

### Axe intestin-cerveau et régulation de la satiété chez l'obèse: étude de l'origine de l'endotoxémie métabolique et de son rôle sur la physiologie du nerf vague dans un modèle d'obésité induite par un régime occidental chez le rat

Mathilde Guerville

#### ► To cite this version:

Mathilde Guerville. Axe intestin-cerveau et régulation de la satiété chez l'obèse : étude de l'origine de l'endotoxémie métabolique et de son rôle sur la physiologie du nerf vague dans un modèle d'obésité induite par un régime occidental chez le rat. Science des productions animales. Agrocampus Ouest, 2016. Français. NNT : 2016NSARB288 . tel-01636622

### HAL Id: tel-01636622 https://theses.hal.science/tel-01636622

Submitted on 16 Nov 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.

# UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

# AGRO CAMPUS

### Mathilde GUERVILLE • 6 décembre 2016

Thèse AGROCAMPUS OUEST sous le label de l'Université de Bretagne Loire pour obtenir le grade de **DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST** Spécialité Biologie et Agronomie ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS) LABORATOIRE D'ACCUEIL • UR1341 ADNC Alimentation et adaptations digestives, nerveuses et comportementales

Axe intestin-cerveau et régulation de la satiété chez l'obèse : étude de l'origine de l'endotoxémie métabolique et de son rôle sur la physiologie du nerf vague dans un modèle d'obésité induite par un régime occidental chez le rat

#### Vincent RIOUX

OUEST

Professeur, AGROCAMPUS OUEST, USC AO Biochimie / président

#### André BADO

Directeur de recherche, UMR1149 CRI, Paris / rapporteur Vassilia THEODOROU

Professeur, UMR1331 Toxalim, Toulouse / rapporteur

#### Caroline ANINAT Maître de conférences, UMR Numecan, Rennes / examinatrice Jean-Pierre SEGAIN

Directeur de recherche, UMR PHAN 1280, Nantes / examinateur Gaëlle BOUDRY

Chargée de recherche, INRA ADNC Rennes / directrice de thèse

# Remerciements

Je remercie tout d'abord le Docteur André Bado et le Professeur Vassilia Théodorou d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Docteur Caroline Aninat et Docteur Jean-Pierre Segain d'avoir accepté de relire et d'évaluer la version finale de ce rapport de thèse comme examinateurs. Enfin, je tiens à remercier le Professeur Vincent Rioux d'avoir accepté d'être le président de jury.

Merci aussi aux Docteur Véronique Douard, Docteur Patrick Herpin, Docteur Gwenola Le Dréan, et Docteur Mavlyne Rolli-Derkinderen d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse, pour les échanges enrichissants et leurs conseils durant ces trois années. Enfin, je remercie également le Docteur Bernard Fromenty d'avoir été mon tuteur universitaire mais également pour ses conseils scientifiques.

Un très grand merci et un simple merci ne sera pas suffisant à ma directrice de thèse le Docteur Gaëlle Boudry. Je la remercie de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse, de m'avoir formée et fait découvrir et apprendre le métier de chercheur. Je la remercie également pour sa confiance et la grande autonomie qu'elle a pu m'accorder pendant ces trois ans. Merci d'avoir été si accessible et réactive dans tous les domaines, du labo jusqu'à la course à pied !

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe ADNC à St Gilles pour leur bonne humeur, leur attention, leur gentillesse et leur aide précieuse pour ce travail de thèse. Merci à Sophie Blat, Armelle Cahu, Nicolas Coquery, Stéphanie Ferret-Bernard, Michèle Formal, Nicole Gueguen, Sylvie Guérin, Régis Janvier, Laurence Le normand, Isabelle Luron, Paul Meurice, Isabelle Nogret, Gwenaëlle Randuineau, Véronique Romé et David Val-Laillet. Merci pour votre bonne humeur et pour les debriefs précieux de l'actualité footballistique et du programme télé !

Je tiens à remercier les étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant ces 3 ans : Anaëlle, Anaïs, Adelaïde et Angélique qui m'ont surtout beaucoup aidé au labo et à l'animalerie pour ce travail de thèse.

Je remercie également mes collègues doctorants et tout particulièrement Cindy LeBoursicot. On a partagé nos galères de thèse ensemble mais on en est venu à bout ! Je te souhaite plein de réussite! Sans oublier Marion, Alexis, Ying et Yentl à qui je souhaite plein de courage pour finir leur thèse. Je remercie également les anciens qui ont déjà probablement oublié l'INRA : Marion, Pauline, Juliette et Charlène.

I would like to thank Dr Helen Raybould for hosting me in your lab. This stay abroad has been very rewarding both professionally and personally. I would like to thank Kristina Hamilton for her great help in Davis, for our long discussions about differences between French and American people ! Merci à Charlotte Ronveaux pour m'avoir appris tout ce que tu savais sur le nerf vague et pour ta gentillesse à toute épreuve ! Thank you Ricky Stephens for your great help in the lab, I miss working with you in a lab ! Finally, I would like to thank all my friends I have made in Davis, especially Isolde, Niamh and Jaime !

Je tiens également à remercier mes parents et mes frères qui même loin m'ont soutenu tout au long de ces trois ans. Un merci particulier à Emilie et mes parents qui ont fait toute la relecture des fautes d'orthographe du manuscrit. Merci à tous mes amis et en particulier à Claire qui a toujours été la quand il le fallait !

# Liste des communications

### Articles

- Guerville M, Boudry G (2016) Gastro-intestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation.

AJP Gastrointestinal and Liver Physiology 311, G1-G15.

- Guerville M, Leroy A, Sinquin A, Laugerette F, Michalski MC and Boudry G. Western diet consumption alters LPS intestinal handling leading to metabolic endotoxemia. *Soumis à AJP-Endocrinoly and Metabolism*
- Guerville M, Hamilton KM, Ronveaux CC, Ellero-Simatos S, Boudry G and Raybould HE.
  Consumption of synthetic diets irrespective of fat content and fiber type induces loss of CCK sensitivity in vagal afferents neurons.

En préparation

### **Communications orales**

- Guerville M\*, Leroy A, Sinquin A, Laugerette F, Michalski MC and Boudry G. Transient overconsumption induced by a Western diet in rats is essential to the control of metabolic endotoxemia via regulation of LPS intestinal translocation. International congress of obesity 2016, Vancouver, Canada. 03/05/2016
- Guerville M\*, Leroy A, Sinquin A, Laugerette F, Michalski MC and Boudry G. L'hyperphagie transitoire lors de la consommation d'un régime de type occidental est nécessaire au contrôle de l'endotoxémie métabolique à moyen terme chez le rat. 34ème congrès CECED (Club d'Etudes des Cellules Epitheliales Digestives), Lille. 11/03/2016
- Guerville M\*, Sinquin A, Laugerette F, Michalski MC and Boudry G. Relation entre hyperphagie et troubles métaboliques associés à l'obésité chez le rat. Journée des doctorants Numecan, Rennes 15/01/2016
- Présentation lors de la finale régionale (Bretagne) « ma thèse en 180 secondes ». Brest 07/04/2016

### Communications affichées

- Guerville M\*, Laugerette F, Michalski MC and Boudry G. Impact d'un régime obesogène sur la prise en charge intestinale du lipopolysaccharide.
  - Journées francophones de Nutrition, Marseille, Décembre 2015.
  - Journée des doctorants INRA Saint-Gilles, 19 avril 2016

# Liste des formations

- *Mister :* Maitriser l'Information Scientifique et Technique en Recherche 17-18 décembre 2013, Le Rheu
- *Rédaction scientifique en anglais* 15 au 17 janvier 2014 au Rheu
- Formation expérimentation animale niveau 1
  16-28 juin 2014 à Caen
- Ecole d'été INRA « Alimentation Humaine »
  8-10 Juillet 2014 à Saint-Brévin
- Formation technique PCR
  16-20 Novembre 2015 à Rennes
- *Participation à la journée après-thèse* 23 novembre 2015 à Rennes
- Participation aux Doctoriales de Bretagne
  4-6 avril 2016 à Brest
- Membre du comité d'organisation du 6<sup>ème</sup> forum docteurs-entreprises Bretagne
  Janvier-Septembre 2016 à Rennes

