudra donc aussi s'attacher à déterminer le niveau de GLP-1 plasmatique de référence, c'est-à-dire celui avec lequel seront comparés les taux de GLP-1 circulants des patients suspectés d'I/R mésentérique. Pour finir, il faudra également que la technique de dosage actuelle du GLP-1 (kit ELISA) soit adaptée à une utilisation clinique.

2. Quel est le rôle du GLP-1 produit en réponse aux LPS ?

Cette étude montre donc que les LPS sont capables de stimuler les EEC et d'induire une sécrétion de GLP-1. Pourquoi les EEC sont-elles programmées pour répondre à une stimulation par les LPS et à quoi peut servir ce GLP-1, que ce soit au niveau local comme au niveau systémique ? Au niveau local, les cellules de Paneth connues pour produire des composants antimicrobiens disposent d'un GLP-1R fonctionnel (Kedees *et al.*, 2013). L'augmentation de GLP-1 pourrait donc stimuler le fonctionnement de ces cellules et ainsi contribuer à combattre l'infection générée par l'I/R. La capacité des EEC à répondre à une stimulation locale par des molécules de LPS intestinales pourrait également être un processus de défense contre une éventuelle infection alimentaire, comme c'est le cas pour la cholécystokinine. Le GLP-1 ayant des propriétés satiétogènes, sa production en réponse à la présence de LPS pathogènes pourrait viser à réduire la prise alimentaire et ainsi éviter la surinfection (Worthington, 2015). La maturation protéolytique du proglucagon à l'origine de la production de l'hormone GLP-1 entraîne également la production de GLP-2. Or, l'administration de GLP-2 ou de ses analogues a des effets protecteurs pour la muqueuse en cas d'I/R intestinale (Zhang *et al.*, 2008). Cette sécrétion de GLP-1 en réponse à une altération de la membrane intestinale pourrait donc être la conséquence d'une stimulation de GLP-2 par les molécules de LPS. Le GLP-1 aurait lui-même un rôle protecteur de la muqueuse. En effet, l'administration pharmacologique de GLP-1 est bénéfique pour le tissu cardiaque lors d'une ischémie de cet organe (Bose *et al.*, 2005). L'I/R mésentérique dégrade le fonctionnement mitochondrial et provoque un stress oxydant. Or, en dehors du contexte intestinal, le GLP-1 a déjà été décrit comme capable de stimuler le métabolisme mitochondrial (Morales *et al.*, 2014) et de protéger les cellules vis-à-vis des

dommages oxydatifs (Li *et al.*, 2016). Ces effets dépendants du GLP-1 pourraient parfaitement être transposables au tissu intestinal car les cellules qui le composent expriment un GLP-1R fonctionnel (Kedees *et al.*, 2013). La gravité des lésions intestinales induites par un traitement au DSS est d'ailleurs augmentée chez des souris déficientes en GLP-1R (Yusta *et al.*, 2015). La glutamine, un agent sécrétagogue du GLP-1, est connue pour exercer de nombreuses actions protectrices au niveau de la muqueuse intestinale et notamment pour améliorer les conséquences délétères d'une I/R intestinale (Ikeda *et al.*, 2002). S'agit-il des effets directs de la glutamine ou de sa puissante capacité à faire sécréter du GLP-1 ?

De nombreuses études montrent que l'absence d'un récepteur TLR4 intestinal fonctionnel ou son antagonisation pharmacologique potentialisent les conséquences délétères d'un traitement au DSS et d'une I/R mésentérique. Il aurait un rôle protecteur en cas de dégradation de la barrière (Fukata *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Tatum *et al.*, 2010). Est-ce un effet dépendant du GLP-1 ? La question reste ouverte. Le TLR4 permet la sécrétion de GLP-1 en réponse aux LPS mais il est aussi le principal récepteur à l'origine de la réponse inflammatoire. Ce n'est pas parce que la production de GLP-1 plasmatique apparaît avant l'inflammation systémique, qu'une inflammation locale est à exclure (Collange *et al.*, 2015). Ainsi, la production de cytokines intestinales locales en réponse à l'infiltration bactérienne de la membrane altérée et notamment la production d'IL-6 pourrait également contribuer à stimuler le GLP-1 anti-inflammatoire, protecteur de la muqueuse (Ellingsgaard *et al.*, 2011). Dans cette thèse, nous montrons que l'administration de LPS en systémique est aussi capable de provoquer la sécrétion de GLP-1 *via* un mécanisme dépendant de TLR4. Cette réponse des EEC à la présence de LPS dans l'organisme pourrait justement s'expliquer par les propriétés anti-inflammatoires avérées de cette hormone intestinale ou encore à celles de l'hormone pancréatique dont elle stimule la sécrétion : l'insuline (Sun *et al.*, 2014; Lee & Jun, 2016).

Nous pourrions envisager d'explorer le rôle du GLP-1 produit en réponse aux LPS en utilisant soit des souris déficientes en GLP-1R, soit un antagoniste du récepteur au GLP-1 tel que l'exendin (9-39).

3. Les cellules de l'immunité pourraient-elles être une source de GLP-1 ?

Nos tentatives de double marquage fluorescent de coupes d'intestin pour mettre en avant la localisation du récepteur TLR4 sur les EEC n'ont pour l'instant pas été fructueuses. Nous n'avons pas réussi à obtenir un signal spécifique pour les deux anticorps simultanément. Tout d'abord, l'anticorps anti-TLR4 murin utilisé n'était pas spécifique dans les conditions de préparation préconisées pour l'anticorps anti-GLP-1. Puis le deuxième essai montre un double marquage dans la partie centrale des villosités intestinales, au niveau de la *lamina propria* et des vaisseaux sanguins. Il est normal de retrouver un signal TLR4 dans cette zone, du fait de la présence de cellules de l'immunité. Toutefois, cela n'est pas le cas pour le signal du GLP-1 qui aurait dû être restreint aux EEC de l'épithélium intestinal. Ce second essai pose donc la question de la spécificité de l'anticorps anti-GLP-1 et apparaît donc comme non exploitable.

Considérons que ce second essai ait fonctionné et que les cellules de l'immunité présentes dans cette zone villositaire soient capables de stocker ou de produire du GLP-1. Cela renforcerait le rôle de « régulateur du statut inflammatoire » de cette hormone et cela contribuerait à sa sécrétion rapide en réponse à une dégradation de la barrière intestinale. Une capacité de stockage d'hormones « intestinales » par les cellules de l'immunité a déjà été mise en évidence pour la sérotonine. Les cellules dendritiques sont capables de capter la sérotonine et de la stocker dans des vésicules intracellulaires dont l'exocytose est calcium-dépendante (O'Connell *et al.*, 2006). De plus, les lymphocytes T sont capables de synthétiser certaines des hormones « intestinales » dont la sérotonine et la ghréline (Hattori *et al.*, 2001; León-Ponte *et al.*, 2007). Le stockage de sérotonine par les cellules dendritiques résulterait d'ailleurs d'une interaction avec les lymphocytes T producteurs de cette hormone (O'Connell *et al.*, 2006). Finalement, pour conforter cette hypothèse, il a été montré que : i) la stimulation du récepteur TLR4 macrophagique par des LPS conduit à une augmentation du calcium intracellulaire, ii) les macrophages expriment l'enzyme PC1/3 et iii) dans les macrophages, l'expression de cette enzyme est stimulée par les LPS. L'enzyme PC1/3 apparaît comme un facteur clé dans la régulation des sécrétions cytokiniques. Son inhibition oriente la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 (Lansac *et al.*, 2006; Duhamel *et al.*, 2015). Toutefois, PC1/3 est aussi connue pour permettre la synthèse du GLP-1 dans d'autres types cellulaires. Les cellules de l'immunité pourraient donc stocker du GLP-1, son précurseur le proglucagon ou bien encore être capables de synthétiser ce dernier. Cette hypothèse doit encore être vérifiée.

Partie 2

Endotoxémie et maladies métaboliques

Contexte général

Avec un coût économique mondial approximatif de 2400 milliards d'euros annuel, l'obésité et le diabète sont des maladies métaboliques représentant un véritable fardeau financier et dont la prévalence ne cesse malheureusement d'augmenter. En 1998, l'OMS qualifiait l'obésité de première « épidémie » non infectieuse de l'Histoire. Selon cette même institution, il y avait en 2014 environ 1,9 milliard d'adultes (âgés de 18 ans et plus) en surpoids, dont au moins 600 millions d'obèses. En France, les chiffres sont également inquiétants : en 2012, l'étude Obépi estimait à près de 7 millions le nombre de personnes obèses, soit environ 15% de la population et près de 50 fois plus qu'en 1960. Les chiffres concernant le diabète ne sont pas plus rassurants. Selon la FID, dans le monde, une personne meurt du diabète toutes les 7 secondes. C'est plus que le sida et la malaria réunis. Parmi les 422 millions de diabétiques (données de 2014 – OMS), 90% présentent un DT2 dont le facteur de risque majeur est l'obésité. En effet, près de 80% des diabétiques de type 2 sont obèses ou en surpoids, mais « seuls » 25 à 30 % des obèses sont diabétiques. DT2 et obésité sont étroitement liés, si bien qu'un nouveau terme est apparu dans la littérature scientifique, celui de « diabésité ».

L'origine de ces maladies est complexe et reste à ce jour inconnue ; multifactorielle, elle résulte d'interactions entre composantes génétiques et éléments environnementaux tels que l'alimentation, la sédentarité ou encore notre microbiote intestinal. Au sein de ce microbiote, des bactéries colonisent notre tractus digestif depuis notre plus jeune âge et vivent en totale synergie avec nous. Des travaux utilisant des souris axéniques montrent que le microbiote intestinal exerce un rôle non négligeable dans le développement de l'obésité, de la stéatose hépatique ou encore de la résistance à l'insuline (Bäckhed *et al.*, 2004, 2007; Rabot *et al.*, 2010; Le Roy *et al.*, 2013). De plus, une étude de 2013 met en avant un lien entre la richesse du microbiote et le statut métabolique des individus : la diminution de la diversité bactérienne se caractérise par une adiposité, un état inflammatoire ainsi qu'une résistance à l'insuline plus développés (Le Chatelier *et al.*, 2013). Cependant, à l'heure actuelle il est encore difficile de dire si ces modifications sont la cause ou la conséquence des maladies métaboliques.

Un nombre croissant d'études scientifiques suggère que les LPS, des composés pro-inflammatoires présents à la surface des bactéries à Gram négatif de ce microbiote, pourraient contribuer au développement de l'inflammation à bas bruit toujours associée aux maladies métaboliques. En effet, des études chez l'animal ont montré qu'un régime riche en graisses s'accompagnait d'une augmentation modérée des taux de LPS plasmatiques (Cani *et al.*, 2007a, 2007c). Ainsi est né le concept d'« endotoxémie métabolique ». Il a ainsi été montré que l'induction expérimentale d'une endotoxémie métabolique, c'est-à-dire d'une faible augmentation des taux de LPS plasmatiques, mime les effets d'un régime obésogène en favorisant la prolifération de précurseurs adipocytaires, l'accumulation de masse grasse et le développement de la résistance à l'insuline (Cani *et al.*, 2007a; Luche *et al.*, 2013).

Si cette notion d'endotoxémie métabolique a pu être étendue à des études chez l'Homme (Pussinen *et al.*, 2011; Pendyala *et al.*, 2012), sa pertinence physiologique n'en reste pas moins controversée, et cela pour plusieurs raisons : i) chez la souris et chez l'Homme, les régimes riches en graisses ne sont pas toujours associés à une augmentation basale de l'endotoxémie, ii) les LPS plasmatiques ne sont pas forcément nécessaires pour expliquer les effets du microbiote sur l'adiposité et le métabolisme glucidique, iii) chez des rats, l'infusion continue de faibles doses de LPS en IP ou par voie portale pendant 60 et 28 jours respectivement n'altère pas leur sensibilité à l'insuline et iv) toujours chez des rats, l'administration continue d'une faible dose de LPS pendant 90 jours ne modifie pas la masse corporelle des animaux (Smith *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Caesar *et al.*, 2012; Dudele *et al.*, 2015; Janssen & Kersten, 2016). De plus, la technique de dosage des LPS utilisée dans la plupart des études en rapport avec l'endotoxémie métabolique peut manquer de robustesse et de fiabilité lorsqu'il s'agit de quantifier des LPS plasmatiques. Cette technique appelée *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) est basée sur une réaction enzymatique permettant de détecter l'activité biologique des LPS. Peu quantitative, elle permet surtout de détecter la présence de LPS et y est très sensible ; cela implique donc le risque de contaminations et de faux positifs. De plus, les constituants du plasma tels que les acides biliaires et les lipoprotéines ou encore les agents anticoagulants utilisés lors du prélèvement peuvent interférer avec les résultats du test LAL entraînant de ce fait de fortes variabilités (Boutagy *et al.*, 2016). Récemment, une méthode de dosage direct des LPS par HPLC/MS/MS a été développée au laboratoire. Cette technique a été décrite et validée comme étant fiable, pratique, précise, reproductible et sensible. Elle permet une réelle quantification

des LPS même dans des milieux complexes tels que le plasma et sera celle utilisée pour ces travaux de recherche (Pais de Barros *et al.*, 2015). Pour finir, les effets des LPS dépendent beaucoup du statut inflammatoire basal de chaque animal, or celui-ci peut être fortement dépendant de l'environnement, du microbiote de l'animal et donc de l'animalerie. Ce paramètre pourrait expliquer en partie la controverse actuelle quant aux effets d'une endotoxémie métabolique.

Ainsi, le lien éventuel entre endotoxémie et maladies métaboliques ne fait pas encore l'unanimité. Les résultats des études scientifiques à ce sujet ne sont pas cohérents et ne permettent pas de conclure quant aux véritables conséquences d'une hausse de l'endotoxémie sur l'étiologie des désordres métaboliques. C'est dans ce contexte scientifique que s'inscrit cette deuxième partie de thèse. Celle-ci a volontairement été divisée en deux sous-parties :

i. *Quels sont les effets d'une endotoxémie expérimentale lors d'un régime obésogène ?*

Pour cela, nous avons utilisé des pompes osmotiques de type Alzet® : elles permettent une diffusion continue d'une faible dose de LPS pendant 28 jours. Elles ont été implantées dans la cavité intrapéritonéale des souris nourries avec un régime obésogène.

ii. *Les souris déficientes en PLTP sont-elles plus sensibles aux effets d'un régime obésogène ?*

Pour cela, des souris PLTP KO ont été nourries pendant 4 mois avec un régime obésogène. La PLTP contribue à la neutralisation des LPS et les souris PLTP KO sont plus sensibles aux effets des LPS (Gautier *et al.*, 2008). Si le régime obésogène augmente l'endotoxémie et que cela contribue à l'apparition des désordres métaboliques, alors les souris PLTP KO seraient également plus sensibles à ce genre d'alimentation.

Quels sont les effets d'une endotoxémie expérimentale lors d'un régime obésogène ?

I. Introduction

Au laboratoire, il a récemment été montré que, chez des souris, l'injection de LPS est capable d'augmenter les taux circulants de GLP-1 actif et que cela est associé à une augmentation de la SISG. De plus, cette amélioration de la SISG est également observée lorsque les LPS sont administrés *via* l'utilisation de pompes osmotiques de type Alzet® et donc de manière à mimer une endotoxémie métabolique (Nguyen *et al.*, 2014). Les LPS étant de puissants agents pro-inflammatoires, cette nouvelle cascade de régulation LPS / GLP-1 / insuline pose la question de sa pertinence physiologique. En effet, au-delà de leur capacité à réguler la glycémie, le GLP-1 et l'insuline ont de nombreuses propriétés anti-inflammatoires (Sun *et al.*, 2014; Lee & Jun, 2016). Leur induction par les LPS pourrait avoir pour objectif de réguler le statut inflammatoire.

Quoi qu'il en soit, l'augmentation des taux de LPS plasmatiques observée lors d'un régime obésogène pourrait stimuler cette cascade de régulation, dont les conséquences sur le long terme pourraient contribuer aux effets délétères des LPS. En effet, des travaux récents suggèrent qu'une hypersécrétion d'insuline pourrait être le point de départ commun des maladies métaboliques telles qu'obésité et DT2 ; le concept de « syndrome hyperinsulinémique » fait alors son apparition (Kelly *et al.*, 2014). L'hyperinsulinémie serait la cause et non la conséquence de la résistance à l'insuline qui ne serait donc qu'une réponse secondaire à des quantités trop importantes de cette hormone. Toutefois, l'origine de cette hypersécrétion d'insuline est actuellement inconnue. Certains auteurs suggèrent l'implication d'un signal provenant de l'intestin (Pories & Dohm, 2012). En effet, après chirurgie bariatrique, la sécrétion d'insuline est normalisée alors que cette opération ne consiste « qu'à exclure » une partie de l'intestin.

Nous faisons alors l'hypothèse que ce signal pourrait être les LPS du microbiote intestinal. La hausse de l'endotoxémie associée à un mauvais régime alimentaire pourrait, *via* la cascade LPS / GLP-1 / insuline, stimuler de façon chronique la SISG et ainsi être impliquée dans le développement des maladies métaboliques. Effectivement, les effets délétères d'un régime riche en graisses (obésité et résistance à l'insuline) sont amoindris lorsque le TLR4 ou le GLP-1R ne sont pas fonctionnels (Hansotia *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Ayala *et al.*, 2010; Pierre *et al.*, 2013). De plus, sous régime standard, l'amélioration de la tolérance au glucose observée lors d'une stimulation ponctuelle de la cascade LPS / GLP-1 / insuline disparaît lorsque celle-ci est stimulée de façon continue pendant 28 jours (Nguyen *et al.*, 2014) : la stimulation continue de la sécrétion d'insuline pourrait initier une insulino-résistance et ainsi expliquer cet effet sur la tolérance au glucose. Nous faisons l'hypothèse que ce phénomène observé sous régime standard pourrait être exacerbé sous régime obésogène. L'augmentation des LPS plasmatiques liée au régime s'ajouterait aux LPS administrés en continu *via* les pompes osmotiques.

Dans cette étude une légère hausse de l'endotoxémie a été induite par infusion continue de LPS pendant 28 jours chez des animaux sauvages nourris avec un régime riche en graisses. De façon surprenante, dans nos conditions, l'augmentation expérimentale des LPS circulants ne potentialise pas les conséquences délétères d'un régime obésogène. Elle semble au contraire les prévenir. En effet, l'infusion de LPS est associée à : i) une diminution de la masse grasse totale, viscérale et hépatique et ii) une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline *via* une induction de l'utilisation du glucose au niveau musculaire.

II. Résultats expérimentaux

1. L'augmentation de l'endotoxémie entraîne une perte de masse grasse totale

Afin de tester les effets d'une endotoxémie expérimentale au cours d'un régime obésogène, des pompes osmotiques Alzet® ont été implantées dans la cavité péritonéale de souris. Ces pompes délivrent pendant 28 jours une faible dose de LPS (300µg/kg/jour) ou du sérum physiologique en contrôle. Les souris ont été mises sous régime riche en graisses (60% kJ de graisses saturées) une semaine avant l'implantation des pompes.

Afin de valider notre modèle expérimental (Figure 42), nous avons dosé les niveaux de LPS plasmatiques. Les concentrations de LPS ont été déterminées par la mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS. Nous mesurons le 3-HM avant et après hydrolyse des molécules de LPS. En effet, avant hydrolyse, seul le 3-HM libre est dosé. Celui-ci correspond à l'acide gras présent naturellement dans la cellule et pouvant provenir, par exemple, de la β -oxydation de l'acide myristique. Le dosage des LPS, après hydrolyse, permet la quantification de toutes les molécules de 3-HM : celles estérifiées au lipide A et celles présentes naturellement dans la cellule. Ainsi, la différence des concentrations entre le 3-HM total et le 3-HM libre permet de déterminer la part de 3-HM spécifique des LPS. Nous constatons ainsi que l'administration continue de LPS pendant 28 jours, à raison de 300µg/kg/jour, génère une augmentation des niveaux plasmatiques de LPS d'un facteur 5 (Figure 42A). Nous remarquons également que l'infusion de LPS n'a aucune incidence sur les concentrations de 3-HM libre. Cette augmentation d'endotoxémie chez les animaux infusés aux LPS s'accompagne d'une élévation de la concentration plasmatique de certaines cytokines pro-inflammatoires (Figure 42B). Notre modèle expérimental conduit donc à une faible hausse de l'endotoxémie et est associé à un état inflammatoire.

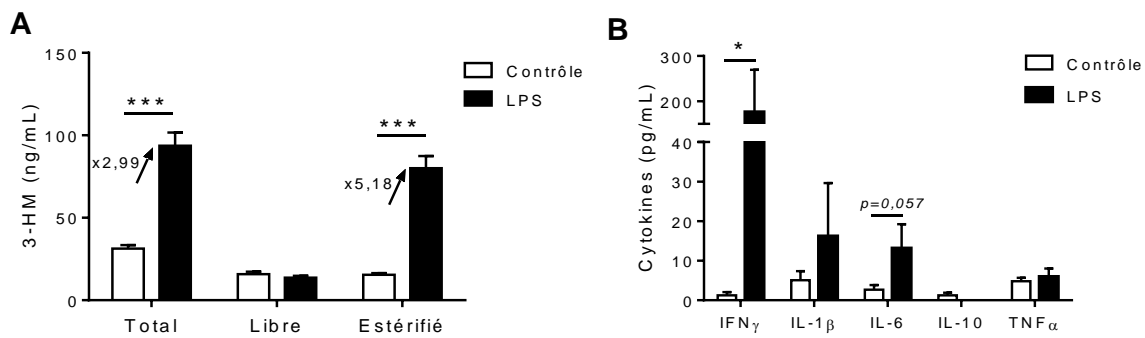


Figure 42

L'infusion continue de LPS induit une augmentation de l'endotoxémie

Évaluation du statut inflammatoire des souris infusées au LPS (300 μ g/kg/jour) ou au NaCl en contrôle pendant 28 jours et nourries avec un régime HF. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=16 contrôles et n=11 LPS). **A.** Quantification des LPS plasmatiques *via* la mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS (ng/mL). **B.** Quantification de différentes cytokines plasmatiques : IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 et TNF α (pg/mL).

Tout au long des 28 jours d'expérimentation, la masse corporelle et la prise alimentaire ont régulièrement été mesurées (Figure 43). Durant les premiers jours qui suivent l'implantation des pompes, nous observons une diminution drastique de la prise alimentaire (Figure 43A). Chez les souris contrôles recevant l'infusion de sérum physiologique, cette baisse est à associer à l'acte chirurgical. Chez les souris implantées avec les pompes LPS, l'infusion entraîne une chute plus importante de la prise alimentaire. Ceci serait probablement la conséquence des effets anorexigènes des LPS (Langhans, 2007). Toutefois, cette diminution de prise alimentaire n'est que temporaire. En effet, à partir du quatrième jour post implantation et jusqu'à la fin de l'expérimentation, la prise alimentaire est identique entre les deux groupes d'animaux. Cette variation de la prise alimentaire influence de façon similaire la masse corporelle des animaux. Post implantation, les souris infusées aux LPS ont une perte de masse corporelle plus importante que les souris contrôles. La masse corporelle des souris LPS reste ensuite toujours légèrement inférieure à celles des souris contrôles (Figure 43B). Le calcul du ratio prise de masse corporelle / prise alimentaire correspond à l'efficacité alimentaire et illustre la capacité des animaux à

transformer les kilocalories qu'ils ingèrent en grammes de masse corporelle. Nous avons effectué ce calcul à partir du cinquième jour post implantation pour s'affranchir des effets anorexigènes des LPS. Nous avons constaté que les deux groupes d'animaux présentent la même efficacité alimentaire (Figure 43C). Dans nos conditions expérimentales, l'infusion de LPS sous régime HF n'influence pas la prise alimentaire et n'est pas associée à une augmentation de la masse corporelle par rapport aux souris contrôles.

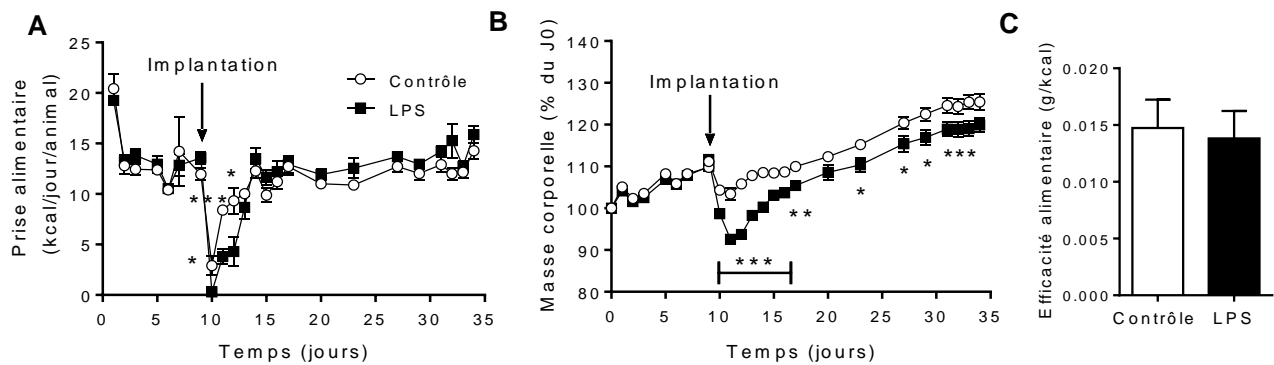


Figure 43

L'infusion continue de LPS n'augmente pas la masse corporelle

Suivi régulier de la prise alimentaire et de la masse corporelle au cours des 28 jours d'infusion continue de LPS (300µg/kg/jour) ou de NaCl en contrôle et sous régime HF. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001. Les valeurs sont les moyennes ± SEM. **A.** Mesure de la prise alimentaire exprimée en kilocalories consommées par jour et par souris (n=4 dans chaque groupe) **B.** Evolution de la masse corporelle représentée comme le pourcentage de la masse de chaque animal le premier jour du régime (J0) (n=16 contrôles et n=11 LPS). **C.** Efficacité alimentaire déterminée par le ratio : grammes de masse corporelle accumulés par jour / la prise alimentaire du jour en kilocalories (n=4 dans chaque groupe).

Nous avons évalué la composition corporelle des animaux par EchoMRI® (Figure 44). L'infusion continue de LPS entraîne une diminution de la masse grasse totale des animaux. Cette diminution de masse grasse est compensée par une augmentation de masse maigre (Figure 44A). Par ailleurs, le pourcentage de masse grasse totale est inversement corrélé avec les niveaux plasmatiques de LPS : plus l'endotoxémie est élevée, moins la masse grasse est développée (Figure 44B).

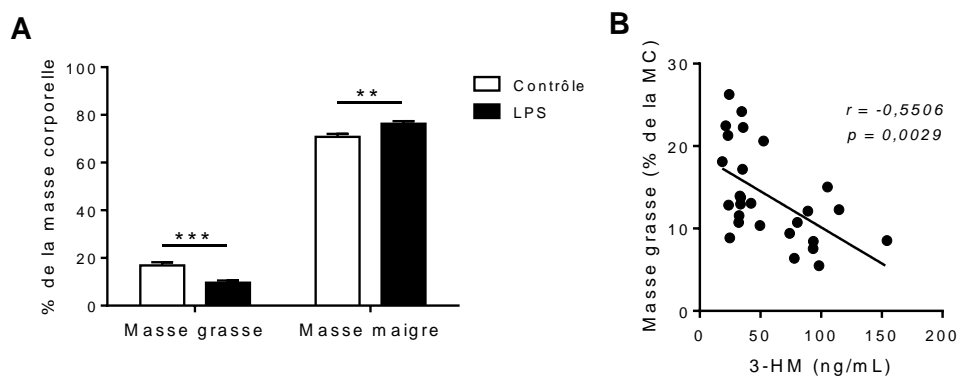


Figure 44

L'augmentation de l'endotoxémie est associée à une perte de masse grasse

Composition corporelle (EchoMRI®) des souris infusées aux LPS (300µg/kg/jour) ou au NaCl en contrôle pendant 28 jours et nourries avec un régime HF. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié ou du test de corrélation de Pearson, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=16 contrôles et n=11 LPS). **A.** Masse grasse et masse maigre totales (% de la masse corporelle). **B.** Corrélation entre la masse grasse (% de la masse corporelle) et les niveaux plasmatiques de 3-HM total (ng/mL).

2. Effets des LPS sur le tissu adipeux blanc et le foie

a) Le tissu adipeux péri-épididymaire

Les modulations de la masse grasse totale sont souvent associées à des modifications au niveau du principal organe de stockage des graisses de l'organisme, le tissu adipeux blanc. Nous nous sommes de ce fait intéressés aux conséquences de l'infusion de LPS sur le métabolisme de cet organe et plus particulièrement sur celui du TAPE (Figure 45). D'un point de vue morphologique, l'infusion de LPS entraîne une modification de la taille des adipocytes au sein du TAPE. Des coupes histologiques montrent une réduction de la taille des adipocytes chez les animaux traités aux LPS par rapport aux animaux contrôles (Figure 45A). En effet, la fréquence de distribution des adipocytes en fonction de leur surface est décalée vers les classes les plus

petites pour les animaux infusés aux LPS (Figure 45B). Ainsi, la surface moyenne des adipocytes apparaît comme étant plus faible chez les souris LPS (Figure 45C). Conformément aux analyses EchoMRI® montrant de façon non spécifique, une diminution de masse grasse chez les animaux infusés aux LPS, la masse de TAPE pesée au sacrifice des animaux est aussi plus faible chez les souris LPS (Figure 45D). De façon très intéressante, l'infusion continue de LPS augmente considérablement la teneur en LPS normalement faible de ce tissu (Figure 45E).

Nous avons ensuite étudié l'expression de certains gènes d'intérêt codant pour des protéines impliquées soit dans la réponse inflammatoire, soit dans le métabolisme du TAPE. L'infusion de LPS entraîne une augmentation de l'expression de certains gènes marqueurs d'une inflammation, tels que la cytokine TNF α ou le marqueur de l'infiltration macrophagique F4-80 (Figure 45F). Nous avons également étudié l'expression de gènes impliqués dans les voies métaboliques clés du TAPE. Parmi les gènes codant pour des protéines impliquées dans l'entrée des acides gras, l'expression de la LPL a tendance à être diminuée par la présence de LPS et nous observons une nette diminution de l'expression du transporteur FAT/CD36. Par contre, nous remarquons également une moindre expression du FIAF décrit comme étant un inhibiteur de la LPL (Figure 45G). Si la voie d'entrée des AGL semble globalement diminuée, il existe également une voie de production et de stockage interne aux adipocytes. En effet, la lipogenèse *de novo* consiste à produire des acides gras en utilisant le glucose comme précurseur. Celle-ci se déroule principalement dans le foie mais les adipocytes sont aussi capables de réaliser cette transformation biochimique. La DGAT et la FAS sont deux protéines connues pour être impliquées dans cette voie métabolique. Nous constatons ici que l'expression de ces deux protéines est diminuée par le traitement aux LPS (Figure 45G). Enfin, le tissu adipeux étant un organe de stockage, il est normal que, dans certaines conditions, celui-ci puisse mobiliser ses réserves. Pour être déstockés, les TG sont à nouveau hydrolysés en acides gras. Pour cela, des protéines telles que l'ATGL et l'HSL sont nécessaires. Nous remarquons sur la Figure 45G que si l'expression génique de l'ATGL n'est pas modifiée par les LPS, celle de l'HSL est considérablement diminuée. Toutefois, l'activation de ces deux protéines nécessite des étapes de phosphorylation et la mesure de leur expression génique ne reflète donc pas forcément leur activité cellulaire. L'adipocyte peut utiliser les acides gras comme source d'énergie *via* la β -oxydation mitochondriale, dont la protéine CPT1 est un facteur clé. Son expression génique n'est pas modifiée par le traitement aux LPS (Figure 45G).

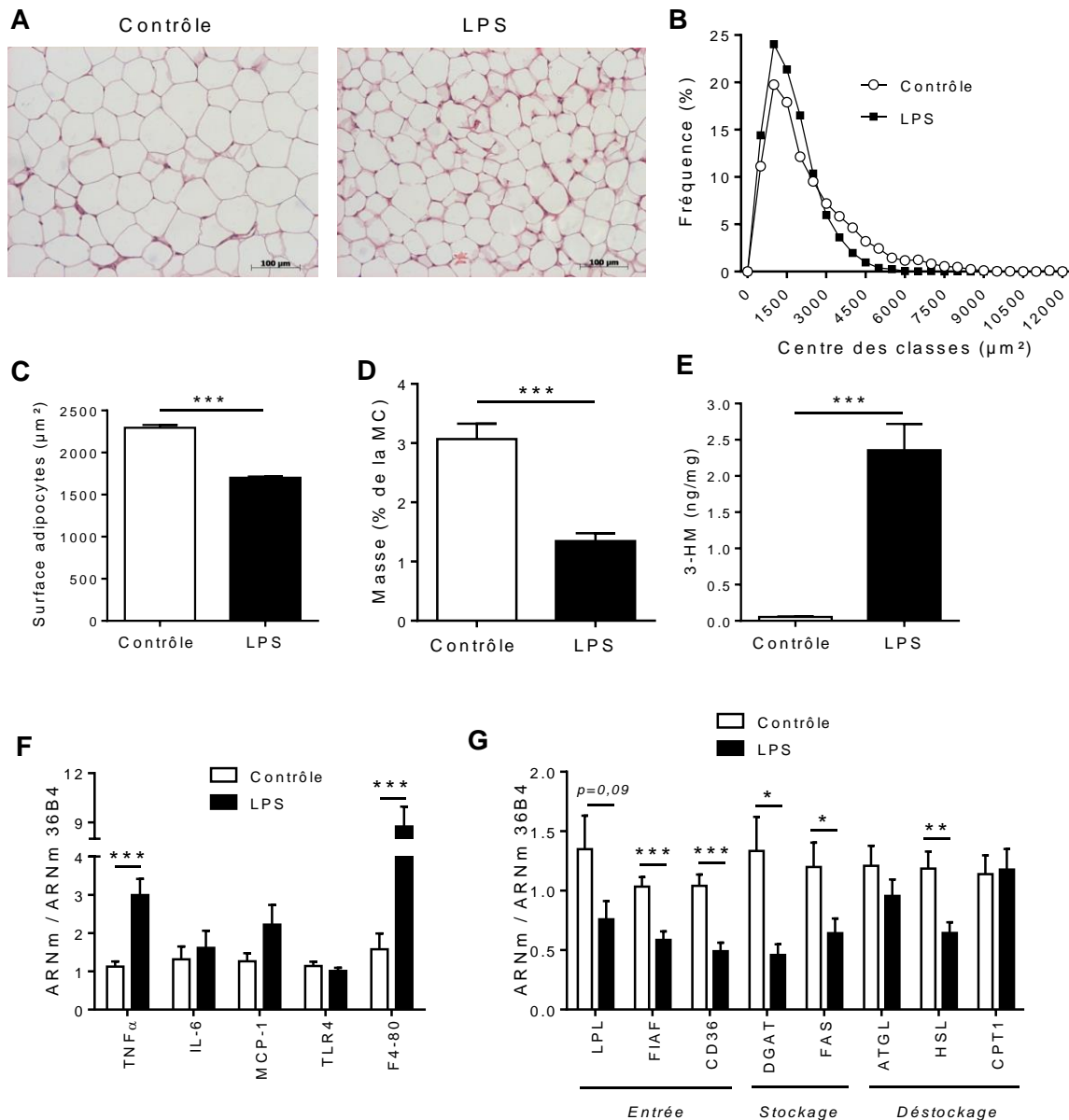


Figure 45

L'infusion continue de LPS : conséquences sur le TAPE

Effets d'une infusion continue de LPS (300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$) pendant 28 jours sur le métabolisme du tissu adipeux péri-épididymaire (TAPE) d'animaux nourris avec un régime HF, du NaCl est infusé en contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Mann-Whitney ou du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=16 contrôles et n=11 LPS). **A.** Coupes histologiques de TAPE colorées à l'hématoxyline/éosine et témoignant de la taille des adipocytes. **B & C.** Respectivement, fréquence de distribution des adipocytes en fonction de leur surface (%) et surface moyenne des adipocytes (μm^2 ; n=2570 NaCl et n=3853 LPS). **D.** Masse du TAPE au sacrifice exprimée en pourcentage de la masse de l'animal. **E.** Quantification des LPS dans le TAPE *via* la mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS (ng/mg). **F & G.** Expressions géniques rapportées à l'expression de la 36B4 : respectivement des gènes codant pour des marqueurs de l'inflammation et pour des protéines impliquées dans le métabolisme du tissu.

b) Le foie

Bien que cela ne soit pas sa fonction principale, le foie peut aussi stocker l'énergie sous forme de graisses : stockage de TG à partir des acides gras circulants ou issus de la lipogenèse *de novo*. La stéatose hépatique, c'est-à-dire l'accumulation de graisses au niveau de cet organe, est un facteur souvent associé à la masse grasse globale de l'organisme. Les paramètres mesurés précédemment dans le TAPE ont également été déterminés dans le foie afin d'observer les effets d'une infusion continue de LPS sur cet organe (Figure 46). Des coupes histologiques de foie colorées avec de l'Oil Red O mettent en évidence une diminution de l'accumulation lipidique chez les souris infusées aux LPS (Figures 46A et 46B). Le dosage des lipides totaux hépatiques montre qu'après 28 jours d'infusion de LPS, la teneur en lipides du foie des souris est diminuée d'environ 30% par rapport au foie des souris contrôles (Figure 46C). Les animaux infusés aux LPS présentent toutefois une masse hépatique plus importante que celle des animaux contrôles (Figure 46D). La quantification des LPS présents au sein de cet organe a été réalisée. Comme dans le TAPE, l'administration de LPS conduit à une augmentation significative de la quantité de LPS dans le foie (Figure 46E). Notons cependant que le foie étant un organe qui détoxifie les molécules de LPS présentes dans l'organisme, le contenu en LPS du foie des souris contrôles n'est pas négligeable.

L'infusion de LPS semble bien induire un phénotype inflammatoire au niveau du foie. En effet, l'expression des gènes codant pour la cytokine pro-inflammatoire TNF α ou le facteur d'attraction des macrophages MCP1 est augmentée (Figure 46F). Nous remarquons également une plus forte expression de GPR120 connu comme ayant des propriétés anti-inflammatoires notamment au niveau hépatique (Oh *et al.*, 2010). GPR120 est exprimé sur les macrophages. Cette augmentation de l'expression hépatique de GPR120 pourrait donc être le reflet d'une infiltration macrophagique dans ce tissu, comme le suggère également l'augmentation de l'expression de MCP1. Ces résultats semblent donc indiquer une induction du statut inflammatoire hépatique suite à l'infusion intrapéritonéale de LPS pendant 28 jours. Le traitement aux LPS s'accompagne aussi d'une modulation de l'expression génique de certaines protéines impliquées dans le métabolisme lipidique hépatique (Figure 46G). L'expression génique de l'HL n'est pas modifiée et ne semble donc pas être impactée par le traitement aux LPS. Nous observons cependant une augmentation significative de l'expression génique de la LPL, conjointement avec une diminution de l'expression du FIAF, un de ses inhibiteurs. Nous

avons mesuré l'expression de quelques gènes clés impliqués dans la lipogenèse *de novo*. La protéine FAS a tendance à être diminuée par l'infusion de LPS mais l'expression des facteurs de transcription SREBP1c et ChREBP n'est pas impactée par l'infusion de LPS. Pour être déstockés du foie, les TG doivent à nouveau être hydrolysés en acides gras. Cette étape nécessite des enzymes telles que l'ATGL, dont l'expression génique est augmentée par le traitement aux LPS. Une des voies d'élimination des TG hépatiques est la sécrétion des VLDL. Nous remarquons que l'expression génique de l'apolipoprotéine B (ApoB) et de la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP), des protéines nécessaires à la formation des VLDL, n'est pas modifiée par l'infusion de LPS. L'autre voie d'élimination des acides gras est leur utilisation en tant que substrat énergétique dans les mitochondries. Or, l'expression de la protéine CPT1 hépatique n'est pas non plus modifiée par l'infusion de LPS (Figure 46G).

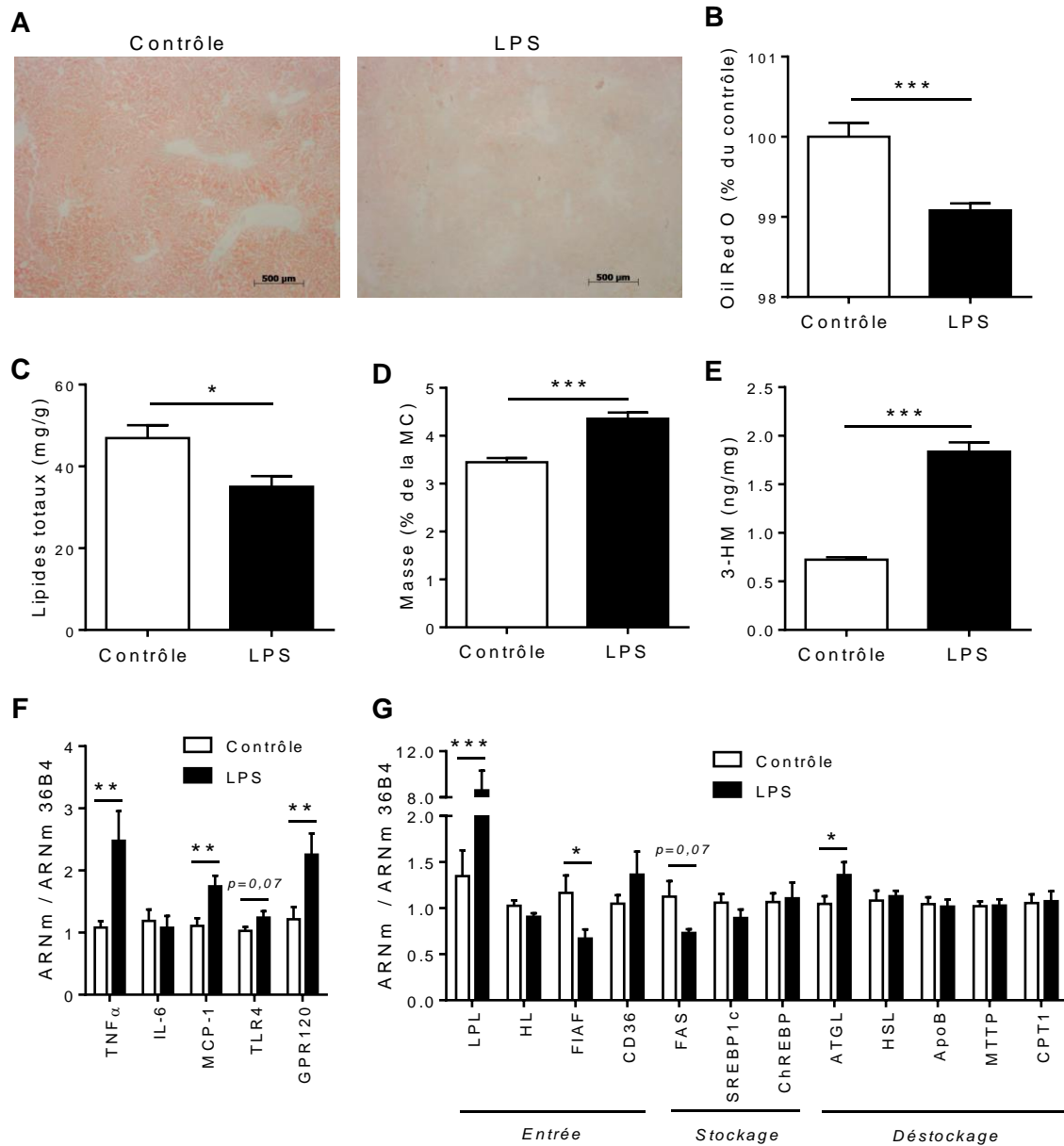


Figure 46

L'infusion continue de LPS : conséquences sur le foie

Effets d'une infusion continue de LPS (300 μ g/kg/jour) pendant 28 jours sur le métabolisme du foie d'animaux nourris avec un régime HF, du NaCl est infusé en contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Mann-Whitney ou du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n=16 contrôles et n=11 LPS). **A.** Coupes histologiques de foie colorées à l'Oil Red O et témoignant du niveau de stéatose hépatique. **B.** Intensité de coloration Oil Red O (% des animaux contrôles ; n=44 dans chaque groupe). **C.** Quantification des lipides totaux (mg/g de foie). **D.** Masse de foie au sacrifice exprimée en pourcentage de la masse de l'animal. **E.** Quantification des LPS dans le foie *via* la mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS (ng/mg). **F & G.** Expressions géniques rapportées à l'expression de la 36B4 : respectivement des gènes codant pour des marqueurs de l'inflammation et pour des protéines impliquées dans le métabolisme hépatique.