#### Dans le cadre de l'Ecole Internationale de la Recherche d'Agreenium :

- Séminaire « Les réponses de la recherche aux enjeux du changement climatique » Toulouse 24-28 Avril 2014
- Séminaire « La forêt dans les territoires, risques et enjeux » Nancy 12-15 Avril 2015
- 1h de coaching d'orientation professionnelle
  Danièle Veret Directrice d'un cabinet de recrutement

# Sommaire

Liste des abréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	5
Avant-propos	7
Chapitre 1 : Obésité et endotoxémie métabolique	9
1 L'obésité	9
1 1 Définition prévalence et mesure de l'obésité	9
1.2. Causes de l'obésité	9
1.3. Obésité et comportement alimentaire	10
1.3.1. Troubles du comportement alimentaire	10
1.3.2. Changement du rythme alimentaire	11
1.4. Complications métaboliques associées à l'obésité	13
2. L'obésité : une maladie inflammatoire	14
2.1. Inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité	14
2.2. Une des conséquences de l'inflammation : la résistance à l'insuline	15
2.2.1. Généralités	15
2.2.2. Les mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline	16
2.2.3. Conséquences de l'inflammation et de l'insulino-resistance au niveau hépatique	16
3. L'endotoxémie métabolique	17
3.1. Premières hypothèses	17
3.2. Utilisation de modèles déficients pour des molécules de signalisation de TLR4	18
3.3.1. Endotoxémie et consommation d'un régime obésogène	19
3.3.2. Endotoxémie et obésité	20
3.4. Variabilité des valeurs de LPS	21
3.5. Autres marqueurs d'endotoxémie	21
3.5.1. La LBP	22
3.5.2. sCD14	23
4. Implication du LPS dans le développement de l'obésité	24
4.1. Au niveau du tissu adipeux	24
4.2. Sur le comportement alimentaire	25
Chapitre 2 : Mécanismes intestinaux et hépatiques limitant l'entrée et la diffusion du LPS dans l'organisme	27
Chapitre 3 : Les mécanismes de prise en charge du LPS sont-ils modifiés lors	s de $43$
1 Modulation du microbiota	+J
	43

1.1. Premières études montrant l'importance du microbiote dans l'obésité	
1.2. Le concept de dysbiose lors de l'obésité	
1.3. Nouvelles méthodes d'analyses du microbiote et obésité	
1.4. Quantité de LPS dans la lumière intestinale	
2. Mécanismes de protection au niveau de la muqueuse	
2.1. Mucus	
2.2. Phosphatase alcaline intestinale (IAP)	
2.3. Peptides antimicrobiens (AMPs)	49
3. Neutrophiles polynucléaires	50
3.1. BPI	50
3.2. Lactoferrine	50
4. Perméabilité intestinale et régime obesogène	
4.1. Méthodes pour mesurer la perméabilité intestinale	
4.2. Obésité et barrière intestinale	52
4.3. Consommation d'un régime hyperlipidique et barrière intestinale	
4.4. Mécanismes possibles	53
4.5. Perméabilité intestinale spécifique au LPS	
4.6. Passage postprandial via les chylomicrons	55
5. Prise en charge hépatique	
5.1. Enzymes hépatiques de détoxification du LPS	
5.2. Bile	
5.2.1. Métabolisme de la bile et des acides biliaires	
5.2.2. Composition et excrétion de bile pendant l'obésité	58
5.3. Prise en charge plasmatique : Lipoprotéines	58
Chapitre 4 : Régulation de la prise alimentaire	60
1. Notion de balance énergétique	60
2. Structures centrales impliquées dans le contrôle de la balance énergétique	
2.1. L'hypothalamus	
2.1.1. Le novau arqué (ARC)	
2.1.2. Autres novaux hypothalamiques	
2.2. Régions extra-hypothalamiques	
3. Les principales hormones impliquées dans la régulation de la PA	
3.1. Les cellules entéroendocrines – détection des nutriments	
3.2. L'hormone orexigène majeure: la ghréline	
3.3. Hormones maieures de la satiété	
3.3.1. Cholécystokinine	
3.3.2. Le peptide YY	
3.3.3. Dérivés du pré-pro-glucagon	
3.3.4. La leptine	
•	

3.3.5. Polypeptide pancréatique (PP)	. 68
3.3.6. Insuline	. 68
4. L'obésité et la régulation de la PA	. 68
4.1. La ghréline	. 68
4.2. Cholécystokinine	. 70
4.3. Peptide YY	. 70
4.4. Polypeptide pancréatique	. 70
4.5. Dérivés du pré-pro-glucagon	. 71
4.6. Leptine et résistance à la leptine	. 71
5. Rôle spécifique du nerf vague dans la régulation de la prise alimentaire	. 73
5.1. Anatomie et physiologie du nerf vague	. 73
5.2. Neuropeptides et nerf vague	. 74
5.3. Implication du nerf vague dans le contrôle de la prise alimentaire	. 75
5.3.1. Plasticité des VANs en fonction du statut nutritionnel	. 75
5.4. Dysfonctionnement des VANs lors de l'obésité	. 77
5.4.1. Diminution de la sensibilité aux signaux mécaniques	. 77
5.4.2. Résistance aux hormones intestinales	. 77
5.4.3. Quels sont les facteurs pouvant modifier la physiologie des VANs lors de l'obésité ?	. 78
Chapitre 5 : Modèles d'étude de l'obésité	81
1. Animaux génétiquement obèses et transgéniques	. 81
1.1. Déficience en leptine	. 81
1.2. Mutations au niveau des peptides régulant la prise alimentaire	. 81
1.3. Obésité génétique et endotoxémie métabolique	. 82
2. Induction de l'obésité par un régime obésogène	. 82
2.1. Différents régimes et modèles animaux	. 82
2.2. Les régimes enrichis en glucides :	. 83
2.3. Régime riche en lipides et en glucides.	. 83
2.4. Variabilité de la réponse au régime obesogène	. 84
3. L'importance du régime témoin	. 85
Objectifs de thèse	87
Article 1	89
Article 21	.22
Article 31	38
Discussion1	55
Conclusion1	.71
Perspectives 1	.73
Références1	75

# Liste des abréviations

AB : acide biliaire AGL : acides gras libres AgRP : Agouti-gene related peptide AGV : acides gras volatiles ALP : alkaline phosphatase AMPs : anti-microbial peptides AOAH : Acyloxylacylhydroxylase ARC: noyau arqué ASBT/IBAT: apical sodium dependent bile acid transporter BED : binge-eating disorders BEI : barrière épithéliale intestinale BHE : barrière hémato-encéphalique **BPI** : permeability-increasing protein CA : acide cholique CART : cocaïne and amphetamine regulated transcript CCK : cholécystokinine CD14 : Cluster of differentiation 14 CDCA : acide chénodésoxycholique **CREB:** C-AMP Response Element-binding protein CV : conventionnel CYP7A1 : cholestérol-α-hydroxylase DBT2 : diabète de type 2 DCA : acide déoxycholique Defa: defensin DIO : diet-induced obesity EEC : cellules entéroendocrines EGR-1: early growth response protein 1 EOPS : exempt d'organisme pathogène spécifique FD4 : FITC-dextran 4 FGF15 : fibroblast growth factor 15 FGFR4 : fibroblast growth factor 15/19 receptor 4 FXR : farnesoid x receptor GAP : goblet-cell associated passage GF : germ-free GHSR : growth hormone secretagogue receptor GIT : gastro-intestinal tractus GLP-1 : glucagon like peptide 1 GLP-2 : glucagon like peptide-2 GOAT : ghréline O-acyl-transferase GHSR :growth hormon secretagogue receptor HDL : high density lipoprotein HFD : high fat diet HRP: Horseradish peroxidase IAP : intestinal alkaline phosphatase IEC: Intestinal epithelial cells

IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ IL: interleukin IMC : indice de masse corporelle KO: knock-out LAL : limulus amebocyte lysate LBP : lipopolysaccharides-binding protein LFD : low fat diet LPS : lipopolysaccharides LXR : liver X receptor LyzC : lysozyme C MCH: melanocortin concentrating hormone MCP-1 : monocyte chimioattractant protein MCH : melanin concentrating hormone Myd88 : myeloid differentiation primary response gene 88 NAFLD : non alcoholic fatty liver disease NASH : nonalcoholic steatohepatitis NF $\kappa$ B : nuclear Factor  $\kappa$  B NMDA: n-méthyl-D-aspartate NPY : neuropeptide Y NTS: noyau du tractus solitaire OB-P: obesity-prone OB-R : obesity-resistant OMS : organisation mondiale de la santé PA : prise alimentaire PAI : plasminogen activator inhibitor Pla-2 : phospholipase A2 POMC : pro-piomélanocortine PP : polypeptide pancréatique PPAR- $\gamma$ : peroxisome proliferator activated receptor-y PTP1b: protein tyrosine phosphatase 1B PXR : pregnane X receptor PYY : peptide YY Reg3- $\beta$ : regenerating islet-derived protein- $\beta$ Reg3- $\gamma$ : regenerating islet-derived protein- $\gamma$ RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction SHP : small heterodimer partner SNC : système nerveux central SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3 SR-B1 : scavenger receptor B1 STAT : signal transducer and activator of transcription TA : tissu adipeux TCA : troubles du comportement alimentaire TG : triglycerides TLR4: Toll-like receptor 4 TNF-α: tumor necrosis factor-α VAN : vagal afferent neurons WD : western diet

## Liste des figures

#### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Principales causes de l'obésité

Figure 2 : Mécanismes impliqués dans l'installation de l'inflammation chronique de bas-grade dans l'obésité.

Figure 3 : Effets du LPS sur l'intestin, le tissu adipeux, le foie, le cerveau et le nerf vague

Figure 1 (Revue publiée) : Organisation de la membrane des bactéries Gram-négatif et structure des LPS.

Figure 2 (Revue publiée) : Voies possibles de transport des LPS à travers l'intestin grêle et le gros intestin.

Figure 3 (Revue publiée) : Schéma récapitulatif des mécanismes limitant l'entrée et la dissémination des LPS dans le système circulatoire.

Figure 4 : La modulation de l'expression génique des AMPs est dépendante du site intestinal considéré.

Figure 5 : Schéma simplifié des voies de synthèse des acides biliaires.

Figure 6 : Schéma du cycle enterohépatique

Figure 7 : Schéma récapitulatif du chapitre 3

Figure 8 : Schéma représ entant l'axe intestin-cerveau. Les hormones synthétisées par la périphérie interagissent avec les neurones de l'ARC.

Figure 9 : Cascade de signalisation de la leptine.

Figure 10 : Anatomie et organes innervés par le nerf vague

Figure 11 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la plasticité du nerf vague suivant l'état suivant l'état nutritionnel.

Figure 12 : Hypothèse d'altération de la physiologie du nerf vague lors de l'obésité

Figure 13 : Utilisation de régimes « Chow » vs synthétiques dans 35 articles provenant de Cell Metabolism, Diabetes, The Journal of Clinical Investigation, Nature et Nature Medicine.

#### **ARTICLE 1 :**

Figure 1 : Phénotype d'obésité et fonction hépatique

Figure 2 : Endotoxémie

Figure 3 : Composition du microbiote caecal

Figure 4 : Morphologie des cellules à mucus de l'iléon

Figure 5 : Perméabilité iléale et caecale

Figure 14 : Effets d'un régime obesogène avec ou sans hyperphagie sur l'expression de LXR, PXR,

FXR, TGR5, FGF15/19 et ASBT au niveau de l'iléon distal.

Figure 15 : Effets d'un régime obesogène avec ou sans hyperphagie sur l'expression de LXR, PXR, FXR, TGR5 au niveau du caecum.

Figure 16 : Effets d'un régime obesogène avec ou sans hyperphagie sur l'expression de LXR, PXR, FXR, TGR5, Cyp7A1et SR-B1 au niveau du foie.

#### **ARTICLE 2 :**

Figure 1: Evolution du gain de poids et de la prise alimentaire

Figure 2: Index d'adiposité et poids des tissus adipeux mésentériques, retropéritonéaux et épididymaux.

Figure 3: Analyse métabolomique par RMN du contenu caecal de rats nourris avec un régime synthétique *vs* chow.

Figure 4: Analyse métabolomique par RMN du contenu caecal de rats nourris avec un régime LFC, LFI, HFC et HFI.

Figure 5: Poids du caecum et du contenu caecal

Figure 6: Activité caecale de l'IAP

Figure 7: Sensibilité à la CCK

#### ARTICLE 3 :

Figure 17 : Caractérisation du modèle d'endotoxémie métabolique -

Figure 18 : Effet d'un régime obésogène pendant 1 et 6 semaines sur les expressions géniques de protéines de signalisation du LPS : TLR4 et MD2 ainsi qu'une cytokine pro-inflammatoire MCP-1, de récepteurs aux hormones intestinales : CCK-1R, Y2-R et CNR1 et de protéines inhibitrices de la signalisation de la leptine : PTP1b et SOCS3.

Figure 19 : Expression protéique de PTP1b dans le ganglion noueux - Article 2

Figure 20 :Effet d'injections quotidiennes pendant 7 jours ou aigue sur le gain de poids, l'index adiposité et l'ingéré moyen (g/jour).

Figure 21 : Effet d'injections quotidiennes pendant 7 jours de LPS (100µg/kg/jour) ou aigüe

(100µg/kg) sur l'expression protéique de PTP1b

Figure 22 : Impact du LPS sur l'expression de SOCS3 et PTP1b sur des cultures primaires de nerf vague.

#### DISCUSSION

Figure 23 : Différentes phases de l'obésité

Figure 24 : Cinétique de gain de poids et de prise alimentaire similaire dans nos deux modèles d'obésité induite par la consommation chronique d'un régime obésogène.

Figure 25: Perméabilité intestinale de rats nourris avec un régime Chow, SD-LF et SD-HF pendant 1 semaine.

Figure 26 : Proportion de séquences impliquées dans la biosynthèse de LPS dans le microbiote caecal de rats nourris avec un régime C ou WD pendant 1, 3 et 6 semaines.

Figure 27: La composition du microbiote intestinal est différente selon site intestinal.

Figure 28 : Transport de LPS à travers les cellules intestinales de l'intestin grêle. Images obtenues grâce à la technique d'imagerie *in vivo*.

Figure 29: Prise alimentaire (Kcal/j) des ratsnourris ad libitum avec un régime standard, western diet ou WD supplémenté avec de l'inuline et de rats nourris avec western diet en pair-feeding pendant 1 semaine.

Figure 30 : La prise alimentaire de la première semaine est prédictive du gain de poids à 6 semaines.

Figure 31 : Effet de la consommation d'un régime obésogène pendant 1,2 ou 4 jours sur la prise alimentaire, l'endotoxémie et la perméabilité au LPS.

Figure 32 : Perméabilité au LPS après une semaine de régime obésogène.

Figure 33 : Niveau protéique de CKK dans l'intestin de souris conventionnelles (NORM) et GF après une nuit de jeune.

Figure 34 : Expression protéique de PTP1b dans l'hypothalamus et le ganglion noueux de rats chow injectés en intra-péritonéal avec du sérum physiologique ( 400µl) ou de la leptine (80ug/kg de poids).

Figure 35: Expression protéique de PTP1b dans l'hypothalamus (A) et le ganglion noueux (B) de rats

chow, HFC, LFC, HFI, LFI (résumé en régime synthétique) injectés en intrapéritonéal avec du sérum physiologique ou de la leptine (80ug/kg de poids).