3. L'augmentation de l'endotoxémie réduit l'inactivation du GLP-1

Il a récemment été montré au laboratoire i) qu'une injection aiguë de LPS est capable d'augmenter les taux circulants de GLP-1 actif ainsi que la SISG et que ii) l'infusion continue de LPS, sans manipulation nutritionnelle, induit une augmentation de la SISG (Nguyen *et al.*, 2014). Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant l'effet d'une infusion continue de LPS sur les niveaux plasmatiques de GLP-1. Nous nous sommes donc ici intéressés aux niveaux plasmatiques de ces deux hormones : le GLP-1 et l'insuline (Figure 47).

Tout comme l'injection aiguë, l'infusion continue de LPS entraîne une augmentation des taux circulants de GLP-1 actif (Figure 47A). Cependant, les concentrations plasmatiques de GLP-1 total (actif + inactif), reflétant le niveau de sécrétion du GLP-1, sont identiques entre les deux groupes d'animaux, que ce soit en condition basale ou stimulée par du glucose (Figure 47B). L'infusion de LPS en continu ne stimule donc pas la sécrétion de GLP-1. L'augmentation observée pourrait être la conséquence d'une diminution de son inactivation. En effet, le calcul de l'indice d'inactivation (GLP-1 total / GLP-1 actif) nous indique que l'ensemble des voies de dégradation protéolytiques du GLP-1 (DPP-IV et autres) est diminué. (Figure 47C). Corroborant ces observations, l'expression génique de la DPP-IV est diminuée dans le foie et le TAPE des souris traitées aux LPS (Figure 47D). Chez ces animaux nourris avec un régime obésogène, l'infusion de LPS n'entraîne pas d'augmentation de sécrétion d'insuline en conditions basale et stimulée (Figure 47E), et ce contrairement à ce qui avait été publié sous régime standard (Nguyen *et al.*, 2014). En revanche, l'induction des taux plasmatiques d'insuline par le gavage au glucose est plus importante en présence de LPS (Figure 47F). Afin d'évaluer la capacité des cellules β pancréatiques à produire de l'insuline en réponse à des modulations glycémiques, nous avons calculé l'indice insulino-génique. Comme cela avait déjà été observé suite à une infusion de LPS sous régime standard (Nguyen *et al.*, 2014), cet indice est également augmenté chez les animaux infusés avec des LPS sous régime riche en graisses (Figure 47G). Cela suggère ainsi une amélioration de la fonction des cellules β pancréatiques suite à l'infusion continue de LPS.

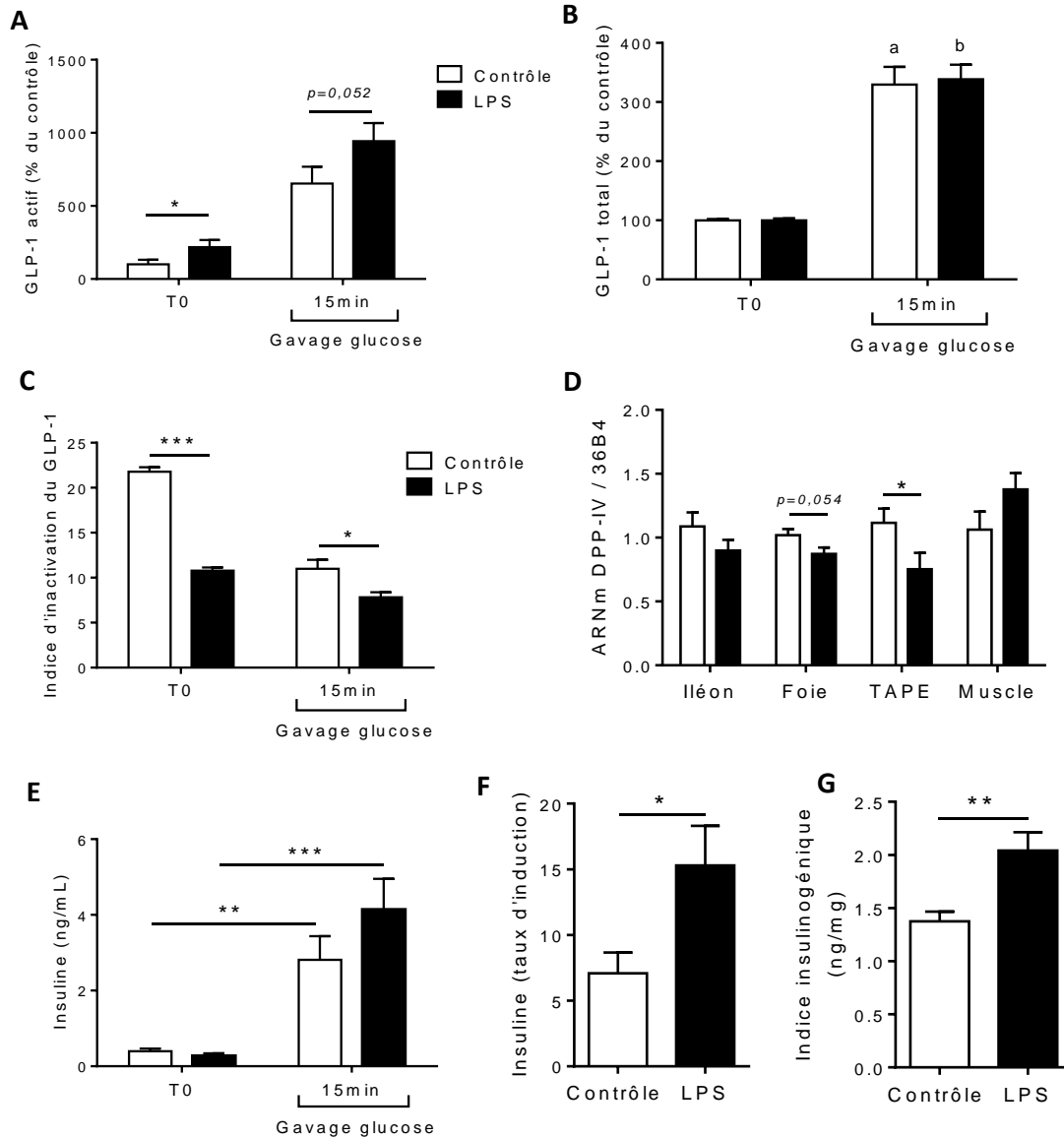


Figure 47

L'infusion continue de LPS réduit l'inactivation du GLP-1 et ne modifie pas la SISG

Effets d'une infusion continue de LPS (300µg/kg/jour) pendant 28 jours sur le métabolisme du GLP-1 et de l'insuline d'animaux nourris avec un régime HF, du NaCl est infusé en contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$; ^a $p < 0,001$ et ^b $p < 0,001$ par rapport au groupe contrôle à T0 et au groupe LPS à T0 respectivement. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A, B & C.** Respectivement, GLP-1 actif plasmatique, GLP-1 total plasmatique et indice d'inactivation du GLP-1 en condition basale (T0) ou 15 minutes après un gavage au glucose à 2g/kg ; les niveaux plasmatiques de GLP-1 sont exprimés en % du groupe contrôle à T0 et l'indice d'inactivation se calcule de cette façon : GLP-1 total (pM) / GLP-1 actif (pM) (n=10 contrôles et n=10 LPS). **D.** Expression génique de la DPP-IV dans différents tissus (n=16 contrôles et n=11 LPS, sauf pour le muscle n=8 dans chaque groupe). **E.** Niveaux plasmatiques d'insuline (ng/mL) en condition basale (T0) ou 15 minutes après un gavage au glucose à 2g/kg. **F.** Taux d'induction de l'insuline par le gavage au glucose. **G.** Indice insulino-génique (ng/mg) calculé de la façon suivante : Δ insuline (T0-15min) / Δ glucose (T0-15min).

4. Les LPS améliorent le métabolisme du glucose : utilisation musculaire augmentée

L'endotoxémie métabolique expérimentale est également décrite pour participer à l'installation de la résistance à l'insuline (Cani *et al.*, 2007a). Nous avons donc évalué le métabolisme glucidique des animaux infusés ou non avec des LPS (Figure 48). Un test de tolérance orale au glucose montre que l'infusion continue de LPS est associée à une amélioration de la réponse glycémique des animaux (Figure 48A). De façon similaire, l'insulino-sensibilité des animaux infusés aux LPS apparaît comme étant améliorée (Figure 48 B). Le calcul des aires sous les courbes confirme bien les observations faites sur les cinétiques OGTT et ITT (Figure 48C).

Afin de confirmer ces observations, nous avons réalisé, en collaboration avec le Professeur C. Leloup (CSGA, Dijon), des clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques. Les animaux anesthésiés ont été perfusés avec de l'insuline et du glucose par la veine jugulaire cathétérisée. Le but du clamp est de stabiliser la glycémie des animaux. La perfusion d'insuline est constante tout le long du clamp. La variable permettant les modulations de la glycémie est donc le débit de la perfusion de glucose (GIR). L'évaluation de la sensibilité à l'insuline est réalisée par la détermination de ce GIR dans les 20 dernières minutes du clamp, lorsque GIR et glycémie sont stables. Pendant ces 20 dernières minutes, les insulinémies n'étaient pas significativement différentes entre les souris contrôles et les souris infusées aux LPS ($4,23 \pm 0,70$ ng/mL pour le groupe contrôle et $3,04 \pm 0,71$ ng/mL pour le groupe LPS), indiquant ainsi que le clamp a atteint l'état d'équilibre et que les résultats sont exploitables. Nous remarquons que le GIR est plus élevé chez les souris traitées aux LPS comparé aux souris contrôles (Figure 48D). Les souris LPS sont donc plus insulino-sensibles (ou moins insulino-resistantes) que les souris contrôles. La production de glucose hépatique étant identique entre les deux groupes de souris, la constante d'utilisation du glucose (Rd) est donc supérieure chez les animaux infusés aux LPS (Figure 48D). Ces résultats, obtenus avec la technique considérée comme étant le « Gold standard » dans la détermination de l'insulino-sensibilité des organismes, confirment nos observations réalisées avec des tests « basiques », tels que peuvent l'être l'OGTT et l'ITT.

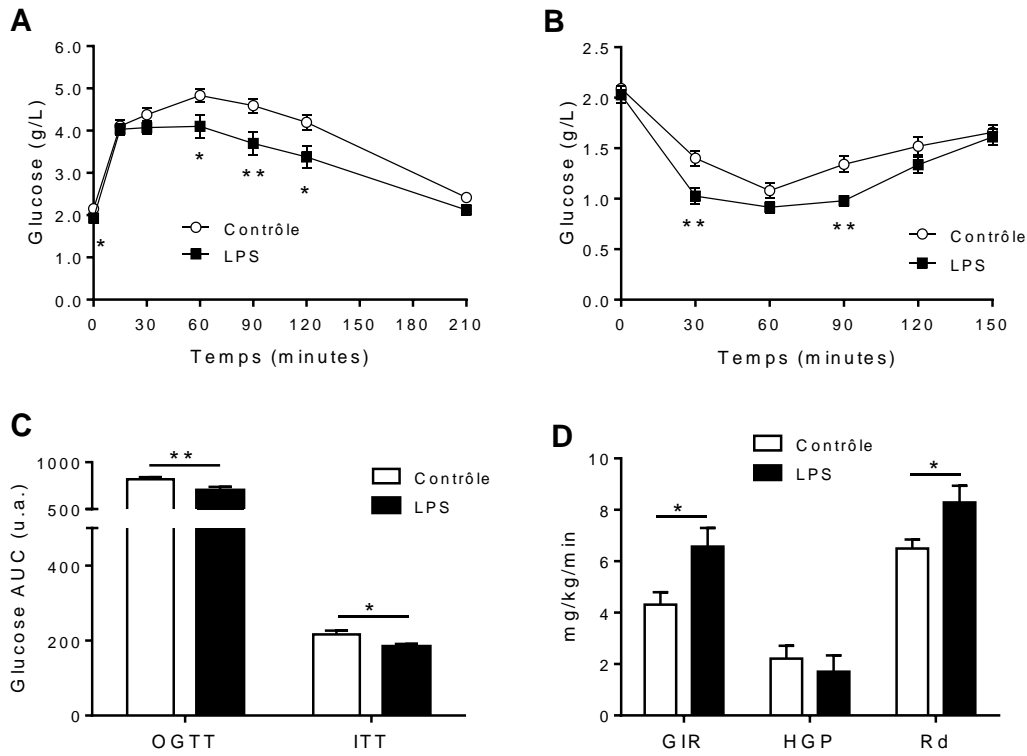


Figure 48

L'infusion continue de LPS améliore le métabolisme du glucose

Effets d'une infusion continue de LPS (300µg/kg/jour) pendant 28 jours sur le métabolisme glucidique d'animaux nourris avec un régime HF, du NaCl est infusé en contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, *p<0,05 et **p<0,01. Les valeurs sont les moyennes ± SEM. **A.** Test de tolérance orale au glucose (OGTT) réalisé avec du glucose à 2g/kg et suivi de la glycémie (g/L) pendant 210 minutes (n=16 contrôles et n=11 LPS). **B.** Test de tolérance à l'insuline (ITT) après une injection IP d'insuline à 0,3u/kg et suivi de la glycémie (g/L) pendant 150 minutes (n=16 contrôles et n=11 LPS). **C.** Aires sous les courbes de l'OGTT et de l'ITT (u.a. : unités arbitraires). **D.** Clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques (GIR : débit de perfusion du glucose ; HPG : production hépatique de glucose ; Rd : utilisation du glucose) à 8mU/kg/min d'insuline (n=8 NaCl et n=6 LPS).

Afin de mieux comprendre les origines de la meilleure utilisation du glucose induite par l'infusion continue de LPS, nous avons collaboré avec la plateforme d'imagerie préclinique du centre anticancéreux de Dijon, le Centre Georges François Leclerc (CGFL). La technique de tomoscintigraphie par émission de positons couplée à la correction d'atténuation (PET/CT) a été utilisée. Elle permet de visualiser et de quantifier la distribution de glucose radioactif dans différents organes (Figure 49). Les animaux contrôles et les animaux infusés aux LPS ont été injectés avec une solution de glucose radioactif par voie caudale. La distribution de ce glucose dans différents organes d'intérêt a été suivie pendant 45 minutes. Cette expérience a été réalisée en condition basale ainsi que 10 minutes après une injection d'insuline.

L'analyse d'images statique en point final, c'est-à-dire après les 45 minutes d'acquisition, permet de quantifier le glucose capté par les différents organes d'intérêt pendant cette période. La Figure 49A montre que, sous régime HF, l'infusion continue de LPS ne modifie pas la distribution du glucose en condition basale dans les différents organes étudiés. Par contre, lorsque l'administration du glucose se fait chez des animaux préalablement traités avec de l'insuline, nous remarquons que les muscles squelettiques des souris LPS captent significativement plus de glucose que ceux des souris contrôles (Figure 49B). Ces résultats suggèrent donc une plus forte insulino-sensibilité musculaire chez les animaux traités aux LPS.

L'analyse d'images dynamique en temps réel consiste à étudier l'évolution de la quantité de glucose radioactif dans les différents organes d'intérêt au cours du temps. Pour cela, l'acquisition de 45 minutes a été découpée en 45 phases d'une minute chacune et la quantité de glucose radioactif dans les organes a été évaluée pour chacune de ces phases. La Figure 49C représente l'évolution de la radioactivité en fonction du temps dans le muscle cardiaque. Le calcul de la tangente à l'origine permet de connaître la vitesse d'entrée du glucose radioactif. Nous remarquons que, suite à une injection d'insuline, la consommation de glucose radio-maqué par le muscle cardiaque est plus rapide chez les animaux infusés aux LPS que chez les animaux contrôles (Figure 49D).

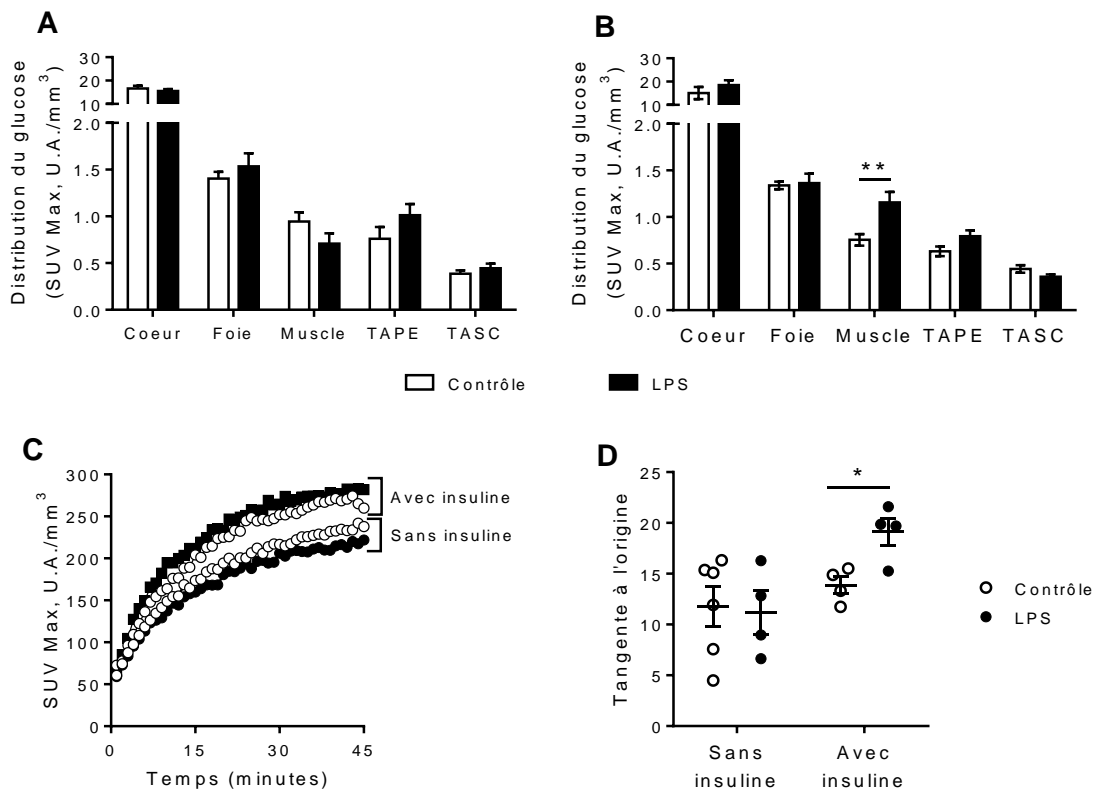


Figure 49

Les LPS augmentent l'utilisation musculaire du glucose

Infusion continue de LPS (300µg/kg/jour) pendant 28 jours chez des animaux nourris avec un régime HF, infusion de NaCl en contrôle. Etude de la distribution du glucose dans différents organes (cœur, foie, muscle squelettique gastrocnémien, tissu adipeux péri-épididymaire et tissu adipeux sous-cutané) après injection IV de ¹⁸F-FDG et imagerie PET/CT, en condition basale et après une injection IP d'insuline à 0,3u/kg. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, *p<0,05 et **p<0,01. Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n=5-6 dans chaque groupe). **A & B.** Analyse d'images statique en point final (SUV Max, U.A./mm³) respectivement en condition basale et après l'injection d'insuline. **C.** Analyse d'images dynamique, absorption du traceur radioactif en temps réel dans le cœur (SUV Max, U.A./mm³). **D.** Tangente à l'origine des courbes d'absorption cardiaque.

III. Discussion

Nous montrons dans cette étude que, couplée à un régime obésogène, l'infusion continue de LPS pendant 28 jours chez des souris sauvages n'empire pas les conséquences délétères du régime mais semble au contraire les améliorer. Effectivement, les animaux traités aux LPS présentent une diminution de la masse grasse totale, viscérale et hépatique, ainsi qu'une amélioration du métabolisme glucidique, pouvant s'expliquer par une augmentation de l'utilisation du glucose au niveau musculaire.

D'après la littérature, les régimes riches en graisses sont associés à une augmentation de l'endotoxémie de faible intensité, aussi appelée « endotoxémie métabolique ». Celle-ci participerait à l'installation des maladies métaboliques telles que l'obésité et le DT2. En effet, la reproduction expérimentale d'une telle endotoxémie sous régime normal mime les effets d'un régime obésogène : augmentation de la masse corporelle et de la résistance à l'insuline (Cani *et al.*, 2007a). Les LPS étant capables d'augmenter les taux de GLP-1 circulants et la SISG (Nguyen *et al.*, 2014), nous pensions donc que ces effets délétères des LPS pourraient être les conséquences sur le long terme de la cascade LPS / GLP-1 / insuline. En effet, selon le syndrome hyperinsulinémique, l'hypersécrétion d'insuline serait à l'origine de la résistance à cette hormone. Nous pensions également qu'en couplant infusion de LPS et régime obésogène, nous amplifierions ce phénomène mais nos hypothèses de départ étaient erronées. Effectivement, dans nos conditions, lorsque LPS et régime obésogène sont administrés de façon simultanée, les LPS semblent au contraire prévenir les effets délétères du régime obésogène en améliorant notamment le métabolisme glucidique. Nous montrons que sous régime HF, l'infusion continue de LPS augmente le GLP-1 actif mais n'induit pas la SISG. Elle augmente tout de même l'indice insulino-génique, c'est-à-dire la capacité des cellules β du pancréas à sécréter de l'insuline en réponse à des modulations glycémiques. Cette meilleure fonction β pancréatique suite à une infusion de LPS pourrait être associée à l'augmentation du GLP-1 actif car ce dernier favorise la prolifération des cellules β et augmente la biosynthèse d'insuline (Drucker *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1999).

Lorsque les LPS ne sont pas administrés en aigu mais en continu et à de faibles doses, les conséquences physiologiques sur le GLP-1 sont différentes : nous observons effectivement

une augmentation des taux de GLP-1 circulants mais ce n'est plus un phénomène sécrétoire comme cela a été décrit dans la partie précédente, c'est une action sur son taux d'inactivation. Pourquoi l'infusion continue de LPS et donc l'augmentation modérée mais stable de l'endotoxémie n'induit-elle pas la sécrétion de GLP-1 ? Cela pourrait être expliqué par le phénomène de tolérance aux endotoxines. Nous avons montré que l'effet sécrétagogue des LPS sur le GLP-1 passe par une stimulation du récepteur TLR4. Or, il est connu dans la littérature que les LPS sont capables d'initier un phénomène de tolérance lorsqu'ils sont administrés de manière répétée (Beeson & Roberts, 1947; Lang & Spitzer, 1987; López-Collazo & del Fresno, 2013). Cette tolérance se traduit notamment par une diminution de l'expression du récepteur TLR4 sur les membranes des cellules de l'immunité (Nomura *et al.*, 2000). Nous pouvons donc raisonnablement imaginer le même mécanisme au niveau des EEC, d'autant plus que l'expression du récepteur TLR4 au niveau de l'épithélium intestinal est connue pour être régulée à la baisse par la colonisation microbienne du tube digestif (Otte *et al.*, 2004; Shibolet & Podolsky, 2007). Il est donc tout à fait envisageable que l'infusion continue de LPS aboutisse aux mêmes effets. Ce phénomène de tolérance à la charge endotoxique est visible sur les courbes de prise alimentaire. Dans les trois jours qui suivent l'implantation des pompes, les animaux infusés aux LPS mangent très peu. Ils finissent toutefois par s'adapter et les effets anorexigènes des LPS disparaissent au bout de trois jours. Il serait intéressant de doser régulièrement le GLP-1 afin d'étudier son évolution lors de cette phase d'adaptation. Il est possible que dans les premiers jours, l'infusion de LPS augmente fortement la sécrétion de GLP-1, puis que ce phénomène se régule du fait de la diminution de l'expression du récepteur TLR4. Ayant des propriétés satiétogènes avérées, le GLP-1 fortement induit dans les premiers jours pourrait en partie participer aux effets anorexigènes des LPS ; hypothèse confortée par le fait que l'antagonisation cérébrale du GLP-1R est capable d'atténuer les effets anorexigènes des LPS (Grill *et al.*, 2004). De plus, cette diminution de l'expression des récepteurs TLR4 par l'infusion de LPS pourrait contribuer à l'amélioration des effets délétères du régime riche en graisses. En effet, cela pourrait réduire l'inflammation initiée par le régime hyperlipidique et ainsi expliquer en partie nos résultats. La déficience en TLR4 est d'ailleurs associée à une moindre insulino-résistance et à une accumulation de masse grasse plus faible chez des souris nourries avec un régime riche en graisses (Kim *et al.*, 2007; Pierre *et al.*, 2013).

Sous HF, les animaux traités aux LPS sont plus tolérants au glucose et plus sensibles (ou moins résistants) à l'insuline que les animaux contrôles. Ces effets bénéfiques sur le métabolisme du glucose ont été observés suite à de « simples » tests de tolérance au glucose et à l'insuline et ont été confirmés par la réalisation d'une expérimentation plus physiologique, le clamp euglycémique-hyperinsulinémique. Pour la même quantité d'insuline administrée, les animaux traités aux LPS pendant 28 jours ont besoin d'une perfusion de glucose plus importante pour compenser l'hypoglycémie générée par l'insuline. Ils sont donc plus sensibles à cette hormone. De plus, la réalisation des clamps a également mis en avant une utilisation du glucose accrue chez les animaux infusés aux LPS. L'imagerie PET/CT a été utilisée afin de visualiser et de quantifier l'entrée du glucose dans les différents organes d'intérêt. Nous avons ainsi pu remarquer que l'infusion de LPS pendant 28 jours ne modifie pas la distribution glucidique basale. Cela explique d'ailleurs les glycémies basales identiques entre les deux groupes. Toutefois, après une stimulation à l'insuline, les animaux traités aux LPS captent plus de glucose au niveau musculaire que les animaux contrôles.

Les LPS sont effectivement connus pour perturber le métabolisme glucidique. Les endotoxines bactériennes ont par exemple été décrites comme capables de stimuler l'utilisation cellulaire de glucose (Gamelli *et al.*, 1996) et l'administration aiguë de LPS améliore la clairance du glucose (van der Crabben *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2014). Ce phénomène serait expliqué par une stimulation de la sécrétion d'insuline dont l'origine pourrait être : i) un effet sécrétagogue direct des LPS au niveau des cellules β pancréatiques ou encore ii) une induction des taux circulants de l'incrétine GLP-1 par les LPS (Vives-Pi *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2014). Ici, nous montrons que la présence de LPS en continu favorise la clairance du glucose en améliorant son utilisation musculaire suite à une injection d'insuline et donc l'insulino-sensibilité musculaire.

Il est connu dans la littérature que la stimulation avec des LPS de myocytes murins en culture modifie leur consommation basale de substrats énergétiques de façon TLR4-dépendante : augmentation de l'oxydation du glucose au détriment de celle des acides gras (Frisard *et al.*, 2010). De plus, les myocytes en culture transportent également plus de glucose après une stimulation avec simultanément des LPS et des cytokines telles que l'IFN γ (Khanna *et al.*, 1999). Cela ferait intervenir un mécanisme dépendant de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) ainsi qu'une augmentation et une diminution des expressions de GLUT1 et

GLUT4 respectivement. Toutefois, les effets de ces composés pro-inflammatoires ne sont observés qu'en condition basale. La capacité de l'insuline à induire l'entrée de glucose dans les myocytes est au contraire diminuée en présence de LPS et de cytokines (Bédard *et al.*, 1997). Dans notre étude, l'infusion de LPS ne modifie pas l'expression génique musculaire des protéines GLUT1, GLUT4 et iNOS (données non présentées) et au contraire, les effets des LPS au niveau musculaire ne sont observés qu'en présence d'insuline. Toutefois, les comparaisons avec ces études scientifiques sont difficiles à établir car notre contexte d'expérimentation est complètement différent : i) nous travaillons *in vivo* sur des organismes entiers et la diminution de la masse grasse peut fortement influencer sur l'insulino-sensibilité, ii) les LPS sont administrés en continu et en faible quantité, et iii) nous travaillons uniquement en conditions obésogènes, nous ne savons donc pas s'il s'agit d'une augmentation de l'utilisation musculaire du glucose ou d'une prévention de sa diminution. Quoi qu'il en soit, nos travaux de recherche montrent que même si l'infusion continue de LPS ne perturbe que très peu les taux plasmatiques de cytokines, seul l'IFN γ est fortement induit. L'association LPS – IFN γ , connue *in vitro* pour stimuler le transport du glucose musculaire (Khanna *et al.*, 1999), pourrait donc contribuer à l'insulino-sensibilité des muscles squelettiques observée suite à une infusion continue de LPS. Dans ce sens, nous avons également observé dans cette étude que les animaux traités aux LPS présentent significativement plus de masse maigre que les animaux contrôles. De plus, nous avons récemment montré au laboratoire que l'injection de LPS à des souris déficientes en PLTP, connues pour être plus sensibles aux LPS, s'accompagne au niveau musculaire d'une augmentation de l'utilisation du glucose ainsi que d'une induction du contenu en glycogène par rapport aux souris WT (Nguyen *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant d'approfondir les effets d'une légère augmentation de l'endotoxémie sur la fonction musculaire des animaux ; des expérimentations sont actuellement en cours en collaboration avec le Professeur P. Valet (I2MC, Toulouse).

Le traitement en continu des animaux avec une faible dose de LPS (300 μ g/kg/jour) pendant 28 jours provoque une diminution de la masse grasse viscérale pouvant également contribuer à cette amélioration du métabolisme glucidique. En effet, l'expansion du tissu adipeux viscéral est connue pour contribuer au développement de l'inflammation à bas bruit et de l'insulino-résistance. A l'inverse, la perte de masse corporelle et plus particulièrement la perte de tissu adipeux viscéral entraîne une amélioration de ces paramètres (Goodpaster *et al.*,

1999; Weiss *et al.*, 2016). Nous avons échantillonné le tissu adipeux viscéral en prélevant le TAPE. Nous avons constaté une diminution massive considérable ainsi qu'une réduction de la taille des adipocytes constitutifs après 28 jours d'infusion continue de LPS. Cet effet hypotrophique d'une infusion de LPS avait déjà été démontré dans du tissu adipeux sous-cutané d'animaux nourris avec un régime standard (Cani *et al.*, 2007a). Les analyses de biologie moléculaire apportent un premier élément de réponse pour expliquer ce phénomène. En effet, les mesures d'expressions géniques révèlent globalement une diminution de l'entrée et du stockage des AGL dans ce tissu. Concernant la lipolyse, même si celle-ci est connue comme étant induite par une injection IV de LPS (Fong *et al.*, 1990), ici l'expression génique de l'enzyme lipolytique HSL est diminuée par l'infusion de LPS. Toutefois, l'expression de la cytokine TNF α , connue pour avoir des propriétés lipolytiques (Kawakami *et al.*, 1987), apparaît comme étant fortement augmentée suite aux 28 jours d'administration de LPS. Cependant, il ne s'agit ici que des taux d'ARNm, une analyse quantitative des protéines correspondantes et de leur niveau d'activation serait nécessaire. Nous pourrions également évaluer, *in vitro*, la lipolyse du tissu adipeux.

Le foie est lui aussi impacté par cette diminution de masse grasse. Des coupes histologiques montrent une stéatose hépatique moins développée chez les animaux traités avec des LPS et nourris avec un régime HF par rapport aux animaux uniquement nourris avec le régime HF. Est-ce que l'infusion de LPS améliore la stéatose hépatique ou prévient son apparition ? La question reste encore ouverte. Quoi qu'il en soit, l'élévation de l'endotoxémie est associée à une réduction du contenu lipidique hépatique. La stéatose hépatique s'explique par une accumulation de graisses et donc par un déséquilibre entre les entrées et les sorties des composés lipidiques. Chez les animaux infusés aux LPS, la mesure de l'expression des gènes met en avant une augmentation de la LPL corroborée avec une diminution d'un de ses inhibiteurs, le FIAF (Sukonina *et al.*, 2006). Cette possible induction de l'entrée des AGL au niveau hépatique pourrait servir à compenser la « fuite » du TAPE et donc réguler le taux d'AGL plasmatiques, qui n'apparaît d'ailleurs pas modulé par l'infusion de LPS (donnée non présentée). Malgré cette induction de la LPL, la stéatose hépatique est tout de même réduite chez les animaux traités aux LPS. Les principales voies d'élimination des TG hépatiques sont l'oxydation des acides gras et la sécrétion des VLDL. L'expression génique de certaines protéines impliquées dans ces voies d'élimination n'est pas augmentée chez les souris traitées

avec des LPS. Cela ne semble donc pas présager une augmentation de la sécrétion lipoprotéique. Toutefois, l'expression génique de la PLTP hépatique est significativement augmentée et cela est connu pour être associé à une induction de la production de VLDL (Yazdanyar & Jiang, 2012). Cela expliquerait ainsi la légère augmentation du taux de LDL plasmatiques chez les souris traitées aux LPS (données non présentées). Concernant l'oxydation des acides gras, seule l'expression génique de CPT1 a été mesurée dans cette étude, il faudrait donc approfondir davantage les effets d'une infusion de LPS sur cette voie d'utilisation des acides gras.

Les résultats que nous obtenons sont donc contradictoires avec les effets connus et décrits d'une faible élévation des LPS plasmatiques (Cani *et al.*, 2007a). Notre modèle expérimental d'endotoxémie n'est donc peut-être pas approprié pour mimer les effets d'une « endotoxémie métabolique ». Il est possible que dans nos conditions, l'inflammation générée par l'infusion continue de LPS (300µg/kg/jour en IP) soit trop importante et soit à l'origine d'une induction de la dépense énergétique : fonte du TAPE, diminution de la stéatose hépatique et augmentation de l'utilisation du glucose (Fong *et al.*, 1990). Cette hypothèse expliquerait ainsi une bonne partie de nos observations. Nous pourrions donc être en dehors des limites de l'« endotoxémie métabolique » telle qu'elle est définie dans la littérature, à savoir une augmentation d'un facteur deux ou trois par rapport à l'endotoxémie basale (Cani *et al.*, 2007a). Ici, nous n'avons pas utilisé la même technique de dosage des LPS et avons mesuré une augmentation d'un facteur cinq des taux de LPS plasmatiques. Cette augmentation certes minime en comparaison avec une injection IP aiguë de LPS à 1mg/kg par exemple (augmentation de l'endotoxémie d'un facteur 30 – données non présentées) reste supérieure à la définition actuelle de l'« endotoxémie métabolique ». Nous avons pourtant utilisé le même LPS (souche bactérienne identique) et la même dose. Cependant, les LPS sont des molécules amphiphiles, difficiles à manipuler dans du sérum physiologique, car elles ont tendance à y former des agrégats hétérogènes. La technique de préparation de la solution de LPS est donc une source de variabilité importante. De plus, le régime alimentaire est différent et la zone d'implantation des pompes osmotiques diverge entre notre étude et l'étude de Cani et ses collaborateurs : IP et sous-cutanée respectivement. La dose effective est donc peut-être supérieure lors d'une implantation en IP. N'ayant pas réussi à dépasser les 11 jours d'expérimentation en implantant les pompes en sous-cutané (inflammation locale par les LPS, assèchement cutané et perte des pompes suite à une rupture de la peau), nous avons reproduit

l'expérience en IP avec une dose de LPS trente fois plus faible, soit 10 μ g/kg/jour. Des résultats préliminaires (non présentés) montrent, qu'à cette dose, l'infusion de LPS ne modifie pas les masses grasses et maigres totales des animaux mais diminue toujours la masse du TAPE. Pour finir, même cette dose de LPS trente fois plus faible permet d'améliorer les paramètres métaboliques que sont les tolérances au glucose et à l'insuline.

En conclusion, dans cette étude nous montrons que l'induction d'une endotoxémie expérimentale chez des animaux sauvages nourris avec un régime HF semble prévenir les effets délétères de ce régime sur la prise de masse grasse et sur la dégradation du métabolisme glucidique. La présence en continu de LPS plasmatiques améliore l'insulino-sensibilité en favorisant notamment l'utilisation du glucose au niveau musculaire. Ainsi, la notion d'« endotoxémie métabolique » comme levier contribuant à l'étiologie des maladies métaboliques n'est pas mise en avant dans ces travaux de thèse. Ces résultats s'inscrivent donc dans la controverse actuelle quant à la pertinence physiologique de cette endotoxémie métabolique. Nous démontrons que même si l'infusion continue d'une faible dose de LPS augmente l'endotoxémie et le statut inflammatoire des animaux, cela n'est pas pour autant associé à une prise de masse grasse supplémentaire ou à une altération du métabolisme glucidique.

IV. Perspectives

1. Les effets observés des LPS sont-ils dépendants du GLP-1 ?

Nous montrons dans cette étude que l'infusion de LPS pendant 28 jours induit une augmentation du GLP-1 actif circulant. Même si les taux plasmatiques d'insuline ne sont pas augmentés, nous pouvons nous poser la question des conséquences physiologiques de cette cascade LPS / GLP-1 stimulée de façon continue pendant 28 jours. En effet, connu pour moduler le métabolisme glucidique, le GLP-1 pourrait contribuer à l'amélioration de la tolérance au glucose et de l'insulino-sensibilité observées dans cette étude. D'autant plus que le GLP-1 ou ses analogues ont déjà été décrits comme capables de moduler le métabolisme des organes ici impactés par l'infusion continue de LPS pendant 28 jours : i) diminution de l'accumulation lipidique hépatique (Ding *et al.*, 2006), ii) augmentation du métabolisme glucidique musculaire (Luque *et al.*, 2002), iii) réduction de l'adiposité viscérale en favorisant un « brunissement » adipocytaire (augmentation de la lipolyse, de l'oxydation des acides gras ou encore de la biogenèse mitochondriale) *via* un mécanisme qui pourrait faire intervenir la protéine sirtuine 1 (SIRT1) (Xu *et al.*, 2016) et enfin iii) stimulation de l'adipogenèse et de la différenciation adipocytaire (Challa *et al.*, 2012). Si ce dernier paramètre semble être contradictoire avec ce que nous observons, il est toutefois encore discuté. En effet, une étude récente montre que la liraglutide, un analogue du GLP-1, inhibe la prolifération adipocytaire (Cantini *et al.*, 2015). De plus, même si le GLP-1 favorise effectivement l'hyperplasie adipocytaire (paramètre que nous n'avons pas évalué dans cette étude), cela pourrait améliorer la plasticité du tissu adipeux et *in fine* son insulino-sensibilité (Kim *et al.*, 2014).

L'augmentation du GLP-1 actif par l'infusion continue de LPS est certes faible mais permanente. Contrairement à de nombreux travaux qui explorent les effets du GLP-1 par des techniques pharmacologiques, il s'agit ici d'une hausse continue de GLP-1 endogène. L'organisme pourrait donc y être plus réceptif et sensible. Pour déterminer l'implication du GLP-1, nous pourrions premièrement coupler les LPS des pompes osmotiques avec de l'exendin (9-39), un antagoniste du GLP-1R. Cela permettrait donc d'infuser des LPS pendant 28 jours tout en bloquant pharmacologiquement l'action du GLP-1 et ainsi d'étudier le rôle de

cette hormone dans les effets observés des LPS. Deuxièmement, nous pourrions directement utiliser des souris déficientes en GLP-1R. Celles-ci sont résistantes à l'obésité et au développement de l'insulino-résistance lors de l'administration d'un régime obésogène (Hansotia *et al.*, 2007; Ayala *et al.*, 2010), mais cela nous permettrait de connaître les effets dépendants de cette augmentation de GLP-1 endogène lors d'un régime standard.

Toutefois, il est important de garder à l'esprit que ces perspectives se focalisent sur le GLP-1R alors que certaines formes inactives du GLP-1 exerceraient leurs effets *via* des mécanismes indépendants de ce récepteur, mais encore inconnus. Il a par exemple été montré chez l'Homme que l'administration de GLP-1 (9-36) « inactif » à des patients obèses et résistants à l'insuline diminue la production hépatique de glucose de plus de 50% et que cet effet est observé même après blocage du GLP-1R (Elahi *et al.*, 2008). De plus, une autre forme inactive du GLP-1, le GLP-1 (28-36), est capable *in vitro* d'entrer dans le milieu intracellulaire d'hépatocytes indépendamment du GLP-1R et de diminuer à la fois la gluconéogenèse et le stress oxydant en agissant au niveau mitochondrial (Tomas *et al.*, 2011a).

2. L'infusion de LPS de 28 jours suffit-elle pour observer les effets « à long terme » ?

Au vu de ces résultats, nous pourrions penser que 28 jours d'infusion continue d'une faible dose de LPS ne suffisent pas pour observer l'installation d'une insulino-résistance, la prise de masse grasse... Les pompes Alzet® que nous avons utilisées ne permettent que 28 jours de traitement. Nous avons donc pensé à retirer la première pompe afin d'en implanter une nouvelle et de poursuivre l'expérience 28 jours supplémentaires. Toutefois, il était difficile de retirer la première pompe LPS. Elles étaient prises dans une sorte de tissu fibreux s'étant développé autour de la pompe, si bien qu'il était impossible de l'extraire sans mettre en péril la vie de l'animal. Cela pourrait être à rapprocher de la capacité des LPS à induire une fibrose, effet qui a été démontré au niveau du tissu adipeux (Vila *et al.*, 2014). Nous avons donc inséré la deuxième pompe sans retirer la première. Malheureusement, cette deuxième implantation ou la présence de deux pompes dans la cavité péritonéale a changé le comportement des animaux et notamment alimentaire. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre l'expérience et de ne pas en interpréter les résultats.

Nous avons ensuite testé un autre mode d'administration des LPS sur le long terme, les Pellet®. Les deux technologies entre Alzet® et Pellet® sont complètement différentes. Alors qu'avec les pompes Alzet®, la solution de LPS est insérée par nos soins dans le « réservoir » de la pompe, avec les pompes Pellet®, les LPS sont incorporés par le fabricant directement dans le matériau constitutif de la pompe ; elles sont donc réalisées à la demande. Une fois implantée dans l'animal, la pompe Alzet® libère lentement son contenu par pression osmotique alors que pour la pompe Pellet®, c'est sa lente auto-dégradation qui permet de libérer les LPS. Ce modèle Pellet® nous paraissait intéressant car il garantit une diffusion constante pendant 3 mois de la molécule à tester. Malheureusement, notre essai a été infructueux. Nous avons perdu les animaux implantés avec la pompe LPS dans les 4 jours post implantation. Les souris contrôles étant en parfait état de santé, les LPS étaient à l'origine de ces décès prématurés. Avec les pompes Alzet® et afin de réguler le débit des pompes, le fournisseur préconise un équilibrage dans du sérum physiologique à 37°C pendant 48 heures avant l'implantation. Nous pensons qu'une possible diffusion trop brusque des LPS, lors de l'implantation des Pellet®, est à l'origine de la perte prématurée des animaux.

Si nous voulons étudier les effets des LPS au-delà de 28 jours d'infusion, l'idéal serait de travailler sur un autre modèle animal, les rats. Nous pourrions ainsi soit utiliser un modèle de pompes Alzet® permettant jusqu'à 6 semaines d'infusion de LPS, soit utiliser les pompes iPRECIO® programmables et rechargeables qui permettent, elles, jusqu'à 6 mois d'infusion continue de la molécule d'intérêt.

Les souris déficientes en PLTP sont-elles plus sensibles aux effets d'un régime obésogène ?

I. Introduction

En parallèle de la voie pro-inflammatoire dépendante des LPS, existe une voie de neutralisation et d'élimination de ces molécules. En effet, l'association des LPS avec les lipoprotéines circulantes est une étape essentielle dans la prévention de l'inflammation. Les lipoprotéines ne sont pas des entités stables, elles sont en permanence modifiées sous l'action de facteurs spécifiques, dont les protéines de transfert des lipides telles que la PLTP. Celle-ci a d'ailleurs été décrite *in vitro* comme étant un facteur clé permettant le transfert des LPS sur les lipoprotéines (Hailman *et al.*, 1996). De plus, il a récemment été montré au laboratoire que comparées aux souris sauvages, les souris déficientes en PLTP présentent une inactivation et une élimination biliaire des LPS diminuées. Elles résistent ainsi moins bien au choc endotoxique que les souris sauvages (Gautier *et al.*, 2008). Aussi, la PLTP pourrait contribuer à prévenir le développement de l'inflammation à bas bruit et donc des maladies métaboliques.