Figure 36 : Schéma général de thèse

### Liste des tableaux

#### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Indice de masse corporelle et signification

Tableau 2 : Etudes sur l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez l'homme sain et obèse

Tableau 3 : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez la souris C57Blck6.

Tableau 4 : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez le rat.

Tableau 5 : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur la concentration de LBP dans le sang chez la souris et le rat.

Tableau 6 : Etudes sur l'impact de l'obésité sur la concentration plasmatique de LBP chez des souris génétiquement obèses

Table 1 (Revue publiée) : Affinités des principales protéines de transport du LPS

Tableau 7 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur le nombre de cellules à mucus, l'expression de muc2 dans l'intestin chez la souris et le ra

Tableau 8 : Etudes montran t l'impact de la consommation d'un régime obésogè ne sur l'activité de l'IAP dans l'intestin chez la souris et le rat.

Tableau 9 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'expression protéique ou génique d'AMPs dans l'intestin chez la souris

Tableau 10 : Etudes montrant l'impact de l'obésité sur la perméabilité intestinale mesurée en chambres d'Ussing.

Tableau 11 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la perméabilité intestinale mesurée *in vivo*.

Tableau 12 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la perméabilité intestinale mesurée en chambre d'Ussing.

Tableau 13 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la sécrétion de CCK chez l'animal et l'homme.

Tableau 14 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'expression génique de CCK1R chez l'animal.

Tableau 15 : Etudes montrant l'impact de l'obésité la production de PYY chez l'homme et l'animal

Tableau 16 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la sécrétion de PYY chez l'animal et l'homme.

Tableau 17 : Principaux récepteurs exprimés sur le nerf vague

Tableau 18 Physiologie intestinale et endotoxémie chez des animaux génétiquement obèses

Tableau 19 : Origines de nutriments des principaux régimes standard utilisés dans les études sur l'impact d'un régime obesogène chez le rongeur

#### **ARTICLE 1 :**

Table 1 : Séquences des primers utilisées dans cette étude

Table 2 : Expression génique de peptides anti-microbiens dans l'iléon et activité iléale et caecale de l'IAP.

Table 3 : Expression génique de TLR4, MD2, Myd88 et IL-1 $\beta$  dans le foie, le caecum et l'iléon chez les animaux nourris avec un régime C et WD pendant 6 semaines.

Table 4 : Expression génique d'enzymes hépatiques impliquées dans la détoxification du LPS

Table 5 : Expression génique de TLR4, MD2 et Myd88 dans le caecum et l'iléon chez les animaux nourris avec un régime C et WD pendant 1 semaine.

Tableau 20 : Séquences des primers utilisées dans l'étude

#### **ARTICLE 2 :**

Table 1 : Composition en ingrédients et en énergie du régime C.

Table 2 : Composition en ingrédients et en énergie des régimes synthétiques : LFC, HFC, LFI and HFI

Table 3. Métabolites significativement modifiés dans le contenu caecal d'animaux nourris avec des régimes synthétiques comparé à celui d'animaux nourris avec un régime chow.

Table 4. Métabolites significativement modifiés dans le contenu caecal d'animaux nourris avec des régimes synthétiques enrichis en inuline comparé à celui d'animaux nourris avec un régime synthétique enrichi en cellulose.

#### ARTICLE 3 :

Tableau 22 : Séquences des primers utilisées dans l'étude

#### DISCUSSION

Tableau 23 : Part d'implication de l'introduction du régime synthétique, du pourcentage de lipides dans le régime ou de l'obésité sur les principaux mécanismes intestinaux pouvant être impliqués dans la régulation de l'endotoxémie métabolique.

Tableau 24 : Récapitulatif des résultats obtenus dans l'article de Williams et collaborateurs.

# Avant-propos

L'augmentation importante de la prévalence de l'obésité dans le monde a incité l'Organisation mondiale de la santé (OMS) à la caractériser de véritable épidémie. L'OMS définit l'obésité et le surpoids comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». En plein essor, l'obésité touche aujourd'hui près de 650 millions d'adultes soit 13 % de la population mondiale adulte<sup>1</sup>. Le caractère pathologique de l'obésité est souvent attribué à la présence d'un nombre important de comorbidités telles que les maladies cardio-vasculaires, le diabète, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et les pathologies chroniques du foie. L'obésité, en plus de représenter un véritable problème de santé publique, est également un enjeu économique. En France, le coût de l'assurance maladie pour traiter l'obésité et ses maladies associées s'élèverait à près de 5 milliards d'euros. Parmi les recommandations pour prévenir et lutter contre l'obésité, la promotion d'une alimentation saine et de l'exercice physique reste la priorité pour les états membres de l'OMS. Dans ce contexte, la relation entre l'environnement alimentaire et le développement de l'obésité est une question essentielle de recherche.

L'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance entre les apports et les dépenses énergétiques. Pour maintenir cette homéostasie énergétique, l'hôte possède un système de régulation complexe reposant sur une communication inter-organes. Parmi ces interactions, l'axe intestin-cerveau est essentiel à la régulation de la prise alimentaire (PA) à court terme, i.e. dans l'initiation et la terminaison des repas. Les hormones sécrétées par l'intestin en réponse à l'absence de nutriments ou au contraire à l'ingestion d'un repas transmettent, entre autres, des signaux de faim ou de satiété au système nerveux central *via* la circulation sanguine et le nerf vague. Il a été suggéré que lors du développement de l'obésité ou une fois l'obésité installée, cet axe de régulation est perturbé, avec notamment une baisse des signaux de satiété conduisant à une élévation continue de la PA.

Lorsque la PA devient trop importante, les apports énergétiques sont supérieurs aux dépenses entraînant un déséquilibre de la balance énergétique. Cet apport superflu est stocké dans le tissu adipeux (TA) et, entrainant une augmentation de la masse grasse de l'individu. Lorsque les capacités de stockage du TA sont dépassées, la lipolyse se met en place et libère dans le sang une quantité importante d'acides gras libres (AGL) capables d'induire une réponse inflammatoire dans de multiples organes. Cet état inflammatoire généralisé, bien que de faible intensité, exerce de profondes complications métaboliques associées à l'obésité. Ainsi, alors que l'obésité a longtemps été considérée comme une maladie du TA uniquement, il est maintenant reconnu que ses complications métaboliques

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> "Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 populationbased measurement studies with 19.2 million participants" Lancet, 2016

et comportementales résultent d'une inflammation chronique perturbant la physiologie et la communication entre organes.

En parallèle de cette inflammation engendrée par les AGL, les recherches de ces dernières années ont mis en évidence l'implication forte du microbiote intestinal et de ses composés bactériens, les lipopolysaccharides (LPS) dans l'inflammation associée à l'obésité. En effet, *via* l'interaction avec leur récepteur spécifique toll-like receptor 4 exprimé de façon relativement ubiquitaire, les LPS sont capables d'engendrer une inflammation. Les travaux initiateurs de Cani et collaborateurs ont identifié les LPS comme déclencheurs de l'inflammation lors du développement de l'obésité. Cette élévation de l'endotoxémie observée lors de l'obésité induite par un régime obsogène est appelée «endotoxémie métabolique ». Cependant, les mécanismes expliquant pourquoi, lors du développement de l'obésité, les LPS sont capables de traverser la barrière intestinale et d'atteindre le système circulatoire ne sont pas encore totalement élucidés.

Une fois dans le sang, ces LPS engendrent une inflammation dans de multiples organes et pourraient être à l'origine des troubles métaboliques et comportementaux associés à l'obésité. Un nombre croissant d'études montre l'implication du microbiote dans les désordres centraux, laissant suggérer qu'une altération du microbiote associée à la présence de LPS dans le sang pourrait également être à l'origine des perturbations de la régulation de la PA, aggravant ainsi la prise de poids.

Dans ce contexte, comprendre par quelle(s) voie(s) les LPS traversent l'intestin et sont ensuite pris en charge seraient des atouts essentiels pour élaborer des stratégies de prévention efficaces contre les complications inflammatoires de l'obésité. De plus, approfondir les connaissances actuelles sur le potentiel rôle du microbiote et des LPS dans la régulation du comportement alimentaire pourrait permettre d'imaginer des méthodes efficaces pour limiter la PA excessive, point de départ et de pérennisation de l'obésité.

L'objectif de ma thèse était de répondre à ces questions. Pour y répondre, une première partie fera l'état des lieux des connaissances sur la régulation de l'endotoxémie et de la PA dans un contexte physiologique et d'obésité. Puis, les résultats à ces problématiques seront présentés et discutés dans une dernière partie.

	Indice de masse corporelle (kg/m²)
Maigreur	< 18.5
Corpulence normale	18.5-24.9
Surpoids	25.0-29.9
Obésité modérée	30.0 - 34.9
Obésité sévère	35-39.9
Obésité morbide	>40

Tableau 1 : Indice de masse corporelle et signification



Figure 1 : Principales causes de l'obésité

### Chapitre 1 : Obésité et endotoxémie métabolique

### 1. L'obésité

#### 1.1. Définition, prévalence et mesure de l'obésité

Selon l'OMS, l'obésité et le surpoids se définissent comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure simple couramment utilisée pour estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte. Il correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimé en kg/m<sup>2</sup>. Cette mesure permet une classification du poids, décrite dans le tableau 1, allant de l'insuffisance pondérale à l'obésité morbide. La prévalence de l'obésité entre 1980 et 2014 a plus que doublé au niveau mondial. En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids soit une moyenne de 39 % des adultes du monde entier. Sur ce total, 600 millions de personnes présentaient une obésité, représentant un pourcentage de 13 % de la population mondiale (Chiffres OMS 2014).

L'IMC est uniquement un rapport de proportionnalité entre le poids et la taille ne donnant aucune information sur la distribution du poids et ne distingue pas l'âge ou le sexe de l'individu. Il donne une indication approximative car il ne correspond pas forcément au même degré d'adiposité d'un individu à l'autre. Il est maintenant admis qu'indépendamment de l'IMC, l'excès de tissu adipeux (TA) au niveau de la cavité abdominale, appelé obésité androïde, est beaucoup plus néfaste pour la santé qu'une accumulation de masse graisseuse à niveau des hanches et des cuisses dit obésité gynoïde. Ainsi, il existe d'autres indicateurs qui renseignent de l'adiposité tels que le rapport tour de taille/tour de hanche qui chez une personne normo-pondérée se situe en dessous de 1 chez l'homme et en dessous de 0.85 chez la femme. Deux techniques permettent de renseigner de la localisation et de la quantité des dépôts graisseux contenus dans le corps : la tomodensitométrie (CT-scan) ou l'imagerie à résonance magnétique.

#### 1.2. Causes de l'obésité

L'obésité est une pathologie complexe qui résulte d'une interaction entre une multitude de facteurs génétiques et environnementaux (Figure 1). Les progrès en génétique ont permis de mettre en évidence l'importance du patrimoine génétique dans le développement de l'obésité. Bien que certains types d'obésité soient le résultat d'une mutation sur un gène unique (appelé obésité monogénique), ils ne représentent que 5 % des personnes obèses. Les formes les moins courantes d'obésité sont la résultante de prédispositions génétiques (causées par des variations au sein d'un grand nombre de gènes) associées à un environnement défavorable. En effet, la cause fondamentale du surpoids et de l'obésité

est étroitement liée à une alimentation hypercalorique associée à une réduction de la dépense énergétique.

D'énormes progrès scientifiques ont été réalisés ces dernières années sur la compréhension des causes et des conséquences de l'obésité. Pour approfondir ces connaissances, les études ont souvent recours à l'utilisation de modèles animaux développant les symptômes se rapprochant au plus de ceux retrouvées chez l'homme obèse. De par sa similitude sur de nombreux systèmes physiologiques avec l'homme et sa facilité d'élevage, le rongeur est l'animal le plus utilisé en expérimentation animale. Chez le rongeur, certaines souches sélectionnées génétiquement développent spontanément une obésité. La consommation d'un régime obesogène, généralement riche en lipides et pauvre en fibres induit également une obésité. Ces modèles d'études seront détaillés dans le chapitre 5.

#### 1.3. Obésité et comportement alimentaire

#### 1.3.1. Troubles du comportement alimentaire

Bien que les troubles du comportement alimentaire (TCA) soient considérés comme des désordres d'ordre psychiatrique et l'obésité définie plutôt comme un trouble métabolique, des corrélations peuvent être établies entre ces maladies.

Les TCA les plus retrouvés lors de l'obésité sont les compulsions alimentaires (BED pour Binge-Eating Disorders), qui se définissent par au moins un épisode par semaine de consommation excessive et incontrôlée de nourriture. A l'inverse de la boulimie nerveuse, le BED n'est pas associé à un comportement de compensation tel que des vomissements (Cuzzolaro, 2016). Selon une étude récente sur 502 patients obèses ou en surpoids (IMC>25 kg/m<sup>2</sup>), 8,5% présentaient des BED (Ivezaj *et al.*, 2016). De plus, les personnes obèses atteintes de BED présenteraient un profil métabolique et inflammatoire plus sévère que les personnes obèses sans BED (Succurro *et al.*, 2015). En conséquence, ces personnes auraient tendance à présenter un IMC plus important et à développer plus facilement des troubles psychiatriques (Cuzzolaro, 2016).

Certaines personnes obèses présentent également des épisodes de consommation excessive de nourriture mais sans perte de contrôle, appelé épisodes d'hyperphagie (Cuzzolaro, 2016). Bien que ce TCA puisse contribuer au développement de l'obésité dans certains cas, c'est surtout un syndrome caractéristique d'une maladie génétique : le Syndrome de Prader-Willi (Irizarry *et al.*, 2016).

Les phénomènes d'hyperphagie, de BED et de boulimie peuvent être considérés, dans certains cas, comme des troubles du système de la récompense. En effet, les personnes obèses présenteraient une diminution de l'activation du système de la récompense (Burger *et al.*, 2011). Ainsi, elles auraient besoin de consommer une quantité d'aliments plus importante pour arriver à une activation du système de la récompense suffisante (Burger *et al.*, 2011). Par ailleurs, la ghréline et la leptine, hormones

participant à la régulation de l'homéostasie énergétique décrite dans le chapitre 4, semblent également jouer un rôle dans l'activation de ce système de la récompense, soulignant les relations étroites entre les troubles métaboliques et psychiatriques (Singh, 2014).

Enfin, les prises alimentaires nocturnes (NES pour Night Eating Syndrome) sont définies par la triade : anorexie matinale, hyperphagie durant la nuit et insomnie (Cuzzolaro, 2016). Comparées à des personnes normo-pondérées, les personnes obèses ou en surpoids présentent une prévalence plus élevées de NES (de 12 à 64% chez les personnes obèses) (Gallant *et al.*, 2012). Cependant, les corrélations entre prise de poids et NES ne sont pas retrouvées dans toutes les études notamment dû au fait du manque d'homogénéité dans les critères de diagnostic (Gallant *et al.*, 2012). La perturbation du rythme circadien induite par ces prises alimentaires nocturnes peut également participer au développement de l'obésité (Gallant *et al.*, 2012).

#### 1.3.2. Changement du rythme alimentaire

Le changement de rythme alimentaire i.e. la fréquence à laquelle les repas sont consommés, est également un trouble important du comportement alimentaire chez l'obèse.

#### a) <u>Chez l'homme</u>

Pour mesurer la prise alimentaire (PA) chez l'homme, les études utilisent des questionnaires à remplir par les participants qui peuvent sur ou sous-estimer l'apport alimentaire. Ainsi, les études sont difficiles à conduire et les résultats très hétérogènes. C'est pourquoi l'association entre fréquence de repas et maladies métaboliques associées à l'obésité n'a pas été retrouvée dans toutes les études (Hutchison *et al.*, 2016). Cependant, une étude récente sur près de 200 femmes suédoises a montré que les femmes obèses (IMC moyen à 41 kg/m<sup>2</sup>) consommaient en moyenne 6.1 repas/jour contre 5.2 repas/jour en moyenne chez les femmes normo-pondérées (IMC moyen= 23 kg/m<sup>2</sup>) (Berteus Forslund *et al.*, 2002). L'obésité serait ainsi associée à une augmentation du nombre de repas par jour.