Plusieurs études démontrent effectivement un lien entre PLTP et désordres métaboliques mais considèrent l'activité de cette enzyme comme un facteur contribuant à leur apparition et non l'inverse. Il a notamment été montré : i) une augmentation des niveaux plasmatiques de PLTP chez les sujets obèses et une association positive avec des paramètres de l'insulino-résistance (Dullaart *et al.*, 1994; Murdoch *et al.*, 2000; Kaser *et al.*, 2001), ii) une augmentation de l'activité PLTP chez des patients diabétiques de type 2 (Dullaart *et al.*, 2007) et iii) une activité PLTP comme un facteur prédictif de développement du DT2 (Abbasi *et al.*, 2015). Une seule étude montre qu'au contraire la perte de fonction de la PLTP pourrait favoriser le développement des maladies métaboliques. En effet, chez l'Homme, le polymorphisme du gène codant pour la PLTP humaine est associé à un tour de taille augmenté et un risque accru d'apparition de l'obésité (Bossé *et al.*, 2005).

Des études sont donc encore nécessaires pour réellement comprendre les liens entre PLTP et désordres métaboliques. Afin de préciser la nature de cette association et surtout d'identifier le rôle de la PLTP dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier les conséquences de l'administration d'un régime obésogène chez des animaux ne disposant pas d'une PLTP fonctionnelle. Nous faisons l'hypothèse qu'étant plus sensibles aux LPS, les souris PLTP KO seront également plus sensibles à l'endotoxémie métabolique induite par un régime obésogène et donc également plus susceptibles aux conséquences délétères de ce régime.

Dans cette étude nous montrons qu'effectivement les souris déficientes en PLTP sont plus sensibles aux effets d'un régime obésogène que les souris sauvages : elles prennent plus de masse corporelle et leur métabolisme glucidique est davantage altéré après 4 mois de régime hyperlipidique. Nous avons également mis en évidence une adiposité accrue chez les souris PLTP KO : celles-ci disposent de plus de masse grasse que les souris sauvages nourries avec le même régime et cela quelle que soit la nature de celui-ci : contrôle ou hyperlipidique. Toutefois, nous n'avons pas observé de différence d'endotoxémie entre les deux génotypes. La sensibilité accrue des souris PLTP KO aux molécules de LPS ne semble donc pas être à l'origine de ces altérations phénotypiques. Cela est d'autant plus vrai que, dans nos conditions, le régime obésogène lui-même n'entraîne pas une augmentation de l'endotoxémie des animaux.

II. Résultats expérimentaux

1. La déficience en PLTP est associée à une masse corporelle augmentée sous HF

Afin d'étudier le rôle de la PLTP au cours d'un régime obésogène, nous avons utilisé des souris exprimant (WT) ou non cette protéine (PLTP KO). Pendant 4 mois, nous les avons nourries, soit avec un régime hyperlipidique (*high-fat* ou HF, 60% kJ de graisses saturées), soit avec le régime contrôle correspondant (*low-fat* ou LF, 10% kJ de graisses saturées).

Pendant la durée des régimes, nous avons régulièrement mesuré la prise alimentaire et la masse corporelle (Figure 50). Les souris nourries avec le régime HF ont un gain de masse supérieur à celles nourries avec le régime LF. De plus, sous régime HF, une différence significative apparaît dès la deuxième semaine et semble être dépendante du génotype. En effet, les souris PLTP KO prennent plus de masse que les souris WT (Figure 50A). Une prise de masse excessive peut avoir comme origine une augmentation de la prise alimentaire. Concernant le régime HF, la mesure quotidienne de la prise alimentaire ne montre pas de réelles différences mais l'analyse cumulée sur la durée du régime, soit 4 mois, est significativement différente (Figure 50B) : les souris PLTP-KO ont une prise alimentaire cumulée légèrement inférieure aux souris WT alors qu'elles ont une prise de masse supérieure. Aucune différence de masse corporelle ou de prise alimentaire, même cumulée, n'est observée chez les animaux sous régime LF (Figures 50A et 50B).

Une augmentation de masse corporelle, sans augmentation de la prise alimentaire, laisse supposer que la dépense énergétique des animaux pourrait être altérée. Les animaux nourris avec un régime LF ne présentant pas de différence de masse corporelle et de prise alimentaire, nous nous sommes focalisés sur la dépense énergétique des animaux nourris avec un régime HF (Figure 51). Nous avons donc mesuré la prise alimentaire (Figure 51A), la dépense énergétique (Figure 51B) et les pertes fécales en lipides (Figure 51C). Quel que soit le paramètre étudié, aucune différence n'a été constatée entre les deux génotypes sous régime HF. Leur balance énergétique semble donc être similaire.

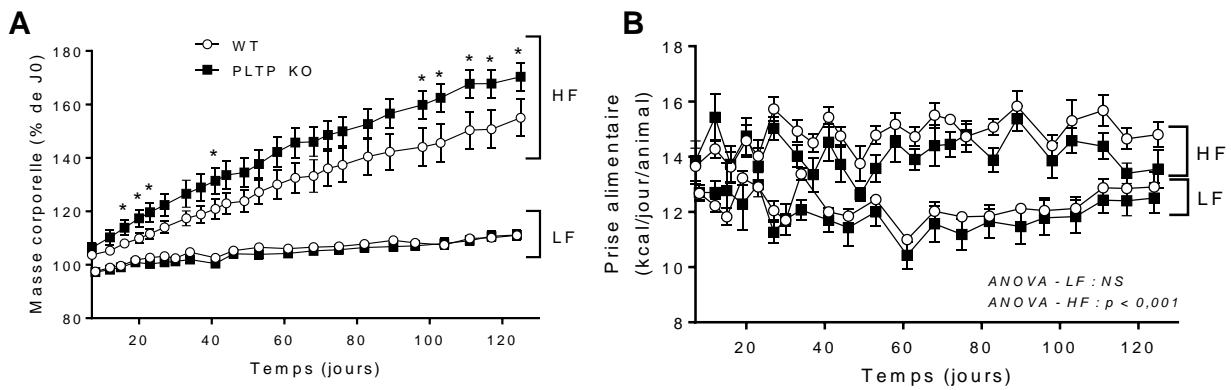


Figure 50

Les souris PLTP KO ont une masse corporelle plus importante sous HF

Suivi régulier de la prise alimentaire et de la masse corporelle lors des 4 mois de régimes LF ou HF chez les souris WT et PLTP KO. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié ou d'une ANOVA à deux facteurs, *p<0,05, NS pour non significatif. Les valeurs sont les moyennes ± SEM. **A.** Evolution de la masse corporelle en pourcentage de la masse de chaque animal le premier jour du régime (J0) (LF : n=13 WT et n=16 PLTP KO ; HF : n=12 dans chaque groupe). **B.** Mesure de la prise alimentaire (kcal/jour/animal ; LF : n=4 WT et n=7 PLTP KO ; HF : n=4 dans chaque groupe).

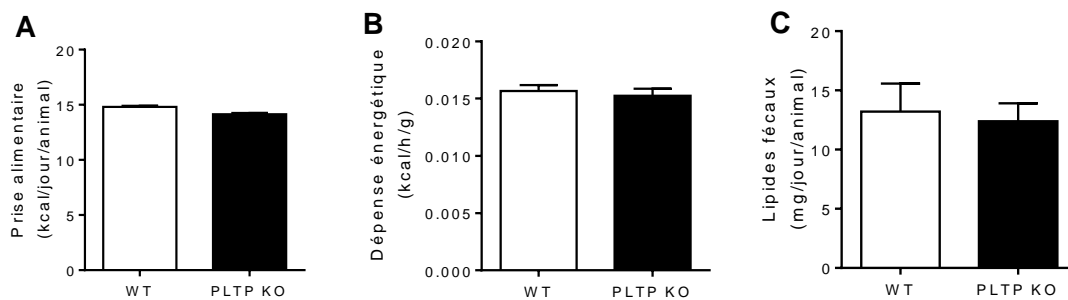


Figure 51

La balance énergétique des souris PLTP KO n'est pas altérée sous HF

Évaluation de la balance énergétique chez les souris WT et PLTP KO après 4 mois de régime HF. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié. Les valeurs sont les moyennes ± SEM. **A.** Mesure de la prise alimentaire (kcal/jour/animal ; n=4 dans chaque groupe). **B.** Dépense énergétique mesurée par calorimétrie indirecte (kcal/h/g ; n=12 dans chaque groupe). **C.** Lipides totaux quantifiés dans des fécès récoltés sur 24 heures (mg/jour/animal ; n=4 dans chaque groupe).

Prise alimentaire et balance énergétique étant identiques, nous avons calculé l'efficacité alimentaire. L'efficacité alimentaire est un paramètre permettant de quantifier la capacité des animaux à transformer les kilocalories qu'ils ingèrent en grammes de masse corporelle. Le calcul se fait en rapportant la prise alimentaire journalière (kcal) à la prise de masse corporelle (g) sur la même durée. Nous observons ici que, sous régime HF, cette efficacité alimentaire est augmentée chez les souris PLTP KO (Figure 52).

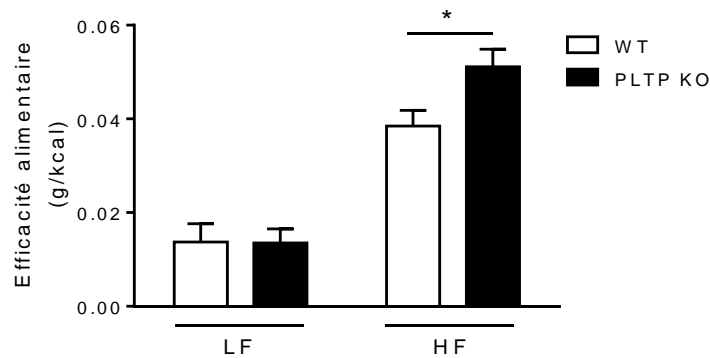


Figure 52

Les souris PLTP KO ont une meilleure efficacité alimentaire sous régime HF

Efficacité alimentaire chez les souris WT et PLTP KO nourries pendant 4 mois avec un régime LF ou HF. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. L'efficacité alimentaire est déterminée par le ratio : grammes de masse corporelle accumulés par jour / la prise alimentaire du jour en kilocalories (LF : $n=4$ WT et $n=7$ PLTP KO ; HF : $n=4$ dans chaque groupe).

2. La déficience en PLTP est associée à une accumulation de masse grasse

Pour connaître la composition corporelle des souris, nous les avons analysées avec la technologie EchoMRI® (Figure 53). Nous avons ainsi mis en évidence une proportion plus importante de masse grasse chez les souris PLTP KO, quel que soit le régime (Figure 53A). Cette masse grasse augmentée est associée à une diminution de la masse maigre (Figure 53B).

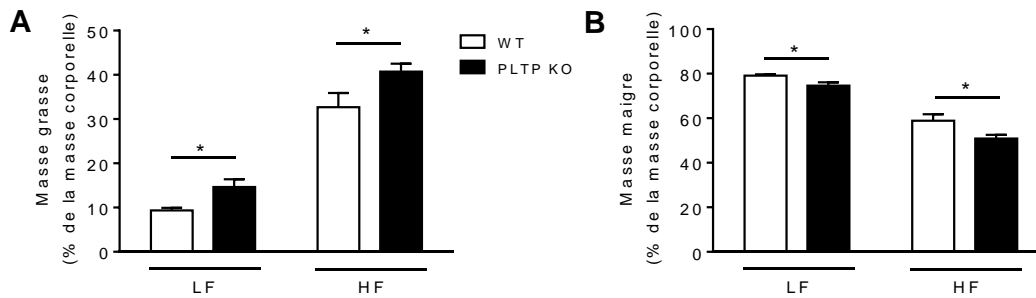


Figure 53

Les souris PLTP KO ont plus de masse grasse totale que les WT

Évaluation de la composition corporelle par EchoMRI® chez des animaux WT et PLTP KO nourris avec un régime LF ou HF pendant 4 mois. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ($n=10$ WT et $n=12$ PLTP KO dans chaque groupe). **A & B.** Respectivement les masses grasse et maigre totales (pourcentage de la masse corporelle de chaque animal).

Lors d'une alimentation riche en graisses, le tissu adipeux blanc stocke le surplus énergétique de l'alimentation. L'expansion de ce tissu ayant ses limites, d'autres organes, tels que le foie, peuvent également stocker l'énergie excédentaire. Des coupes histologiques du foie et du TAPE ont été réalisées (Figure 54). Les photos montrent qu'un régime HF s'accompagne d'un développement accru de la stéatose hépatique ainsi que d'une hypertrophie adipocytaire chez les souris PLTP KO. Nous remarquons également que ce phénotype exacerbé observé chez les souris PLTP KO sous régime HF est déjà présent, bien que moindre, sous régime LF (Figures 54A et 54B). En effet, l'intensité de coloration Oil Red O est toujours supérieure chez les souris PLTP KO, quel que soit le régime (Figure 54C). De la même manière, la surface moyenne des adipocytes est plus élevée chez les souris déficientes en PLTP (Figure 54D). L'hypertrophie adipocytaire des souris PLTP KO se répercute d'ailleurs sur la distribution des adipocytes en fonction de leur surface : les fréquences de distribution sont décalées vers les classes les plus grandes pour les souris déficientes en PLTP (Figures 54E et 54F).

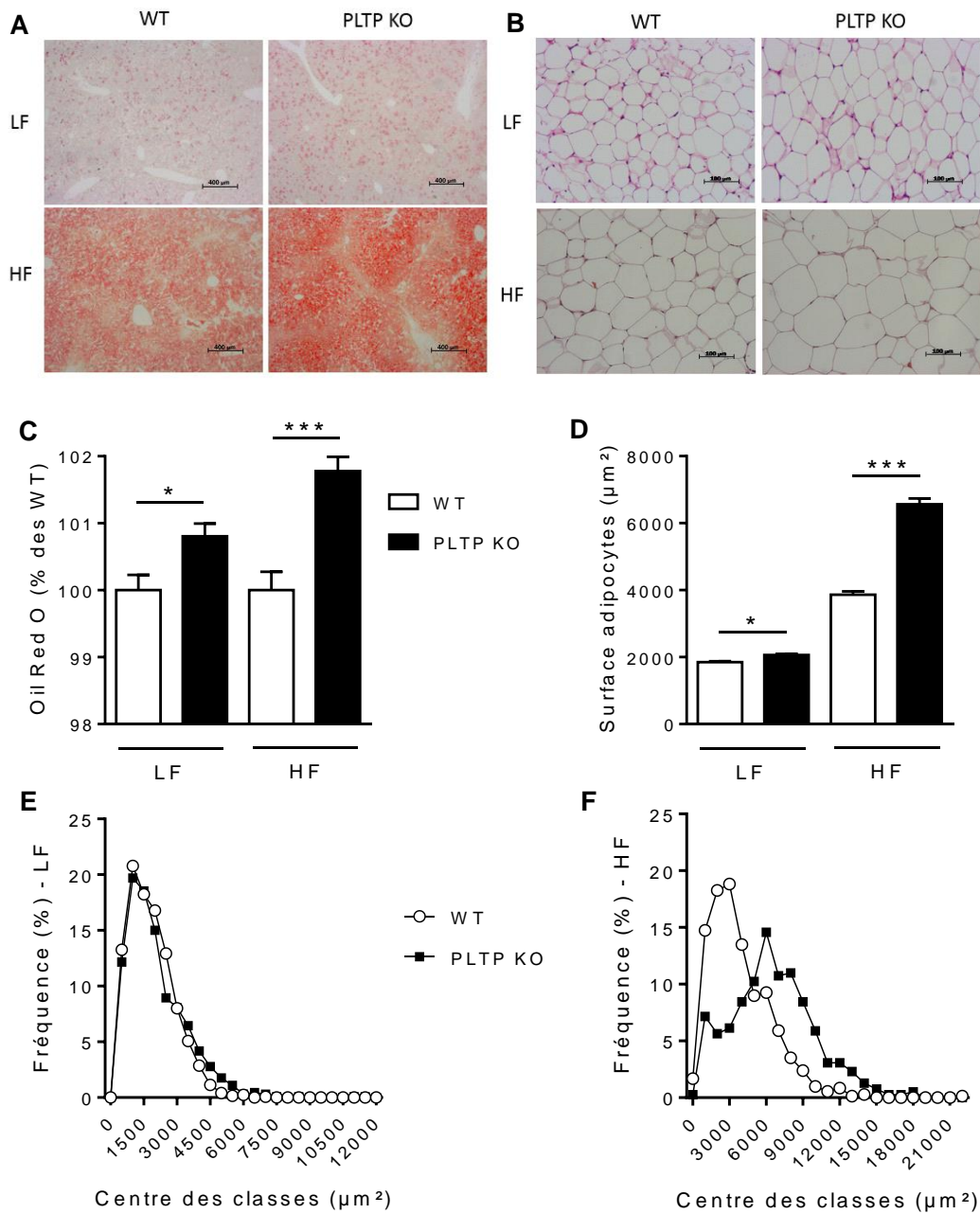


Figure 54

Stéatose hépatique et hypertrophie adipocytaire augmentées en l'absence de PLTP

Analyses histologiques du foie et du tissu adipeux péri-épididymaire d'animaux WT et PLTP KO nourris avec un régime LF ou HF pendant 4 mois. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A.** Coupes histologiques hépatiques avec une coloration Oil Red O. **B.** Coupes histologiques du TAPE avec une coloration hématoxyline/éosine. **C.** Intensité de coloration moyenne (% des souris WT nourries avec le même régime ; $n=24$ dans chaque groupe). **D.** Surface moyenne des adipocytes (μm^2 ; LF : $n=1221$ WT et $n=1365$ PLTP KO ; HF : $n=712$ WT et $n=391$ PLTP KO). **E & F.** Fréquences de distribution des adipocytes en fonction de leur surface (%) chez les animaux nourris avec un régime LF ou HF respectivement.

3. Les souris PLTP KO présentent une homéostasie glucidique perturbée

Sous régime HF, les souris PLTP KO ont une masse corporelle ainsi qu'un taux de masse grasse augmentés. Cela correspond, chez l'Homme, à la définition de l'obésité selon l'OMS. L'obésité étant un facteur de risque important pour le développement du DT2, nous avons souhaité explorer le métabolisme glucidique de ces souris (Figure 55).

Un test de tolérance au glucose nous permet de conclure que le génotype des souris n'a aucun impact *per se* sur les résultats. Sous régime LF, la réponse des souris PLTP KO et des souris sauvages à une charge en glucose est identique. La situation est différente sous régime HF. En effet, dans ce cas, les souris PLTP KO présentent une légère mais significative intolérance au glucose (Figures 55A et 55B). Un test de tolérance à l'insuline conduit aux mêmes conclusions. Pas de différence sous régime LF mais une insulino-résistance des souris PLTP KO sous régime HF (Figures 55C et 55D). Enfin, la glycémie à jeun plus élevée des souris nourries avec un régime HF montre que le stade de DT2 est certainement atteint. L'insulino-résistance s'accompagne généralement d'une hypersécrétion d'insuline. La mesure des taux plasmatiques d'insuline en conditions basales et stimulées (suite à un gavage au glucose) a été réalisée. Ici aussi, aucune différence n'est observée sous régime LF alors que sous régime HF, les souris PLTP KO présentent une tendance à l'hypersécrétion basale qui devient significative en condition stimulée (Figure 55E). L'indice insulino-génique a été calculé (Figure 55F). Il traduit la capacité des cellules β pancréatiques à sécréter de l'insuline en réponse à des modulations glycémiques. Cette capacité sécrétoire est significativement plus marquée chez les souris déficientes en PLTP, quel que soit le régime. Il semblerait que le régime HF induise une « perte d'efficacité du pancréas » chez les souris WT uniquement. Les souris déficientes en PLTP conservent, elles, le même indice insulino-génique que sous régime LF. Ainsi, si le régime HF conduit bien à un stade de DT2, les souris PLTP KO, malgré leur plus forte insulino-résistance, ne semblent pas avoir atteint le stade plus avancé, caractérisé par l'insulinopénie.

Enfin, les taux plasmatiques de GLP-1 ont été quantifiés en condition basale et après un gavage au glucose (Figure 55G). Sous LF comme sous HF, les souris PLTP KO ont significativement moins de GLP-1 basal que les souris WT. De plus, le régime riche en graisses augmente la production basale de GLP-1 mais uniquement chez les souris WT. En revanche, après un gavage au glucose, nous n'observons plus aucune différence entre les deux génotypes. Nous remarquons que, sous HF, le gavage au glucose semble générer une augmentation plus marquée du GLP-1 circulant chez les souris PLTP KO. En nous inspirant du calcul de l'indice insulino-génique, nous avons créé et calculé un indice que nous avons nommé « indice GLPique ». Il témoignerait donc de la capacité d'une charge glucidique à induire les taux de GLP-1 circulants. Sous régime LF, la déficience en PLTP n'influe pas sur cet indice. Par contre, sous régime HF, l'induction des quantités circulantes de GLP-1 en réponse à une charge glucidique est significativement supérieure chez les souris PLTP KO (Figure 55H).

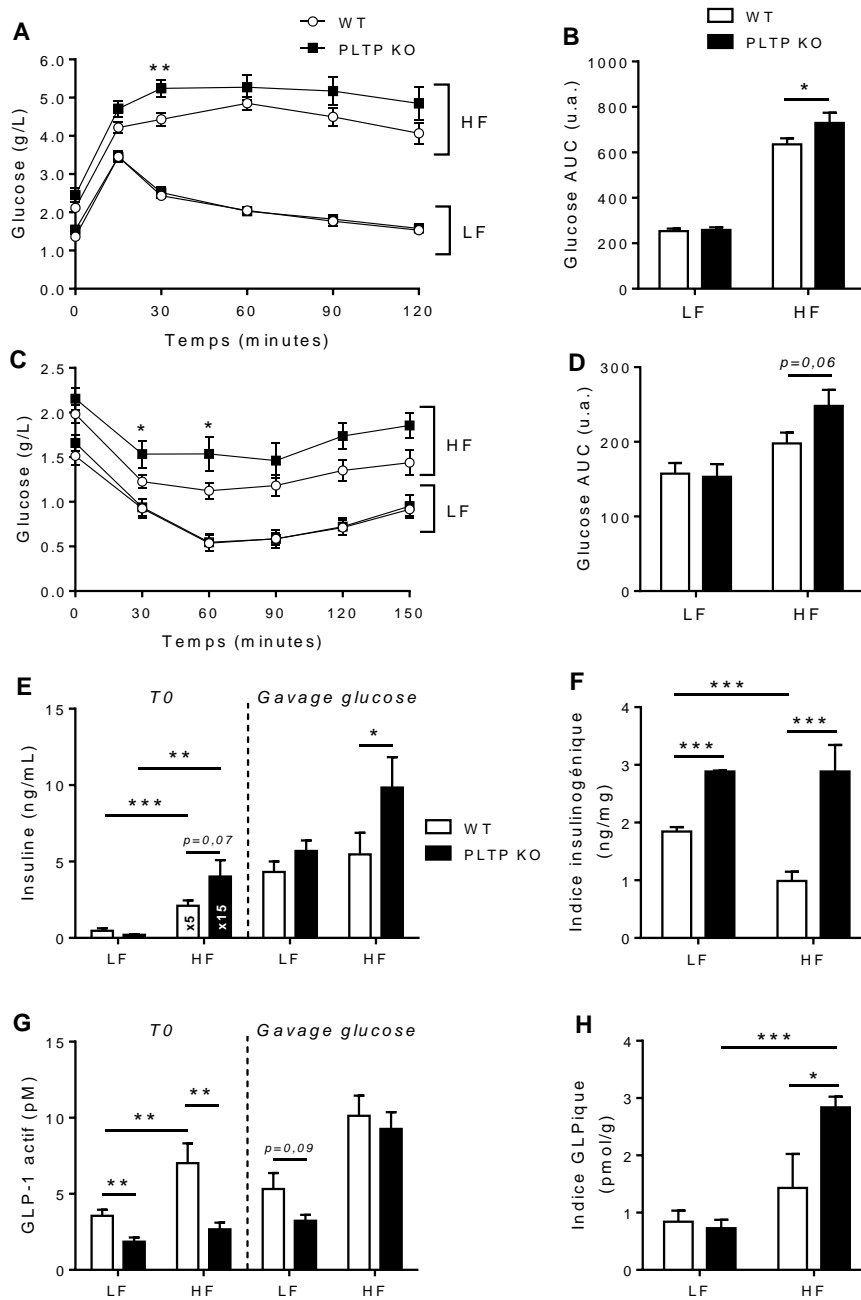


Figure 55

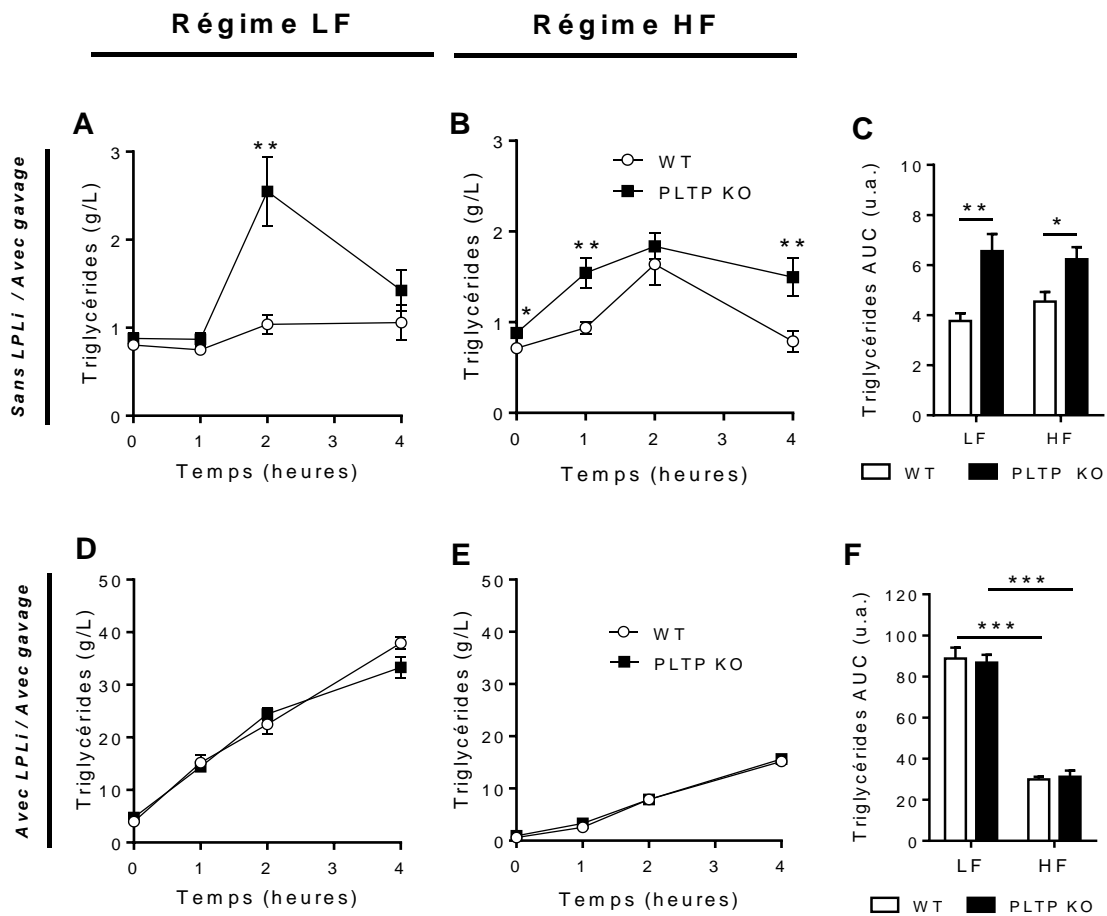
Altération du métabolisme glucidique des souris PLTP KO

Evaluation du métabolisme glucidique chez des souris WT et PLTP KO après 4 mois de régime LF ou HF. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (LF : $n = 8-12$ WT et $n = 8-16$ PLTP KO ; HF : $n = 12$ WT et $n = 7-9$ PLTP KO). **A**. Test de tolérance orale au glucose (1,5g/kg) et suivi de la glycémie (g/L ; 120min). **B**. Aires sous les courbes de l'OGTT (u.a. : unités arbitraires). **C**. Test de tolérance à l'insuline (0,5u/kg) et suivi de la glycémie (g/L ; 150min). **D**. Aires sous les courbes de l'ITT (u.a. : unités arbitraires). **E**. Insulinémies (ng/mL) basales (T0) et 15 minutes après un gavage au glucose à 1,5g/kg. **F**. Indice insulino-génétique (ng/mg) entre T0 et 15 minutes : Δ insuline/ Δ glucose. **G**. Niveaux plasmatiques de GLP-1 actif (pM) en basal (T0) et 15 minutes après un gavage au glucose à 1,5g/kg. **H**. Indice GLPique (pmol/g) entre T0 et 15 minutes : Δ GLP-1/ Δ glucose.

4. Les souris déficientes en PLTP ont un défaut de clairance des triglycérides

La PLTP est une protéine impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines et donc dans le métabolisme des lipides en général. L'accumulation de masse grasse PLTP-dépendante, observée dans cette étude, pourrait donc être expliquée par une perturbation de l'homéostasie lipidique. Afin d'éclaircir ce point, nous avons réalisé des hyperlipémies forcées et nous avons suivi la triglycéridémie des animaux WT et PLTP KO sous LF et sous HF (Figure 56).

A l'inverse de ce que nous avons observé avec une charge glucidique, une charge lipidique s'accompagne de perturbations phénotypiques des souris PLTP KO, que ce soit sous régime LF comme sous régime HF : elles présentent une accumulation de TG plasmatiques (Figure 56A). Sous régime HF, si les souris WT présentent une « intolérance aux lipides », celle-ci est néanmoins plus importante chez les souris PLTP KO (Figure 56B). Le calcul des aires sous les courbes démontre bien que la quantité totale de TG circulants pendant les 4 heures de cinétique est supérieure chez les souris PLTP KO (Figure 56C). Cette accumulation de TG observée chez les souris déficientes en PLTP pourrait avoir deux origines : une sécrétion intestinale de CM accrue ou une réduction de la clairance des TG plasmatiques. Afin de tester l'hypothèse de la sécrétion intestinale, nous avons réalisé la même expérience que précédemment mais en prétraitant cette fois les animaux avec un inhibiteur de la LPL (LPLi). La LPL est responsable de l'hydrolyse des TG circulants. Lorsqu'elle est inhibée, les TG s'accumulent dans la circulation sanguine et la triglycéridémie postprandiale est donc principalement le reflet de la sécrétion intestinale de CM. Dans ces conditions de clairance bloquée, nous remarquons que quel que soit le régime, il n'y a plus aucune différence de triglycéridémie entre les deux génotypes (Figures 56D et 56E). La quantité totale de lipides sur les 4 heures de cinétique, déterminée par les aires sous les courbes, est identique pour les deux génotypes (Figure 56F). Ces résultats suggèrent que l'hypertriglycéridémie postprandiale des souris PLTP KO n'est pas d'origine intestinale mais serait plutôt le reflet d'un défaut de clairance des TG alimentaires.


Figure 56
Clairance des triglycérides alimentaires diminuée par la déficience en PLTP

Quantification des triglycérides plasmatiques (g/L) chez les souris WT et PLTP KO nourries pendant 4 mois avec un régime LF ou HF, traitées ou non avec un inhibiteur de la LPL (LPLi ; injection IP de poloxamer 407 à 1mg/kg) et gavées avec de l'huile de maïs (500µL/animal). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (LF : $n = 11$ WT et $n = 12-17$ PLTP KO ; HF : $n = 12$ WT et $n = 11-14$ PLTP KO). **A & B**. Hyperlipémie induite par un gavage à l'huile et suivi de la triglycéridémie pendant 4 heures. **C**. Aires sous les courbes des triglycéridémies des animaux traités par gavage uniquement (u.a. : unités arbitraires). **D & E**. Hyperlipémie induite par un gavage à l'huile chez des animaux préalablement traités avec un LPLi et suivi de la triglycéridémie pendant 4 heures. **F**. Aires sous les courbes des triglycéridémies des animaux traités par gavage et LPLi (u.a. : unités arbitraires).

Ce défaut de clairance des TG pourrait être en lien avec la LPL. Aussi, nous avons mesuré son expression génique dans différents organes (Figure 57). Sous régime LF, l'expression de la LPL est significativement diminuée dans le foie et l'iléon des souris PLTP KO par rapport aux souris WT (Figure 57A). Ces diminutions de l'expression génique de la LPL chez les souris déficientes en PLTP pourraient contribuer au défaut de clairance de TG observé chez ces souris. Toutefois, ces différences d'expression génique entre les deux génotypes sont estompées par l'administration d'un régime riche en graisses alors que le défaut de clairance des TG persiste (Figure 57B).

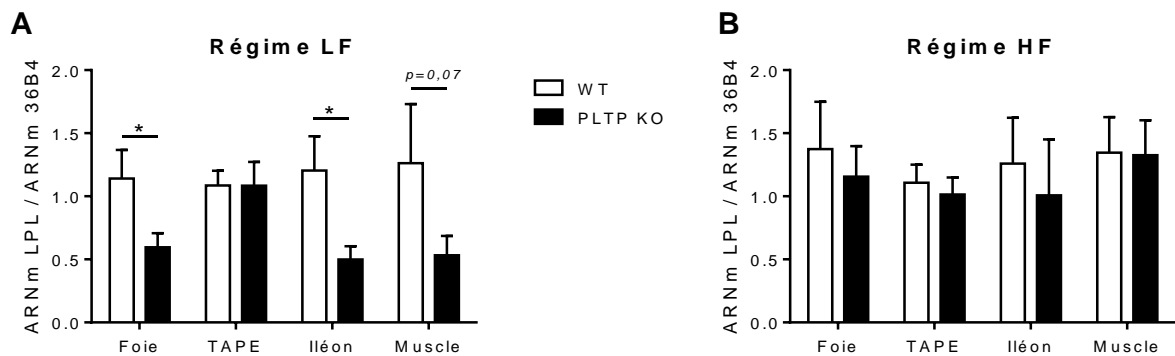


Figure 57

L'expression génique de la LPL est diminuée dans les tissus des souris PLTP KO sous LF

Mesure de l'expression génique de la LPL rapportée à l'expression de la 36B4 dans le foie, le tissu adipeux péri-épididymaire, l'iléon et le muscle squelettique de souris WT et PLTP KO nourries pendant 4 mois avec un régime LF (A) ou HF (B). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (LF : $n=10$ WT et $n=13$ PLTP KO ; HF : $n=11$ WT et $n=11$ PLTP KO).

5. Autres modifications lipidomiques observées chez les souris déficientes en PLTP

En période postprandiale, les CM sont la principale source de TG circulants. Cependant, en période interprandiale, les TG plasmatiques proviennent également des VLDL sécrétés par le foie. Afin d'évaluer cette production de VLDL hépatiques, nous avons réalisé la même expérience que précédemment, mais cette fois sur des animaux à jeun et en absence de gavage lipidique. Les animaux étant à jeun, l'accumulation de TG provoquée par l'inhibition de la LPL est donc majoritairement le reflet de la sécrétion hépatique de VLDL. Comme le montre la Figure 58, nous n'avons pas observé de différences majeures de triglycéridémie entre les deux génotypes, que ce soit sous régime LF (Figure 58A) ou sous régime HF (Figure 58B). Les souris déficientes en PLTP semblent produire plus de VLDL mais cela n'est que ponctuel. Par contre, nous remarquons que l'administration d'un régime HF diminue la production de VLDL chez les animaux WT uniquement (Figure 58C).

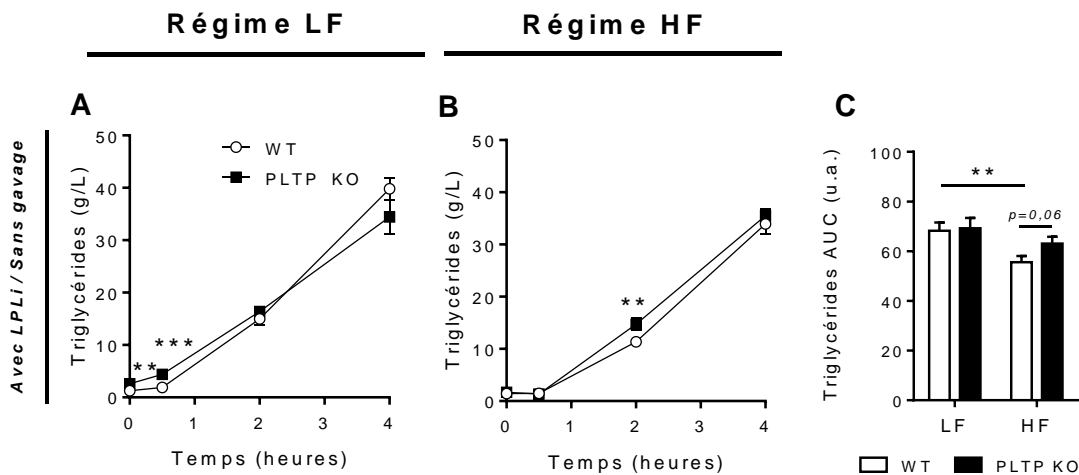


Figure 58

La déficience en PLTP ne modifie pas la sécrétion hépatique des VLDL

Quantification des TG plasmatiques (g/L) chez les souris WT et PLTP KO nourries pendant 4 mois avec un régime LF ou HF et traitées avec un inhibiteur de la LPL (LPLi ; injection IP de poloxamer 407 à 1mg/kg). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (LF : $n=11$ WT et $n=12-17$ PLTP KO ; HF : $n=12$ WT et $n=11-14$ PLTP KO). **A & B.** Mesure de la triglycéridémie pendant 4 heures après une injection de LPLi chez des animaux à jeun. **C.** Aires sous les courbes des triglycéridémies des animaux (u.a. : unités arbitraires).

La déficience en PLTP provoque donc d'importantes modifications du métabolisme lipidique. Pour étudier celles-ci plus en détail, nous avons réalisé, en collaboration avec le Docteur I. Dugail (UPMC, Paris), des analyses lipidomiques. Les différentes classes de phospholipides et de sphingolipides ont été quantifiées chez les animaux WT et PLTP KO nourris avec un régime LF ou HF. La Figure 59 représente les résultats sous forme de ratios des concentrations (PLTP KO / WT) et montre que le lipidome des souris est fortement altéré à la fois par la déficience en PLTP et à la fois par l'administration d'un régime hyperlipidique. Concernant les quantités plasmatiques de phospholipides, nous remarquons que sous régime contrôle, les souris déficientes en PLTP ont significativement moins de phospholipides que les souris WT. Cela est valable pour toutes les classes de phospholipides sauf pour les phosphatidylsérines, qui elles ont tendance à être augmentées chez les souris PLTP KO (Figure 59A). Ces différences entre les deux génotypes sont considérablement réduites lors de l'administration d'un régime HF (Figure 59B). La quantification des sphingolipides plasmatiques chez les souris nourries avec un régime LF démontre une diminution des sphingomyélines chez les souris PLTP KO, alors que les niveaux de céramides ne sont pas impactés par le génotype (Figure 59C). Il en résulte donc une augmentation relative du taux de céramides chez les souris PLTP KO nourries avec un régime LF. De nouveau, l'administration d'un régime riche en graisses estompe la différence concernant les sphingomyélines. Par contre, le taux de céramides plasmatiques des souris déficientes en PLTP devient significativement supérieur à celui des souris WT (Figure 59D).

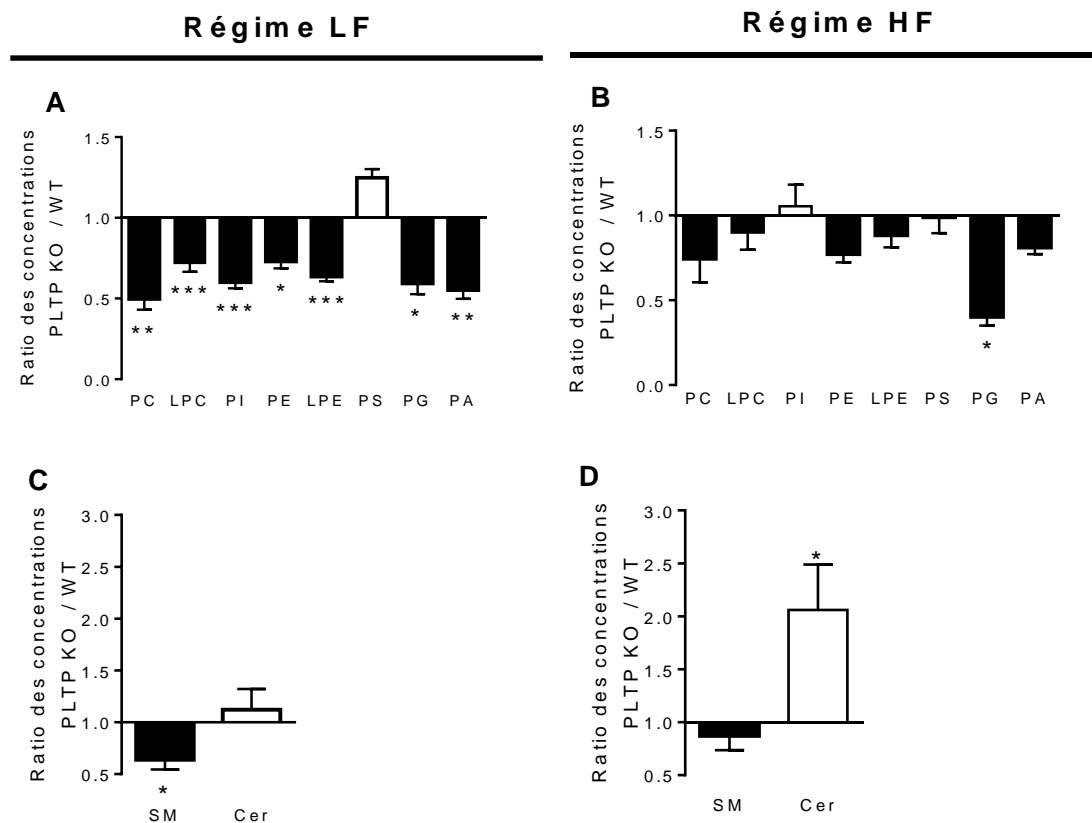


Figure 59

Lipidome fortement altéré par la déficience en PLTP et le régime HF

Quantification des différentes classes de phospholipides (A & B) et de sphingolipides (C & D) chez les souris WT et PLTP KO nourries pendant 4 mois avec un régime LF ou HF respectivement. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (LF : $n=4$ dans chaque groupe ; HF : $n=5$ dans chaque groupe). Pour chaque classe de molécule, les résultats sont exprimés comme le ratio des concentrations observées chez les souris PLTP KO (nmol/mL) sur la moyenne des concentrations calculées chez les souris WT (nmol/mL). Phospholipides : phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylinositol (PI), phosphatidyléthanolamine (PE), lysophosphatidyléthanolamine (LPE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylglycérol (PG) et acide phosphatidique (PA). Sphingolipides : sphingomyéline (SM) et céramides (Cer).

6. L'absence de PLTP ne modifie pas l'endotoxémie totale

La déficience en PLTP entraîne un ralentissement de la détoxification des LPS ainsi qu'une sensibilité accrue à ces molécules (Gautier *et al.*, 2008). Les régimes riches en graisses augmenteraient légèrement les niveaux plasmatiques de LPS et cette endotoxémie qualifiée de « métabolique » contribuerait à l'apparition des maladies métaboliques (Cani *et al.*, 2007a).

Nous avons donc fait l'hypothèse que les souris PLTP KO seraient plus sensibles à l'administration d'un régime riche en graisses : hypothèse qui a été confirmée dans les résultats décrits ci-dessus. Pour pouvoir associer les altérations métaboliques des souris PLTP KO sous régime HF à une potentielle hausse de l'endotoxémie, nous nous sommes intéressés à leur profil inflammatoire (Figure 60). Premièrement, l'endotoxémie a été mesurée chez les animaux nourris, soit avec le régime LF, soit avec le régime HF. Les niveaux de LPS sanguins ont été déterminés *via* la mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS (Figure 60A). Quel que soit le régime, aucune différence n'a été observée entre les deux génotypes. Le régime HF lui-même n'entraîne d'ailleurs pas d'augmentation de l'endotoxémie. La mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS permet de connaître la quantité totale de LPS circulants. Elle ne permet cependant pas de faire la distinction entre les LPS libres biologiquement actifs, et les LPS associés aux lipoprotéines dont l'activité pro-inflammatoire a été neutralisée. Les cytokines plasmatiques ont été quantifiées car elles sont représentatives du statut inflammatoire (Figure 60B) : seuls l'IL-10 et le TNF α , respectivement une cytokine anti- et une cytokine pro-inflammatoire, apparaissent comme étant significativement augmentés chez les souris PLTP KO sous HF. Ainsi, hormis une légère modification du profil cytokinique, la déficience en PLTP ne semble pas avoir une grande influence sur le statut inflammatoire des animaux.

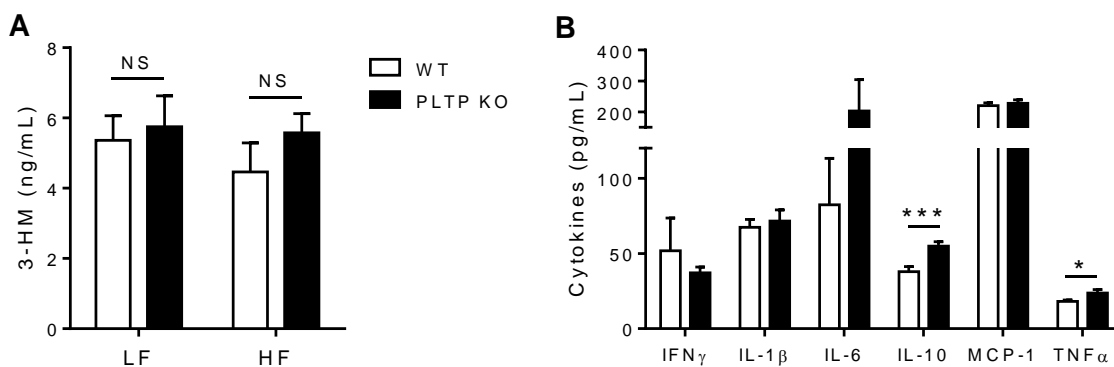


Figure 60

La déficience en PLTP ne modifie que très peu le statut inflammatoire sous HF

Evaluation du statut inflammatoire des souris WT et PLTP KO nourries avec un régime HF ou LF pendant 4 mois. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié, NS : non significatif, * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM ($n = 11-12$ WT et $n = 10-11$ PLTP KO). **A.** Quantification des LPS sanguins *via* la mesure du 3-HM par HPLC/MS/MS (ng/mL). **B.** Quantification de différentes cytokines plasmatiques chez les animaux nourris avec un régime HF : IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, TNF α (pg/mL).

III. Discussion

Nous montrons dans cette étude que les souris déficientes en PLTP sont plus sensibles à l'administration d'un régime riche en graisses que les souris sauvages : elles prennent plus de masse corporelle, développent une plus forte intolérance au glucose et deviennent plus résistantes à l'insuline. Quel que soit le régime, l'absence d'une PLTP fonctionnelle est associée à une augmentation de l'adiposité ainsi qu'à une forte altération du métabolisme des lipides. Ce défaut de prise en charge des composés lipidiques pourrait en partie expliquer les dégradations phénotypiques observées sous régime HF. L'endotoxémie totale étant identique entre les deux génotypes, ce facteur ne semble pas être impliqué dans l'apparition des désordres métaboliques initiés par le régime riche en graisses.

Les résultats de cette étude montrent donc que, sous régime HF, la masse corporelle des souris déficientes en PLTP se développe plus rapidement que celle des souris sauvages. Cependant, cette prise de masse sous HF n'est pas associée à une prise alimentaire plus importante, au contraire. Si au quotidien la prise alimentaire n'est pas significativement différente entre les deux génotypes, celle des souris déficientes en PLTP est toujours légèrement inférieure à celle des souris sauvages. Ainsi, cette différence journalière minime, cumulée sur les 4 mois de régime, devient conséquente et, sous régime HF, les souris PLTP KO ont une prise alimentaire globale finalement plus faible que les souris WT. Cette disparité entre l'apport énergétique et la prise de masse corporelle est d'ailleurs mise en avant par le calcul de l'efficacité alimentaire : il montre qu'effectivement les souris PLTP KO sont plus efficaces pour transformer les kilocalories ingérées en grammes de masse corporelle, c'est-à-dire pour stocker l'énergie. Les pertes fécales en lipides étant identiques entre les deux génotypes, cela illustre une capacité d'absorption énergétique similaire. Ainsi, étant donné que « rien de se perd, rien ne se crée, tout se transforme » (Anaxagore et Lavoisier), nous pouvons imaginer que l'absence de PLTP serait aussi associée à une réduction de la dépense énergétique. Or, de façon surprenante, nous obtenons les mêmes valeurs de dépense énergétique pour les deux génotypes. Toutefois, quatre paramètres peuvent interférer avec ces résultats. Premièrement, la mesure est effectuée dans des locaux différents et dans des cages spécifiques dans lesquelles les animaux sont individualisés. Même si une période d'acclimatation est prévue, l'environnement différent

peut fortement moduler le comportement des animaux. Deuxièmement, la mesure de la dépense énergétique a été effectuée sur 24 heures. Or, comme nous l'avons vu pour la prise alimentaire, cela n'est peut-être pas suffisant pour observer des différences entre les deux génotypes. Une dépense énergétique légèrement plus faible pourrait être insignifiante au quotidien mais avoir des conséquences sur le plus ou moins long terme. Troisièmement, cette évaluation de la balance énergétique ne prend pas en considération la possible implication du microbiote intestinal : celui-ci peut consommer ou au contraire apporter de l'énergie. Le microbiote des souris PLTP KO pourrait ainsi produire davantage d'énergie disponible pour son hôte sans que cela ne transparaisse dans la mesure de la balance énergétique. Quatrième paramètre et pas des moindres, les souris PLTP KO ont une adiposité plus développée et le tissu adipeux est connu pour être métaboliquement peu actif. La mesure de la dépense énergétique doit donc être ajustée à cette disparité morphologique. Or, les techniques d'ajustement sont encore beaucoup discutées à l'heure actuelle et aucun consensus ne semble réellement émerger (Even & Nadkarni, 2012).

Effectivement, quel que soit le régime, les souris déficientes en PLTP disposent de plus de masse grasse totale que les souris sauvages. Cela s'illustre d'ailleurs par une stéatose hépatique et une hypertrophie adipocytaire viscérale plus développées en l'absence de PLTP. Cette différence d'adiposité pourrait d'ailleurs contribuer à la plus forte altération du métabolisme glucidique observée chez les souris PLTP KO sous régime HF. En effet, l'expansion du tissu adipeux et le dépôt de graisses ectopiques sont associés à une lipotoxicité propice au développement de l'insulino-résistance (Samuel & Shulman, 2012). L'hyperglycémie basale observée chez les souris nourries avec un régime HF démontre que le stade de DT2 a été atteint pour les deux génotypes ; les animaux ne sont plus capables de réguler correctement leur glycémie. Pour les souris sauvages, cette perte de capacité de régulation pourrait s'expliquer par l'insulino-résistance couplée à un début d'insulinopénie. En effet, celles-ci présentent un indice insulino-génique plus faible sous régime HF. La capacité de leurs cellules β pancréatiques à sécréter de l'insuline en réponse à une charge glucidique est donc plus faible. Toutefois, chez les souris PLTP KO, le régime HF n'a pas d'impact sur la fonction de leurs cellules β . Cette préservation de la fonction pancréatique pourrait être liée aux taux plasmatiques de l'incrétine GLP-1. En effet, la capacité d'une charge glucidique à induire les taux plasmatiques de cette hormone est significativement supérieure chez les souris PLTP KO

nourries avec un régime HF. Les souris déficientes en PLTP, qui ont une meilleure fonction β pancréatique en temps normal, pourraient la préserver des effets délétères du régime HF *via* le GLP-1 insulino-tropique.

Cette meilleure fonction β pancréatique des souris déficientes en PLTP, quel que soit le régime, est d'ailleurs assez intrigante. Malgré leur forte capacité à sécréter de l'insuline en réponse à des modulations glycémiques et malgré la préservation de cette fonction β pancréatique sous régime HF, ce sont quand même ces souris qui deviennent plus intolérantes au glucose et insulino-résistantes, lors de l'administration d'un régime HF. Cette fonction pancréatique se traduit d'ailleurs par une tendance à l'augmentation de l'insulinémie basale ainsi qu'une augmentation significative de la SISG chez ces animaux. L'hypersécrétion d'insuline ne pourrait-elle pas contribuer aux altérations phénotypiques observées ? Cette interrogation quant au rôle de l'insuline dans la pathogenèse du DT2 est d'ailleurs le fondement du syndrome hyperinsulinémique. Selon ce concept, la résistance à l'insuline serait initiée par une hypersécrétion de cette hormone (Corkey, 2012; Kelly *et al.*, 2014). Du fait de sa charge calorique importante, le régime HF stimule davantage la sécrétion d'insuline quotidienne que le régime LF. La meilleure fonctionnalité des cellules β pancréatiques observée chez les souris PLTP KO est alors exacerbée par le régime HF. Cela pourrait ainsi participer au développement de leur plus forte insulino-résistance. De plus, l'insuline est connue comme étant une hormone anabolisante. Elle favorise donc, notamment, le stockage dans le tissu adipeux sous forme de graisses et inhibe sa lipolyse. La meilleure fonction pancréatique des souris PLTP KO pourrait donc aussi contribuer à leur forte adiposité et *in fine* à l'insulino-résistance.

Au départ, nous avons choisi de travailler sur le modèle de souris PLTP KO car, du fait de leur moindre capacité de détoxification des LPS, elles sont également plus sensibles à leurs effets pro-inflammatoires (Gautier *et al.*, 2008). Nous faisons l'hypothèse que si le régime HF augmente l'endotoxémie et que cela contribue à l'apparition des désordres métaboliques, alors les souris PLTP KO seraient également plus sensibles aux conséquences délétères d'un régime riche en graisses. Nous avons effectivement observé une sensibilité accrue des souris PLTP KO à l'administration d'un régime HF. Cependant, nous n'avons pas observé de différence d'endotoxémie entre les deux génotypes. Nous n'avons d'ailleurs pas non plus observé de différence d'endotoxémie entre les animaux nourris avec un régime LF et les animaux nourris avec un régime HF. Dans nos conditions, l'administration d'un régime hyperlipidique n'est

donc pas associée à une augmentation des niveaux sanguins de LPS, que ce soit chez les animaux sauvages comme chez les animaux PLTP KO. La hausse des LPS plasmatiques et la sensibilité accrue des souris PLTP KO à ces molécules pro-inflammatoires ne semblent donc pas participer à l'initiation des désordres métaboliques induits par le régime HF. L'hyperinsulinémie des souris PLTP KO sous régime HF peut certes être la conséquence d'une stimulation par le GLP-1 mais ne serait pas associée à la cascade de régulation LPS / GLP-1 / insuline (Nguyen *et al.*, 2014). Toutefois, les dosages de LPS ont été réalisés dans du sang total, sans faire de distinction entre les LPS de la fraction libre biologiquement actifs et les LPS inactivés par leur liaison aux lipoprotéines circulantes. La PLTP étant justement impliquée dans ce transfert des LPS sur les lipoprotéines (Hailman *et al.*, 1996), il serait intéressant de quantifier les endotoxines dans les différentes fractions lipoprotéiques. En effet, il a été montré que, suite à une administration aiguë ou chronique de LPS, les souris déficientes en PLTP présentent une moindre quantité de LPS dans la fraction HDL, suggérant ainsi que la proportion de LPS actif pourrait être supérieure chez ces souris (Gautier *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2014). L'éventuelle augmentation des taux de LPS actifs chez les souris PLTP KO nourries avec un régime HF pourrait, *via* le GLP-1, stimuler la sécrétion d'insuline sans que cela ne se répercute sur l'endotoxémie. La pertinence de cette cascade LPS / GLP-1 / insuline serait donc à approfondir chez les souris PLTP KO.

La dégradation du phénotype des animaux déficients en PLTP sous régime HF pourrait également être la conséquence de l'altération de leur métabolisme lipidique. La déficience en PLTP est associée à une augmentation des céramides plasmatiques sous régime HF. Cela pourrait contribuer à l'altération du métabolisme glucidique de ces souris car les céramides sont connus pour être associés avec le développement de l'insulino-résistance (Chavez & Summers, 2012). Nos résultats d'hypertriglycéridémie forcée montrent une diminution de l'absorption / sécrétion intestinale des CM chez les animaux nourris avec un régime HF, indépendamment du génotype. Cette observation est en accord avec les données de la littérature montrant que l'administration chronique d'un régime hyperlipidique réduit cette capacité intestinale (Petit *et al.*, 2007). Toutefois, l'hypertriglycéridémie postprandiale est plus prononcée chez les souris PLTP KO. Elle n'est pas provoquée par une élévation de la sécrétion intestinale des CM mais serait la conséquence d'un défaut du catabolisme des TG. Nous avons mis en évidence que, sous LF, la déficience en PLTP est associée à une réduction de l'expression génique de la LPL

intestinale, musculaire et hépatique. Cette différence génotypique observée sous LF est toutefois complètement masquée par l'administration d'un régime HF alors que la différence d'hypertriglycémie postprandiale persiste. Il serait intéressant de quantifier les activités LPL et HL chez ces animaux, même si l'expression génique de cette dernière n'est pas modifiée (donnée non présentée). Pour finir, nous avons également observé que, sous LF, les souris PLTP KO ont moins de phospholipides que les souris WT et, de nouveau, cela s'amenuise avec l'administration d'un régime HF. Ces modifications phospholipidiques pourraient aussi participer à la perturbation de la clairance des TG en entraînant un remaniement des lipoprotéines et une possible altération des échanges avec la LPL.

En conclusion, dans cette étude nous montrons pour la première fois que les souris déficientes en PLTP sont plus sensibles à l'administration d'un régime obésogène. Ces altérations phénotypiques seraient plus probablement liées à l'implication de cette protéine dans le métabolisme lipidique, plutôt qu'à son rôle de détoxification des LPS. En effet, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'endotoxémie entre les deux génotypes. Par contre, nous montrons que la déficience en PLTP est associée à une altération du métabolisme lipidique et notamment un ralentissement de la clairance des TG. Cette perturbation métabolique est donc forcément davantage sollicitée lors d'un régime riche en graisses et pourrait ainsi expliquer la sensibilité des souris PLTP KO aux effets de ce régime.

IV. Perspectives

1. Quelles seraient les perspectives à court terme ?

Certains paramètres doivent encore être déterminés sur le matériel biologique issu des expériences précédentes. Il faudrait premièrement doser les LPS dans les différentes fractions lipoprotéiques afin de connaître le ratio LPS biologiquement actifs / LPS inactivés. Pour cela, il faut séparer les différentes fractions lipoprotéiques plasmatiques par ultracentrifugation et quantifier le 3-HM dans chacune de ces fractions. Deuxièmement, il faudrait explorer les origines du défaut de clairance des TG des souris PLTP KO. Y a-t-il moins de LPL plasmatique ? La LPL est-elle moins active ? Ou bien ce défaut de clairance des TG est-il engendré par une étape en aval de l'activité LPL ? Ce sont toutes des questions auxquelles il faudrait essayer de répondre en commençant notamment par doser l'activité LPL plasmatique.

2. Quels seraient les effets d'une infusion de LPS chez des souris PLTP KO sous HF ?

Nous montrons que les altérations phénotypiques induites par le régime HF ne sont pas la conséquence d'une augmentation de l'endotoxémie, que ce soit chez les souris sauvages comme chez les souris PLTP KO. Etant donné que le régime HF n'a pas d'effet sur l'endotoxémie, il n'est donc pas suffisant pour étudier les effets d'une hausse des taux de LPS plasmatiques. Dans ce contexte et afin d'exacerber les conséquences de la déficience en PLTP, nous pouvons envisager d'implanter des pompes osmotiques permettant une infusion de LPS à des animaux PLTP KO sous régime HF. Une expérience préliminaire a déjà été réalisée dans ce sens. Des premiers résultats montrent que les effets d'une infusion continue de LPS à 10µg/kg/jour pendant 28 jours chez les souris déficientes en PLTP sont différents de ceux obtenus chez les souris WT : i) pas de hausse des taux circulants de GLP-1 actif basal, ii) pas de diminution de la masse du TAPE et iii) pas d'amélioration du métabolisme glucidique (données non présentées). Les souris PLTP KO avec et sans infusion de LPS présentent des taux de GLP-1, une tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline identiques. Les effets d'une infusion continue de LPS nécessiteraient donc la présence d'une PLTP fonctionnelle. Par quels mécanismes la PLTP pourrait-elle contribuer à ces effets LPS-dépendants ?

3. La PLTP contribuerait-elle à prévenir les maladies métaboliques ?

Les régimes LF et HF administrés aux souris WT et PLTP KO pendant 4 mois montrent que le régime hyperlipidique augmente le GLP-1 actif basal chez les souris sauvages alors qu'il n'a pas d'effet chez les souris déficientes en PLTP (Figure 55). De plus, l'expérience d'infusion continue de LPS (10µg/kg/jour) chez les souris WT et PLTP KO, mentionnée ci-dessus, démontre que les LPS augmentent le taux basal de GLP-1 actif chez les souris sauvages mais n'ont pas d'effets chez les souris PLTP KO. Ainsi, comme le schématise la Figure 61, chez les souris sauvages le régime HF et l'infusion continue de LPS augmentent le GLP-1 actif. Cependant chez les souris PLTP KO, ni le régime HF, ni l'infusion de LPS n'ont d'effet sur le GLP-1 actif plasmatique. La PLTP pourrait donc être un intermédiaire entre régime HF, LPS et GLP-1. Pourrait-elle aussi être impliquée dans les autres effets ?

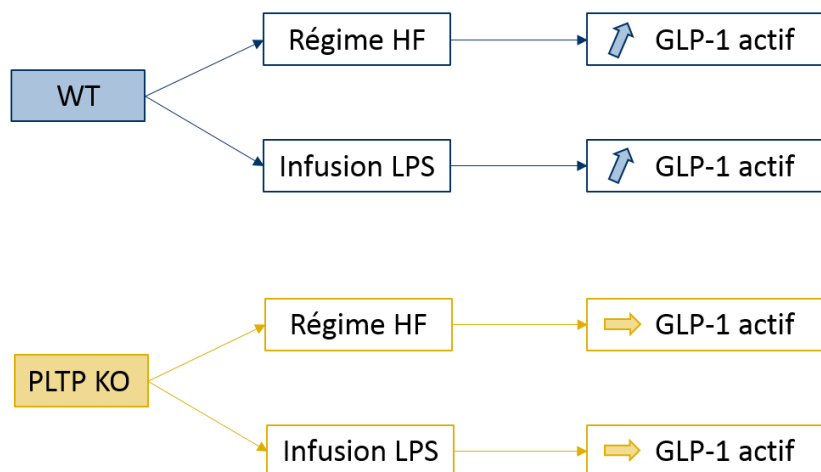


Figure 61

Le régime HF et l'infusion de LPS n'augmentent pas le GLP-1 actif en absence de PLTP

L'administration d'un régime HF pendant 4 mois ou l'infusion de LPS pendant 28 jours augmentent les taux circulants de GLP-1 actif uniquement chez les souris sauvages (WT). La déficience en PLTP (PLTP KO) ne permet pas ces effets du régime obésogène et de l'infusion de LPS.

L'absence de PLTP rend les souris plus sensibles aux effets d'un régime riche en graisses. Au contraire, l'infusion de LPS chez des souris sauvages améliore les conséquences délétères de ce genre de régime. Toutefois, ces effets dépendants des LPS ne sont à priori pas observés chez des souris déficientes en PLTP. L'activité PLTP pourrait-elle contribuer aux conséquences d'une infusion continue de LPS ? Des résultats préliminaires obtenus au

laboratoire confirment cette hypothèse (Figure 62). En effet, l'infusion de doses croissantes de LPS augmente l'endotoxémie de façon croissante (Figure 62A) et l'activité PLTP de façon dose dépendante (Figure 62B). De plus, endotoxémie et activité PLTP apparaissent comme étant positivement corrélées : plus l'endotoxémie est élevée plus l'activité PLTP est importante (Figure 62C). Les animaux infusés aux LPS ont de surcroît une augmentation de l'expression génique de la PLTP dans plusieurs tissus : TAPE, foie, muscle squelettique et iléon (Figure 62D). Pour finir, le dernier argument permettant de conforter cette hypothèse est en lien avec l'adiposité. En effet, l'expression de la PLTP dans le tissu adipeux influe sur son métabolisme (Jiang *et al.*, 2015) et ce dernier semble être au cœur de nos observations : une accumulation de masse grasse chez les souris PLTP KO et une diminution de cette masse grasse, et notamment celle du TAPE, par l'infusion continue de LPS chez des souris sauvages.

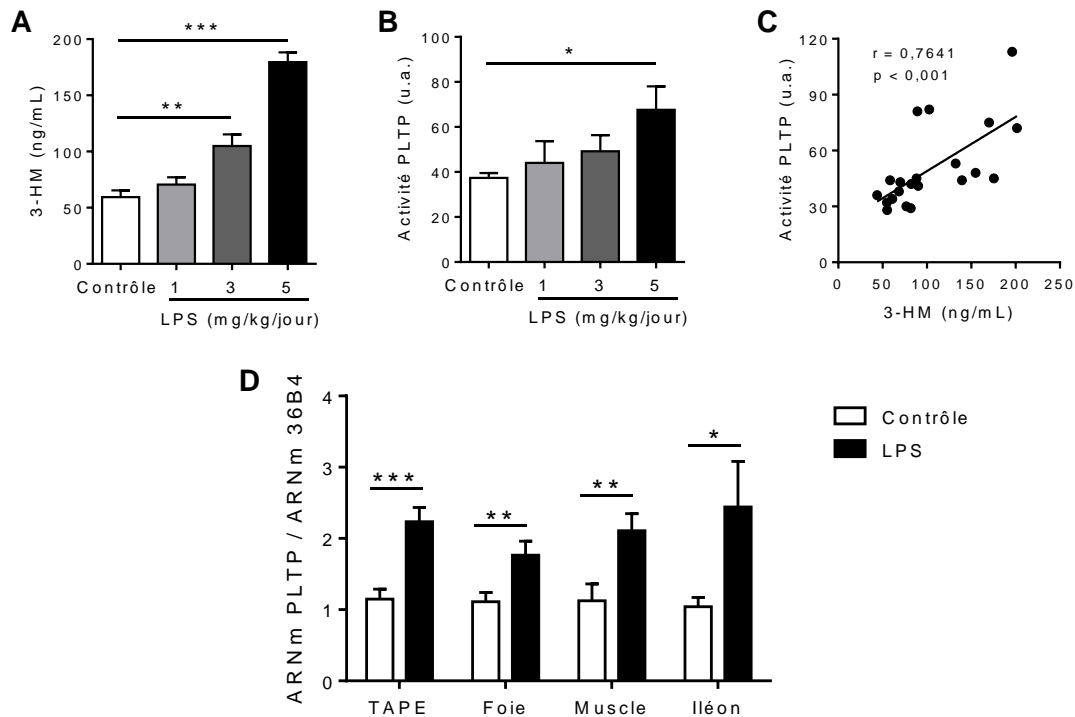


Figure 62

L'infusion de LPS augmente l'expression génique et l'activité de la PLTP

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student apparié ou du test de corrélation de Spearman, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM. **A, B & C.** Respectivement LPS plasmatiques (3-HM en ng/mL), activité PLTP (u.a. : unités arbitraires) et corrélation entre ces deux paramètres chez des souris infusées avec du NaCl en contrôle ou des LPS pendant 11 jours (1, 3 et 5mg/kg/jour ; implantation en sous-cutané ; $n=5-6$ dans chaque groupe). **D.** Mesure de l'expression génique de la PLTP rapportée à l'expression de la 36B4 dans le tissu adipeux péri-épididymaire, le foie, le muscle squelettique et l'iléon chez des souris infusées avec du NaCl en contrôle ou des LPS pendant 28 jours (300 μ g/kg/jour ; implantation IP ; $n=14-16$ contrôles et $n=9-11$ LPS).

La PLTP est connue pour être associée aux maladies métaboliques : i) son activité est augmentée chez les patients DT2 et chez les obèses (Dullaart *et al.*, 1994, 2007; Murdoch *et al.*, 2000; Kaser *et al.*, 2001) et ii) elle est considérée comme un facteur de risque d'apparition du DT2 (Abbasi *et al.*, 2015). Ces études présentent la hausse de l'activité PLTP comme un facteur contribuant à l'apparition des maladies métaboliques. Cependant, selon ces travaux de thèse, la PLTP permettrait de prévenir les effets d'un régime obésogène. Dans ce sens, une étude de 2005 montre que le polymorphisme du gène codant pour la PLTP humaine est associé à un tour de taille augmenté et un risque accru de devenir obèse (Bossé *et al.*, 2005). Nous pouvons donc nous poser la question du rôle de la PLTP dans le développement des maladies métaboliques. L'augmentation de l'activité PLTP prédispose-t-elle à l'installation des maladies métaboliques ou au contraire, aurait-elle une finalité protectrice en étant induite par le développement de ces pathologies (Figure 63) ?

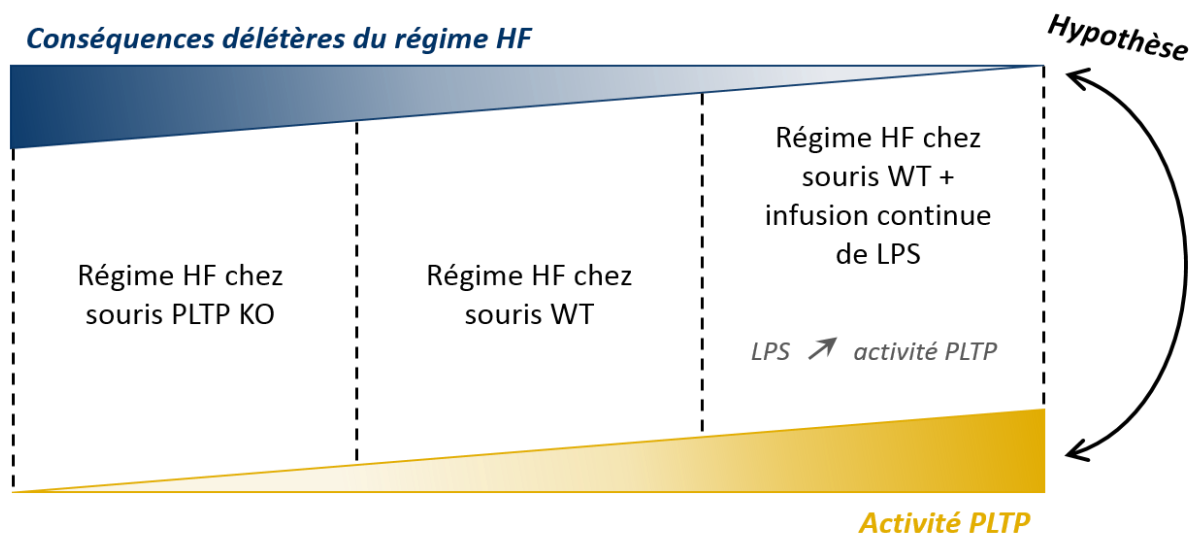


Figure 63

Hypothèse d'une activité PLTP protectrice

L'administration d'un régime riche en graisses (HF) à des souris déficientes en PLTP (PLTP KO) a des conséquences plus délétères que l'administration de ce même régime à des souris sauvages (WT) disposant d'une PLTP fonctionnelle. L'activité PLTP semble donc être associée à une diminution des effets du régime HF. Ces effets sont encore moins prononcés chez des animaux sauvages ayant une activité PLTP augmentée par une infusion de LPS. Ainsi, plus l'activité PLTP augmente, moins les effets délétères du régime HF sont prononcés.

4. Y aurait-il un lien entre PLTP et fonction pancréatique ?

Nous montrons dans cette étude que les souris PLTP KO disposent d'une meilleure fonction β pancréatique, et cela quel que soit le régime. Pour une même charge glucidique, les souris PLTP KO sécrètent plus d'insuline que les souris WT. Nous faisons alors l'hypothèse qu'il pourrait y avoir un lien direct entre PLTP et métabolisme pancréatique. A notre connaissance, une seule étude associe PLTP et pancréas en reliant l'activité de cette enzyme au risque de développer une pancréatite (Saunders *et al.*, 2010). L'effet de la PLTP sur la fonction pancréatique pourrait être relayé par les lipoprotéines circulantes. La PLTP est fortement impliquée dans le remodelage des HDL et ces derniers sont connus pour influencer la sécrétion d'insuline. L'interaction entre les apolipoprotéines des HDL et les récepteurs *ATP binding cassette* (ABC) A1 et G1 des cellules β en culture induit une sécrétion d'insuline (Fryirs *et al.*, 2010). Des souris présentant une délétion du récepteur ABCA1 spécifiquement dans les cellules β présentent une accumulation de cholestérol dans ces cellules ainsi qu'un défaut de SISG (Brunham *et al.*, 2007). Toutefois, les souris PLTP KO ont moins de HDL circulants mais ont également une amélioration de la fonction β pancréatique. L'apolipoprotéine A-I présente sur les HDL est connue pour stimuler la production de prostaglandines E_2 (PGE_2) dans les monocytes humains en culture (Kim *et al.*, 2005). Or, *in vivo* chez l'Homme, l'infusion de PGE_2 réduit la SISG (Robertson & Chen, 1977). Les cellules β en culture sont capables de produire des PGE_2 et leur sécrétion d'insuline est plus importante lorsque la voie de synthèse de ces molécules est pharmacologiquement bloquée (Tran *et al.*, 1999). Les prostaglandines sont produites à partir des phospholipides intracellulaires. La PLTP pourrait donc également jouer un rôle directement dans les cellules du pancréas. En effet, la PLTP est connue pour être fortement exprimée dans cet organe (Pussinen *et al.*, 1997). Nous pouvons donc imaginer que la génération d'un KO pour cette protéine puisse avoir des conséquences physiologiques non négligeables dans le pancréas. Les phospholipides ont été décrits comme participant activement à l'exocytose des granules d'insuline. En effet, lors d'une stimulation avec du glucose, il a été montré des remaniements membranaires au niveau de ces granules de sécrétion et notamment des modifications dans le contenu en phospholipides. Cela permet de favoriser la fluidité membranaire, la fusion des membranes et donc l'exocytose. Les phospholipides fortement augmentés dans les vésicules de sécrétion suite à une stimulation avec du glucose sont les phosphatidylsérines : étant chargées négativement, elles facilitent l'interaction avec les

protéines responsables de l'exocytose, qui elles, sont chargées positivement (MacDonald *et al.*, 2015). Or, nous avons vu dans cette étude que sous régime LF, la déficience en PLTP entraîne une forte diminution de toutes les classes de phospholipides sauf les phosphatidylsérines. Cela pourrait donc participer à l'amélioration de la fonction β pancréatique observée chez ces souris. Ainsi, au vu de nos résultats, il serait intéressant d'approfondir cette piste.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce doctorat et décrits dans cette thèse ont été synthétisés dans la Figure 64. D'un point de vue mécanistique, nous avons montré que les LPS sont capables d'augmenter la sécrétion de GLP-1 en stimulant directement le récepteur TLR4 des EEC. Cette nouvelle voie de sécrétion du GLP-1 par les LPS serait donc à ajouter à celles connues à l'heure actuelle : nutriments, hormones... Nous montrons que les EEC de type L pourraient être impliquées dans la détection précoce d'une altération de la barrière intestinale telle qu'elle est observée lors d'une I/R mésentérique. En effet, chez la souris, le GLP-1 circulant est très rapidement augmenté suite à une I/R mésentérique, avant même que l'endotoxémie ne soit modifiée. Les LPS, très nombreux dans la lumière intestinale, ne stimulent la sécrétion de GLP-1 qu'en conditions physiopathologiques, après une dégradation de la perméabilité intestinale. Ils sont d'ailleurs impliqués dans la sécrétion précoce de GLP-1 lors d'une I/R mésentérique : la réduction des niveaux de LPS endogènes ou l'antagonisation de leurs effets diminue l'induction du GLP-1 en réponse à une I/R mésentérique. Etant produit par des cellules encore fonctionnelles, le GLP-1 est donc un marqueur précoce d'une altération de la barrière intestinale. Nous montrons de plus que la capacité des LPS à stimuler la sécrétion de cette hormone est aussi fonctionnelle chez l'Homme. Le GLP-1 pourrait donc être un outil clinique prometteur de diagnostic de l'I/R mésentérique. Des études sont néanmoins nécessaires et sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer si, chez l'Homme, une altération de la barrière intestinale s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de GLP-1.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets d'une augmentation de l'endotoxémie sur l'installation des maladies métaboliques que sont l'obésité et le DT2. Les LPS étant capables de stimuler la sécrétion d'insuline *via* une augmentation du GLP-1 circulant, nous voulions étudier les conséquences au long terme et sous régime hyperlipidique de cette cascade LPS / GLP-1 / insuline. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles : le premier permet une augmentation expérimentale de l'endotoxémie *via* l'infusion continue d'une faible dose de LPS, et le deuxième génère une augmentation « endogène » de l'endotoxémie ou plutôt une sensibilisation aux LPS, *via* l'utilisation de souris déficientes en PLTP. Dans nos conditions, la légère augmentation des taux plasmatiques de LPS, induite par une endotoxémie expérimentale, n'est pas associée à une aggravation des conséquences délétères d'un régime hyperlipidique. Au contraire, pour une même prise alimentaire, les animaux infusés aux LPS disposent de moins de masse grasse. Ils présentent de plus une amélioration de leur métabolisme glucidique, à

laquelle contribue certainement l'augmentation de l'utilisation musculaire du glucose observée chez ces animaux. Les souris déficientes en PLTP sont plus sensibles aux effets délétères du régime riche en graisses que les souris sauvages : augmentation de la masse corporelle et dégradation du métabolisme glucidique plus prononcées. L'absence d'une PLTP fonctionnelle est associée à une augmentation de l'adiposité ainsi qu'à une forte altération du métabolisme des lipides, quel que soit le régime. Ce défaut de prise en charge des composés lipidiques pourrait en partie expliquer les dégradations phénotypiques observées sous régime HF. L'endotoxémie totale étant identique entre les deux génotypes, ce facteur ne semble pas être impliqué dans l'apparition des désordres métaboliques initiés par le régime riche en graisses. Cette expérience nous montre de plus que, dans nos conditions, l'administration d'un régime riche en graisses n'entraîne pas d'augmentation de l'endotoxémie, que ce soit chez les souris PLTP KO ou chez les souris sauvages.

Ces travaux de thèse, intitulés « lipopolysaccharides et glucagon-like peptide 1 : des mécanismes moléculaires à la physiopathologie », apportent donc les réponses à certaines questions mais sont aussi à l'origine de nouvelles interrogations. La partie mécanistique décrit la nature des liens entre les LPS et le GLP-1 mais pose la question de la pertinence physiologique de cette cascade LPS / GLP-1. Cette hormone intestinale initialement connue pour son rôle dans le métabolisme glucidique est de plus en plus décrite, dans la littérature scientifique, comme un agent anti-inflammatoire. Les LPS étant de puissantes molécules pro-inflammatoires, la production de GLP-1 en réponse aux LPS pourrait s'inscrire dans un processus de régulation de l'inflammation, locale ou systémique. La deuxième partie, plus physiologique, s'inscrit dans la controverse actuelle concernant l'existence de l'« endotoxémie métabolique » induite par un régime riche en graisses et les effets métaboliques délétères de cette endotoxémie. Nos résultats apportent une preuve scientifique supplémentaire pour étayer cette controverse. Ils montrent que : i) le régime hyperlipidique n'augmente pas l'endotoxémie et ii) l'infusion continue de LPS augmente certes le statut inflammatoire des animaux, mais n'entraîne pas de prise de masse grasse ou d'altération du métabolisme glucidique. L'absence de PLTP rend les animaux plus sensibles aux conséquences délétères du régime hyperlipidique sans que leur endotoxémie ne soit pour autant modifiée. L'activité PLTP étant connue pour être modulée lors des maladies métaboliques telles que l'obésité et le DT2, cela ouvre des perspectives de recherche visant à déterminer son implication dans ces pathologies.

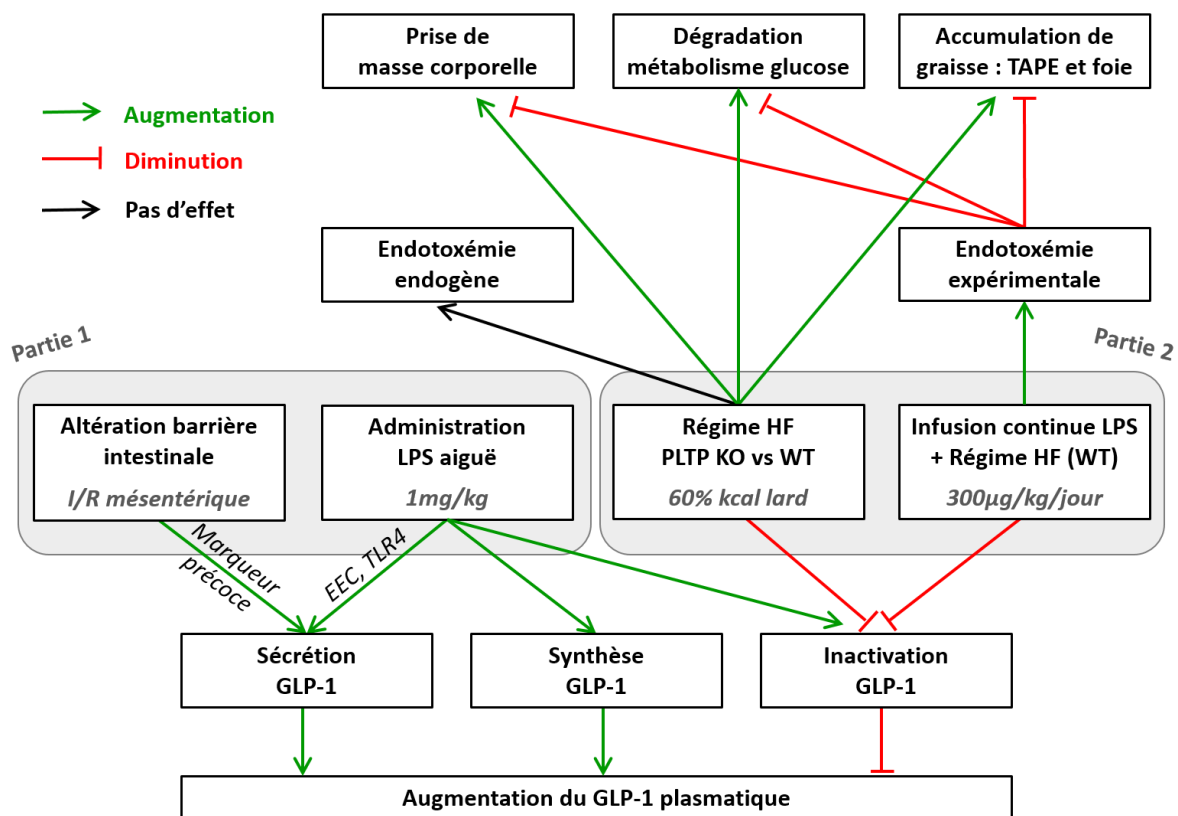


Figure 64

Vue d'ensemble des résultats de thèse

Cette figure représente de manière schématique et synthétique les résultats décrits dans les deux parties de ces travaux de thèse.

Abréviations : I/R – ischémie/reperfusion ; LPS – lipopolysaccharides ; EEC – cellules entéroendocrines ; PLTP KO – *plasma phospholipid transfer protein knockout* (souris déficientes en PLTP) ; WT – *wild-type* (souris sauvages) ; HF – *high-fat* (régime riche en graisses) ; GLP-1 – *glucagon-like peptide 1*.

BIBLIOGRAPHIE

~ **A** ~

- Abbasi A, Dallinga-Thie GM & Dullaart RPF (2015). Phospholipid transfer protein activity and incident type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **439**, 38–41.
- Abrams GD, Bauer H & Sprinz H (1963). Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* **12**, 355–364.
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET & Arditi M (2001). Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md 1950* **167**, 1609–1616.
- Adib-Conquy M & Cavaillon J-M (2009). Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* **101**, 36–47.
- Agwunobi AO, Reid C, Maycock P, Little RA & Carlson GL (2000). Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3770–3778.
- Alexander S, Bramson J, Foley R & Xing Z (2004). Protection from endotoxemia by adenoviral-mediated gene transfer of human bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* **103**, 93–99.
- Allison DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ, Bray GA, Eckel RH, Finkelstein EA, Jensen MD & Tremblay A (2008). Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obes Silver Spring Md* **16**, 1161–1177.
- Alsalam W, Omar B, Pacini G, Bizzotto R, Mari A & Ahrén B (2015). Incretin and islet hormone responses to meals of increasing size in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, 561–568.
- Anbazzhagan AN, Thaqi M, Priyamvada S, Jayawardena D, Kumar A, Gujral T, Chatterjee I, Mugarza E, Saksena S, Onyuksel H & Dudeja PK (2016). GLP-1 nanomedicine alleviates gut inflammation. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*; DOI: 10.1016/j.nano.2016.08.004.
- Anini Y & Brubaker PL (2003a). Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology* **144**, 3244–3250.
- Anini Y & Brubaker PL (2003b). Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* **52**, 252–259.
- Anini Y, Hansotia T & Brubaker PL (2002). Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* **143**, 2420–2426.
- Anjani K, Lhomme M, Sokolovska N, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Bouillot J-L, Lesnik P, Bedossa P, Kontush A, Clement K, Dugail I & Tordjman J (2015). Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J Hepatol* **62**, 905–912.
- Arner P & Langin D (2014). Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab TEM* **25**, 255–262.
- Aulinger BA, Vahl TP, Prigeon RL, D'Alessio DA & Elder DA (2016). The incretin effect in obese adolescents with and without type 2 diabetes: impaired or intact? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, E774–E781.
- Ayala JE, Bracy DP, James FD, Burmeister MA, Wasserman DH & Drucker DJ (2010). Glucagon-like peptide-1 receptor knockout mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Endocrinology* **151**, 4678–4687.

~ **B** ~

- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF & Gordon JI (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15718–15723.

- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF & Gordon JI (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 979–984.
- Baggio LL & Drucker DJ (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131–2157.
- Balbi V & Ciarletta P (2013). Morpho-elasticity of intestinal villi. *J R Soc Interface* **10**, 20130109.
- Balks HJ, Holst JJ, von zur Mühlen A & Brabant G (1997). Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 786–790.
- Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz S-S, Drucker DJ & Husain M (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* **117**, 2340–2350.
- Barrera JG, Jones KR, Herman JP, D'Alessio DA, Woods SC & Seeley RJ (2011). Hyperphagia and increased fat accumulation in two models of chronic CNS glucagon-like peptide-1 loss of function. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **31**, 3904–3913.
- Bates JM, Akerlund J, Mittge E & Guillemin K (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe* **2**, 371–382.
- Bayliss WM & Starling EH (1902). The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol* **28**, 325–353.
- Beamer LJ, Carroll SF & Eisenberg D (1997). Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* **276**, 1861–1864.
- Bédard S, Marcotte B & Marette A (1997). Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* **325** (Pt 2), 487–493.
- Beeson PB & Technical Assistance of Elizabeth Roberts (1947). TOLERANCE TO BACTERIAL PYROGENS : I. FACTORS INFLUENCING ITS DEVELOPMENT. *J Exp Med* **86**, 29–38.
- Berg DJ, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Menon S, Davidson N, Grünig G & Rennick D (1995). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* **96**, 2339–2347.
- Beutler B & Rietschel ET (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**, 169–176.
- Birjmohun RS, van Leuven SI, Levels JHM, van 't Veer C, Kuivenhoven JA, Meijers JCM, Levi M, Kastelein JJP, van der Poll T & Stroes ESG (2007). High-density lipoprotein attenuates inflammation and coagulation response on endotoxin challenge in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1153–1158.
- Biswas SK & Lopez-Collazo E (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* **30**, 475–487.
- Bleicher PA, Balk SP, Hagen SJ, Blumberg RS, Flotte TJ & Terhorst C (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* **250**, 679–682.
- Bleich S, Cutler D, Murray C & Adams A (2008). Why is the developed world obese? *Annu Rev Public Health* **29**, 273–295.
- Bogunovic M, Davé SH, Tilstra JS, Chang DTW, Harpaz N, Xiong H, Mayer LF & Plevy SE (2007). Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1770–G1783.
- Bohórquez DV, Chandra R, Samsa LA, Vigna SR & Liddle RA (2011). Characterization of basal pseudopod-like processes in ileal and colonic PYY cells. *J Mol Histol* **42**, 3–13.
- Bonneville M, Janeway CA, Ito K, Haser W, Ishida I, Nakanishi N & Tonegawa S (1988). Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature* **336**, 479–481.
- Borgstrom B, Dahlqvist A, Lundh G & Sjovall J (1957). Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J Clin Invest* **36**, 1521–1536.
- Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL & Yellon DM (2005). Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* **54**, 146–151.