#### b) Chez le rongeur

Chez le rongeur, l'utilisation de cages métaboliques i.e. cages mesurant, entre autres, la consommation de nourriture et d'eau pratiquement en temps réel, a facilité l'étude du comportement alimentaire lors de l'obésité. Les animaux sont alors placés dans ces cages et soumis soit à un régime obesogène soit standard.

Les résultats sont assez homogènes bien que différents sur certains points. En effet, alors que certaines études montrent que l'introduction d'un régime obesogène induit un phénomène d'hyperphagie i.e une surconsommation d'aliments, tout au long du traitement (Farley *et al.*, 2003; Winzell *et al.*, 2004; Wellman *et al.*, 2005; Pfluger *et al.*, 2008; Martire *et al.*, 2013), d'autres décrivent une hyperphagie
transitoire seulement les 3-4 premiers jours (Woods *et al.*, 2003; Melhorn *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2015). Dans ces études, l'hyperphagie transitoire est caractérisée par une augmentation de la taille des repas pendant la journée (Melhorn *et al.*, 2010). Après 3-4 jours d'hyperphagie, les animaux régulent leur prise alimentaire en diminuant l'apport en grammes pour correspondre à l'apport calorique des animaux nourris avec un régime standard (Woods *et al.*, 2003; Melhorn *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2015). L'hyperphagie semble avoir un impact important sur le développement de l'obésité puisque la prise alimentaire de ces premiers jours est corrélée à l'adiposité à une semaine (Melhorn *et al.*, 2010). De plus, chez les rats Sprague-Dawley nourris avec un régime obesogène, les animaux susceptibles à l'obésité (Cf chapitre 5 sur les modèles d'études) sont hyperphages tout au long de l'étude alors que les rats résistants à l'obésité ont une prise alimentaire (PA) similaire aux rats nourris avec un régime standard (Farley *et al.*, 2003; de La Serre *et al.*, 2010). Enfin, une autre étude montre des résultats encore différents avec une première phase d'hyperphagie pendant les 3 premiers jours, un retour à un ingéré normal puis une reprise de l'hyperphagie 5-6 semaines après le début du régime (de Lartigue *et al.*, 2011).

Avec ou sans hyperphagie, le rythme alimentaire est tout de même modifié par l'introduction d'un régime obesogène. La prise de poids serait la résultante d'une augmentation de la taille des repas associée, ou non selon les études, à une diminution du nombre de repas, plus particulièrement pendant la phase d'éveil (donc de nuit) (Warwick et al., 2000; Farley et al., 2003; Wellman et al., 2005; Melhorn et al., 2010; Martire et al., 2013). Chez des animaux sains, la consommation d'une solution enrichie en lipides augmente la quantité consommée comparée à une solution isocalorique enrichie en glucides, suggérant que l'élévation de la charge lipidique serait responsable de l'altération du rythme alimentaire plutôt que l'augmentation de la charge calorique (Warwick et al., 2000). De même, l'obésité ne semble pas être le facteur prédominant dans ces dérégulations du rythme alimentaire puisque chez des animaux Sprague-Dawley, les deux phénotypes obèses résistants (OB-R) et obèses prones (OB-P) présentent une diminution du nombre de repas lorsqu'ils sont soumis à un régime obésogène comparés aux rats nourris avec un régime standard (Farley et al., 2003). Cependant, les rats OB-P uniquement présentaient une augmentation de la taille des repas relativement aux rats OB-R et contrôles (Farley et al., 2003) Enfin, la consommation d'un régime Cafétéria (Cf chapitre 5 section 2.3) induit une augmentation du nombre de snacks, définis comme une PA non suivie d'une phase de repos, durant les premières phases de régime (5 semaines) qui se stabilise à 10 et 15 semaines au niveau des animaux nourris au régime standard (Martire et al., 2013). On peut également noter que suite à la consommation d'un régime hyperlipidique, la consommation d'eau durant la phase de nuit diminue (Wellman et al., 2005).

La régulation du rythme alimentaire semblerait impliquer la leptine, une hormone synthétisée majoritairement par le tissu adipeux et l'estomac qui diminue la PA (Cf Chapitre 4, section 3). En effet, la délétion du récepteur à la leptine au niveau des neurones afférents du vague induit une augmentation de la PA caractérisée par une augmentation du temps et de la taille des repas comparé à des animaux sauvages (de Lartigue *et al.*, 2014). De même, les animaux déficients pour le gène de la leptine, Rats Zucker et souris ob/ob, nourris avec un régime standard, consomment des repas plus gros mais à la même fréquence que les rats Zucker maigres ou les souris sauvages, respectivement (Ho *et al.*, 1988; Strohmayer *et al.*, 1994).

#### 1.4. Complications métaboliques associées à l'obésité

Outre ces perturbations du comportement alimentaire, le caractère pathologique de l'obésité est souvent attribué à la présence d'un nombre important de comorbidités définies cliniquement comme le syndrome métabolique. Les principales comorbidités de l'obésité sont les maladies cardio-vasculaires, l'hypertension artérielle, une dyslipidémie et une résistance à l'insuline. L'occurrence de trois de ces pathologies suffit pour diagnostiquer un syndrome métabolique.

Une des principales complications métaboliques de l'obésité est la résistance à l'insuline qui se définit comme l'incapacité des organes périphériques comme le foie, le muscle ou le TA à répondre efficacement à l'insuline. Cette complication contribue majoritairement à l'apparition du diabète de type 2 (DBT2). En 2014, 8,5 % des adultes dans le monde présentaient un diabète et le diabète de type 2 représenterait 90% des nouveaux diagnostics (OMS). Le DBT2 se définit comme une perturbation du métabolisme glucidique caractérisée par une élévation de la glycémie à jeun et en postprandial (van Greevenbroek *et al.*, 2013). A terme, le diabète peut entrainer des rétinopathies, accidents cardiovasculaires ainsi qu'une insuffisance rénale (van Greevenbroek *et al.*, 2013).

L'obésité est également associée à des complications hépatiques telles que la stéatose hépatique non alcoolique NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), maladie chronique du foie la plus courante dans les pays occidentaux. La NAFLD est une affection caractérisée par une accumulation excessive de lipides dans le foie sous forme de triglycérides (TG) appelée stéatose (Cohen *et al.*, 2011). La NAFLD peut évoluer vers la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) caractérisée par des lésions des cellules hépatiques ainsi qu'une inflammation (Cohen *et al.*, 2011). Par la suite, le foie est susceptible de développer une fibrose hépatique, cirrhose puis un hépato-carcinome (Cohen *et al.*, 2011).

En plus d'affections endocriniennes et hépatiques, les patients obèses peuvent également souffrir d'hypertension artérielle et possèdent des facteurs de risque d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque (Mandviwala *et al.*, 2016). Enfin, il a été montré que l'obésité pouvait être un facteur de risque pour le développement de certains types de cancer comme le cancer du sein (Allott *et al.*, 2015), de la prostate (Allott *et al.*, 2015), de l'endomètre (Laskey *et al.*, 2016) ou du colon (Pischon *et al.*,

2008). D'autres pathologies peuvent également apparaître comme des troubles respiratoires (Sebastian, 2013), des douleurs articulaires (Nourissat *et al.*, 2015) mais également des problèmes psychologiques (Lopresti *et al.*, 2013).

#### 2. L'obésité : une maladie inflammatoire

Les différents travaux de ces dernières années ont décrit l'obésité comme un état d'inflammation chronique de bas grade. La première étude mettant en évidence le lien entre inflammation et obésité a été conduite par Hotamisligil et collaborateurs en 1993. Ils ont montré que dans des modèles murins d'obésité ainsi que chez des personnes obèses, le gène codant pour une cytokine pro-inflammatoire le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) était surexprimé au niveau du TA et du muscle (Hotamisligil *et al.*, 1993) (Hotamisligil *et al.*, 1995; Kern *et al.*, 1995). De même, des souris déficientes pour TNF- $\alpha$  nourries avec un régime obésogène sont résistantes à l'obésité et à l'intolérance au glucose (Uysal *et al.*, 1997; Ventre *et al.*, 1997). Par la suite, de nombreuses études ont décrit l'obésité comme une inflammation chronique de bas grade ou méta-inflammation, caractérisée par une augmentation modérée de cytokines pro inflammatoires au niveau circulant mais sans signes cliniques d'inflammation soit de faible intensité comparée à la septicémie, elle exerce de profonds désordres métaboliques.

#### 2.1. Inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité

Le TA joue un rôle prépondérant dans le développement de l'obésité et de ses complications. Les recherches de ces dernières années ont montré qu'il exerçait une large variété de fonctions métaboliques, hormonales et immunitaires ayant des répercussions sur l'homéostasie générale. De par sa fonction première de stockage de graisses, le TA est fortement impliqué dans la physiopathologie de l'obésité et de la résistance à l'insuline.

Le TA est le site clé où interagissent les adipocytes, cellules sécrétrices d'un grand nombre d'adipokines, et les cellules effectrices du système immunitaire (Hotamisligil, 2006). L'inflammation d'un tissu est caractérisée par l'infiltration par des cellules immunitaires comme les neutrophiles, éosinophiles et macrophages dans le tissu. Dans les stades précoces de l'obésité, le TA doit s'agrandir pour augmenter ses capacités de stockage produisant, lors de ce processus, des signaux chimiotactiques qui conduisent au recrutement de macrophages (Wellen *et al.*, 2005). De plus, l'expansion du TA pourrait engendrer une hypoxie des adipocytes entrainant une augmentation de la nécrose de ces cellules induisant également l'infiltration de macrophages (Wellen *et al.*, 2005; Hotamisligil, 2006). Le TA de personnes obèses est donc caractérisé, lors d'observations histologiques, par une augmentation significative du nombre de « crown-like structure », structures en forme de couronne, qui représentent des macrophages entourant des adipocytes nécrosés (Hotamisligil,



**Figure 2 : Mécanismes impliqués dans l'installation de l'inflammation chronique de bas-grade dans l'obésité**. Le gain de poids est associé à des changements de la fonction des adipocytes induisant une augmentation de la sécrétion d'adipokines et des cytokines pro-inflammatoires. L'infiltration par les cellules immunitaires telles que les macrophages participe également à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

De (Castanon et al., 2014)

2006). La prévalence de ces crown-like structure est très fortement corrélée à l'inflammation dans le TA et aux troubles métaboliques liés à l'obésité.

Le TA a une capacité de stockage limitée. Une fois la limite dépassée, la lipolyse se met en place et libère dans le sang une quantité importante d'acides gras libres (AGL). Au niveau du TA, ces AGL sont capables de se lier avec le récepteur Toll-Like Receptor 4 (TLR4) et induire une réponse inflammatoire. Les cytokines pro-inflammatoires libérées vont à leur tour stimuler la lipolyse et augmenter la libération d'AGL, aggravant ainsi l'inflammation.

Lors de l'expansion du TA, le statut sécrétoire des adipocytes change, la production de leptine augmente tandis que celle d'adiponectine diminue. La leptine stimule la différentiation des monocytes en macrophages *in vitro* augmentant ainsi la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les cellules immunitaires (Gainsford *et al.*, 1996; Marti *et al.*, 2001; Khodabandehloo *et al.*, 2016). A l'inverse, l'adiponectine, inversement proportionnelle à la masse grasse, exerce des activités anti-inflammatoires puisqu'elle inhibe l'activation du facteur de transcription Nuclear Factor  $\kappa$ -B (NF $\kappa$ B) (Ghigliotti *et al.*, 2014; Khodabandehloo *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces mécanismes est schématisé en figure 2. Dans un deuxième stade, l'inflammation du TA se propage au niveau systémique et altère les fonctions physiologiques d'autres organes.

# 2.2. Une des conséquences de l'inflammation : la résistance à l'insuline

#### 2.2.1. Généralités

Cliniquement, le terme « résistance à l'insuline » représente une concentration supérieure à la normale d'insuline pour maintenir une glycémie normale. Lors de l'obésité, la résistance à l'insuline se manifeste par l'incapacité de l'insuline à stimuler le transport et le métabolisme du glucose dans le TA et le muscle associée à une perte de l'inhibition de gluconéogenèse hépatique. En présence d'insuline, la lipolyse est inhibée et le glucose remplace les acides gras (AG) comme substrat énergétique dans le muscle et le cœur. Chez la personne diabétique ou insulino-résistante, l'insuline n'exerce plus son action inhibitrice sur la lipolyse du TA, entraînant la libération d'AGL dans le sang et donc un apport constant de lipides dans différents organes tels que le muscle et le foie. L'ensemble de ces dérégulations provoque une hyperglycémie qui sera compensée par une surproduction d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. Cette hyper-insulinémie compensatoire durera quelques temps jusqu'à l'épuisement des cellules pancréatiques puis les premiers signes cliniques du DBT2 vont apparaître.

Concentration plasmatique LBP souris obèses	Concentration plasmatique WT	Méthodes	Ref
<u>Ob/Ob</u> 32 µg/ml 10.7 µg/ml	<u>C57blck</u> 12 μg/ml 5 μg/ml	HyCult Biotechnology	(Stenman <i>et al.</i> , 2013) (Naito <i>et al.</i> , 2011)
<u>Db/db</u> 9 μg/ml	<u>C57blck</u> 5 µg/ml	HyCult Biotechnology,	(Naito et al., 2011)

 Tableau 6 : Etudes sur l'impact de l'obésité sur la concentration plasmatique de LBP chez des souris génétiquement obèses

#### 2.2.2. Les mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline

Au niveau moléculaire, un défaut de la signalisation intracellulaire suite à la liaison de l'insuline avec son récepteur Insulin Receptor semble être la cause majeure de résistance à l'insuline (Khodabandehloo *et al.*, 2016). Physiologiquement, la fixation de l'insuline sur son récepteur stimule l'activité de diverses kinases qui phosphorylent des protéines Insulin Receptor Substrate au niveau des tyrosines, point de départ de la cascade de signalisation intracellulaire (Hotamisligil, 2006; Khodabandehloo *et al.*, 2016). Dans la majorité des cas de résistance à l'insuline chez l'homme et chez l'animal, un défaut de phosphorylation est observé (Wellen *et al.*, 2005), certains facteurs étant capables d'induire ces défauts de signalisation tels que les cytokines pro inflammatoires dont TNF- $\alpha$ (Aguirre *et al.*, 2000; Karin *et al.*, 2000; Hirosumi *et al.*, 2002) ainsi que les AGL (Hirosumi *et al.*, 2002).

## 2.2.3. Conséquences de l'inflammation et de l'insulino-resistance au niveau hépatique

L'hyperinsulinémie, causée par la résistance à l'insuline, augmente la lipogenèse hépatique, diminue l'oxydation des AGL et l'excrétion de lipoprotéines de faible densité transportant le cholestérol et les TG (Very low density lipoproteins VLDL). De plus, l'insulino-résistance supprime l'inhibition de la lipolyse du TA ce qui augmente le flux d'AGL qui seront estérifiés sous forme de TG et stockés au niveau hépatique (Dowman *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2014). De par ce fort afflux d'AGL associé à une baisse de l'oxydation, ces lipides seront stockés au niveau hépatique, c'est la stéatose (Dowman *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2015). La progression de la NAFLD en NASH dépend de nombreux facteurs tels que la production de cytokines pro inflammatoires et d'adipokines, de la présence de stress oxydatif et de dysfonctions mitochondriales interagissant avec des prédispositions génétiques (Dowman *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010).