- Bossé Y, Bouchard L, Després J-P, Bouchard C, Pérusse L & Vohl M-C (2005). Haplotypes in the phospholipid transfer protein gene are associated with obesity-related phenotypes: the Québec Family Study. *Int J Obes* **2005** **29**, 1338–1345.
- Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI & Hulver MW (2016). Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie* **124**, 11–20.
- Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MHJ, Blume A & Garidel P (2002). Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem FEBS* **269**, 5972–5981.
- Brighton CA, Rievaj J, Kuhre RE, Glass LL, Schoonjans K, Holst JJ, Gribble FM & Reimann F (2015). Bile Acids Trigger GLP-1 Release Predominantly by Accessing Basolaterally Located G Protein-Coupled Bile Acid Receptors. *Endocrinology* **156**, 3961–3970.
- Brown MS & Goldstein JL (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* **7**, 95–96.
- Brubaker PL, Efendic S & Greenberg GR (1997). Truncated and full-length glucagon-like peptide-1 (GLP-1) differentially stimulate intestinal somatostatin release. *Endocrine* **6**, 91–95.
- Brubaker PL, Schloos J & Drucker DJ (1998). Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology* **139**, 4108–4114.
- Brubaker PL & Vranic M (1987). Fetal rat intestinal cells in monolayer culture: a new in vitro system to study the glucagon-like immunoreactive peptides. *Endocrinology* **120**, 1976–1985.
- de Bruïne AP, Dinjens WN, Pijls MM, vd Linden EP, Rousch MJ, Moerkerk PT, de Goeij AF & Bosman FT (1992). NCI-H716 cells as a model for endocrine differentiation in colorectal cancer. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **62**, 311–320.
- Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB & Hayden MR (2007). Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* **13**, 340–347.
- Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G & Martines D (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G518–G525.



- Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lundén GÖ, Cani PD & Bäckhed F (2012). Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut* **61**, 1701–1707.
- Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD & Bäckhed F (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab* **22**, 658–668.
- Cani PD et al. (2007a). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM & Burcelin R (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481.
- Cani PD, Holst JJ, Drucker DJ, Delzenne NM, Thorens B, Burcelin R & Knauf C (2007b). GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion. *Mol Cell Endocrinol* **276**, 18–23.
- Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR & Delzenne NM (2007c). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**, 2374–2383.
- Cantini G, Di Franco A, Samavat J, Forti G, Mannucci E & Luconi M (2015). Effect of liraglutide on proliferation and differentiation of human adipose stem cells. *Mol Cell Endocrinol* **402**, 43–50.

- Cantini G, Mannucci E & Luconi M (2016). Perspectives in GLP-1 Research: New Targets, New Receptors. *Trends Endocrinol Metab* **27**, 427–438.
- Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM & Hotamisligil GS (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* **134**, 933–944.
- Cao X, Flock G, Choi C, Irwin DM & Drucker DJ (2003). Aberrant regulation of human intestinal proglucagon gene expression in the NCI-H716 cell line. *Endocrinology* **144**, 2025–2033.
- Cario E & Podolsky DK (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**, 7010–7017.
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC & Podolsky DK (2000). Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol Baltim Md 1950* **164**, 966–972.
- Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM & Haeffner-Cavaillon N (2002). Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect Inst Pasteur* **4**, 915–926.
- Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, Kirsch SJ & Warren HS (1990). Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun* **58**, 2375–2382.
- Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AIS, Quintão ECR & Soriano FG (2008). Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. *Shock Augusta Ga* **30**, 590–595.
- Chaby R (2004). Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell Mol Life Sci CMLS* **61**, 1697–1713.
- Chai W, Zhang X, Barrett EJ & Liu Z (2014). Glucagon-Like Peptide 1 Recruits Muscle Microvasculature and Improves Insulin's Metabolic Action in the Presence of Insulin Resistance. *Diabetes* **63**, 2788–2799.
- Challa TD, Beaton N, Arnold M, Rudofsky G, Langhans W & Wolfrum C (2012). Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. *J Biol Chem* **287**, 6421–6430.
- Chavez JA & Summers SA (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab* **15**, 585–594.
- Chen L-W, Chang W-J, Chen P-H, Liu W-C & Hsu C-M (2008). TLR ligand decreases mesenteric ischemia and reperfusion injury-induced gut damage through TNF-alpha signaling. *Shock Augusta Ga* **30**, 563–570.
- Chien J-Y, Jerng J-S, Yu C-J & Yang P-C (2005). Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med* **33**, 1688–1693.
- Chisholm C & Greenberg GR (2002). Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E311–E317.
- Christensen LW, Kuhre RE, Janus C, Svendsen B & Holst JJ (2015). Vascular, but not luminal, activation of FFAR1 (GPR40) stimulates GLP-1 secretion from isolated perfused rat small intestine. *Physiol Rep*; DOI: 10.14814/phy2.12551.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS & Obin MS (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* **46**, 2347–2355.
- Claustre J, Brechet S, Plaisancie P, Chayvialle JA & Cuber JC (1999). Stimulatory effect of beta-adrenergic agonists on ileal L cell secretion and modulation by alpha-adrenergic activation. *J Endocrinol* **162**, 271–278.
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL & Shulman GI (1999). Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **341**, 240–246.
- Coburn CT, Knapp FF, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL & Abumrad NA (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* **275**, 32523–32529.

- Collange O, Charles A-L, Lavaux T, Noll E, Bouitbir J, Zoll J, Chakfé N, Mertes M & Geny B (2015). Compartmentalization of Inflammatory Response Following Gut Ischemia Reperfusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* **49**, 60–65.
- Collet X, Tall AR, Serajuddin H, Guendouzi K, Royer L, Oliveira H, Barbaras R, Jiang XC & Francone OL (1999). Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *J Lipid Res* **40**, 1185–1193.
- Colman RJ & Rubin DT (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis* **8**, 1569–1581.
- Cooper AD (1992). Hepatic clearance of plasma chylomicron remnants. *Semin Liver Dis* **12**, 386–396.
- Cordier-Bussat M, Bernard C, Levenez F, Klages N, Laser-Ritz B, Philippe J, Chayvialle JA & Cuber JC (1998). Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene. *Diabetes* **47**, 1038–1045.
- Corkey BE (2012). Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? *Diabetes* **61**, 4–13.
- van der Crabben SN, Blümer RME, Stegenga ME, Ackermans MT, Endert E, Tanck MWT, Serlie MJ, van der Poll T & Sauerwein HP (2009). Early endotoxemia increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 463–468.
- Creutzfeldt W (2005). The [pre-] history of the incretin concept. *Regul Pept* **128**, 87–91.
- Cutuli SL, Artigas A, Fumagalli R, Monti G, Ranieri VM, Ronco C, Antonelli M & EUPHAS 2 Collaborative Group (2016). Polymyxin-B hemoperfusion in septic patients: analysis of a multicenter registry. *Ann Intensive Care* **6**, 77.

~ **D** ~

- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ & Turnbaugh PJ (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563.
- Deacon CF, Hughes TE & Holst JJ (1998). Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes* **47**, 764–769.
- DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J & Felber JP (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* **30**, 1000–1007.
- Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palleau V, Gambert P & Lagrost L (1999). Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **13**, 883–892.
- Deventer S van, Buller HR, Cate J ten, Aarden LA, Hack CE & Sturk A (1990). Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* **76**, 2520–2526.
- Dhanvantari S, Izzo A, Jansen E & Brubaker PL (2001). Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology* **142**, 37–42.
- Diabetes Prevention Program Research Group, Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT, Brown-Friday JO, Goldberg R, Venditti E & Nathan DM (2009). 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet Lond Engl* **374**, 1677–1686.
- Diakogiannaki E, Pais R, Tolhurst G, Parker HE, Horscroft J, Rauscher B, Zietek T, Daniel H, Gribble FM & Reimann F (2013). Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. *Diabetologia* **56**, 2688–2696.

- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S & Relman DA (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* **3**, e3056.
- Ding X, Saxena NK, Lin S, Gupta NA, Gupta N & Anania FA (2006). Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* **43**, 173–181.
- Dobrian AD, Ma Q, Lindsay JW, Leone KA, Ma K, Coben J, Galkina EV & Nadler JL (2011). Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**, E410–E421.
- Doerge H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE & Stahl A (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* **130**, 1245–1258.
- Draisma A, Pickkers P, Bouw MPWJM & van der Hoeven JG (2009). Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med* **37**, 1261–1267.
- Drucker DJ (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab* **3**, 153–165.
- Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA & Brubaker PL (1994). Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol* **8**, 1646–1655.
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL & Habener JF (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3434–3438.
- Dudele A, Fischer CW, Elfving B, Wegener G, Wang T & Lund S (2015). Chronic exposure to low doses of lipopolysaccharide and high-fat feeding increases body mass without affecting glucose tolerance in female rats. *Physiol Rep*; DOI: 10.14814/phy2.12584.
- Duhamel M, Rodet F, Delhem N, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, Pays L, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorski M, Fournier I, Day R & Salzet M (2015). Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. *Mol Cell Proteomics MCP* **14**, 2857–2877.
- Dullaart RPF, de Vries R, Dallinga-Thie GM, van Tol A & Sluiter WJ (2007). Plasma cholesteryl ester transfer protein mass and phospholipid transfer protein activity are associated with leptin in type 2 diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 113–118.
- Dullaart RP, Sluiter WJ, Dikkeschei LD, Hoogenberg K & Van Tol A (1994). Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest* **24**, 188–194.
- Dupre J, Ross SA, Watson D & Brown JC (1973). Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* **37**, 826–828.

~ E ~

- Ebert R, Unger H & Creutzfeldt W (1983). Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoabsorption. *Diabetologia* **24**, 449–454.
- Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R & Göke B (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* **22**, 283–291.
- Elahi D, Egan JM, Shannon RP, Meneilly GS, Khatri A, Habener JF & Andersen DK (2008). GLP-1 (9-36) amide, cleavage product of GLP-1 (7-36) amide, is a gluco regulatory peptide. *Obes Silver Spring Md* **16**, 1501–1509.
- Ellingsgaard H et al. (2011). Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* **17**, 1481–1489.
- Ellis TN & Kuehn MJ (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **74**, 81–94.

- Elphick DA & Mahida YR (2005). Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* **54**, 1802–1809.
- Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ & Arai Y (1964). PLASMA INSULIN RESPONSE TO ORAL AND INTRAVENOUS GLUCOSE ADMINISTRATION. *J Clin Endocrinol Metab* **24**, 1076–1082.
- Emancipator K, Csako G & Elin RJ (1992). In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect Immun* **60**, 596–601.
- Erion DM & Shulman GI (2010). Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med* **16**, 400–402.
- Erridge C, Attina T, Spickett CM & Webb DJ (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* **86**, 1286–1292.
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A & Giugliano D (2002). Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans. *Circulation* **106**, 2067–2072.
- Even PC & Nadkarni NA (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**, R459–R476.

~ **F** ~

- Fain JN, Kovacev VP & Scow RO (1965). Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *J Biol Chem* **240**, 3522–3529.
- Falcon A, Doege H, Fluitt A, Tsang B, Watson N, Kay MA & Stahl A (2010). FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E384–E393.
- Farese RV, Yost TJ & Eckel RH (1991). Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* **40**, 214–216.
- Farquhar MG & Palade GE (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* **17**, 375–412.
- Fava GE, Dong EW & Wu H (2016). Intra-islet glucagon-like peptide 1. *J Diabetes Complications*; DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2016.05.016.
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P & Forano E (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* **3**, 289–306.
- Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509.
- Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT & Lowry SF (1990). The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest* **85**, 1896–1904.
- Freudenberg MA, Freudenberg N & Galanos C (1982). Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br J Exp Pathol* **63**, 56–65.
- Frisard MI, McMillan RP, Marchand J, Wahlberg KA, Wu Y, Voelker KA, Heilbronn L, Haynie K, Muoio B, Li L & Hulver MW (2010). Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E988–E998.
- Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M, Tuch BE, Tabet F, Heather AK & Rye K-A (2010). Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1642–1648.
- Fuentes JM, Fulton WB, Nino D, Talamini MA & Maio AD (2008). Atropine treatment modifies LPS-induced inflammatory response and increases survival. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al* **57**, 111–117.
- Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ & Abreu MT (2006). Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* **131**, 862–877.

Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M & Abreu MT (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G1055–G1065.

~ G ~

Galic S, Oakhill JS & Steinberg GR (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **316**, 129–139.

Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S & Kroemer G (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* **44**, 221–231.

Gameiro A, Reimann F, Habib AM, O'Malley D, Williams L, Simpson AK & Gribble FM (2005). The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. *J Physiol* **569**, 761–772.

Gamelli RL, Liu H, He LK & Hofmann CA (1996). Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. *J Leukoc Biol* **59**, 639–647.

Gao H, Wang X, Zhang Z, Yang Y, Yang J, Li X & Ning G (2007). GLP-1 amplifies insulin signaling by up-regulation of IRbeta, IRS-1 and Glut4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine* **32**, 90–95.

Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna A-L, Paul C, Le Guern N, Athias A, Montange T, Monier S, Piard F, Jiang X-C, Masson D & Lagrost L (2008). Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J Biol Chem* **283**, 18702–18710.

Gautier T & Lagrost L (2011). Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. *Biochem Soc Trans* **39**, 984–988.

Gelberg HB (2014). Comparative Anatomy, Physiology, and Mechanisms of Disease Production of the Esophagus, Stomach, and Small Intestine. *Toxicol Pathol* **42**, 54–66.

Genton L & Kudsk KA (2003). Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* **186**, 253–258.

Ghaisas S, Maher J & Kanthasamy A (2016). Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome–gut–brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* **158**, 52–62.

Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, Levis EN & Weiss JP (2005). Monomeric endotoxin:protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. *J Endotoxin Res* **11**, 117–123.

Gioannini TL, Zhang D, Teghanemt A & Weiss JP (2002). An essential role for albumin in the interaction of endotoxin with lipopolysaccharide-binding protein and sCD14 and resultant cell activation. *J Biol Chem* **277**, 47818–47825.

Goldenberg RL, Hauth JC & Andrews WW (2000). Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* **342**, 1500–1507.

Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A & Thaete FL (1999). Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* **48**, 839–847.

Gorboulev V et al. (2012). Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* **61**, 187–196.

Grace PA (1994). Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* **81**, 637–647.

Green CJ, Henriksen TI, Pedersen BK & Solomon TPJ (2012). Glucagon like peptide-1-induced glucose metabolism in differentiated human muscle satellite cells is attenuated by hyperglycemia. *PLoS One* **7**, e44284.

Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, Reimann F, Holst JJ & Gribble FM (2009). Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* **89**, 106–113.

- Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM & Wilmes P (2016). The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol* **18**, 2103–2116.
- Gribble FM, Williams L, Simpson AK & Reimann F (2003). A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* **52**, 1147–1154.
- Grill HJ, Carmody JS, Amanda Sadacca L, Williams DL & Kaplan JM (2004). Attenuation of lipopolysaccharide anorexia by antagonism of caudal brain stem but not forebrain GLP-1-R. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1190–R1193.
- Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JPM, Matthijsen RA, de Bruïne AP, van Bijnen AA, van Dam RM, Dejong CHC & Buurman WA (2010). Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol* **176**, 2283–2291.
- Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL & Anis AH (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **9**, 88.
- Gustavsson N, Wang Y, Kang Y, Seah T, Chua S, Radda GK & Han W (2011). Synaptotagmin-7 as a positive regulator of glucose-induced glucagon-like peptide-1 secretion in mice. *Diabetologia* **54**, 1824–1830.
- Gutsmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A & Seydel U (2001). Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* **69**, 6942–6950.



- Habib AM, Richards P, Cairns LS, Rogers GJ, Bannon CAM, Parker HE, Morley TCE, Yeo GSH, Reimann F & Gribble FM (2012). Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology* **153**, 3054–3065.
- Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK & Miao EA (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* **341**, 1250–1253.
- Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY & Wright SD (1996). Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* **271**, 12172–12178.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM & Wright SD (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* **179**, 269–277.
- Hansen AMK, Bødvarsdóttir TB, Nordestgaard DNE, Heller RS, Gotfredsen CF, Maedler K, Fels JJ, Holst JJ & Karlens AE (2011a). Upregulation of alpha cell glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in *Psammomys obesus*—an adaptive response to hyperglycaemia? *Diabetologia* **54**, 1379–1387.
- Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, Wellner N, Diep TA, Rehfeld JF, Andersen UB, Holst JJ & Hansen HS (2011b). 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, E1409–E1417.
- Hansen L, Deacon CF, Orskov C & Holst JJ (1999). Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* **140**, 5356–5363.
- Hansen L & Holst JJ (2002). The effects of duodenal peptides on glucagon-like peptide-1 secretion from the ileum. A duodeno–ileal loop? *Regul Pept* **110**, 39–45.
- Hansotia T, Maida A, Flock G, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y & Drucker DJ (2007). Extraprostatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J Clin Invest* **117**, 143–152.
- Han VK, Hynes MA, Jin C, Towle AC, Lauder JM & Lund PK (1986). Cellular localization of proglucagon/glucagon-like peptide I messenger RNAs in rat brain. *J Neurosci Res* **16**, 97–107.
- Harada K, Kitaguchi T & Tsuboi T (2015). Integrative function of adrenaline receptors for glucagon-like peptide-1 exocytosis in enteroendocrine L cell line GLUTag. *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 1053–1058.

- Harris HW, Brady SE & Rapp JH (2002). Hepatic endosomal trafficking of lipoprotein-bound endotoxin in rats. *J Surg Res* **106**, 188–195.
- Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR & Rapp JH (1990). Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest* **86**, 696–702.
- Harrison E, Lal S & McLaughlin JT (2013). Enteroendocrine cells in gastrointestinal pathophysiology. *Curr Opin Pharmacol* **13**, 941–945.
- Hassan M, Eskilsson A, Nilsson C, Jonsson C, Jacobsson H, Refai E, Larsson S & Efendic S (1999). In vivo dynamic distribution of ¹³¹I-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera. *Nucl Med Biol* **26**, 413–420.
- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K & Inagaki C (2001). GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4284–4291.
- He J, Watkins S & Kelley DE (2001). Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* **50**, 817–823.
- Heremans H, Van Damme J, Dillen C, Dijkmans R & Billiau A (1990). Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J Exp Med* **171**, 1853–1869.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S & Tsujimoto G (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**, 90–94.
- Hirasawa H, Oda S & Nakamura M (2009). Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. *World J Gastroenterol WJG* **15**, 4132–4136.
- Hira T, Muramatsu M, Okuno M & Hara H (2011). GLP-1 secretion in response to oral and luminal palatinose (isomaltulose) in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **57**, 30–35.
- Hirst BH (2004). Secretin and the exposition of hormonal control. *J Physiol* **560**, 339.
- Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, Rietschel ET, Strittmatter W & Morrison DC (1986). Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol* **166**, 699–705.
- Hofmann B (2016). Obesity as a Socially Defined Disease: Philosophical Considerations and Implications for Policy and Care. *Health Care Anal HCA J Health Philos Policy* **24**, 86–100.
- Højberg PV, Vilsbøll T, Rabøl R, Knop FK, Bache M, Krarup T, Holst JJ & Madsbad S (2009). Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **52**, 199–207.
- Holst JJ (2007). The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* **87**, 1409–1439.
- Huang C, Yuan L & Cao S (2015). Endogenous GLP-1 as a key self-defense molecule against lipotoxicity in pancreatic islets. *Int J Mol Med* **36**, 173–185.
- Huang T-N, Lu K-N, Pai Y-P, Chin Hsu null & Huang C-J (2013). Role of GLP-1 in the Hypoglycemic Effects of Wild Bitter Gourd. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* **2013**, 625892.
- Hu E, Liang P & Spiegelman BM (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**, 10697–10703.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214.
- Hunter K & Hölscher C (2012). Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci* **13**, 33.
- Hupe-Sodmann K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Göke R, Göke B, Thole H, Zimmermann B & Voigt K (1995). Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul Pept* **58**, 149–156.

~ I ~

- Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M & Itoh G (1998). Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* **42**, 530–537.
- Ikeda S, Zarzaar BL, Johnson CD, Fukatsu K & Kudsk KA (2002). Total parenteral nutrition supplementation with glutamine improves survival after gut ischemia/reperfusion. *JPEN J Parenter Enterol Nutr* **26**, 169–173.
- Ikezawa Y, Yamatani K, Ohnuma H, Daimon M, Manaka H & Sasaki H (2003). Glucagon-like peptide-1 inhibits glucagon-induced glycogenolysis in perivenous hepatocytes specifically. *Regul Pept* **111**, 207–210.
- Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y & Fujimoto Y (1998). Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem (Tokyo)* **124**, 428–433.

~ J ~

- Jackson Huang TH & Brubaker PL (1995). Synthesis and secretion of glucagon-like peptide-1 by fetal rat intestinal cells in culture. *Endocrine* **3**, 499–503.
- Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim B-J, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF & Egan JM (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15069–15074.
- Janssen AWF & Kersten S (2016). Potential mediators linking gut bacteria to metabolic health: a critical view. *J Physiol* n/a – n/a.
- Janssens S, Burns K, Tschopp J & Beyaert R (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol CB* **12**, 467–471.
- Jiang H, Yazdanyar A, Lou B, Chen Y, Zhao X, Li R, Hoang Bui H, Kuo M-S, Navab M, Qin S, Li Z, Jin W & Jiang X-C (2015). Adipocyte phospholipid transfer protein and lipoprotein metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 316–322.
- Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, Subramani DB, Holmén-Larsson JM, Thomsson KA, Bergström JH, van der Post S, Rodriguez-Piñeiro AM, Sjövall H, Bäckström M & Hansson GC (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci CMLS* **68**, 3635–3641.

~ K ~

- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S & Medzhitov R (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* **9**, 361–368.
- Kahles F, Meyer C, Möllmann J, Diebold S, Findeisen HM, Leberher C, Trautwein C, Koch A, Tacke F, Marx N & Lehrke M (2014). GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering. *Diabetes* **63**, 3221–3229.
- Kailasan Vanaja S, Rathinam VAK, Atianand MK, Kalantari P, Skehan B, Fitzgerald KA & Leong JM (2014). Bacterial RNA:DNA hybrids are activators of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7765–7770.
- Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ & Hayes MR (2011). Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology* **152**, 3103–3112.
- Kappe C, Zhang Q, Holst JJ, Nyström T & Sjöholm A (2013). Evidence for paracrine/autocrine regulation of GLP-1-producing cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **305**, C1041–C1049.

- Kaser S, Sandhofer A, Föger B, Ebenbichler CF, Igelseder B, Malaimare L, Paulweber B & Patsch JR (2001). Influence of obesity and insulin sensitivity on phospholipid transfer protein activity. *Diabetologia* **44**, 1111–1117.
- Kastin AJ, Akerstrom V & Pan W (2002). Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci MN* **18**, 7–14.
- Kato M, Tani T, Terahara N & Tsuda T (2015). The Anthocyanin Delphinidin 3-Rutinoside Stimulates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Murine GLUTag Cell Line via the Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II Pathway. *PLoS One* **10**, e0126157.
- Katsuma S, Hirasawa A & Tsujimoto G (2005). Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 386–390.
- Kawakami M, Murase T, Ogawa H, Ishibashi S, Mori N, Takaku F & Shibata S (1987). Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J Biochem (Tokyo)* **101**, 331–338.
- Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, Forsberg LS, Carlson RW & Dixit VM (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* **341**, 1246–1249.
- Keddes MH, Guz Y, Grigoryan M & Teitelman G (2013). Functional activity of murine intestinal mucosal cells is regulated by the glucagon-like peptide-1 receptor. *Peptides* **48**, 36–44.
- Kelly CT, Mansoor J, Dohm GL, Chapman WHH, Pender JR & Pories WJ (2014). Hyperinsulinemic syndrome: the metabolic syndrome is broader than you think. *Surgery* **156**, 405–411.
- Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AGP, Pettersson S & Conway S (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nat Immunol* **5**, 104–112.
- Kelly M, Gauthier M-S, Saha AK & Ruderman NB (2009). Activation of AMP-activated protein kinase by interleukin-6 in rat skeletal muscle: association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes* **58**, 1953–1960.
- Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE & Kuehn MJ (2004). Enterotoxigenic Escherichia coli vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J* **23**, 4538–4549.
- Khadaroo RG, Fortis S, Salim SY, Streutker C, Churchill TA & Zhang H (2014). I-FABP as biomarker for the early diagnosis of acute mesenteric ischemia and resultant lung injury. *PLoS One* **9**, e115242.
- Khanna S, Roy S, Packer L & Sen CK (1999). Cytokine-induced glucose uptake in skeletal muscle: redox regulation and the role of alpha-lipoic acid. *Am J Physiol* **276**, R1327–R1333.
- Kilimnik G, Kim A, Steiner DF, Friedman TC & Hara M (2010). Intra-islet production of GLP-1 by activation of prohormone convertase 1/3 in pancreatic α -cells in mouse models of β -cell regeneration. *Islets* **2**, 149–155.
- Kim Chung LT, Hosaka T, Yoshida M, Harada N, Sakaue H, Sakai T & Nakaya Y (2009). Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 613–618.
- Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW & Schwartz MW (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* **100**, 1589–1596.
- Kim JI, Huh JY, Sohn JH, Choe SS, Lee YS, Lim CY, Jo A, Park SB, Han W & Kim JB (2015). Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. *Mol Cell Biol* **35**, 1686–1699.
- Kim KD, Lim HY, Lee HG, Yoon D-Y, Choe Y-K, Choi I, Paik S-G, Kim Y-S, Yang Y & Lim J-S (2005). Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1126–1136.

- Kim SM, Lun M, Wang M, Senyo SE, Guillermier C, Patwari P & Steinhauser ML (2014). Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance. *Cell Metab* **20**, 1049–1058.
- Kirschning CJ, Unbehauen A, Fiedler G, Hallatschek W, Lamping N, Pfeil D & Schumann RR (1997). The transcriptional activation pattern of lipopolysaccharide binding protein (LBP) involving transcription factors AP-1 and C/EBP beta. *Immunobiology* **198**, 124–135.
- Kitajima S, Takuma S & Morimoto M (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim Jpn Assoc Lab Anim Sci* **48**, 137–143.
- Kjems LL, Holst JJ, Vølund A & Madsbad S (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* **52**, 380–386.
- Knauf C, Cani PD, Kim D-H, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ & Burcelin R (2008). Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* **57**, 2603–2612.
- Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Grémeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C & Burcelin R (2005). Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* **115**, 3554–3563.
- Knop FK, Aaboe K, Vilsbøll T, Vølund A, Holst JJ, Krarup T & Madsbad S (2012). Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab* **14**, 500–510.
- Knudsen LB & Pridal L (1996). Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *Eur J Pharmacol* **318**, 429–435.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Medzhitov R & Flavell RA (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191–202.
- Kokrashvili Z, Mosinger B & Margolskee RF (2009). T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann N Y Acad Sci* **1170**, 91–94.
- Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys C-LM, Ong H, Vance DE & Dyck JRB (2007). Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes* **56**, 2863–2871.
- Kopp F, Kupsch S & Schromm AB (2016). Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: Implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 660–672.
- Kosacka J, Kern M, Klötting N, Paeschke S, Rudich A, Haim Y, Gericke M, Serke H, Stumvoll M, Bechmann I, Nowicki M & Blüher M (2015). Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* **409**, 21–32.
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA & Bloom SR (1987). Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet Lond Engl* **2**, 1300–1304.
- Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L & Smith U (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* **72**, 1150–1162.
- Kuhre RE, Albrechtsen NW, Windeløv JA, Svendsen B, Hartmann B & Holst JJ (2014). GLP-1 amidation efficiency along the length of the intestine in mice, rats and pigs and in GLP-1 secreting cell lines. *Peptides* **55**, 52–57.



- Labbé K, Miu J, Yeretssian G, Serghides L, Tam M, Finney CA, Erdman LK, Goulet M-L, Kain KC, Stevenson MM & Saleh M (2010). Caspase-12 dampens the immune response to malaria independently of the inflammasome by targeting NF-kappaB signaling. *J Immunol Baltim Md 1950* **185**, 5495–5502.

- Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R & Ferrara P (1993). Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol* **23**, 2144–2151.
- Lagrost L (1994). Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* **1215**, 209–236.
- Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V & Gambert P (1998). Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* **9**, 203–209.
- Lagrost L, Girard C, Grosjean S, Masson D, Deckert V, Gautier T, Debomy F, Vinault S, Jeannin A, Labbé J & Bonithon-Kopp C (2014). Low preoperative cholesterol level is a risk factor of sepsis and poor clinical outcome in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* **42**, 1065–1073.
- Lambeir A-M, Durinx C, Scharpé S & De Meester I (2003). Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* **40**, 209–294.
- Lamont BJ, Li Y, Kwan E, Brown TJ, Gaisano H & Drucker DJ (2012). Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. *J Clin Invest* **122**, 388–402.
- Lang CH & Spitzer JA (1987). Glucose kinetics and development of endotoxin tolerance during long-term continuous endotoxin infusion. *Metabolism* **36**, 469–474.
- Langhans W (2007). Signals generating anorexia during acute illness. *Proc Nutr Soc* **66**, 321–330.
- Lansac G, Dong W, Dubois CM, Benlarbi N, Afonso C, Fournier I, Salzet M & Day R (2006). Lipopolysaccharide mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide precursor processing in the rat spleen. *J Neuroimmunol* **171**, 57–71.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ & Orskov C (1997). Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* **77**, 257–270.
- Larsson H, Holst JJ & Ahrén B (1997). Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic glucose production indirectly through insulin and glucagon in humans. *Acta Physiol Scand* **160**, 413–422.
- Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K & International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group (2016). Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* **375**, 794–798.
- Leblond CP & Messier B (1958). Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine-H3 into mice. *Anat Rec* **132**, 247–259.
- Le Chatelier E et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546.
- Lee JH, Patel K, Tae HJ, Lustig A, Kim JW, Mattson MP & Taub DD (2014). Ghrelin augments murine T-cell proliferation by activation of the phosphatidylinositol-3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling pathways. *FEBS Lett* **588**, 4708–4719.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH & Hwang D (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 16683–16689.
- Lee YC, Asa SL & Drucker DJ (1992). Glucagon gene 5'-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice. *J Biol Chem* **267**, 10705–10708.
- Lee Y-S & Jun H-S (2016). Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control. *Mediators Inflamm* **2016**, 3094642.
- Lee Y-S, Park M-S, Choung J-S, Kim S-S, Oh H-H, Choi C-S, Ha S-Y, Kang Y, Kim Y & Jun H-S (2012). Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia* **55**, 2456–2468.
- León-Ponte M, Ahern GP & O'Connell PJ (2007). Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* **109**, 3139–3146.

- Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, Martin P, Philippe C, Walker F, Bado A, Perlemuter G, Cassard-Doulier A-M & Gérard P (2013). Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **62**, 1787–1794.
- Levels JH, Abraham PR, van den Ende A & van Deventer SJ (2001). Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun* **69**, 2821–2828.
- Lim GE & Brubaker PL (2006). Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. *Diabetes* **55**, S70–S77.
- Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ & Brubaker PL (2009). Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology* **150**, 580–591.
- Lingwood D & Simons K (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50.
- Lin S-C, Lo Y-C & Wu H (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* **465**, 885–890.
- Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L & Salfeld J (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**, 401–411.
- Li P-C, Liu L-F, Jou M-J & Wang H-K (2016). The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice. *BMC Neurosci* **17**, 37.
- Li SK, Zhu D, Gaisano HY & Brubaker PL (2014). Role of vesicle-associated membrane protein 2 in exocytosis of glucagon-like peptide-1 from the murine intestinal L cell. *Diabetologia* **57**, 809–818.
- Liu T-T, Kao C-C, Chung C-F & Hsieh P-S (2010). Chronic hepatic inflammation induced by mild portal endotoxemia is not associated with systemic insulin resistance in rats. *ResearchGate* **30**, 015–020.
- Liu Z, Stanojevic V, Brindamour LJ & Habener JF (2012). GLP1-derived nonapeptide GLP1(28-36)amide protects pancreatic β -cells from glucolipototoxicity. *J Endocrinol* **213**, 143–154.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA & Drucker DJ (2003). Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 471–478.
- López-Collazo E & del Fresno C (2013). Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care Lond Engl* **17**, 242.
- Luche E, Cousin B, Garidou L, Serino M, Waget A, Barreau C, André M, Valet P, Courtney M, Casteilla L & Burcelin R (2013). Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. *Mol Metab* **2**, 281–291.
- Lu M & Munford RS (2011). The transport and inactivation kinetics of bacterial lipopolysaccharide influence its immunological potency in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* **187**, 3314–3320.
- Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I & Villanueva-Peñacarrillo ML (2002). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol* **173**, 465–473.

~ **M** ~

- MacDonald MJ, Ade L, Ntambi JM, Ansari I-UH & Stoker SW (2015). Characterization of Phospholipids in Insulin Secretory Granules and Mitochondria in Pancreatic Beta Cells and Their Changes with Glucose Stimulation. *J Biol Chem* **290**, 11075–11092.
- Mace OJ, Schindler M & Patel S (2012). The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *J Physiol* **590**, 2917–2936.
- Maitra SK, Rachmilewitz D, Eberle D & Kaplowitz N (1981). The hepatocellular uptake and biliary excretion of endotoxin in the rat. *Hepatol Baltim Md* **1**, 401–407.
- Maitra U, Deng H, Glaros T, Baker B, Capelluto DGS, Li Z & Li L (2012). Molecular mechanisms responsible for the selective and low-grade induction of proinflammatory mediators in murine macrophages by lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md 1950* **189**, 1014–1023.

- Maitra U, Gan L, Chang S & Li L (2011). Low-dose endotoxin induces inflammation by selectively removing nuclear receptors and activating CCAAT/enhancer-binding protein δ . *J Immunol Baltim Md 1950* **186**, 4467–4473.
- Mangel AW, Prpic V, Snow ND, Basavappa S, Hurst LJ, Sharara AI & Liddle RA (1994). Regulation of cholecystokinin secretion by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* **267**, G595–G600.
- Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB, Purrello F & Dotta F (2012). A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia* **55**, 3262–3272.
- Marques C, Mega C, Gonçalves A, Rodrigues-Santos P, Teixeira-Lemos E, Teixeira F, Fontes-Ribeiro C, Reis F & Fernandes R (2014). Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm* **2014**, 538737.
- Martinez-Santibañez G, Cho KW & Lumeng CN (2014). Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. *Methods Enzymol* **537**, 17–30.
- Martinon F & Tschopp J (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* **14**, 10–22.
- Mathison JC & Ulevitch RJ (1979). The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol Baltim Md 1950* **123**, 2133–2143.
- Mcintyre N, Holdsworth CD & Turner DS (1964). NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE. *Lancet Lond Engl* **2**, 20–21.
- Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, Golenbock DT & Vogel SN (2002). Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol Baltim Md 1950* **169**, 5209–5216.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397.
- Mehta NN, McGillicuddy FC, Anderson PD, Hinkle CC, Shah R, Pruscino L, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR & Reilly MP (2010). Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. *Diabetes* **59**, 172–181.
- Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, Schmidt WE & Gallwitz B (2004). Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes* **53**, 654–662.
- Merenthaler I, Lane M & Shughrue P (1999). Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **403**, 261–280.
- Miller SI, Wallace RJ, Musher DM, Septimus EJ, Kohl S & Baughn RE (1980). Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. *Am J Med* **68**, 649–654.
- Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M & Tanikawa K (1995). Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* **109**, 1969–1976.
- Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F & Ikehara Y (1992). Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta* **1131**, 333–336.
- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L & Habener JF (1986). Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* **261**, 11880–11889.
- Monami M, Dicembrini I, Marchionni N, Rotella CM & Mannucci E (2012). Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight: a meta-analysis. *Exp Diabetes Res* **2012**, 672658.
- Moore B (1906). On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J* **1**, 28–38.
- Morales PE, Torres G, Sotomayor-Flores C, Peña-Oyarzún D, Rivera-Mejías P, Paredes F & Chiong M (2014). GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 410–416.

- Morigny P, Houssier M, Mouisel E & Langin D (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* **125**, 259–266.
- Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ & Orskov C (2003). GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* **114**, 189–196.
- Moss CE, Glass LL, Diakogiannaki E, Pais R, Lenaghan C, Smith DM, Wedin M, Bohlooly-Y M, Gribble FM & Reimann F (2016). Lipid derivatives activate GPR119 and trigger GLP-1 secretion in primary murine L-cells. *Peptides* **77**, 16–20.
- Motshwene PG, Moncrieffe MC, Grossmann JG, Kao C, Ayaluru M, Sandercock AM, Robinson CV, Latz E & Gay NJ (2009). An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J Biol Chem* **284**, 25404–25411.
- Mowat AM (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **3**, 331–341.
- Munford RS & Hall CL (1985). Uptake and deacylation of bacterial lipopolysaccharides by macrophages from normal and endotoxin-hyporesponsive mice. *Infect Immun* **48**, 464–473.
- Murdoch SJ, Carr MC, Hokanson JE, Brunzell JD & Albers JJ (2000). PLTP activity in premenopausal women. Relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. *J Lipid Res* **41**, 237–244.
- Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, Holst JJ & Ferrannini E (2008). Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* **57**, 1340–1348.



- Nagatake T, Fujita H, Minato N & Hamazaki Y (2014). Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS One* **9**, e90638.
- Nahid MA, Pauley KM, Satoh M & Chan EKL (2009). miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* **284**, 34590–34599.
- Nauck MA (1999). Is glucagon-like peptide 1 an incretin hormone? *Diabetologia* **42**, 373–379.
- Nauck MA, Stöckmann F, Ebert R & Creutzfeldt W (1986). Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **29**, 46–52.
- Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R & Schmiegel WH (1997). Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* **273**, E981–E988.
- Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ & Meier JJ (2011). Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia* **54**, 10–18.
- Netea MG, Demacker PN, Kullberg BJ, Boerman OC, Verschueren I, Stalenhoef AF & van der Meer JW (1996). Low-density lipoprotein receptor-deficient mice are protected against lethal endotoxemia and severe gram-negative infections. *J Clin Invest* **97**, 1366–1372.
- Nguyen AT, Mandard S, Dray C, Deckert V, Valet P, Besnard P, Drucker DJ, Lagrost L & Grober J (2014). Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes* **63**, 471–482.
- Nøhr MK, Pedersen MH, Gille A, Egerod KL, Engelstoft MS, Husted AS, Sichlau RM, Grunddal KV, Poulsen SS, Han S, Jones RM, Offermanns S & Schwartz TW (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology* **154**, 3552–3564.
- Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K & Akira S (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol Baltim Md 1950* **164**, 3476–3479.



- O'Connell PJ, Wang X, Leon-Ponte M, Griffiths C, Pingle SC & Ahern GP (2006). A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood* **107**, 1010–1017.
- O'Hara AM & Shanahan F (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**, 688–693.
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM & Olefsky JM (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–698.
- Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH & Morimoto C (2008). Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci J Virtual Libr* **13**, 2299–2310.
- Ohto U, Fukase K, Miyake K & Shimizu T (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 7421–7426.
- O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Olivas AS, Mitra P, Larison WG, Cheang EC, Varlamov O, Corless CL, Roberts CT & Marks DL (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* **54**, 1480–1490.
- Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H & Holst JJ (1994). Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* **43**, 535–539.
- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S & Pedersen BK (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* **508** (Pt 3), 949–953.
- Otte J-M, Cario E & Podolsky DK (2004). Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **126**, 1054–1070.
- Ouchi N & Walsh K (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **380**, 24–30.
- Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F & Tsuboi T (2013). The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *J Biol Chem* **288**, 4513–4521.



- Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E, Lalande C, Le Guern N, Deckert V, Monchi M, Quenot J-P & Lagrost L (2015). Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res* **56**, 1363–1369.
- Palazzo M, Balsari A, Rossini A, Selleri S, Calcaterra C, Gariboldi S, Zanobbio L, Arnaboldi F, Shirai YF, Serrao G & Rumio C (2007). Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion. *J Immunol Baltim Md 1950* **178**, 4296–4303.
- Pardina E, Baena-Fustegueras JA, Catalán R, Galard R, Lecube A, Fort JM, Allende H, Vargas V & Peinado-Onsurbe J (2009). Increased expression and activity of hepatic lipase in the liver of morbidly obese adult patients in relation to lipid content. *Obes Surg* **19**, 894–904.
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H & Lee J-O (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195.
- Parthasarathy V & Hölscher C (2013). The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* **700**, 42–50.
- Pendyala S, Walker JM & Holt PR (2012). A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* **142**, 1100–1101.e2.
- Perley MJ & Kipnis DM (1967). Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* **46**, 1954–1962.

- Persson K, Gingerich RL, Nayak S, Wada K, Wada E & Ahrén B (2000). Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E956–E962.
- Petit V, Arnould L, Martin P, Monnot M-C, Pineau T, Besnard P & Niot I (2007). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J Lipid Res* **48**, 278–287.
- Pierre N, Deldicque L, Barbé C, Naslain D, Cani PD & Francaux M (2013). Toll-Like Receptor 4 Knockout Mice Are Protected against Endoplasmic Reticulum Stress Induced by a High-Fat Diet. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0065061.
- Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, Lau DCW, le Roux CW, Violante Ortiz R, Jensen CB, Wilding JPH & SCALE Obesity and Prediabetes NN8022-1839 Study Group (2015). A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med* **373**, 11–22.
- Plamboeck A, Holst JJ, Carr RD & Deacon CF (2005). Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig. *Diabetologia* **48**, 1882–1890.
- Plóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K & Kwiatkowska K (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci CMLS* **72**, 557–581.
- Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Kamps JA, Hardonk MJ & Meijer DK (1997). Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am J Pathol* **151**, 1163–1169.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH, American Heart Association & Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* **113**, 898–918.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B & Beutler B (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085–2088.
- Poreba MA, Dong CX, Li SK, Stahl A, Miner JH & Brubaker PL (2012). Role of fatty acid transport protein 4 in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from murine intestinal L cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E899–E907.
- Pories WJ & Dohm GL (2012). Diabetes: have we got it all wrong? Hyperinsulinism as the culprit: surgery provides the evidence. *Diabetes Care* **35**, 2438–2442.
- Pouliot MC, Després JP, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, Tremblay A & Bouchard C (1992). Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* **41**, 826–834.
- Puhl RM & Liu S (2015). A national survey of public views about the classification of obesity as a disease. *Obes Silver Spring Md* **23**, 1288–1295.
- Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI & Stappenbeck TS (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 99–104.
- Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J & Salomaa V (2011). Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care* **34**, 392–397.
- Pussinen PJ, Olkkonen VM, Jauhiainen M & Ehnholm C (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the pig plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* **38**, 1473–1481.



- Qin J et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65.

Quinn EM, Wang J & Redmond HP (2012). The emerging role of microRNA in regulation of endotoxin tolerance. *J Leukoc Biol* **91**, 721–727.



Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, Raymond F, Mansourian R & Chou CJ (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **24**, 4948–4959.

Raetz CRH & Whitfield C (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**, 635–700.

Ramasamy I (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med* **52**, 1695–1727.

Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G & Pownall HJ (1997). Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry (Mosc)* **36**, 3645–3653.

Rathinam VAK, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, Leong JM & Fitzgerald KA (2012). TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* **150**, 606–619.

Rauchhaus M, Coats AJ & Anker SD (2000). The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *The Lancet* **356**, 930–933.

Reardon C, Duncan GS, Brüstle A, Brenner D, Tusche MW, Olofsson PS, Olofsson P, Rosas-Ballina M, Tracey KJ & Mak TW (2013). Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1410–1415.

Reed MA, Pories WJ, Chapman W, Pender J, Bowden R, Barakat H, Gavin TP, Green T, Tapscott E, Zheng D, Shankley N, Yieh L, Polidori D, Piccoli SP, Brenner-Gati L & Dohm GL (2011). Roux-en-Y gastric bypass corrects hyperinsulinemia implications for the remission of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 2525–2531.

Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ & Gribble FM (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* **8**, 532–539.

Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA & Gribble FM (2004). Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia* **47**, 1592–1601.

Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Métral V, Rüegg UT & Macé K (2001). A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* **142**, 4522–4528.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP & Ricciardi-Castagnoli P (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361–367.

Resman N, Vasl J, Oblak A, Pristovsek P, Gioannini TL, Weiss JP & Jerala R (2009). Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and toll-like receptor 4 in activation by endotoxin. *J Biol Chem* **284**, 15052–15060.

Richards P, Parker HE, Adriaenssens AE, Hodgson JM, Cork SC, Trapp S, Gribble FM & Reimann F (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes* **63**, 1224–1233.

Rinaman L & Comer J (2000). Antagonism of central glucagon-like peptide-1 receptors enhances lipopolysaccharide-induced fever. *Auton Neurosci Basic Clin* **85**, 98–101.

Rindi G, Grant SG, Yiangou Y, Ghatei MA, Bloom SR, Batach VL, Solcia E & Polak JM (1990). Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol* **136**, 1349–1363.

Robciuc MR, Skrobuk P, Anisimov A, Olkkonen VM, Alitalo K, Eckel RH, Koistinen HA, Jauhiainen M & Ehnholm C (2012). Angiopoietin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes. *PLoS One* **7**, e46212.

- Robertson RP & Chen M (1977). A role for prostaglandin E in defective insulin secretion and carbohydrate intolerance in diabetes mellitus. *J Clin Invest* **60**, 747–753.
- Rocca AS & Brubaker PL (1999). Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* **140**, 1687–1694.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW & Shulman GI (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* **97**, 2859–2865.
- Rodriguez-Juan C, Pérez-Blas M, Valeri AP, Aguilera N, Arnaiz-Villena A, Pacheco-Castro A & Martin-Villa JM (2001). Cell surface phenotype and cytokine secretion in Caco-2 cell cultures: increased RANTES production and IL-2 transcription upon stimulation with IL-1beta. *Tissue Cell* **33**, 570–579.
- Rogers GJ, Tolhurst G, Ramzan A, Habib AM, Parker HE, Gribble FM & Reimann F (2011). Electrical activity-triggered glucagon-like peptide-1 secretion from primary murine L-cells. *J Physiol* **589**, 1081–1093.
- Romano-Keeler J & Weitkamp J-H (2015). Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. *Pediatr Res* **77**, 189–195.
- Rouillé Y, Kantengwa S, Irminger JC & Halban PA (1997). Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J Biol Chem* **272**, 32810–32816.
- Rudbach JA, Anacker RL, Haskins WT, Johnson AG, Milner KC & Ribic E (1966). Physical aspects of reversible inactivation of endotoxin. *Ann N Y Acad Sci* **133**, 629–643.
- Rudbach JA & Johnson AG (1966). Alteration and restoration of endotoxin activity after complexing with plasma proteins. *J Bacteriol* **92**, 892–898.
- Ruiz-Grande C, Pintado J, Alarcón C, Castilla C, Valverde I & López-Novoa JM (1990). Renal catabolism of human glucagon-like peptides 1 and 2. *Can J Physiol Pharmacol* **68**, 1568–1573.



- Sadur CN & Eckel RH (1982). Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* **69**, 1119–1125.
- Sakurai K, Lee EY, Morita A, Kimura S, Kawamura H, Kasamatsu A, Shiiba M, Yabe D, Yokote K & Miki T (2012). Glucagon-like peptide-1 secretion by direct stimulation of L cells with luminal sugar vs non-nutritive sweetener. *J Diabetes Investig* **3**, 156–163.
- Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK, Bensinger SJ, Fitzgerald P, Droin N, Ulevitch RJ, Green DR & Nicholson DW (2006). Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* **440**, 1064–1068.
- Samuel VT & Shulman GI (2012). Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell* **148**, 852–871.
- Sanders FWB & Griffin JL (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc* **91**, 452–468.
- Sandoval DA & D'Alessio DA (2015). Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* **95**, 513–548.
- Sasselli V, Pachnis V & Burns AJ (2012). The enteric nervous system. *Dev Biol* **366**, 64–73.
- Saunders RA, Fujii K, Alabanza L, Ravatn R, Kita T, Kudoh K, Oka M & Chin K-V (2010). Altered Phospholipid Transfer Protein Gene Expression and Serum Lipid Profile by Topotecan. *Biochem Pharmacol* **80**, 362–369.
- Scheele C, Nielsen S, Kelly M, Broholm C, Nielsen AR, Taudorf S, Pedersen M, Fischer CP & Pedersen BK (2012). Satellite cells derived from obese humans with type 2 diabetes and differentiated into myocytes in vitro exhibit abnormal response to IL-6. *PLoS One* **7**, e39657.
- Schirra J, Houck P, Wank U, Arnold R, Göke B & Katschinski M (2000). Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut* **46**, 622–631.

- Schirra J, Wank U, Arnold R, Göke B & Katschinski M (2002). Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on motility and sensation of the proximal stomach in humans. *Gut* **50**, 341–348.
- Schmidt WE, Siegel EG & Creutzfeldt W (1985). Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* **28**, 704–707.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M & Leiter AB (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* **145**, 2639–2644.
- Schoots IG, Koffeman GI, Legemate DA, Levi M & van Gulik TM (2004). Systematic review of survival after acute mesenteric ischaemia according to disease aetiology. *Br J Surg* **91**, 17–27.
- Schumann R, Leong S, Flaggs G, Gray P, Wright S, Mathison J, Tobias P & Ulevitch R (1990). Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding-Protein. *Science* **249**, 1429–1431.
- Schumann RR, Kirschning CJ, Unbehauen A, Aberle HP, Knope HP, Lamping N, Ulevitch RJ & Herrmann F (1996). The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 3490–3503.
- Seino S & Shibasaki T (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* **85**, 1303–1342.
- Sender R, Fuchs S & Milo R (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **164**, 337–340.
- Sewnath ME, Levels HH, Oude Elferink R, van Noorden CJ, ten Kate FJ, van Deventer SJ & Gouma DJ (2000). Endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats after administration of reconstituted high-density lipoprotein. *Hepatology* **32**, 1289–1299.
- Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, Ojogun N, Rockey DC, Dematteo RP & Munford RS (2007). A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem* **282**, 13726–13735.
- Shibolet O & Podolsky DK (2007). TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1469–G1473.
- Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L & Shao F (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187–192.
- Shiraishi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Mizuta H & Takeya M (2012). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **425**, 304–308.
- Sisley S, Gutierrez-Aguilar R, Scott M, D'Alessio DA, Sandoval DA & Seeley RJ (2014). Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *J Clin Invest* **124**, 2456–2463.
- Sjölund K, Sandén G, Håkanson R & Sundler F (1983). Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* **85**, 1120–1130.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C & Hauner H (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1023–1033.
- Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH & Krystal G (2004). LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* **21**, 227–239.
- Smith BJ, Lightfoot SA, Lerner MR, Denson KD, Morgan DL, Hanas JS, Bronze MS, Postier RG & Brackett DJ (2009). Induction of cardiovascular pathology in a novel model of low-grade chronic inflammation. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol* **18**, 1–10.
- Sprong T, Netea MG, van der Ley P, Verver-Jansen TJG, Jacobs LEH, Stalenhoef A, van der Meer JWM & van Deuren M (2004). Human lipoproteins have divergent neutralizing effects on E. coli LPS, N. meningitidis LPS, and complete Gram-negative bacteria. *J Lipid Res* **45**, 742–749.
- Strachan DP (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259–1260.

- Straczkowski M, Kowalska I, Baranowski M, Nikolajuk A, Otziomek E, Zabielski P, Adamska A, Blachnio A, Gorski J & Gorska M (2007). Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia* **50**, 2366–2373.
- Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T & Olivecrona G (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17450–17455.
- Sun Q, Li J & Gao F (2014). New insights into insulin: The anti-inflammatory effect and its clinical relevance. *World J Diabetes* **5**, 89–96.
- Sykes PA, Boulter KH & Schofield PF (1976). Alterations in small-bowel microflora in acute intestinal obstruction. *J Med Microbiol* **9**, 13–22.

~ **T** ~

- Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J & Baltimore D (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12481–12486.
- Takikawa M, Kurimoto Y & Tsuda T (2013). Curcumin stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in GLUTag cells via Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation. *Biochem Biophys Res Commun* **435**, 165–170.
- Tanamoto K, Zähringer U, McKenzie GR, Galanos C, Rietschel ET, Lüderitz O, Kusumoto S & Shiba T (1984). Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus* amoebocyte lysate. *Infect Immun* **44**, 421–426.
- Tatum PM, Harmon CM, Lorenz RG & Dimmitt RA (2010). Toll-like receptor 4 is protective against neonatal murine ischemia-reperfusion intestinal injury. *J Pediatr Surg* **45**, 1246–1255.
- Thaxton CS, Rink JS, Naha PC & Cormode DP (2016). Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.020.
- Thomas L & Good RA (1952). STUDIES ON THE GENERALIZED SHWARTZMAN REACTION. *J Exp Med* **96**, 605–624.
- Thorens B (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8641–8645.
- Tian L & Jin T (2016). The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion. *J Diabetes*; DOI: 10.1111/1753-0407.12439.
- Tobias PS, Mathison J, Mintz D, Lee JD, Kravchenko V, Kato K, Pugin J & Ulevitch RJ (1992). Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 239–245.
- Tobias PS, Soldau K & Ulevitch RJ (1989). Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* **264**, 10867–10871.
- Tomas E, Stanojevic V & Habener JF (2011a). GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide targets to mitochondria and suppresses glucose production and oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Regul Pept* **167**, 177–184.
- Tomas E, Wood JA, Stanojevic V & Habener JF (2011b). GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide inhibits weight gain and attenuates diabetes and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Regul Pept* **169**, 43–48.
- Trabelsi M-S et al. (2015). Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun* **6**, 7629.
- Tran PO, Gleason CE, Poitout V & Robertson RP (1999). Prostaglandin E(2) mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1beta. *J Biol Chem* **274**, 31245–31248.

- Triantafilou M, Morath S, Mackie A, Hartung T & Triantafilou K (2004). Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* **117**, 4007–4014.
- Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H & Kodama M (2001). Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J Surg Res* **100**, 127–134.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J & Bloom SR (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* **379**, 69–72.

~ U ~

- Ungaro R, Fukata M, Hsu D, Hernandez Y, Breglio K, Chen A, Xu R, Sotolongo J, Espana C, Zaias J, Elson G, Mayer L, Kosco-Vilbois M & Abreu MT (2009). A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, G1167–G1179.

~ V ~

- Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, Prigeon RL & D'Alessio DA (2003). Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 1772–1779.
- Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A & Villanueva-Peñacarrillo ML (1994). Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett* **349**, 313–316.
- Vamadevan AS, Fukata M, Arnold ET, Thomas LS, Hsu D & Abreu MT (2010). Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun* **16**, 93–103.
- Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD & Rathinam VAK (2016). Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* **165**, 1106–1119.
- Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM & Dixit VD (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* **17**, 179–188.
- van 't Veer C, van den Pangaart PS, van Zoelen MAD, de Kruif M, Birjmohun RS, Stroes ES, de Vos AF & van der Poll T (2007). Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol Baltim Md 1950* **179**, 7110–7120.
- Venancio TM, Machado RM, Castoldi A, Amano MT, Nunes VS, Quintao ECR, Camara NOS, Soriano FG & Cazita PM (2016). CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis. *Mediators Inflamm*; DOI: 10.1155/2016/1784014.
- Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ & Munford RS (2000). Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* **68**, 2410–2417.
- Vila IK, Badin P-M, Marques M-A, Monbrun L, Lefort C, Mir L, Louche K, Bourlier V, Roussel B, Gui P, Grober J, Štich V, Rossmeslová L, Zakaroff-Girard A, Bouloumié A, Viguerie N, Moro C, Tavernier G & Langin D (2014). Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Rep* **7**, 1116–1129.
- Vilsbøll T, Agersø H, Krarup T & Holst JJ (2003). Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 220–224.
- Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S & Holst JJ (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **50**, 609–613.

- Vives-Pi M, Somoza N, Fernández-Alvarez J, Vargas F, Caro P, Alba A, Gomis R, Labeta MO & Pujol-Borrell R (2003). Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* **133**, 208–218.
- Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE & Meier JJ (2008). Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* **57**, 678–687.
- Vreugdenhil AC, Dentener MA, Snoek AM, Greve JW & Buurman WA (1999). Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immunol Baltim Md 1950* **163**, 2792–2798.



- Wang C-W (2016). Lipid droplets, lipophagy, and beyond. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1861**, 793–805.
- Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E & Yuan J (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* **92**, 501–509.
- Wang Y, Parlevliet ET, Geerling JJ, Tuin SJL, Zhang H, Bieghe V, Jawad AHM, Shiri-Sverdlov R, Bot I, Jager SCA, Havekes LM, Romijn JA, Willems van Dijk K & Rensen PCN (2014). Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *Br J Pharmacol* **171**, 723–734.
- Wang X, Liu H, Chen J, Li Y & Qu S (2015). Multiple Factors Related to the Secretion of Glucagon-Like Peptide-1. *Int J Endocrinol* **2015**, 651757.
- Weiss EP, Reeds DN, Ezekiel UR, Albert SG & Villareal DT (2016). Circulating cytokines as determinants of weight loss-induced improvements in insulin sensitivity. *Endocrine*; DOI: 10.1007/s12020-016-1093-4.
- Weiss J, Muello K, Victor M & Elsbach P (1984). The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope. *J Immunol Baltim Md 1950* **132**, 3109–3115.
- Wei Y & Mojsov S (1995). Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett* **358**, 219–224.
- Wettergren A, Wøjdemann M, Meisner S, Stadil F & Holst JJ (1997). The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut* **40**, 597–601.
- Whalley NM, Pritchard LE, Smith DM & White A (2011). Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic α -cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on β -cells? *J Endocrinol* **211**, 99–106.
- Wilmen A, Göke B & Göke R (1996). The isolated N-terminal extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP)-1 receptor has intrinsic binding activity. *FEBS Lett* **398**, 43–47.
- Wölnerhanssen BK, Cajacob L, Keller N, Doody A, Rehfeld JF, Drewe J, Peterli R, Beglinger C & Meyer-Gerspach AC (2016). Gut hormone secretion, gastric emptying, and glycemic responses to erythritol and xylitol in lean and obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, E1053–E1061.
- Worthington JJ (2015). The intestinal immunoendocrine axis: novel cross-talk between enteroendocrine cells and the immune system during infection and inflammatory disease. *Biochem Soc Trans* **43**, 727–733.
- Wright S, Ramos R, Tobias P, Ulevitch R & Mathison J (1990). Cd14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (Lps) and Lps Binding-Protein. *Science* **249**, 1431–1433.
- Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR & Stahl A (2006). FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* **26**, 3455–3467.

~ X ~

- Xiong Y et al. (2013). Activation of FFA1 mediates GLP-1 secretion in mice. Evidence for allosterism at FFA1. *Mol Cell Endocrinol* **369**, 119–129.
- Xu F, Lin B, Zheng X, Chen Z, Cao H, Xu H, Liang H & Weng J (2016). GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia* **59**, 1059–1069.
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF & Bonner-Weir S (1999). Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* **48**, 2270–2276.

~ Y ~

- Yamauchi T et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* **7**, 941–946.
- Yazdanyar A & Jiang X-C (2012). Liver phospholipid transfer protein (PLTP) expression with a PLTP-null background promotes very low-density lipoprotein production in mice. *Hepatology* **56**, 576–584.
- Yki-Järvinen H (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol* **2**, 901–910.
- Yoshiya K, Lapchak PH, Thai T-H, Kannan L, Rani P, Dalle Lucca JJ & Tsokos GC (2011). Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G1020–G1030.
- Yusta B, Baggio LL, Koehler J, Holland D, Cao X, Pinnell LJ, Johnson-Henry KC, Yeung W, Surette MG, Bang KWA, Sherman PM & Drucker DJ (2015). GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R. *Diabetes* **64**, 2537–2549.

~ Z ~

- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F & Kagan JC (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868–880.
- Zeckwer IT & Goodell H (1925). BLOOD SUGAR STUDIES : II. BLOOD SUGAR CHANGES IN FATAL BACTERIAL ANAPHYLAXIS IN THE RABBIT. *J Exp Med* **42**, 57–67.
- Zhang W, Zhu W, Zhang J, Li N & Li J (2008). Protective effects of glucagon-like peptide 2 on intestinal ischemia-reperfusion rats. *Microsurgery* **28**, 285–290.
- Ziegler-Heitbrock L (2001). The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J Endotoxin Res* **7**, 219–222.

ANNEXES

Annexe 1

Publication scientifique (en préparation)

TITLE PAGE

Title:

**GLP-1 as an early biomarker of gut barrier injuries:
involvement of LPS/TLR4 pathway**

Short Title:

LPS-induced GLP-1 secretion

Authors:

Lorène Lebrun¹, Naig Le Guern¹, Jean-Paul Pais de Barros¹, Jiri Plesnik², Naim Khan², Peter Pickkers³, Stéphane Mandard¹, Valérie Deckert¹, Daniel J. Drucker⁴, Laurent Lagrost^{1,5} and Jacques Grober¹

Affiliations:

¹ INSERM UMR866 – LabEx LipSTIC, UFR Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France; ² INSERM UMR866, Agrosup Dijon, Dijon, France; ³ Department of Intensive Care Medicine, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ⁴ Department of Medicine, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mt. Sinai Hospital, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ⁵ Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital du Bocage, Dijon, France.

Correspondence:

Dr. Jacques Grober or Dr. Laurent Lagrost, INSERM UMR 866, UFR Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France. Tel. +33 3 80 39 32 64; Fax. +33 3 80 39 34 47; E-mail address: jacques.grober@u-bourgogne.fr or laurent.lagrost@u-bourgogne.fr

ABBREVIATIONS

DPP-IV	Didpeptidyl peptidase IV
DSS	Dextran sodium sulfate
EEC	Enteroendocrine cells
GI	gastrointestinal tract
GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
I/R	Ischemia/reperfusion
I-FABP	Intestinal fatty acid binding protein
IL	Interleukin
IL-6 KO	IL-6 deficient mice
LPS	Lipopolysaccharides
PC1/3	Prohormone convertase 1/3
SMA	Superior mesenteric artery
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR4/2 KO	TLR4/2 deficient mice
WT	Wild-type mice

ABSTRACT

BACKGROUND & AIMS:

The gastrointestinal tract (GI) constitutes one of the major interface with external environment and display several defense mechanisms to face this high vulnerability such as an efficient mucosal barrier. Enteroendocrine cells (EEC) are scattered among all the epithelial cells and are responsible for a wide range of gut hormones release. For instance, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is an incretin produced by enteroendocrine L-cells and next to its first described role in glucose homeostasis, GLP-1 can also act as a potent anti-inflammatory compound. Moreover, it was recently highlighted that bacterial lipopolysaccharides (LPS) are able to induce GLP-1 plasma levels. LPS are pro-inflammatory molecules localized on the surface of Gram negative bacteria and therefore present in huge amounts inside the intestinal lumen. However, in physiological conditions LPS do not pass through the intestinal barrier. The goals of this study are i) to identify the molecular mechanisms between LPS and GLP-1 and ii) to determine whether luminal LPS can induce GLP-1 production when the gut barrier is altered.

METHODS:

Molecular mechanisms are investigated through *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* experiments to study the effects of LPS on synthesis, secretion and degradation of GLP-1. The outcomes of gut barrier alteration on LPS and GLP-1 metabolisms are explored *in vivo* by two different models of intestinal mucosal degradation in mice: dextran sodium sulfate (DSS) treatment and ischemia/reperfusion (I/R) of the superior mesenteric artery (SMA).

RESULTS:

In vivo, measurements of total and active GLP-1 plasma levels show that the increase of GLP-1 upon LPS stimulation is due to enhanced secretion and synthesis rather than inhibition of its degradation. Stimulation of ileum explants or cultured EEC by LPS leads to an increased GLP-1 secretion suggesting a direct effect of LPS. This effect is mediated through toll-like receptor 4 (TLR4). Indeed, pharmacological (TLR4 antagonist) and genetical (TLR4 deficiency) experiments suppress GLP-1 secretion. Oral administration of LPS does not induce GLP-1 secretion unless gut barrier is altered by DSS treatment. Mesenteric I/R is associated with rapid and strong alterations of the gut epithelium as well as prompt GLP-1 secretion even before the

increase of endotoxemia. Luminal LPS are involved in this phenomenon. GLP-1 secretion in response to I/R treatment occurs earlier and is more pronounced than the release of the most promising clinical biomarker or I/R: I-FABP. Finally, LPS administration in humans is also associated with a significant increase in GLP-1 secretion.

CONCLUSIONS:

This study shows for the first time that LPS induce GLP-1 secretion through a direct activation of enteroendocrine L-cells *via* a TLR4-dependent mechanism. Gut barrier alterations caused by experimental mesenteric I/R induce a very rapid GLP-1 secretion in which luminal LPS are involved. Our data suggest that GLP-1 can therefore be considered as a promising early biomarker of intestinal damage. This work also demonstrate that the LPS / GLP-1 cascade is functional in humans also. These findings confirm the physiological relevance of GLP-1 as a LPS-induced anti-inflammatory compound in humans and open real perspectives in the field of diagnosis and clinical management of pathologies involving gut injuries.

KEYWORDS: LPS, GLP-1, TLR4, secretion, biomarker, gut injuries

INTRODUCTION

The primary role of the gastrointestinal (GI) tract is to mediate vital nutrients absorption and provide energy to our whole body. Because of its large surface area, it constitutes one of the major interface with external environment. Fortunately, the GI tract have several defense mechanisms to face this high vulnerability. Beyond these absorptive and immunological functions, the GI tract is also considered as the largest endocrine organ in the body due to the presence of numerous enteroendocrine cells. Among all the released gut hormones, glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) have been extensively studied for their incretin effect (1).

GLP-1 is released by intestinal L-cells predominantly localized in the distal small intestine and colon (2). These proglucagon-expressing cells contain the tissue-specific prohormone convertase 1/3 (PC1/3) which process the proglucagon gene product into GLP-1 and other derived peptides (3). Over the past few years, GLP-1 has aroused great clinical interest for the treatment of type 2 diabetes due to its broad role in glucose homeostasis (1). GLP-1 was originally described as one of the nutrient-dependent incretin hormones which potentiates glucose-induced insulin secretion from the pancreatic β -cells (4) but its role in glucose metabolism has been extended. Indeed, GLP-1 exerts also other lowering glucose actions including stimulation of insulin biosynthesis (5,6), suppression of glucagon release (4), delay of gastric emptying (7,8) and reduction of food intake (9,10). GLP-1 secretion from intestinal L-cells is mainly stimulated in response to nutrient ingestion and appears to be under complex regulation (11,12). Carbohydrates, lipids and proteins can all individually stimulate GLP-1 release through a direct interaction with apical processes of intestinal L-cells. However, the higher density of L-cells is in the lower intestine and plasma GLP-1 levels rise rapidly after a meal (13), prior to nutrient reach the distal gut (14). This physiological disparity suggests that GLP-1 secretion (at least the early phase) is under the regulation of a proximal-distal loop. Consistent with this concept, several studies have highlighted endocrine-, paracrine- and neural-dependent indirect pathways involving different actors such as GIP, somatostatine as well as the vagus nerve and its cholinergic receptors (15). Interleukin (IL)-6, which is one of the main pro-inflammatory cytokines, is also able to induce GLP-1 secretion (16).

The GI tract is colonized by billions of bacteria that play a central role in human health. Also known as gut microbiota, this bacterial community was shown to support the gut in performing its main functions (17). Among these bacteria are present Gram(-) bacteria which present lipopolysaccharides (LPS) on their surface. LPS are pro-inflammatory molecules and have already been shown to influence gut immunity (18) and hormones release (19,20). LPS act mainly through an activation of the toll-like receptor 4 (TLR4) (21,22) but recent studies have highlighted that others mechanisms could be part of the LPS recognition pathway (23,24). We and others (25,26) have recently shown that LPS are able to increase circulating GLP-1 levels when intraperitoneally administered. However, molecular mechanisms involved in this LPS-increased GLP-1 plasma levels are not elucidated. GLP-1 is released in an active form and is rapidly degraded by dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Thus, it has a short plasma half-life (1.5-3 minutes) (27,28). Whether LPS induce GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation or both is not known yet.

LPS are present in huge amounts inside the intestinal lumen and TLR4 turns out to be expressed and functional in murine as well as human enteroendocrine cells, which are known to be responsive to LPS stimulation (19,20). Therefore, it is reasonable to consider a possible recognition of LPS by intestinal L-cells. Due to the tiny luminal vicinity between LPS and GLP-1 producing cells, such an interaction may happen in physiological states but may certainly occur in pathophysiological conditions. Indeed, during gut injury the integrity of mucosal barrier becomes compromised (29) and epithelial cells get more reachable and vulnerable to luminal compounds such as LPS.

In this study we show that LPS induce GLP-1 secretion through a direct activation of L-cells. This mechanism is TLR4-dependent. We bring evidences that LPS molecules from the gut stimulate GLP-1 secretion after a gut injury. Experimental mesenteric ischemia/reperfusion (I/R) induces a very rapid GLP-1 secretion. This significant rise in plasma GLP-1 levels occurs after a very short I/R, making GLP-1 as a potential and promising early biomarker of intestinal damage. Moreover, we found in this study that the LPS / GLP-1 cascade originally described in mice is also functional in humans. Our findings opens real perspectives in the field of diagnosis and clinical management of pathologies involving gut injuries.

MATERIALS AND METHODS

Experiments on healthy volunteers

Experimental endotoxemia was induced in healthy volunteers. Subjects are men from 18 to 35 years old without any medical history and/or special medical treatment. LPS solution (LPS purified from *E. coli*; US Reference Standard Endotoxin *E. coli* O:113, Pharmaceutical Development Section of the National Institutes of Health, Bethesda, USA) was administered intravenously to 15 subjects as a bolus of 2 ng/kg. Placebo group consists of 15 subjects who received an intravenous bolus containing no LPS.

Animals

Wild-type mice (WT, 8-12 weeks old, Charles River), IL-6 deficient mice (IL-6 KO, 8-12 weeks, Charles River) and TLR4/2 deficient mice (TLR4/2 KO, 8-12 weeks old, Charles River) from a homogeneous C57BL6/J background were housed in a controlled environment and fed a standard chow diet (A03 diet; Safe, Augy, France). Animals had free access to water and food. All experiments involving animals were performed in accordance with institutional guidelines and approved by the University of Burgundy's Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (protocol number 5459).

Cell culture

The murine enteroendocrine cell lines GLUTag (a gift from Dr. D.J. Drucker, University of Toronto, Toronto, Canada) and STC-1 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) GlutaMAX™ (21885-025, Gibco) containing 5.6 mM glucose and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (10270, Gibco) and 1% (v/v) penicillin-streptomycin (PenStrep, 15140-122, Gibco). Cells were kept in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Medium was exchanged every 3 days and cells were trypsinized and reseeded diluted when 70%-80% confluence was reached (approximately every 7 days). Both L-cells lines have proved to be a reliable models of GLP-1 secretion.

Drugs administrations

LPS were from *Escherichia coli* 055:B5 (L2880, Sigma) LPS were solubilized in NaCl 0.9% when given at 1mg/kg intraperitoneally (i.p.) and intravenously (i.v.) or in drinking water

when administered through an oral load at 5mg/animal. Atropine (4301196, Aguettant) was prepared in NaCl 0.9% and was i.p. injected at 1mg/kg 10 minutes before and 90 minutes after the injection of LPS. Glucose (2mg/kg in drinking water) (G8270, Sigma) and corn oil (500µl/mouse) (C8267, Sigma) were administered through an oral load. Polymyxin B Sulfate (P0972, Sigma) was administered at 0.2mg/mL in drinking water for 14 days. Blood collections were realized at 15 minutes, 30 minutes and 3 hours after drugs administration.

Induction of acute colitis in mice: DSS treatment

Acute colitis was induced by 2.5% (w/v) dextran sodium sulfate (DSS; molecular weight 40kDa; 42867, Sigma) added to the drinking water for 7 days. Drinking water with or without DSS was changed every day to avoid bacterial development. Mice were weighted daily to evaluate DSS effects. After DSS-treatment, mice were given LPS through an oral load. Blood collections for LPS and GLP-1 quantification were realized before, 3 hours and 6 hours after LPS administration.

Animal model of intestinal ischemia/reperfusion

Mice were separated into sham-operated groups and ischemia/reperfusion (I/R) groups (n=5/6). They were anesthetized with isoflurane inhalation and placed in a supine position on heating pads to maintain body temperature at 37°C. Midline laparotomy was performed and the superior mesenteric artery (SMA) was isolated. Ischemia was induced by clamping the SMA for 5, 10, 15 or 20 minutes and was followed by 15, 30, 45, 60, 120 or 360 minutes of reperfusion (removal of the clamp). Gut ischemia was confirmed by intestinal color change and gut reperfusion by the reappearance of pulsation and color. Blood collections (systemic and/or portal circulations) were performed to quantify GLP-1, LPS and cytokines. Mice were euthanatized by cervical dislocation and the distal part of the small intestine (ileum) was removed and immediately fixed for histological studies.

Light microscopy

The morphologic alterations in the gut were examined by light microscopy (x50, x100 and x200). Brissues from the distal small intestine (ileum) were promptly taken in sham-operated and I/R groups after 20 or 40 minutes of ischemia and 15 minutes of reperfusion. Gut samples were fixed for 48 hours in 10% neutral buffered formalin at room temperature,

dehydrated by graded ethanol and embedded in paraffin for histological analysis. Tissue sections (thickness of 5µm) were deparaffinized with xylene, stained with hematoxylin and eosin.

Blood and plasma collection

Humans: blood samples were drawn using an arterial cannula before as well as 3 and 6 hours after the bolus. Blood tubes were centrifuged within 10 minutes of collection at 2000g for 10 minutes and at 4°C. Plasma was initially stored at -20 ° C for up to 24 hours before being stored at -80°C (plasma collected on EDTA tubes and Lithium Heparin).

Mice: Blood samples were collected in EDTA-coated tubes (BD Vacutainer® K2E Tubes, 365975, Odil) from the systemic (retro-orbital or intracardiac puncture) or the portal (portal vein) circulations. When needed, plasma was separated by centrifugation at 8000 rpm for 10 minutes at 4°C. Blood and plasma samples were frozen at -20°C for further analysis.

GLP-1 secretion studies

Ex vivo from ileum explants: mice were anesthetized with isoflurane inhalation and placed in a supine position on heating pads to maintain body temperature at 37°C. Midline laparotomy was performed and the entire small intestine was removed. Mice were euthanatized by cervical dislocation. Only the distal part of the ileum was studied because of its high GLP-1 secretion capacity (8 cm for the secretory profile experiment and 3cm for the others). 1cm-ileum pieces were cut, ligatured at the bottom, fill with either NaCl 0.9%, glucose 3 g/L or LPS at different concentrations (75, 500 or 1000 ng/mL), closed on the other side and incubated in secretion medium at 37°C for 1 hour. Secretion medium is a glucose-free Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRBB; 138mM NaCl, 5.6mM KCl, 2.6mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 4.2mM NaHCO₃, 1.2mM NaH₂PO₄ and 10mM hepes) supplemented with 0.5% (w/v) bovine serum albumin (A1595, Sigma) and adjusted to pH 7.4. At the end of the incubation time, medium was collected, centrifuged at 800g for 5 minutes at 4°C to remove any floating particles and frozen at -20°C for subsequent biochemical analysis.

In vitro from L-cell lines: two days before secretion experiments, cells were plated in 24-well culture plates and allowed to reach 60-80% confluence. On the day of the experiment, cells were washed once with 500µL of secretion medium (GLUTag cells) or culture medium

(STC-1 cells). Secretion medium is the same KRBB as the one used for ileum explants. Experiments were performed by incubating the cells with test reagents in 500 μ L of secretion (GLUTag) or culture medium (STC-1) at 37°C and 5% CO₂. Glucose (G8270, Sigma) and LPS (L2880, Sigma) were prepared in NaCl 0.9%. TLR4 antagonist (TAK-242, 614316, Millipore) was prepared as 2.8mM stock in dimethyl sulfoxide (DMSO, D8418, Sigma) and the final DMSO concentration was adjusted to 0.2%. At the end of the incubation time, medium was collected, centrifuged at 800g for 5 minutes at 4°C to remove any floating cells and frozen at -20°C for subsequent biochemical analysis.

Calcium signaling in vitro

STC-1 and GLUTag cells were suspended in fresh Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM containing 10% fetal bovine serum and seeded (2x10⁵/well) onto a Willico-Dish wells. The changes in intracellular Ca²⁺ (F340/F380) were monitored using a Nikon microscope (TiU) equipped with EM-CCD (Lucas) camera for real time recording of 16-bit digital images and an S-fluor 40x oil immersion objective. The planes were taken at Z intervals of 0.3 μ m, and software (NIS-Elements) was used to analyze the images. The changes in intracellular Ca²⁺ were expressed as Δ Ratio, calculated as the difference between the peak F340/F380 ratio. The data were summarized from a large number of individual cells (20–40 cells in a single run, with 3–9 identical experiments that included at least three cell preparations). For experiments in Ca²⁺-free medium, CaCl₂ was replaced by EGTA (2mM). Experiments were performed by incubating the cells with test reagents. Glucose (G8270, Sigma), LPS (L2880, Sigma) and TLR4 antagonist (LPS-RS Ultrapure, tlr1-prslps, Invivogen) were prepared in NaCl 0.9%.

Real-Time Quantitative PCR

Tissues from the small intestine (ileum) were immediately snap frozen (immersion in liquid N₂) after harvest and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was isolated from the ileum tissues using RNeasy Mini Kit (74106, Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA extraction included a DNase treatment step to remove any contaminating genomic DNA. RNA was quantified using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), and 500ng of RNA from each sample was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Multiscribe® reverse transcriptase, 4368813,

Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCRs were performed using StepOnePlus (Real-Time PCR System, Applied Biosystems), SYBRGreen® technology (4367659, Applied Biosystems) and gene-specific primer sets (sequences are available upon request). The mRNA expression level was normalized to levels of 36B4 mRNA and the results were expressed as relative expression levels using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Biochemical Analysis

LPS concentrations were measured in plasma and blood samples drawn from systemic and/or portal circulations through the quantification of 3-hydroxymyristate (3-HM) levels according to the general procedure previously described (30). Active/total GLP-1, GIP and intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) concentrations were determined by commercially available ELISA Kits (EZGLP1T-36K, Millipore; EGLP-35K, Millipore; EZRMGIP-55K, Millipore; E-EL-M0735, Elabscience) in accordance with manufacturer's protocols. Cytokines plasma levels (interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-10) were measured by Milliplex® MAP 5-Plex Kit using mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel (MCYTOMAG-70K, Millipore) according to the manufacturer's protocol and using a LuminexR apparatus (Bio-Plex 200, Bio-Rad). In the IL-6 KO mice experiment, IL-6 plasma levels were determined by using an ELISA Kit (EZMIL6, Millipore) in accordance with the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Numeric data are presented as mean \pm standard error of mean. Statistical analysis were performed using either the unpaired Student's t-test or the nonparametric Mann-Whitney U test depending on data distribution's normality. D'Agostino's K^2 test was used to establish whether or not groups of data were normally distributed. A statistical correction was applied when variances were different between groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

LPS enhance GLP-1 plasma levels through an increase of its secretion

We reported previously that LPS molecules are able to increase active GLP-1 plasma levels (25). To clarify the underlying mechanisms, we have further investigated LPS effects on GLP-1 metabolism *in vivo*. Mice were *i.p.* injected with LPS, gene expressions and different metabolic parameters were followed over a 24 hours period (Figure 1). 3-HM plasma levels (reflecting the LPS levels) were markedly increased upon LPS *i.p.* injection which confirmed an acute raise of endotoxemia (Fig. 1A). This LPS injection was followed by a significant increase of proglucagon and PC1/3 gene expressions (Fig. 1B and 1C respectively). LPS administration induced both active GLP-1 (Fig. 1D) and total GLP-1 (Fig. 1E) plasma levels but also increased GLP-1 inactivation index (determined by the total GLP-1 over active GLP-1 ratio) (Fig. 1F). Positive correlations between these GLP-1 parameters and 3-HM plasma levels (Fig. 1G-1I) reinforced the link between endotoxemia and GLP-1 secretion.

***In vivo*, LPS-induced GLP-1 secretion is mediated through a TLR4-dependent mechanism**

To better understand how LPS molecules can modulate GLP-1 production, the already known and described pathways of secretion were studied and compared in presence and in absence of LPS (Figure 2). Since LPS conformation include both lipid and carbohydrate parts, glucose and lipid treatments through an oral load were assessed but appeared to not modify the response of mice to LPS (Fig. 2A and 2B respectively). The secretory effect of LPS arose to be distinct from glucose and lipids direct mechanisms, therefore possible indirect LPS-mediated pathways were investigated. The cytokine IL-6 is a known intermediate between LPS and GLP-1 secretion (16). However, as shown in Fig. 2C and 2D the secretory effect of LPS sustained in IL-6 deficient mice. GLP-1 secretion also occurs by neural, hormonal as well as neurohormonal pathways. GIP can induce GLP-1 secretion directly or through the vagus nerve (15). Moreover, it is well known that LPS and neural pathways are closely related (31,32). GIP secretion is not enhanced by LPS (Fig. 2E). To block neural pathways, atropine (a muscarinic receptor antagonist) was used. Pretreatment of mice with atropine substantially attenuated basal GLP-1 secretion but did not modify the secretory effect of LPS (Fig. 2F).

As the main LPS receptor described to date, TLR4 was tested for its direct role in the LPS-induced GLP-1 secretion effect. Indeed, this receptor is known to be expressed by the intestinal EEC (19,20). For this purpose TLR4/2 KO and WT mice were i.p. injected with LPS (Figure 3). Injection of LPS in TLR4-deficient mice was not associated with inflammatory cytokines release as compared to WT mice (Fig. 3A-3D). GLP-1 secretion was completely abolished in deficient mice as compared to WT mice (Fig. 3E).

A vicinity stimulation of enteroendocrine L-cells by luminal LPS

We took advantage of ex vivo and in vitro experiments to assess the hypothesis of a direct loco-regional LPS stimulation of L-cells inside the intestinal lumen (Figure 4). Ileum were used ex vivo because of its great amount of enteroendocrine L-cells (2). We performed a secretory profile experiment and observed that GLP-1 release was higher from distal ileum explants (Fig. 4A). Regarding these results, the three last centimeters of the ileum were used for the following experiments. We first tested and validated that our ileal explants model was relevant to study GLP-1 secretion. As shown in Fig. 4B, when glucose was introduced inside the lumen, GLP-1 secretion was induced. Increasing doses of LPS also trigger growing GLP-1 secretions. To further investigate a potential direct secretory effect of LPS on intestinal L-cells, two enteroendocrine cell lines were challenged with LPS molecules. Firstly, GLUTag cells displayed slight but significant GLP-1 secretions after dose-dependent LPS stimulations (Fig. 4C). Time course experiments showed that GLP-1 secretion is rapid and occurred in the first ten minutes (Fig. 4D). We confirmed these results with STC-1 cells which appeared to be a more sensitive cell line to LPS (Fig. 4E). Cytotoxicity tests revealed that LPS concentrations used did not induce cytotoxic effects and could therefore be at the origin of GLP-1 release (data not shown).

In vitro, LPS-induced GLP-1 secretion needs calcium influx and is also TLR4-dependent

To better understand how LPS can induce GLP-1 secretion, calcium fluxes in L-cell models were measured after LPS stimulation (Figure 5). In both cell lines, LPS stimulation led to a significant increase of calcium signaling in isolated cells, with here again, a higher sensitivity of STC-1 cells (Fig. 5A). Origin of calcium was explored with experiments

performed in 0% calcium buffer compared to those in 100% calcium buffer and showed that extracellular calcium was required (Fig. 5B). Moreover, as in above-mentioned *in vivo* results (Figure 3), *in vitro* GLP-1 secretion depends directly on the TLR4 receptor pathway (Figure 6). Indeed, GLP-1 secretion was totally abolished when cells challenged with LPS (GLUTag and STC-1) were co-treated with a TLR4 antagonist (Fig 6A and 6B). Moreover, LPS-induced calcium fluxes in both cell lines were also blocked when TLR4 receptor was antagonized. (Fig. 6C). Hence, in presence of TLR4 antagonist, LPS molecules failed to induce intracellular calcium fluxes and subsequent GLP-1 secretion *in vitro*.

Luminal LPS enhance GLP-1 secretion after gut barrier injury

LPS-induced secretory effect was different regarding the way of administration (Figure 7). Indeed, LPS administered intravenously or intraperitoneally induce GLP-1 secretion (Fig 7A and 7B respectively) whereas no effect was observed when LPS was given through a gavage (Fig 4C). Since luminal LPS do not significantly enter the bloodstream in physiological conditions (i.e functional gut barrier), we assessed whether LPS could pass through an altered gut barrier and therefore have a different effect on GLP-1 secretion. We first tested the DSS-induced colitis model as it is known to be deleterious for intestinal membrane permeability (Figure 8). In order to study the consequences of this degradation on LPS-induced GLP-1 secretion, a LPS oral load was given to DSS-treated mice compared to control mice. LPS (measured as 3-HM) and GLP-1 plasma levels were quantified over a 6 hours period following a LPS gavage. To overcome liver's detoxification effects, LPS were measured in the portal circulation and were increased in DSS-treated mice but not in control mice (Fig 8A). GLP-1 plasma levels mimicked the results of LPS quantification. Oral administration of LPS induced GLP-1 secretion only in DSS-treated mice (Fig. 8B). LPS and GLP-1 plasma levels were positively correlated (Fig. 8C). To further confirm that alteration of the gut barrier could induce GLP-1 secretion through luminal LPS, we switched to a second model of intestinal permeability alteration: the mesenteric ischemia-reperfusion (I/R). Gut ultrastructure was deeply disorganized after I/R (Figure 9). Short times of I/R were sufficient to damage intestinal villi compared to sham-operated mice (Figure 9A and 9B). Damages were further increased with longer times of I/R (Fig. 9C). I/R experiments led to a rapid increase of GLP-1 plasma levels

(Figure 10). As shown in Fig. 10A, reperfusion of the mesenteric artery for 2 hours after 20 minutes of ischemia led to a raise of GLP-1 plasma levels. More notably, this increase was significant after only 15 minutes of reperfusion. Shorter times of ischemia (< 20 minutes) were still able to induce GLP-1 secretion (Fig 10B). Several studies have recently shown I-FABP to be a promising biomarker for the early detection of mesenteric I/R (33). However, in our present experimental conditions, we showed that GLP-1 secretion not only precedes I-FABP secretion but is quantitatively more important (Fig. 10C). In contrast to I-FABP, a short I/R treatment was sufficient to induce a significant plasma GLP-1. Surprisingly, after a short I/R, GLP-1 secretion is induced whereas LPS plasma levels are not modified (Fig 10D). This latter required a longer reperfusion time and reached significance after 6 hours of reperfusion (Fig 10E). The involvement of LPS in this prompt GLP-1 secretion was further confirmed by two others set of experiments (Figure 11). Firstly, we observed that I/R-induced GLP-1 secretion was lower in mice depleted in luminal LPS through a pretreatment with Polymyxin B, an antibiotic specific to LPS (Fig. 11A and 11B). Secondly, pharmacological TLR4 inhibition by the administration of a TLR4 antagonist before I/R treatment is associated with reduced efficacy of this treatment to induce GLP-1 secretion (Fig. 11C and 11D).

Physiological relevance of this LPS / GLP-1 cascade in humans

In order to consider GLP-1 as a promising biomarker for clinical diagnosis of gut barrier injuries, secretagogue effects of LPS would need to be confirmed in humans (Figure 12). For this purpose, we have worked on a cohort of 30 healthy volunteers: 15 received intravenously a bolus of LPS at 2ng/mL and 15 received the same solution but without LPS molecules (Placebo). Total GLP-1 plasma levels determined before, 3 and 6 hours after the injection showed that even in humans the administration of LPS led to a substantial increase in GLP-1 secretion (Fig. 12A). To sum up (Fig. 12B), if above-described results can be extrapolated to humans, alteration of gut barrier can drive a sudden infiltration of luminal compounds into the mucosa, such as LPS. These molecules can then stimulate enteroendocrine L cells through their TLR4 and led to an increase in GLP-1 secretion from these cells. GLP-1 could therefore be considered as an early clinical biomarker of gut barrier injuries in case of abdominal pain. Beyond intestinal background, GLP-1 could also be a marker of inflammation easy to quantify and very sensitive since tiny amounts of systemic LPS are sufficient to induce GLP-1 secretion.

DISCUSSION

In the present study we found that GLP-1 is rapidly secreted into the bloodstream right after gut barrier alterations. Our data show for the first time that bacterial LPS are able to directly stimulate intestinal enteroendocrine L-cells through their TLR4 receptor leading to intracellular calcium influx and GLP-1 secretion. Therefore, the underlying mechanism of this prompt GLP-1 secretion in response to increased gut permeability may involve luminal LPS. The present study points out GLP-1 as a promising early biomarker of gut injuries.

We and other have previously shown that LPS molecules are able to induce GLP-1 plasma levels (25,26). This GLP-1 accumulation can result from either an increase of its secretion and/or a decrease of its degradation through the action of the DPP-IV protein. However, we have demonstrated here that both synthesis and secretory pathways were induced by LPS. Indeed, LPS administration was followed by an increase in proglucagon and PC1/3 mRNA levels in ileum tissues suggesting a stimulation of GLP-1 synthesis in response to LPS. LPS administration was also followed by a rise in plasma levels of total GLP-1 (active and inactive GLP-1) reflecting an LPS-induced GLP-1 secretion. To assess the DPP-IV degradation pathway, we have determined the GLP-1 inactivation index (total GLP-1/active GLP-1). We found this ratio to be more representative of GLP-1 inactivation than determination of specific DPP-IV plasma activity for two reasons: i) almost all the DPP-IV activity, at least for GLP-1 inactivation, occurs at the membrane level (27,28,34), thus soluble plasmatic form of DPP-IV is not a good marker of total DPP-IV activity, ii) the degradation of GLP-1 is not only strictly dependent on DPP-IV activity (35–37). Therefore, this ratio gives a global overview of total proteolytic activity of GLP-1. Interestingly, in parallel to their synthesis and secretory effects on GLP-1, LPS also lead to an increase in GLP-1 inactivation. Whether it is or not a compensatory effect to counteract the LPS-induced secretion of GLP-1 still needs to be investigated.

The regulation of GLP-1 secretion is complex because under the control of several mechanisms (11,12). During exercise conditions, low levels of IL-6 can directly stimulate intestinal L-cells and lead to GLP-1 secretion (16). Khaled et al. have shown that LPS-induced

GLP-1 plasma levels was completely abolished in IL-6 deficient mice and have therefore reported IL-6 as the mediator between LPS and GLP-1 (26). However, our results are contradictory since we still observed a LPS-induced GLP-1 secretion in IL-6 deficient mice. This divergence may be explained by LPS characteristics. We used LPS from another bacterial strain and at higher concentration. Nonetheless, physiological effects of LPS depend on their concentration and biochemical structure which varies between strains (38,39). Other indirect mechanisms are also known to be involved in GLP-1 secretion. GIP is an incretin secreted by enteroendocrine K-cells which are predominantly localized upstream of L-cells in the gut (40). GIP release is known to induce a subsequent GLP-1 secretion from L-cells (15,41,42). We have therefore consider GIP as a potential mediator between LPS and GLP-1. Nonetheless, we observed in this study that GIP plasma levels were not modulated by LPS administration. The vagus nerve was also identified as an interesting target. It can be implicated in GLP-1 secretion through its muscarinic receptors activation (43,44) and these latter are known to be closely related to LPS inflammatory effects (31,32). In our study, blockade of muscarinic receptors through atropine administration did reduce basal levels of GLP-1. However, LPS-induced GLP-1 effects were not impacted by the administration of atropine.

Finally, the secretory effects of LPS turned out to be due to one of its pro-inflammatory detection pathway: the TLR4 receptor. Until recently TLR4 was considered as the only receptor able to induce an inflammatory response to the presence of LPS molecules. However, it appeared that endotoxins can also be detected and mediate their pro-inflammatory effects through their recognition by caspase-11 or its human orthologues, caspase-4 and caspase-5 (23,24). In this study, TLR4 deficient mice did not display an increase in GLP-1 secretion after LPS administration showing that invalidation of TLR4 receptor completely nullified the secretory effects of LPS. Both murine and human EEC are known to express a functional TLR4 and to be responsive to pro-inflammatory stimuli (19,20). We have seen here that cultured L-cells increased intracellular calcium fluxes and produced GLP-1 when challenged with LPS. Our experiments have also highlighted that LPS-induced intracellular calcium fluxes and GLP-1 secretion were either strongly attenuated or even completely abolished when cells were pretreated with a TLR4 antagonist.

LPS molecules are present in huge amounts inside the GI tract, enough to kill the host many times over. However, the mucus layer together with the intestinal epithelium constitute an efficient and sensitive barrier to pro-inflammatory compounds (45–47). In physiological conditions, LPS do not pass through the gut barrier except for really small quantities with nutrients ingestion (48). We confirmed in this study that even an oral load of purified LPS molecules does not induce an increase in endotoxemia. However, we found *ex vivo* that introduction of LPS in the lumen of ileum explants led to a significant GLP-1 secretion. This discrepancy could be explain by the fact that pieces of ileum explants were no more blood-irrigated and intestinal mucosa was therefore rapidly degraded. Indeed, oral LPS load did induce an increase in endotoxemia as well as GLP-1 secretion but only in DSS-treated mice which displayed an altered intestinal barrier. These results made us hypothesize that LPS-induced GLP-1 secretion from L-cells occurs only after an alteration of gut barrier permeability.

To address this point, mucosal injuries were generated by blocking gut blood irrigation through an experimental model of mesenteric I/R. Thereby, we discovered that mesenteric I/R induced a prompt release of GLP-1. Surprisingly, this secretion occurred even before the detection of LPS in the bloodstream suggesting a rapid stimulation of intestinal L-cells. In mice, EEC were recently shown to participate in the innate immune response against pathogens as well as in the down-regulation of intestinal immunity by interacting with specific microbial patterns (19,49). A novel immunoendocrine intestinal axis has been described and identify EEC as key orchestrators of immune responses to both pathogens and commensal bacteria (50). EEC are deeply localized in the mucosa and may be reached more easily by LPS molecules after mucosal degradation which, according to our light microscopy analysis, happens rapidly after the initiation of mesenteric I/R. To confirm LPS involvement in these observations we have performed I/R treatment in two pharmacological models: i) decrease in luminal LPS content by an antibiotic treatment and ii) blockade of TLR4 by the administration of a TLR4 antagonist. In both cases we observed that GLP-1 induction in response to mesenteric I/R was reduced whatever the pharmacological treatment.

During gut injuries, integrity of mucosal barrier becomes compromised (29), even luminal digestive enzyme were shown to enter the altered epithelium (51). This increase in permeability may allow LPS infiltration, subsequent stimulation of enteroendocrine L-cells and

prompt GLP-1 secretion. This secretion of GLP-1 could therefore be a direct response to pro-inflammatory molecules invasion. GLP-1 is essential for glucose homeostasis but the physiological importance of its first-described incretin role has already been reconsidered (52,53). Indeed, apart from regulating glucose metabolism, GLP-1 might possess extraglycemic activity including anti-inflammatory effects which were shown in peripheral organs (53–58) as well as directly inside the intestinal epithelium (59). For instance, GLP-1 was shown to reduce pyrogenic effects of LPS (60). That would also corroborate the fact that intestinal injury severity in response to DSS treatment is increased in GLP-1R deficient mice (59). Moreover, we have demonstrated here for the first time that the newly described LPS / GLP-1 cascade originally discovered in mice (25) is also functional in humans. It confirms the physiological relevance of GLP-1 as an anti-inflammatory compound produced in response to LPS in humans.

In conclusion, we have demonstrated here that LPS molecules are able to directly stimulate intestinal L-cells through their TLR4 receptor leading to GLP-1 synthesis and secretion. We have therefore considered GLP-1 as a potential anti-inflammatory molecule rapidly released from intestinal L-cells after bacterial LPS stimulation. Gut injuries such as mesenteric I/R are associated with rapid and strong alterations of the gut barrier, LPS infiltration, inflammatory process, multiple organ failure and ultimately death. The high mortality rate of this disease ranges from 60 to 80% and has not changed since the 1940s because of the lack of specific and sensitive biomarkers that can properly and rapidly detect GI damages (61). A large number of preclinical and clinical investigations aim to find such an efficient biomarker and to date the cytoplasmic protein I-FABP appear to be the most promising (33). However, we have found here that in mesenteric I/R condition, GLP-1 secretion occurs earlier than I-FABP and is even more pronounced. Whether it is a defense mechanism or not still need to be investigated but in any case this prompt GLP-1 secretion right after gut barrier alterations makes this hormone a promising early biomarker of gut injuries. These perspectives of clinical diagnosis are even more promising that LPS / GLP-1 cascade was found to be functional and relevant in humans.

ACKNOWLEDGMENT

Authors contributions : study concept and design (JG, LL, LJJ); acquisition of data (LJJ, JG, JPPDB, JP, VD); analysis and interpretation of data (JG, LJJ, JPPDB, LL, NAK, SM); drafting of the manuscript (JG, LL, LJJ); critical reviews (LL, SM), statistical analysis (JG, LJJ); material support (NLG, DJD), study supervision and guarantor of this work (JG).

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, Centre de Recherches U866), the Université de Bourgogne-Franche-Comté and a French Government Grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11 LABX-0021. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2131–57.
2. Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*. 1992 Apr;22(4):283–91.
3. Rouillé Y, Kantengwa S, Irminger JC, Halban PA. Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):32810–6.
4. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet Lond Engl*. 1987 Dec 5;2(8571):1300–4.
5. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(10):3434–8.
6. Fehmman HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology*. 1992 Jan;130(1):159–66.
7. Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci*. 1993 Apr;38(4):665–73.
8. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):E981–8.
9. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):69–72.
10. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):515–20.
11. Kuhre RE, Frost CR, Svendsen B, Holst JJ. Molecular mechanisms of glucose-stimulated GLP-1 secretion from perfused rat small intestine. *Diabetes*. 2015 Feb;64(2):370–82.
12. Tian L, Jin T. The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion. *J Diabetes*. 2016 Jun 11;
13. Rask E, Olsson T, Söderberg S, Johnson O, Seckl J, Holst JJ, et al. Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men. *Diabetes Care*. 2001 Sep;24(9):1640–5.
14. Borgstrom B, Dahlqvist A, Lundh G, Sjövall J. Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J Clin Invest*. 1957 Oct;36(10):1521–36.
15. Lim GE, Brubaker PL. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. *Diabetes*. 2006 Dec 1;55(Supplement 2):S70–7.
16. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, et al. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med*. 2011;17(11):1481–9.

17. Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, Wilmes P. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol.* 2016 Jul;18(7):2103–16.
18. Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. The characteristics and function of bacterial lipopolysaccharides and their endotoxic potential in humans. *Int Rev Immunol.* 2015 Nov 25;1–31.
19. Bogunovic M, Davé SH, Tilstra JS, Chang DTW, Harpaz N, Xiong H, et al. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jun;292(6):G1770–83.
20. Palazzo M, Balsari A, Rossini A, Selleri S, Calcaterra C, Gariboldi S, et al. Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Apr 1;178(7):4296–303.
21. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998 Dec 11;282(5396):2085–8.
22. Beutler B, Du X, Poltorak A. Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies. *J Endotoxin Res.* 2001;7(4):277–80.
23. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science.* 2013 Sep 13;341(6151):1250–3.
24. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science.* 2013 Sep 13;341(6151):1246–9.
25. Nguyen AT, Mandard S, Dray C, Deckert V, Valet P, Besnard P, et al. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes.* 2014 Feb;63(2):471–82.
26. Kahles F, Meyer C, Möllmann J, Diebold S, Findeisen HM, Lebherz C, et al. GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering. *Diabetes.* 2014 Oct;63(10):3221–9.
27. Deacon CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *Am J Physiol.* 1996 Sep;271(3 Pt 1):E458–64.
28. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4):1409–39.
29. Rupani B, Caputo FJ, Watkins AC, Vega D, Magnotti LJ, Lu Q, et al. Relationship between disruption of the unstirred mucus layer and intestinal restitution in loss of gut barrier function after trauma hemorrhagic shock. *Surgery.* 2007 Apr;141(4):481–9.
30. Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res.* 2015 Jul;56(7):1363–9.
31. Fuentes JM, Fulton WB, Nino D, Talamini MA, Maio AD. Atropine treatment modifies LPS-induced inflammatory response and increases survival. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2008 Mar;57(3):111–7.
32. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000 May 25;405(6785):458–62.
33. Khadaroo RG, Fortis S, Salim SY, Streutker C, Churchill TA, Zhang H. I-FABP as biomarker for the early diagnosis of acute mesenteric ischemia and resultant lung injury. *PloS One.* 2014;9(12):e115242.

34. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*. 1999 Nov;140(11):5356–63.
35. Ruiz-Grande C, Pintado J, Alarcón C, Castilla C, Valverde I, López-Novoa JM. Renal catabolism of human glucagon-like peptides 1 and 2. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990 Dec;68(12):1568–73.
36. Hassan M, Eskilsson A, Nilsson C, Jonsson C, Jacobsson H, Refai E, et al. In vivo dynamic distribution of ¹³¹I-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera. *Nucl Med Biol*. 1999 May;26(4):413–20.
37. Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, et al. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):654–62.
38. Maitra U, Deng H, Glaros T, Baker B, Capelluto DGS, Li Z, et al. Molecular mechanisms responsible for the selective and low-grade induction of proinflammatory mediators in murine macrophages by lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Jul 15;189(2):1014–23.
39. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8;109(19):7421–6.
40. Buffa R, Polak JM, Pearse AG, Solcia E, Grimelius L, Capella C. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry*. 1975 Jun 5;43(3):249–55.
41. Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*. 1993 Jul;133(1):233–40.
42. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept*. 2003 Jul 15;114(2-3):189–96.
43. Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*. 1999 Apr;140(4):1687–94.
44. Balks HJ, Holst JJ, von zur Mühlen A, Brabant G. Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Mar;82(3):786–90.
45. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*. 2011 Oct 14;334(6053):255–8.
46. Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011 Nov;68(22):3635–41.
47. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*. 2006 Dec;169(6):1901–9.
48. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007 Nov;86(5):1286–92.
49. Selleri S, Palazzo M, Deola S, Wang E, Balsari A, Marincola FM, et al. Induction of pro-inflammatory programs in enteroendocrine cells by the Toll-like receptor agonists flagellin and bacterial LPS. *Int Immunol*. 2008 Aug;20(8):961–70.

50. Worthington JJ. The intestinal immunoendocrine axis: novel cross-talk between enteroendocrine cells and the immune system during infection and inflammatory disease. *Biochem Soc Trans.* 2015 Aug;43(4):727–33.
51. Chang M, Kistler EB, Schmid-Schönbein GW. Disruption of the mucosal barrier during gut ischemia allows entry of digestive enzymes into the intestinal wall. *Shock Augusta Ga.* 2012 Mar;37(3):297–305.
52. Nauck MA. Is glucagon-like peptide 1 an incretin hormone? *Diabetologia.* 1999 Mar;42(3):373–9.
53. Lee Y-S, Jun H-S. Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3094642.
54. Lee Y-S, Park M-S, Choung J-S, Kim S-S, Oh H-H, Choi C-S, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia.* 2012 Sep;55(9):2456–68.
55. Parthasarathy V, Hölscher C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 30;700(1-3):42–50.
56. Dobrian AD, Ma Q, Lindsay JW, Leone KA, Ma K, Coben J, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Feb;300(2):E410–21.
57. Wang X-C, Gusdon AM, Liu H, Qu S. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on non-alcoholic fatty liver disease and inflammation. *World J Gastroenterol.* 2014 Oct 28;20(40):14821–30.
58. Marques C, Mega C, Gonçalves A, Rodrigues-Santos P, Teixeira-Lemos E, Teixeira F, et al. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:538737.
59. Yusta B, Baggio LL, Koehler J, Holland D, Cao X, Pinnell LJ, et al. GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R. *Diabetes.* 2015 Jul;64(7):2537–49.
60. Rinaman L, Comer J. Antagonism of central glucagon-like peptide-1 receptors enhances lipopolysaccharide-induced fever. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2000 Dec 20;85(1-3):98–101.
61. Schoots IG, Koffeman GI, Legemate DA, Levi M, van Gulik TM. Systematic review of survival after acute mesenteric ischaemia according to disease aetiology. *Br J Surg.* 2004 Jan;91(1):17–27.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: LPS enhance GLP-1 plasma levels *via* an increase of its secretion

Plasma quantification of LPS (A), ileum gene expression measurements (B & C), plasma active GLP-1 (D) and total GLP-1 (E) at different time points (basal, 3h, 6h, 12h and 24h) after an intraperitoneal injection of LPS at 1mg/kg in mice (n=9-10). Statistical analysis were performed using an unpaired t test or a spearman correlation test, *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001. Values are mean \pm SEM. A. LPS plasma levels are evaluated by the quantification of 3-HM (ng/mL) measured by LC/MS². B & C. Respectively proglucagon and prohormone convertase 1/3 mRNA relative expression measurements in ileum. D & E. Respectively active and total GLP-1 plasma levels (% of basal). F. GLP-1 inactivation index determined as follows: total GLP-1 (pM) / active GLP-1 (pM). G. Correlation between active GLP-1 (pM) and 3-HM (ng/mL). H. Correlation between total GLP-1 (pM) and 3-HM (ng/mL). I. Correlation between GLP-1 inactivation index and 3-HM (ng/mL).

Figure 2: The secretory effect of LPS is distinct from the most common GLP-1 secretion pathways

Effects of nutrients (A: glucose & B: lipids), proinflammatory cytokines (C&D: IL-6), paracrine (E) and nerve (F) pathways on the LPS-induced GLP-1 secretion in mice. LPS (1mg/kg) was IP injected and saline was injected as control. Statistical analysis were performed using an unpaired t test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ^ap<0.01 compared to the LPS-injected WT mice. Values are mean \pm SEM. A & B. Active GLP-1 plasma levels (% of control values at T0; n=11) 3 hours after an injection of LPS in basal condition (T0) or after a nutrient stimulation, respectively 15 minutes after an oral glucose load (2g/kg) and 30 minutes after an oral lipid load (500 μ L/mice). C & D. Respectively IL-6 plasma levels (pg/mL) and total GLP-1 plasma levels (% of control in WT mice) 3 hours after an injection of LPS in wild-type mice (WT; n=10) or IL-6-deficient mice (IL-6 KO; n=8). E. GIP plasma levels (% of control values; n=11) 15 minutes after an oral glucose load (2g/kg) and 3 hours after an injection of LPS. F. Active GLP-1 plasma levels (% of control values; n=4-6) 3 hours after an injection of LPS in absence or presence of atropine 1mg/kg IP injected 10 minutes before and 90 minutes after the injection of LPS.

Figure 3: LPS induce GLP-1 secretion via a TLR4-dependent mechanism

Secretory effects of LPS in wild-type (WT) and TLR4/2-deficient mice (TLR4/2 KO). LPS (1mg/kg) was IP injected and saline was injected as control. Statistical analysis were performed using an unpaired t test, *** $p < 0.001$. Values are mean \pm SEM. **A, B, C & D.** Quantification of different cytokines plasma levels (pg/mL; n=6-7) 3 hours after an injection of LPS in WT and TLR2/4 KO mice: respectively IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10. **E.** Active GLP-1 plasma levels (% of control values; n=11-12), 3 hours after an injection of LPS in WT and TLR2/4 KO mice.

Figure 4: LPS enhance GLP-1 secretion from ileum explants and enteroendocrine cultured cells

Secretion of GLP-1 by mice ileum explants (**A & B**), GLUTag cells (**C & D**) and STC-1 cells (**E**) in response to incubation with glucose or LPS. Values are mean \pm SEM. Statistical analysis were performed using an unpaired t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. **A.** Secretory profile from distal to proximal ileum after a 60 minutes intraluminal glucose stimulation at 3g/L (pM; n=10). **B.** Secretory response of the distal ileum (three last centimeters) to glucose 3g/L or to LPS at different concentrations (75ng/mL, 500ng/mL and 1000ng/mL) placed in the ileum lumen (% of control values; n=11-16). **C.** Secretory response of GLUTag cells to glucose 3g/L or to different concentrations of LPS (200ng/mL, 500ng/mL and 1000ng/mL) for 90 minutes (% of control values; n=6). **D.** Time course of GLP-1 release by GLUTag cells in the presence of LPS 200ng/mL (% of control values; n=4-5). **E.** Secretory response of STC-1 cells to different concentrations of LPS (1ng/mL and 10ng/mL) for 90 minutes (% of control values; n=4).

Figure 5: LPS trigger calcium signaling in GLUTag and STC-1 cells

Results are expressed as F_{340}/F_{380} ratio. **A.** Calcium signaling for 500 seconds and 300 seconds in GLUTag and STC-1 cell lines respectively after a stimulation with LPS at 200ng/mL. **B.** Calcium signaling in STC-1 cells for 500 seconds after a stimulation with LPS at 200ng/mL in a 0% calcium or 100% calcium buffer.

Figure 6: Enteroendocrine cells respond to LPS via a TLR4-dependent mechanism

Secretory effects of LPS *in vitro* in the presence of TLR4 antagonists. Statistical analysis were

performed using an unpaired t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Values are mean \pm SEM. **A.** Secretory response of GLUTag cells to LPS 200ng/mL for 90 minutes in the absence or presence of TAK242 5 μ M in the cell culture media (% of control values; n=5). **B.** Secretory response of STC-1 cells to LPS 10ng/mL for 2, 12 or 24 hours in the absence or presence of TAK242 5 μ M in the cell culture media (% of control values at 2 hours; n=4-6). **C.** Calcium signaling in GLUTag and STC-1 cells after a stimulation with LPS 200ng/mL in the absence or presence of TLR4 antagonist (LPS-RS 0.5 μ g/mL), results are expressed as F₃₄₀/F₃₈₀ ratio.

Figure 7: Different ways of LPS administration and modulation of its secretory effects

Statistical analysis were performed using an unpaired t test, *** $p < 0.001$. Results are expressed as a percentage of the control values, saline was injected as control. Values are mean \pm SEM. Active GLP-1 plasma levels in mice 3 hours after an intraperitoneal injection of LPS 1mg/kg (n=11) (**A**) or an intravenous injection of LPS 1mg/kg (n=6-8) (**B**) or an oral 1mg LPS load (n=9-10) (**C**).

Figure 8: Increased LPS levels in DSS-treated mice are positively correlated with GLP-1 secretion

Portal LPS (**A**) and plasma total GLP-1 (**B**) quantification at different time points (basal, 1h and 6h) after an oral LPS load (5mg/animal) in DSS-treated mice (n=8-10) and in control mice (n=8-10). Statistical analysis were performed using an unpaired t test or a spearman correlation test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Results are expressed as a percentage of basal. **A.** LPS levels in portal blood are evaluated by the quantification of 3-HM LC/MS², **B.** Total GLP-1 plasma levels. **C.** Correlation between total GLP-1 (% of basal) and 3-HM (% of basal).

Figure 9: Intestinal injury following acute mesenteric ischemia and reperfusion

Hematoxylin / eosin staining of ileum histological sections after sham treatment (**A**), 20 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion (**B**) and 40 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion (**C**).

Figure 10: Ischemia – reperfusion of the SMA is promptly followed by a GLP-1 secretion

Ischemia-reperfusion (I/R) of the superior mesenteric artery, sham-operated mice were used as control. Statistical analysis were performed using an unpaired t test, difference from sham (*) or basal (§) are displayed: */§p<0.05, **/§§p<0.01 and ***/§§§p<0.001. Values are mean ± SEM. Blood LPS levels are determined by the quantification of 3-hydroxymyristate by LC/MS/MS. **A.** Total GLP-1 plasma levels (pM; n=5) after 20 minutes of ischemia followed by 15, 30, 45, 60, 120 and 360 minutes of reperfusion. **B.** Total GLP-1 plasma levels (% of sham; n=5) after 5, 10 and 15 minutes of ischemia followed by 15min of reperfusion. **C.** Total GLP-1 and I-FABP plasma levels (% of sham, n=6) after a short and a long I/R (20 minutes ischemia and 15 minutes or 2 hours reperfusion respectively) . **D.** Total GLP-1 plasma levels and LPS blood levels (% of sham; n=5) after 20 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion. **E.** Time course of LPS blood levels during reperfusion after 20 minutes of ischemia (% of basal; n=5 sham and n=6 I/R treated mice).

Figure 11: LPS involvement in I/R treatment-induced GLP-1 secretion

Ischemia-reperfusion (I/R) of the superior mesenteric artery: 20 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion. Sham-operated mice were used as control. Statistical analysis were performed using an unpaired t test: *p<0.05, and **p<0.01. Values are mean ± SEM. **A & B.** Total GLP-1 plasma levels (pM) before and after I/R and fold induction (% of basal) due to I/R treatment in control and Polymyxin B treated mice (pM, n=6). **C & D.** Total GLP-1 plasma levels (pM) before and after I/R and fold induction (% of basal) due to I/R treatment in control and TLR4 antagonist treated mice (pM, n=6).

Figure 12: a functional LPS / GLP-1 cascade in humans, hypothetical relevance

A. Total GLP-1 plasma levels in patients injected with a LPS bolus at 2ng/kg and in Placebo patients: basal, 3 and 6 hours after injection. Statistical analysis were performed using an unpaired t test: ***p<0.001. Values are mean ± SEM. **B.** Hypothetical model for the physiological relevance of this LPS / GLP-1 cascade: deterioration of the intestinal mucosa allows luminal LPS infiltration, EEC stimulation *via* an activation of their TLR4 and rapid secretion of GLP-1. Therefore, this intestinal hormone could be an early biomarker of gut barrier injuries.

FIGURE 1

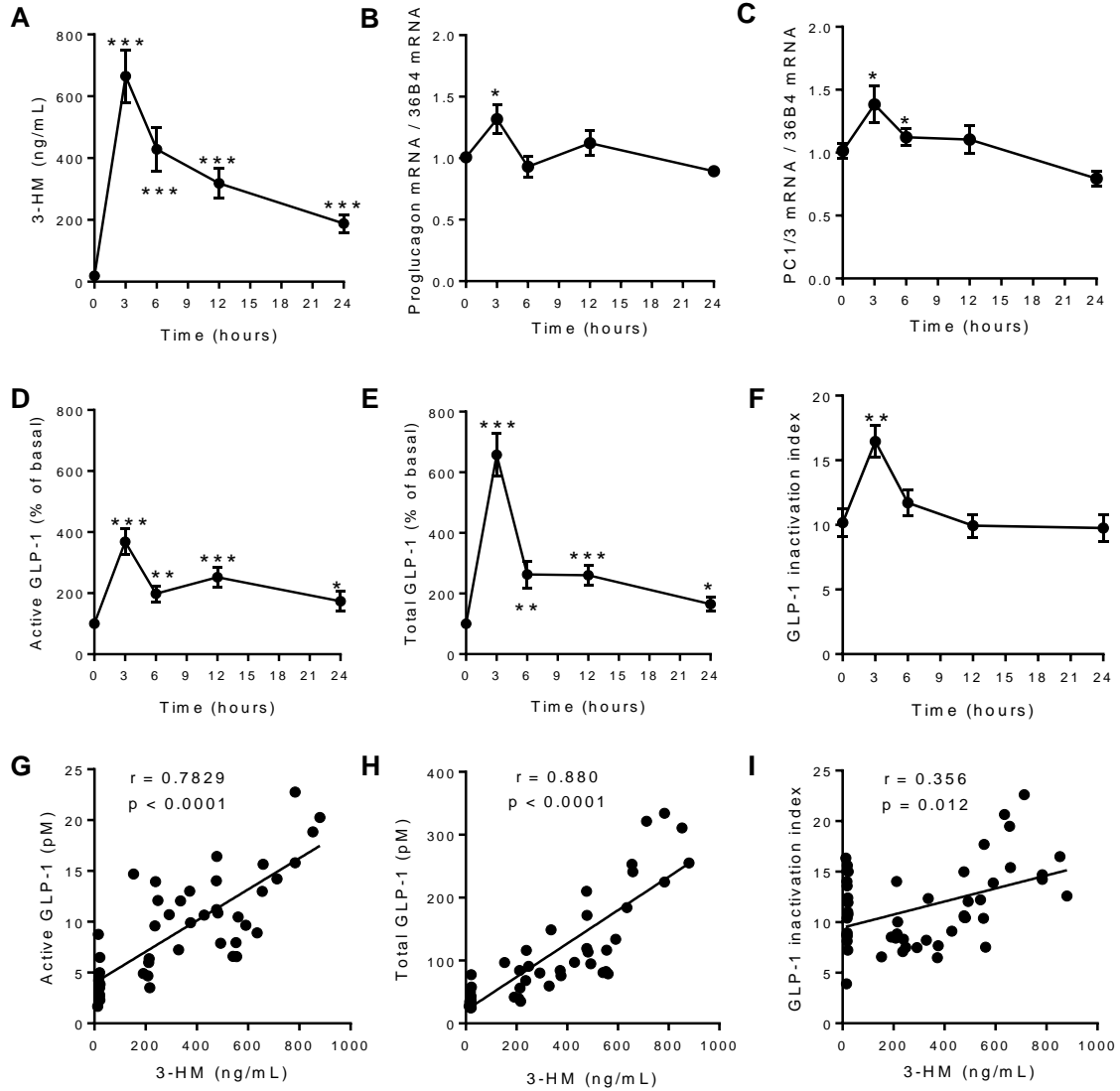


FIGURE 2

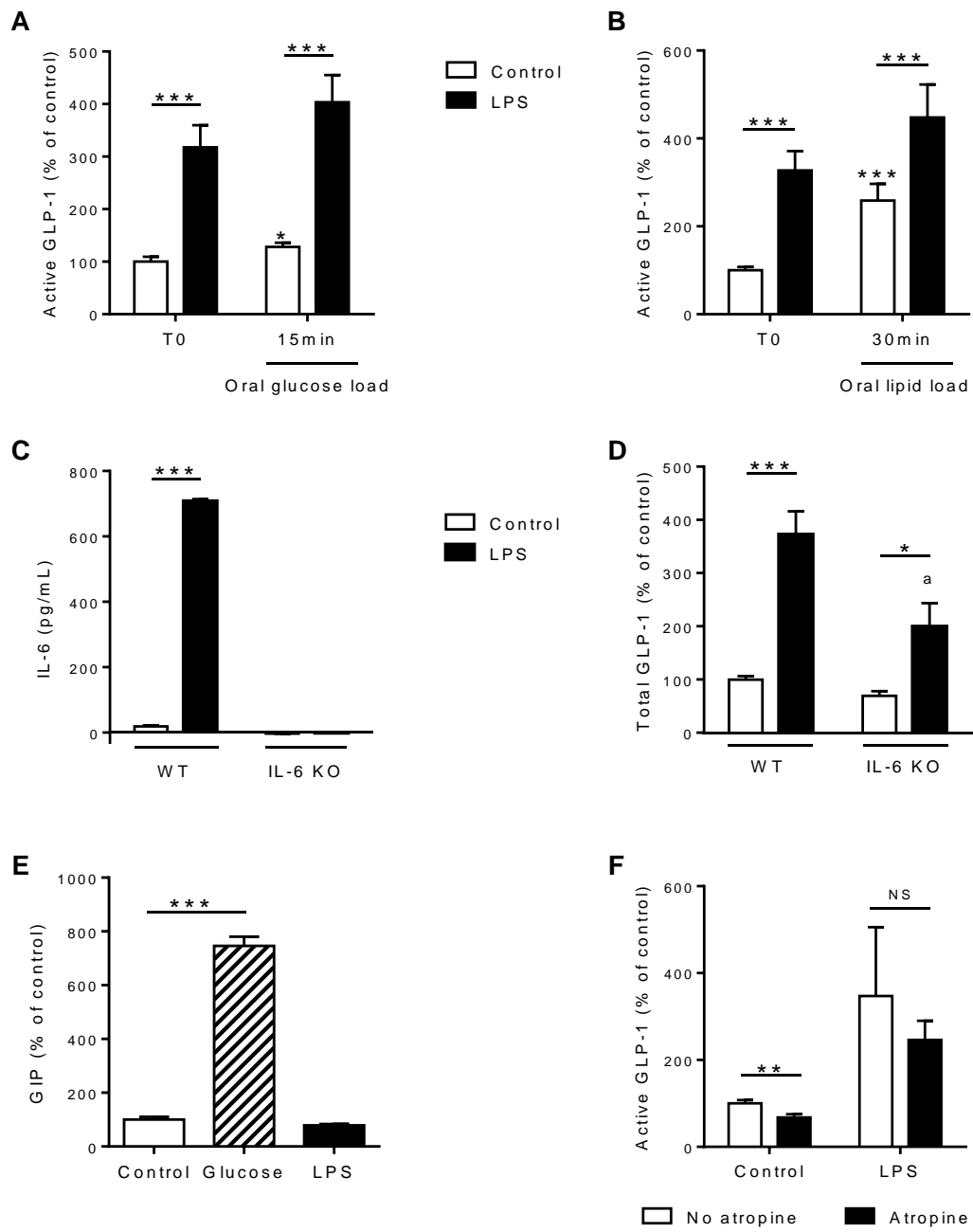


FIGURE 3

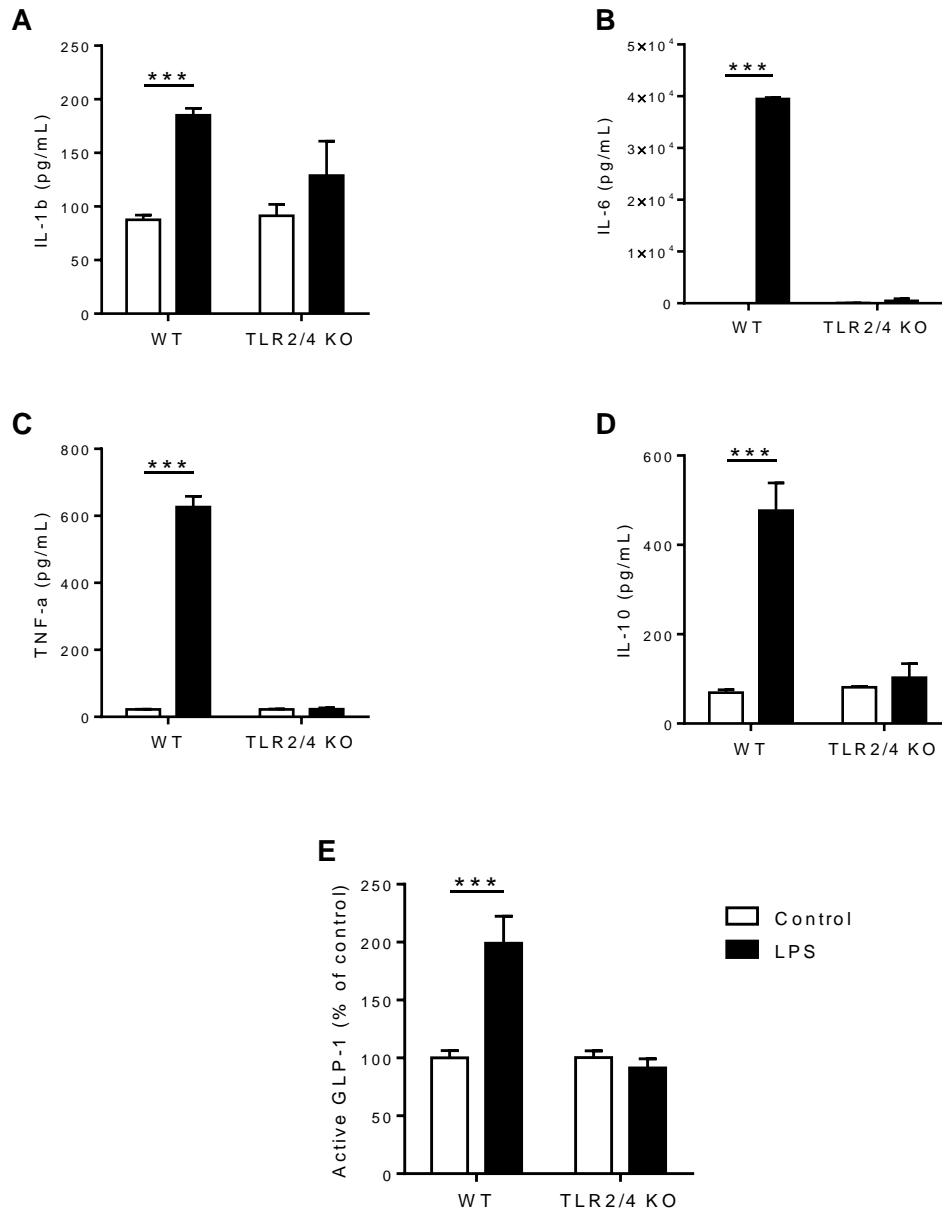


FIGURE 4

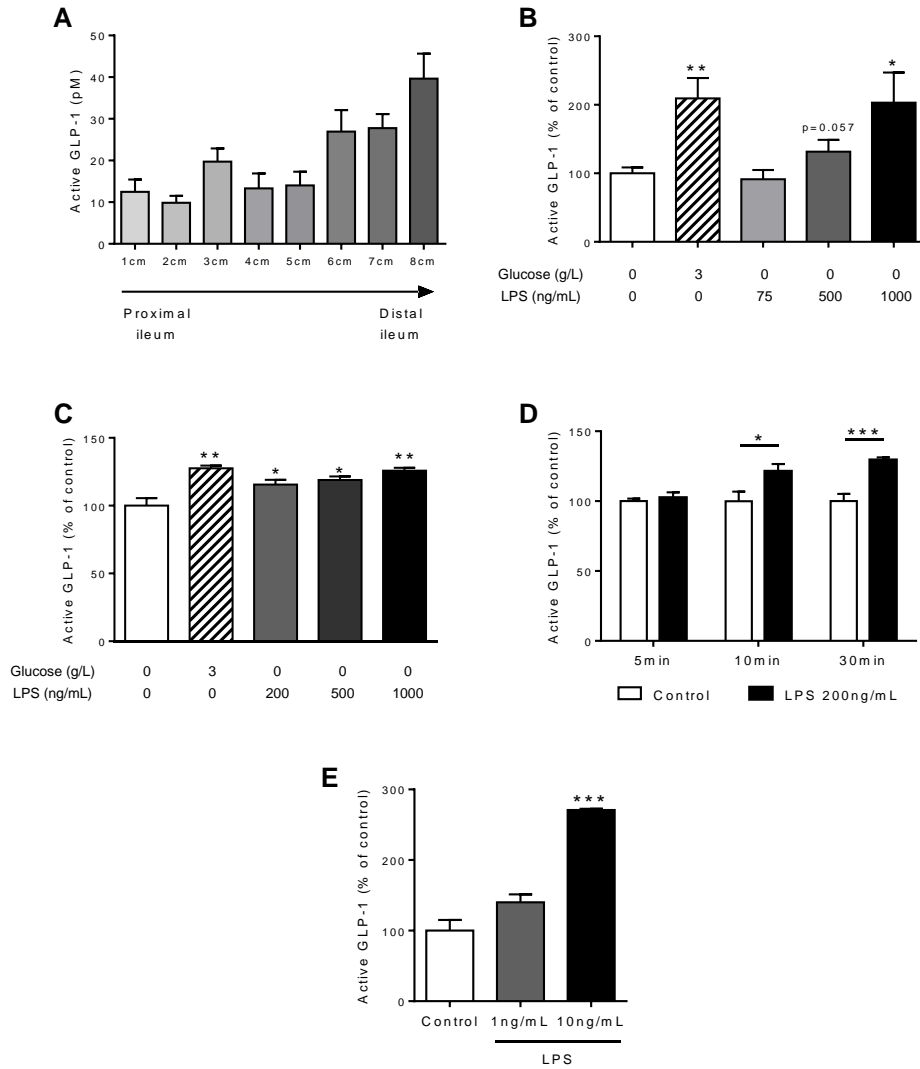


FIGURE 5

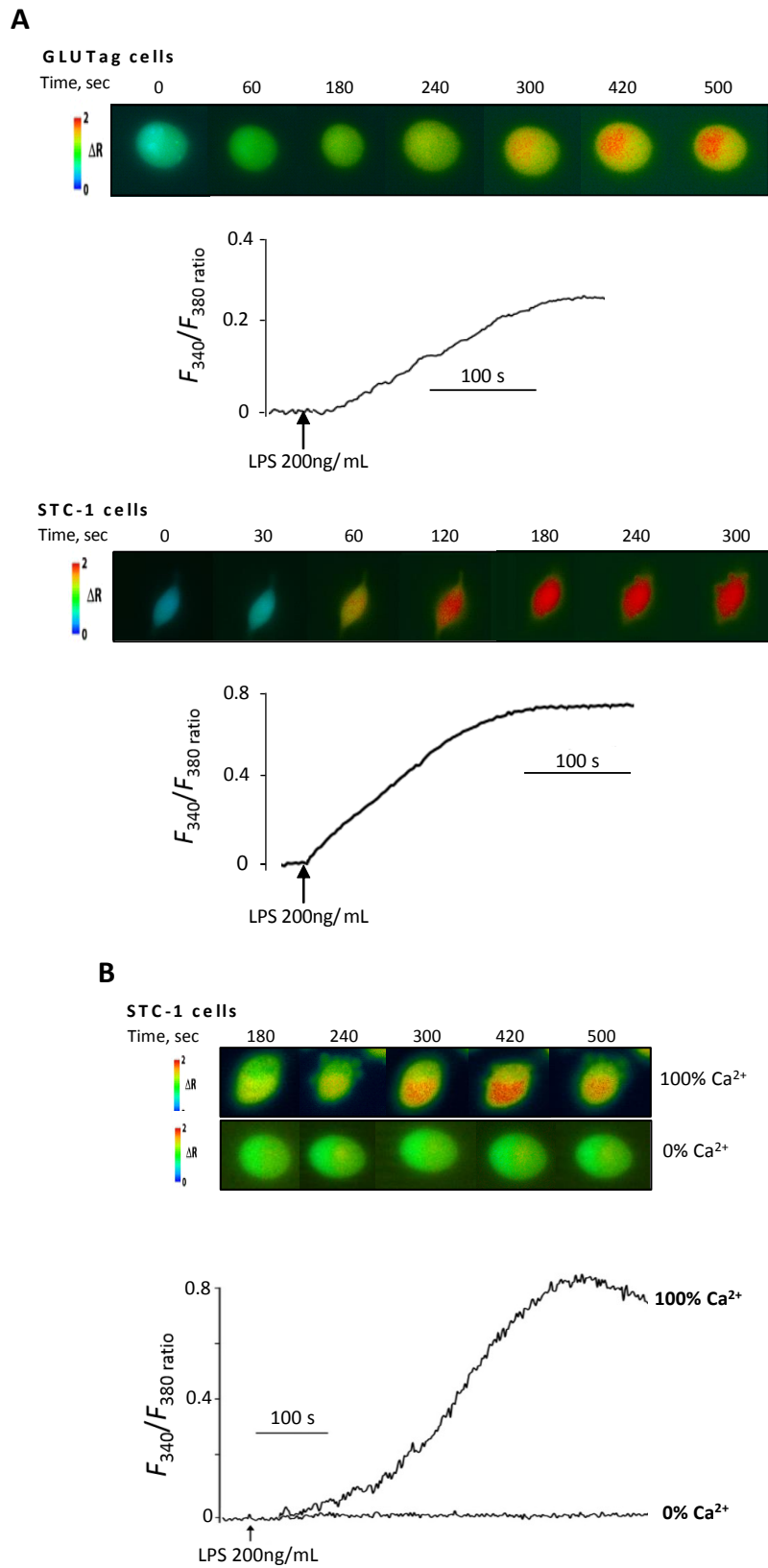


FIGURE 6

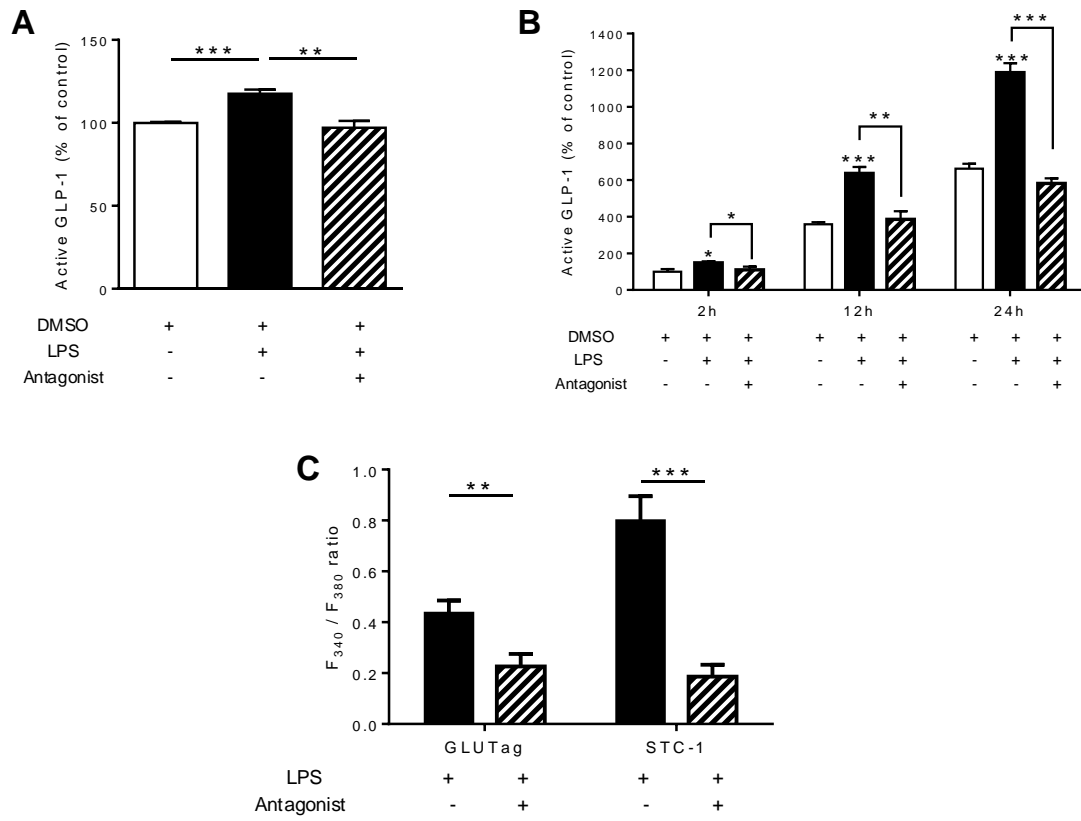


FIGURE 7

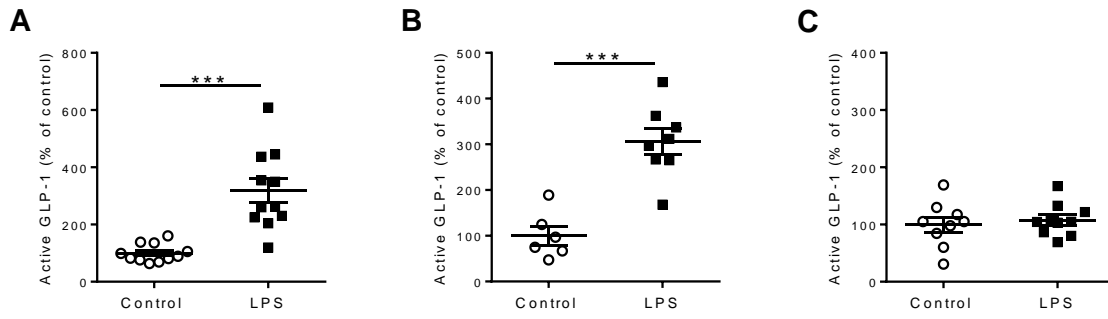


FIGURE 8

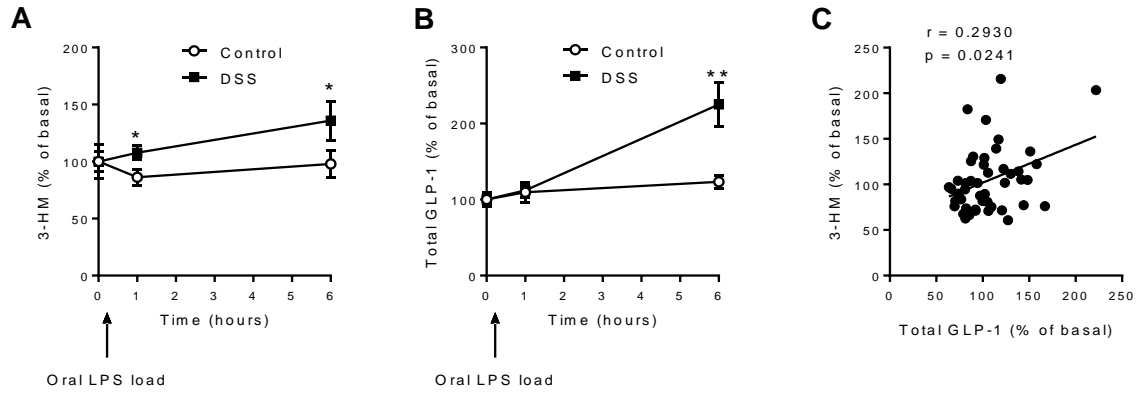


FIGURE 9

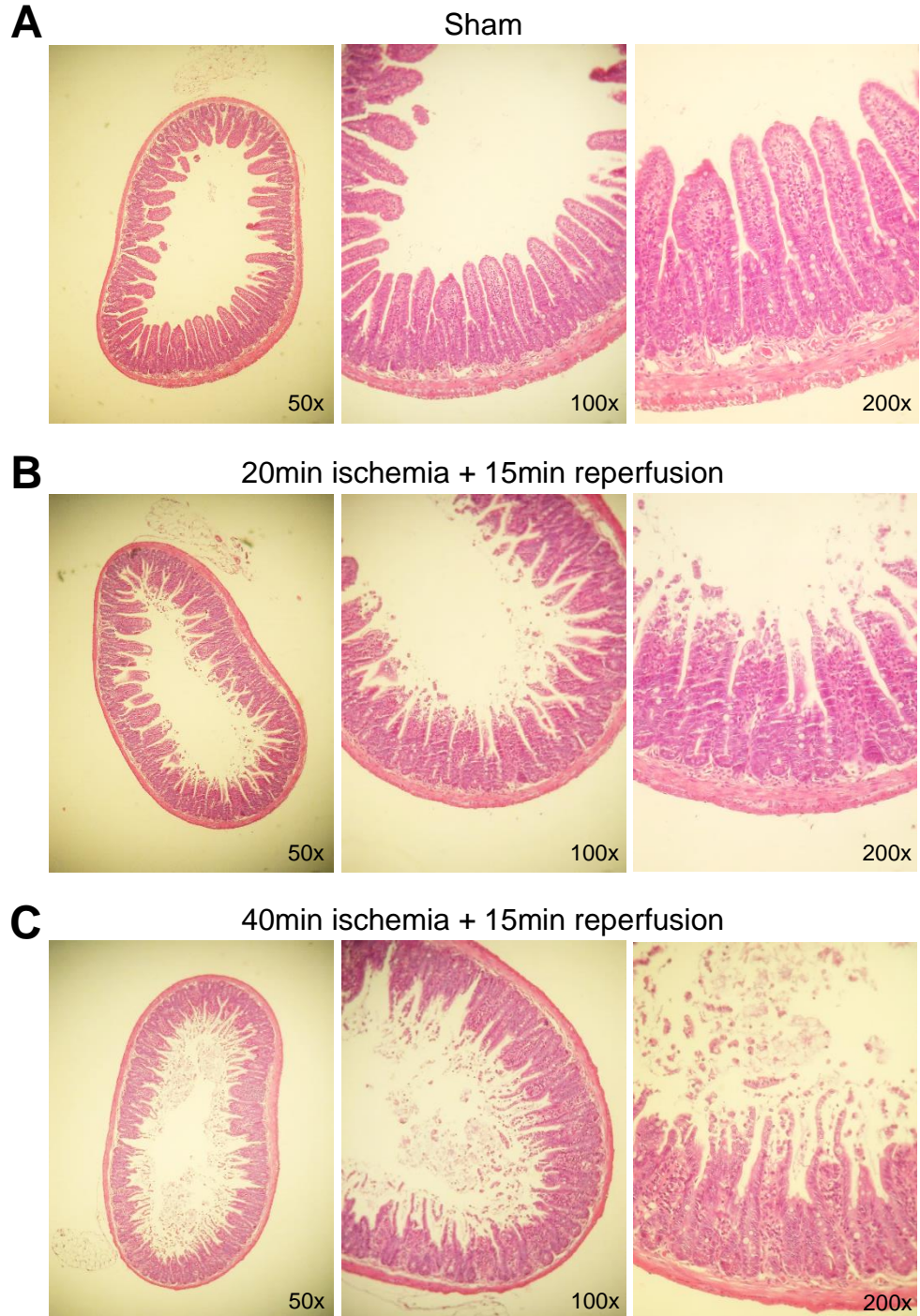


FIGURE 10

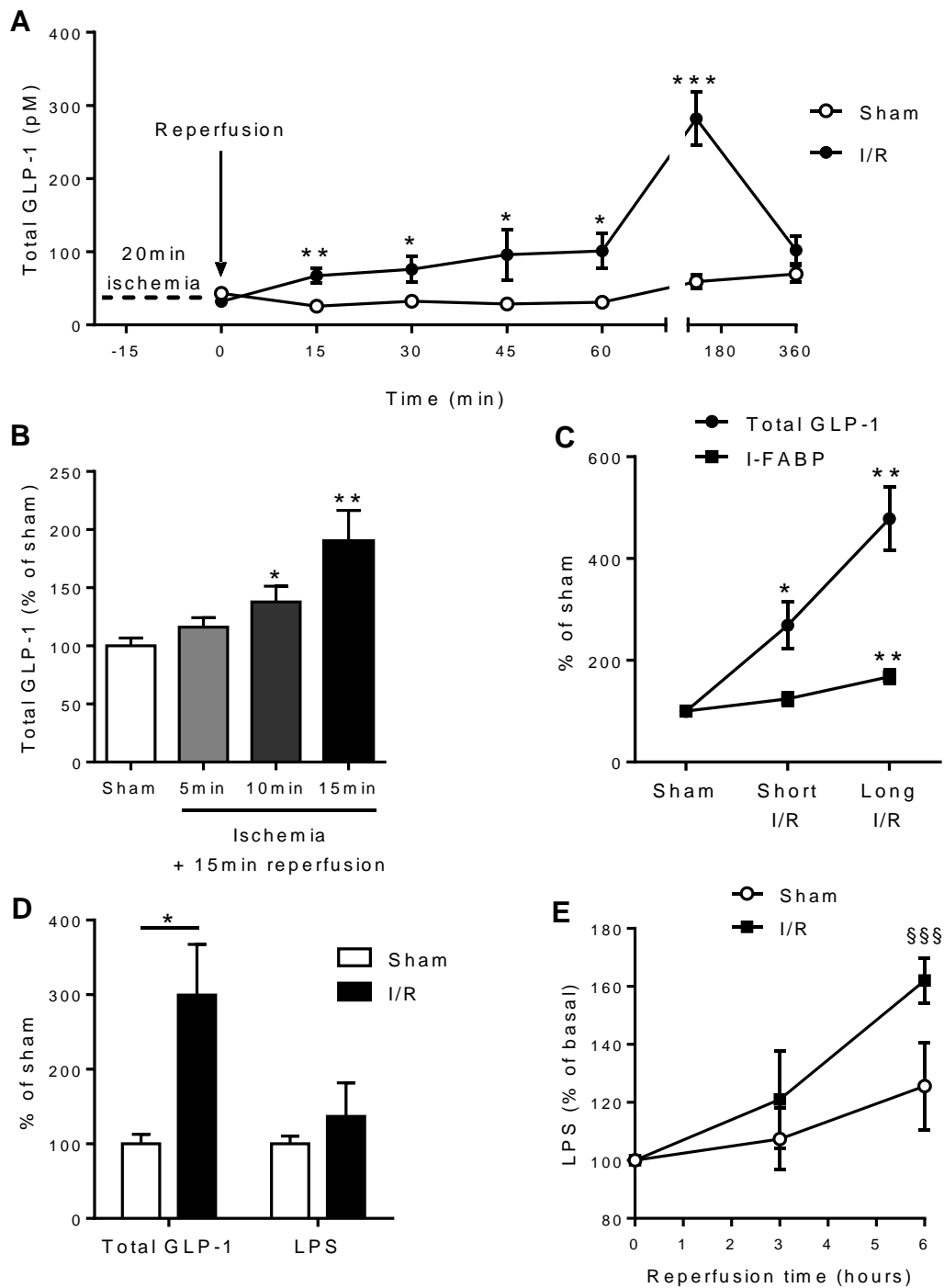


FIGURE 11

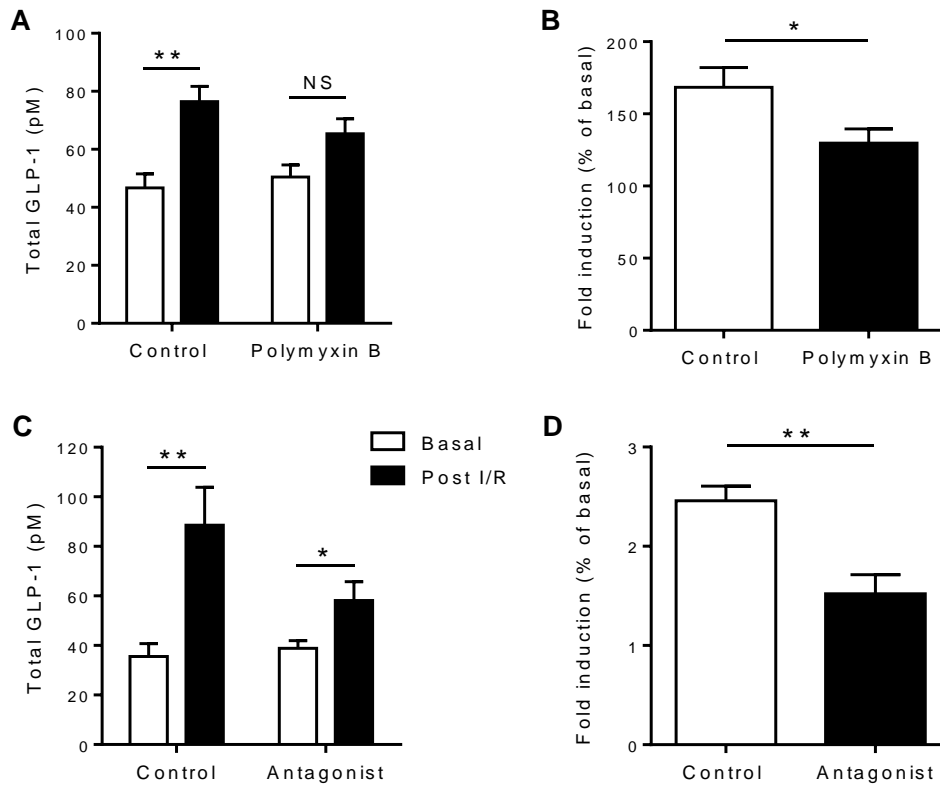
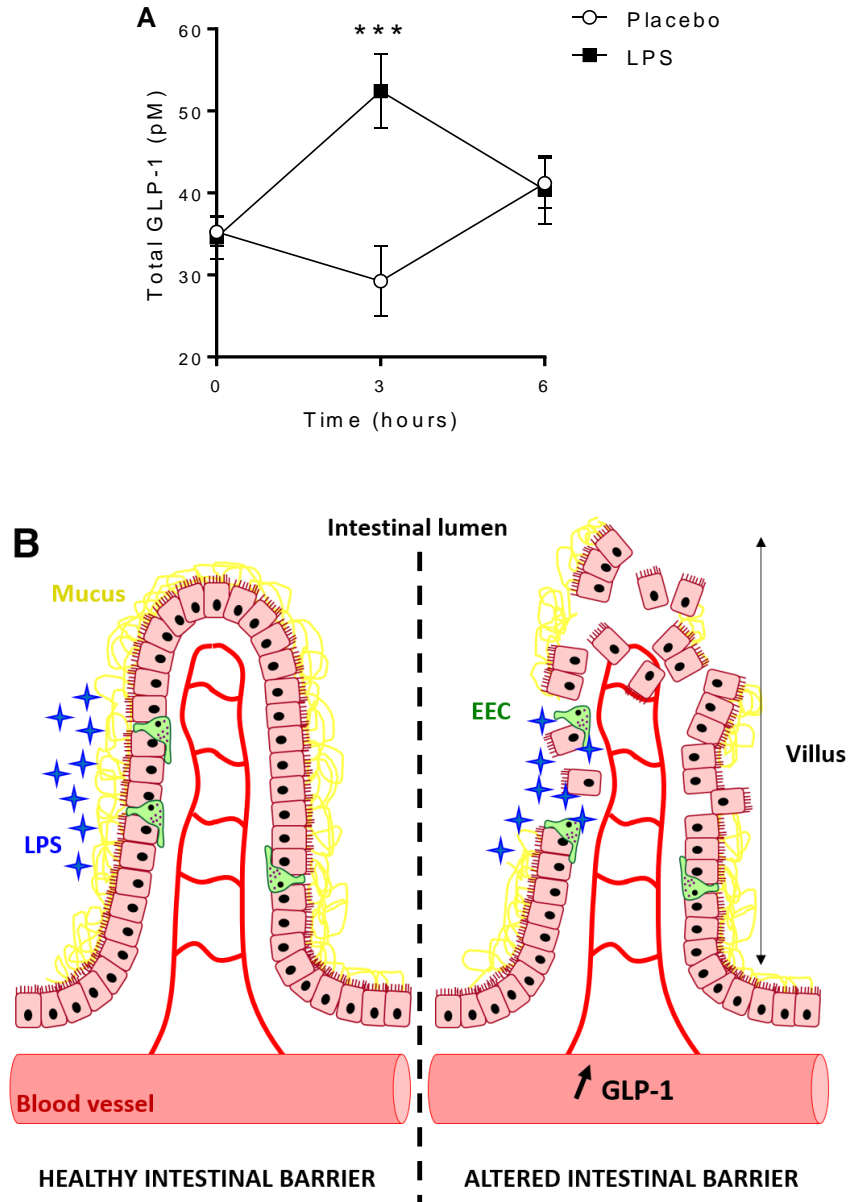


FIGURE 12



Annexe 2

Demande de brevet (déposée)



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000365665	
Application number	EP16306199.7	
File No. to be used for priority declarations	EP16306199	
Date of receipt	20 September 2016	
Your reference	IOBI16SREGLP	
Applicant	UNIVERSITE DE BOURGOGNE	
Country	FR	
Title	IN VITRO METHOD FOR DIAGNOSING AT EARLY STAGE INTESTINAL ISCHEMIA	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf/DEPOT.pdf (14 p.) feesheetint.pdf (1 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) f1002-1.pdf (1 p.)
Submitted by	EMAIL=cmougetgoniot@pontet-allano.com,CN=Claire MOUGET GONIOT,O=CABINET PONTET ALLANO ET ASSOCIES,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	20 September 2016, 12:10:29 (CEST)	
Official Digest of Submission	B1:71:89:74:AC:70:3A:CA:E6:73:E0:31:4C:39:FF:E1:EA:EC:7B:90	

/INPI, section dépôt/

Form 1002 - 1: Public inventor(s)

Designation of inventor 123

User reference: IOB116SREGLP
 Application No:

Public

	Inventor The applicant has acquired the right to the European patent:	Name: GROBER, M. Jacques Address: 3 allée des Lilas 21310 BELLENEUVE France	As employer
	Inventor The applicant has acquired the right to the European patent:	Name: LEBRUN, Mme Lorène Address: 6 rue Claus Sluter 21000 DIJON France	As employer

Signature(s)

Place: Saint Aubin
 Date: 20 September 2016
 Signed by: FR, CABINET PONTET ALLANO ET ASSOCIES, Claire MOUGET GONIOT
 Association: PONTET ALLANO & ASSOCIES
 Representative name: Claire MOUGET-GONIOT
 Capacity: (Mandataire)

IN VITRO METHOD FOR DIAGNOSING AT EARLY STAGE INTESTINAL ISCHEMIA

5 The present invention concerns an *in vitro* method for diagnosing at early stage an intestinal ischemia.

 Acute mesenteric ischemia (AMI) is a severe medical emergency caused by a sudden decrease of blood flow through the mesenteric vessels, as a result of some diseases, trauma, shock, surgery, or organ
10 transplantation. Mesenteric ischemia leads to cellular dysfunction and eventual gangrene of the bowel wall. AMI may be classified as either arterial or venous. Arterial AMI may be also classified into nonocclusive mesenteric ischemia (NOMI) and occlusive mesenteric arterial ischemia (OMAI). In large part because of the association with atherosclerosis, AMI is commonly
15 considered a disease of the older population, with the typical age of onset being older than 60 years (Cardin et al., *Aging Clin Exp Res.* 2012 Jun. 24 (3 suppl): 43-46).

 If mesenteric ischemia itself is deleterious for organism, its treatment which consists in a reperfusion, could be worse. The bowel is one of the organs
20 the most sensible to ischemia-reperfusion (Yamamoto et al., *J. Surg. res.*, 2001, 99: 134-141). Intestinal mucosa can be rapidly impacted by a hypoperfusion (lack of oxygen). However, paradoxically, restoration of blood flow after ischemia (reperfusion) of ischemically damaged intestinal tissue may further aggravate tissue damage rather than decrease tissue damage as
25 it abruptly reintroduces oxygen that stimulates the production of free radicals that promote or accelerate necrosis (Guan et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009, 297: G187-G196). Ischemia followed by reperfusion (IR) can rapidly trigger the production of inflammation mediators. This local inflammation can be quickly generalized at the systemic level. The passing of
30 pro-inflammatory bacterial endotoxins through intestinal barrier can result in systemic inflammation response syndrome (SIRS) state and dysfunction of other organs. By the way, intestinal ischemia-reperfusion is considered as a motor of multiple organ failure (MOF) state (Harvard et al., *J. Vasc. Surg.* 1993, 18: 459-469).

Despite the last medical advances, the high mortality of this pathology has not changed since the 1940s: it is about from 60% to 80% of patients suffering from said disease (Schoots et al., *Br. J. Surg.* 2004 Jan. 91(1): 17-27). Once bowel wall infarction has occurred, mortality may be as high as 90%. Even with good treatment, as many as 50-80% of patients die.

This high mortality is partially due to the difficulty for diagnosing AMI at early stage. Before evidence of peritonitis presents, symptoms of AMI are initially nonspecific. Until now, there is no efficient biological marker which enables to diagnose AMI at early stage. Conventional clinical used markers are serum lactate level and white blood cell number. These markers have neither satisfactory specificity, nor sensibility and cannot diagnose AMI at early stage. Other diagnostic tests existing for the moment, such as angiography or tomodensitometry, have many disadvantages, since they are invasive and could generate medical complications, such as those at renal level (Glenister et Corker, *ANSZ J. Surg.* 2004, 74: 260-265).

In the last years, a great clinical and preclinical effort has been done for seeking for biomarkers which could predict gastro-intestinal damage before it is generated to systematic level. D-lactate (Demir et al., *Dig. Surg.*, 2012, 29: 226-235), intestinal fatty acid binding protein "I-FABP" (Cronk et al., *Curr. Surg.* 2006, 63: 322-325), α -glutathione S-transferase (Khurana et al., 2002, *J. Pediatr. Surg.*, 2002, 37: 1543-1548), albumin (Dundar et al., *Acad. Emerg. Med.* 2010, 17: 1233-1238) and D-dimer (Chiu et al., *Am. J. Emerg. Med.* 2009, 27: 975-979) are studied as potential biomarker for diagnosing AMI. I-FABP is particular promising, since the concentration of plasma I-FABP in mouse is increased after 30 minutes of ischemia followed by 2 hours of reperfusion, which enables to predict intestinal ischemia prior to the appearance of pathological evidence (Khadaroo et al., *PLoS One*, 2014, 9: e115242).

However, it remains necessary to develop new biomarkers able to diagnose more rapidly AMI at more early stage.

The Inventors have surprisingly found in a mouse model of intestinal ischemia/reperfusion, that when a mouse suffers from intestinal ischemia, an increase of plasma level of circulating glucagon-like peptide (GLP-1) in said mouse can be observed after only 10 minutes of ischemia followed by 15

minutes of reperfusion. In another word, GLP-1 is predictive at a very early stage of an intestinal ischemia in the mice.

These experimental results suggest that GLP-1 could also be predictive at a very early stage of an intestinal ischemia in human or other non-human animal, particularly in patient suspected of suffering from intestinal ischemia.

The circulating GLP-1 protein is mainly secreted by intestinal L-cells predominantly localized in the distal small intestine and colon. The circulating GLP-1 forms are: GLP-1-(7-37) and GLP-1-(7-36)NH₂.

Therefore, the first aspect of the invention relates to an *in vitro* diagnostic method for diagnosing at an early stage an intestinal ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia, which comprises:

- (i) determining in a biological sample from said patient the circulating glucagon-like peptide 1 (GLP-1) level,
- (ii) comparing said level with the circulating glucagon-like peptide 1 level in a reference sample ,

wherein the increase of said level in the patient is indicative of said patient suffering from intestinal ischemia.

"A patient suspected of suffering from intestinal ischemia" refers to a patient who suffers from one of the diseases which are generally known as causes of intestinal ischemia or has predisposing conditions, such as a patient suffering from a cardiac emboli, emboli from fragments of proximal aortic thrombus, atheromatous plaque dislodged by arterial catheterization or surgery, an atherosclerotic vascular disease, aortic aneurysm, aortic dissection, arteritis, decreased cardiac output from myocardial infarction or congestive heart failure, dehydration from any cause, hypotension from congestive heart failure, myocardial infarction, sepsis, aortic insufficiency, severe liver or renal disease, or recent major cardiac or abdominal surgery, or a patient consuming vasopressors, ergotamines, cocaine, or digitalis, or a patient having hypercoagulability from protein C and S deficiency, antithrombin III deficiency, dysfibrinogenemia, abnormal plasminogen, polycythemia vera, thrombocytosis, sickle cell disease, factor V Leiden mutation, pregnancy, and oral contraceptive use, tumor causing venous compression or hypercoagulability, intra-abdominal infections, such as

appendicitis, diverticulitis, or abscess, venous congestion from cirrhosis, venous trauma from accidents or surgery, especially portacaval surgery, increased intra-abdominal pressure from pneumoperitoneum during laparoscopic surgery, pancreatitis, decompression sickness.

5 The term "at early stage" refers to a period as short as 10 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion.

 The term "biological sample" refers to any biological sample which can be obtained from a patient, in particular a sample of body fluids, such as urine or blood. In a preferred embodiment of the present invention, the biological
10 sample is a blood plasma sample.

 A reference sample used in the *in vitro* method of the present invention is a biological sample obtained from a healthy subject.

 According to the present invention, when GLP-1 level in a biological sample of a patient suspected of suffering from intestinal ischemia is at least
15 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, or 300% higher than GLP-1 level measured at the same time in reference sample, it is considered that there is an increase of GLP-1 level in said patient and there is very high probability that said patient are suffering from an intestinal ischemia.

20 An "intestinal ischemia" is referred to a variety of disorders that occur when blood flow in the gastrointestinal tract is insufficient, which can affect small intestine (mesenteric ischemia) or colon (ischemic colitis). The method of the present invention can be used for *in vitro* diagnosis of mesenteric ischemia-reperfusion, especially acute mesenteric ischemia or chronic
25 mesenteric ischemia, ischemic colitis, or a disease or trouble linked to gut barrier. In a preferred embodiment, the method of the present invention is for *in vitro* diagnosing acute mesenteric ischemia.

 According to the method of the present invention, the level of circulating glucagon-like peptide 1 is determined by mean of an immunoassay.

30 An immunoassay is understood as different immunological techniques known from the one skilled in the art such as ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Western-blot, RIA (radioimmunoassay), competitive EIA (competitive enzyme immunoassay), immunocytochemistry and immunohistochemistry techniques.

In a particular embodiment, the immunoassay is an ELISA test, which uses at least one antibody with specificity for GLP-1. Said antibody can be a commercially available monoclonal or polyclonal antibody directed against
5 GLP-1.

The ELISA test can be carried out by a commercially available GLP-1 ELISA test.

Said ELISA assay can be direct ELISA, indirect ELISA, sandwich ELISA, or competitive ELISA.

10 In a direct ELISA test, the presence of GLP-1 is directly indicated by a specific antibody conjugated with an enzyme; while in an indirect ELISA test, GLP-1 is recognized by a first antibody specific to GLP-1 protein, said first antibody being recognized by a second antibody conjugated with an enzyme.

The sandwich ELISA quantifies GLP-1 protein between two layers of
15 antibodies (i.e. capture and detection antibody). Either monoclonal or polyclonal antibodies can be used as the capture and detection antibodies in Sandwich ELISA systems.

Another aspect of the present invention concerns the use of a reagent capable of detecting the level of circulating glucagon-like peptide 1 for
20 diagnosing *in vitro* at an early stage an intestinal ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia.

In a preferred embodiment, said reagent is an antibody directed against glucagon-like peptide 1. Said antibody can be any conventional or commercially available monoclonal or polyclonal antibody known in prior art.

25 Particularly, the present invention concerns the use of a kit of ELISA containing an antibody directed against glucagon-like peptide 1 for diagnosing *in vitro* at an early stage an intestinal ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia.

The ELISA test can be carried out by a commercially available GLP-1
30 ELISA test.

The present invention is explained more in detail by following figures and examples.

Figures

Figures 1A, 1B and 1C show intestinal injury following acute mesenteric ischemia and reperfusion. Hematoxylin / eosin staining of ileum histological sections after sham treatment (figure 1A), 20 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion (figure 1B) and 40 minutes of ischemia followed by 15 minutes of reperfusion (figure 1C).

Figures 2A and 2B show that intestinal ischemia/reperfusion induces a quick secretion of GLP-1. Ischemia-reperfusion (I/R) of the superior mesenteric artery is applied in a group of mice. Sham-operated mice were used as control. Statistical analysis were performed using an unpaired t test, difference from sham (*) are displayed: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Values are mean \pm SEM. Figure 2A: total GLP-1 plasma levels (pM; n=5) after 20 minutes of ischemia followed by 15, 30, 45, 60 and 120 minutes of reperfusion. Figure 2B: total GLP-1 plasma levels (% of sham; n=5) after 5, 10 and 15 minutes of ischemia followed by 15min of reperfusion.

Figure 3: total GLP-1 and I-FABP plasma levels (% of sham, n=6) after a short and a long I/R (20 minutes ischemia followed by 15 minutes or 2 hours reperfusion respectively).

Figure 4 shows the comparison of the secretion of inflammation markers after a treatment of I/R (20min/30min) in mice of Sham group and of I/R group.

25 **Examples**

1. Materials and methods

Animals

WT mice (8-12 weeks old, Charles River) from a homogeneous C57BL6/J background were housed in a controlled environment and fed a standard chow diet (A03 diet; Safe, Augy, France). Animals had free access to water and food. All experiments involving animals were performed in accordance with institutional guidelines and approved by the University of Burgundy's Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals (protocol number 5459).

Animal model of intestinal ischemia/reperfusion

Mice were separated into sham-operated groups and ischemia/reperfusion (I/R) groups (n=5/6). They were anesthetized with isoflurane inhalation and placed in a supine position on heating pads to
5 maintain body temperature at 37°C. Midline laparotomy was performed and the superior mesenteric artery (SMA) was isolated. Ischemia was induced by clamping the SMA for 5, 10, 15 or 20 minutes and was followed by 15, 30, 45, 60 or 120 minutes of reperfusion (removal of the clamp). Gut ischemia was confirmed by intestinal color change and gut reperfusion by the
10 reappearance of pulsation and color. Blood collections were performed to quantify GLP-1 and cytokines. Mice were euthanatized by cervical dislocation and the distal part of the small intestine (ileum) was removed and immediately fixed for histological studies.

Surgical operation for sham-operated group mice was the same,
15 except that the superior mesenteric artery was not clamped.

Light microscopy

The morphologic alterations in the gut were examined by light
microscopy (x50, x100 and x200). Briefly, tissues from the distal small
20 intestine (ileum) were promptly taken in sham-operated and I/R groups after 20 or 40 minutes of ischemia and 15 minutes of reperfusion. Gut samples were fixed for 48 hours in 10% neutral buffered formalin at room temperature, dehydrated by graded ethanol and embedded in paraffin for histological analysis. Tissue sections (thickness of 5µm) were deparaffinized with xylene,
25 stained with hematoxylin and eosin.

Blood and plasma collection

Blood samples were collected in EDTA-coated tubes (BD Vacutainer®) from the systemic (retro-orbital or intracardiac puncture) circulation. Plasma
30 was separated by centrifugation at 8000 rpm for 10 minutes at 4°C. Blood and plasma samples were frozen at -20°C for further analysis.

Biochemical Analysis

Total GLP-1 and I-FABP concentrations were determined by commercially available ELISA Kits (Millipore, St. Charles, MO and Cliniscience) in accordance with manufacturer's protocols.

Cytokines plasma levels (interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α)) were measured by Milliplex MAP 5-Plex Kit using mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel (Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's protocol and using a LuminexR apparatus (Bio-Plex 200, Bio-Rad).

Statistical Analysis

Numeric data are presented as mean \pm standard error of mean. Statistical analysis were performed using either the unpaired Student's t-test or the nonparametric Mann-Whitney U test depending on data distribution's normality. D'Agostino's K² test was used to establish whether or not groups of data were normally distributed. A statistical correction was applied when variances were different between groups. A value of P < 0.05 was considered statistically significant.

2. Results

Rapid GLP-1 secretion after gut barrier injury

The mesenteric ischemia-reperfusion (I/R) was produced in a group of mice. A group of sham-operated mice was used as control. Gut ultrastructure was deeply disorganized after I/R (Figures 1A, 1B, 1C). Short times of I/R were sufficient to damage intestinal villi compared to sham-operated mice (Figure 1A and 1B). Damages were further increased with longer times of I/R (Fig. 1C). I/R experiments led to a rapid increase of GLP-1 plasma levels (Figures 2A and 2B). As shown in Fig. 2A, reperfusion of the mesenteric artery for 2 hours after 20 minutes of ischemia led to a raise of GLP-1 plasma levels. More notably, this increase was significant after only 15 minutes of reperfusion. Shorter times of ischemia (< 20 minutes) were still able to induce GLP-1 secretion (Fig 2B).

It is revealed that after mesenteric ischemia-reperfusion, GLP-1 secretion precedes I-FABP secretion (Figure 3) and markers of inflammation, such as IL-1b, IL-6, TNF-a (Figure 4). In contrast to I-FABP, a short I/R
5 treatment was sufficient to induce a significant plasma GLP-1. Moreover, after mesenteric ischemia-reperfusion, GLP-1 secretion is quantitatively more important than that of I-FABP (Figure 3).

These results show that, compared with I-FABP, GLP-1 is more sensitive and can be used as biomarker for diagnosing gut barrier injury at
10 more early stage.

Claims

1. An *in vitro* diagnostic method for diagnosing at an early stage an intestinal ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia, which comprises:
 - 5 (i) determining in a biological sample from said patient the circulating glucagon-like peptide 1 (GLP-1) level,
 - (ii) comparing said level with the circulating glucagon-like peptide 1 level in a reference sample,wherein the increase of said level in the patient is indicative of said
10 patient suffering from intestinal ischemia.

2. The method according to claim 1, wherein the intestinal ischemia is mesenteric ischemia-reperfusion, especially acute mesenteric ischemia, chronic mesenteric ischemia, or ischemic colitis, or a disease
15 or trouble linked to gut barrier.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the biological sample is a blood plasma sample.

- 20 4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein the level of circulating glucagon-like peptide 1 is determined by the means of an immunoassay.

5. The method according to claim 4, wherein said immunoassay is ELISA.

- 25 6. The method according to any one of claims 1 to 5, wherein the reference sample is a biological sample from a healthy subject.

7. Use of a reagent capable of detecting the level of circulating glucagon-like peptide 1 for diagnosing *in vitro* at an early stage an intestinal
30 ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia.

8. The use according to claim 7, wherein the reagent is an antibody directed against glucagon-like peptide 1.

9. Use of a kit of ELISA containing an antibody directed against glucagon-like peptide 1 for diagnosing *in vitro* at an early stage an intestinal ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia.

Abstract

The present invention concerns an *in vitro* diagnostic method for diagnosing at an early stage an intestinal ischemia in a patient suspected of suffering from intestinal ischemia.

1/3

Figure 1A

Sham

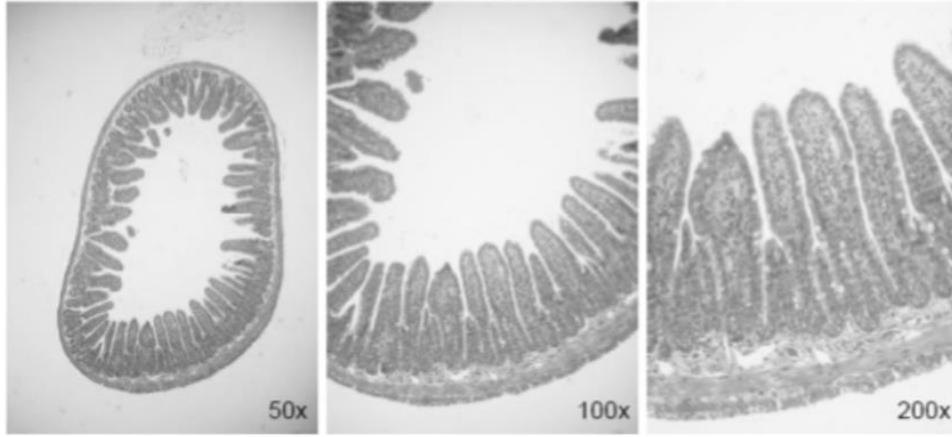


Figure 1B

20 min ischemia+ 15 min reperfusion

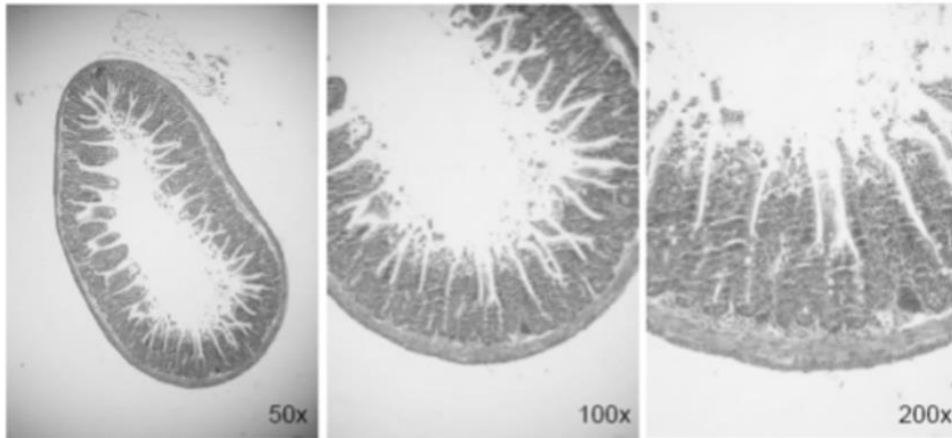
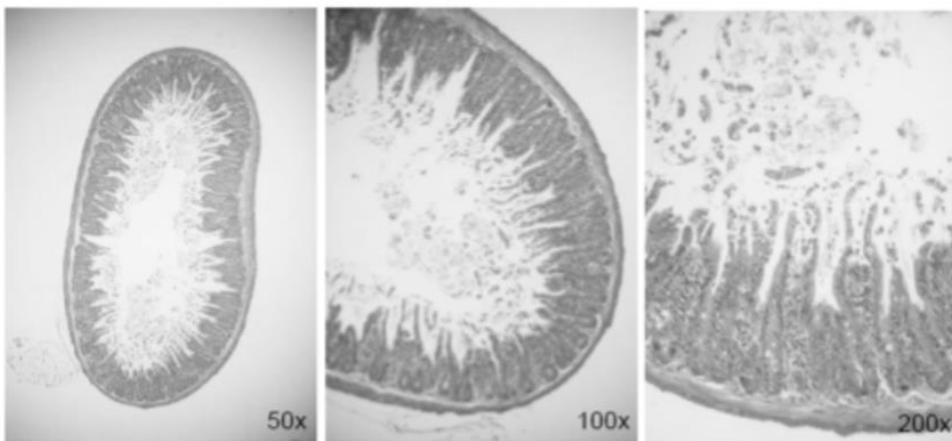


Figure 1C

40 min ischemia+ 15 min reperfusion



2/3

Figure 2A

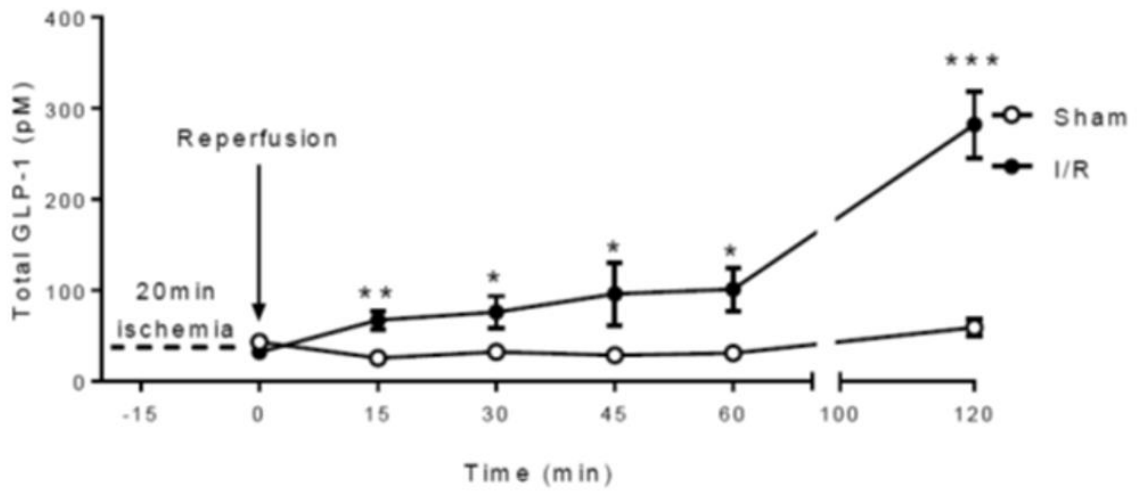


Figure 2B

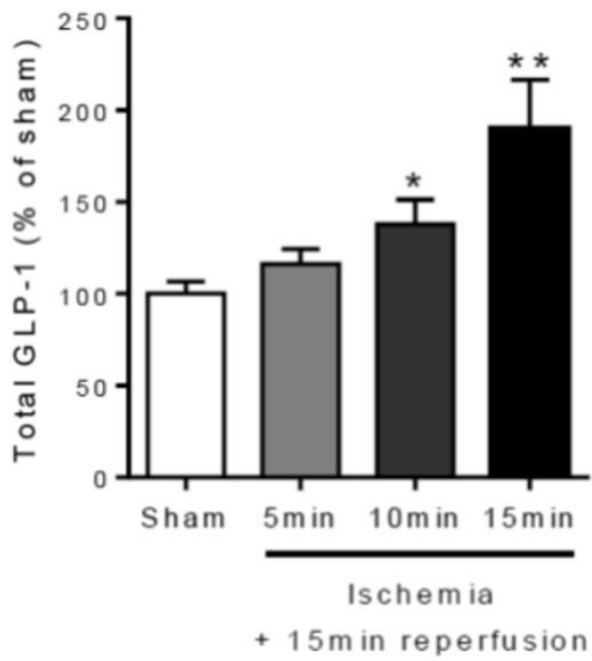


Figure 3

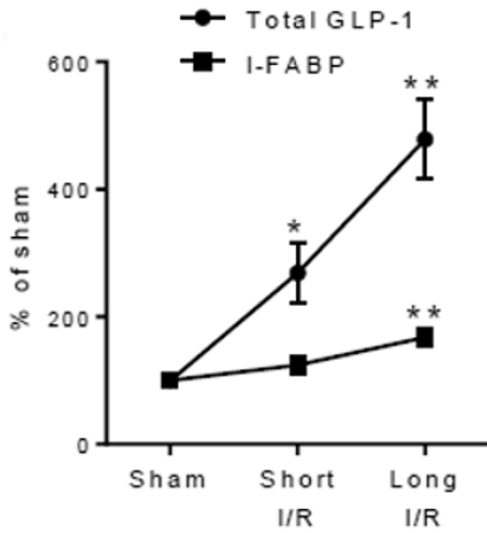


Figure 4