### 3. L'endotoxémie métabolique

#### 3.1. Premières hypothèses

Cani et collaborateurs ont été les premiers à émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'endotoxémie, c'est-à-dire l'élévation de la présence dans le sang de composés des membranes bactériennes contenus dans le microbiote intestinal, appelé LPS, pouvait être un deuxième facteur déclencheur de l'inflammation observée lors de l'obésité.

Pour élaborer son hypothèse, Cani et collaborateurs ont utilisé deux faits de la littérature. Tout d'abord, en 2007, quelques études montraient l'importance du microbiote dans l'homéostasie énergétique et son implication dans le développement de l'obésité (Ley *et al.*, 2005). De plus, grâce aux travaux sur le sepsis, il était connu que les LPS, des composants principaux de la membrane externe des bactéries Gram-négatif, sont capables d'engendrer une réponse inflammatoire *via* l'interaction avec son récepteur TLR4 (Akira *et al.*, 2004). Pour valider leur hypothèse, Cani et collaborateurs ont mesuré les concentrations plasmatiques de LPS durant 24h chez des animaux nourris soit avec un régime standard soit avec un régime obésogène (72% de lipides) pendant 4 semaines (Cani *et al.*, 2007). Ils ont montré que les animaux rendus obèses par le régime (DIO pour diet-induced obesity) présentaient une perturbation du rythme circadien de la concentration plasmatique de LPS caractérisé par un taux stable à environ à 8 EU/ml comparé à celui des animaux standards qui montrait un pic de sécrétion avant le jour (9 EU/ml) suivi d'un taux relativement stable autour de 6-7 EU/ml le reste de la journée et de la nuit (Cani *et al.*, 2007).

Pour montrer l'importance du LPS dans le développement de l'obésité, Cani et collaborateurs ont développé un modèle animal d'endotoxémie en implantant à des souris des mini-pompes osmotiques délivrant en continu du LPS ( $100\mu g/kg/jour$ ) conduisant à une endotoxémie similaire à celle induite par la consommation d'un régime hyperlipidique pendant 4 semaines i.e. sans fluctuations circadiennes (Cani *et al.*, 2007). Ils ont montré que les souris infusées chroniquement avec le LPS développaient une obésité associée à une stéatose hépatique, une résistance à l'insuline et une adiposité élevée, de la même manière que les animaux nourris avec un régime obésogène pendant 4 semaines (Cani *et al.*, 2007). Parallèlement, les souris DIO comme celles soumises à une endotoxémie expérimentale, présentaient une inflammation caractérisée par une augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$ , Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 et Plasminogen-Activator-Inhibitor dans le foie, dans les TA viscéraux et sous cutanés ainsi que dans le muscle (Cani *et al.*, 2007).

A partir de ces résultats, Cani et collaborateurs ont décrit alors le LPS comme un potentiel déclencheur de l'inflammation associée à l'obésité. Cette élévation de l'endotoxémie observée lors de l'obésité induite par un régime est alors appelée « endotoxémie métabolique ».

# *3.2. Utilisation de modèles déficients pour des molécules de signalisation de TLR4*

Pour induire une réponse inflammatoire, le LPS interagit avec plusieurs molécules de signalisation dont son récepteur spécifique le TLR4 et une molécule adaptatrice le Cluster de differentitation 14 (CD14). L'utilisation de souris Knock-out (KO) pour TLR4 et CD14 a permis de relier le LPS à l'inflammation associée à l'obésité. En effet, des souris déficientes pour CD14 sont résistantes à l'obésité, à l'inflammation et à la résistance à l'insuline induites par la consommation d'un régime obésogène (Cani *et al.*, 2007; Fernandez-Real *et al.*, 2011). De même, l'absence d'une protéine TLR4 fonctionnelle protège les souris d'une obésité et d'une résistance à l'insuline (Tsukumo *et al.*, 2007; Pierre *et al.*, 2013). Cependant, Davis et collaborateurs montrent seulement une atténuation de la prise de poids et des troubles métaboliques chez les animaux TLR4 KO (Davis *et al.*, 2008). A l'inverse, Suganami et collaborateurs ne décrivent aucun effet protecteur d'une déficience en TLR4 sur l'obésité mais montrent une amélioration de l'homéostasie glucidique (Suganami *et al.*, 2007).

Lors de la liaison du LPS avec TLR4 deux voies de signalisation sont activées : les voies dépendante ou indépendante de Myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88) (Akira *et al.*, 2004). Plusieurs études se sont intéressées à l'implication de Myd88 dans le développement de l'obésité et montrent des résultats divergents en fonction des sites de délétion (Kleinridders *et al.*, 2009; Hosoi *et al.*, 2010; Everard *et al.*, 2014). Une délétion spécifique au niveau des cellules épithéliales intestinales (IEC pour intestinal epithelial cell) ou au niveau du système nerveux central (SNC) atténue les effets du régime sur l'obésité et ses troubles métaboliques (Kleinridders *et al.*, 2009; Everard *et al.*, 2014). En revanche, un KO général ou une délétion spécifique au niveau des cellules immunitaires n'induit aucune protection (Hosoi *et al.*, 2010; Everard *et al.*, 2014).

Ces résultats décrivent le rôle majeur du LPS et de l'inflammation dans le développement de l'obésité induite par un régime obésogène. De plus, le stress du réticulum endoplasmique serait un des candidats potentiels pouvant expliquer l'inflammation lors de l'obésité (Hummasti *et al.*, 2010). Pierre et collaborateurs ont montré que les animaux KO pour TLR4 soumis à un régime obésogène ne présentaient aucun signe de stress du RE contrairement aux animaux sauvages (Pierre *et al.*, 2013). Ainsi, le LPS pourrait également jouer un rôle dans l'induction du stress du réticulum endoplasmique observé lors de l'obésité.

	Ref		(Laugerette et al., 2011)	(Moreira <i>et al.</i> , 2016)	(Erridge <i>et al.</i> , 2007)	(Ghanim et al., 2009)	(Deopurkar et al., 2010)	(Pendyala <i>et al.</i> , 2012)	(Anderson et al., 2015)	(Laugerette et al., 2014)		Clemente-Postigo et al., 2012)
	A jeun vs nourri		*	NS	*	*	*	*	*	NS		*
de LPS	Unités		EU/ml	EU/ml	pg/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml		EU/ml
Valeurs	Après régime		0.26	HF-O=1 HF=1.70	12.2	0.58	0.23	De 0.10- 0.40	3	0.28		De 0.19- 0.32
	Avant régime		0.18	HF-O=1.4 HF = 1.1	8.2	0.39	0.29	De 0.5- 0.25	1.5	0.23		De 015- 0.2
its	Kit	SUJETS SAINS	LAL Biogenic	LAL Hycult Biotech	LAL Pyrochrome	LAL Cambrex	LAL Cambrex	Neutrophil method	PyroGene Factor C assay	LAL Biogenic	UJETS OBESES	LAL Lonza
chantillons et K	Condition de prélèvement		Plasma Sous héparine	Plasma EDTA	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	ċ	Plasma	91	Sérum
E	Etat nutritionnel		A jeun et Nourri	A jeun et en postprandial	A jeun et en postprandial	A jeun et en postprandial	A jeun et en postprandial	A jeun et en postprandial	A jeun et en postprandial	A jeun et en postprandial		A jeun et en postprandial
ime	Durée du régime		1 repas	1 repas	1 repas	1 repas	1 repas	1 mois	5 jours	55 jours		1 repas
Régi	Régime % de lipides		33 %	50% de lipides enrichi ou non en ac oleique	42%	42 %	88%	40 %	55%	81 %		50g de lipides
	Caractérisation de la population		20 hommes sains	65 hommes sains	20 hommes sains	20 sujets sains	24 hommes sains	8 sujets sains	20 sujets sains	18 hommes sains		40 sujets obèses

Tableau 2: Etudes sur l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez l'homme sain et obèse

% de lip :% de lipides de l'énergie totale du régime. ? : non indiqué dans l'étude \* P<0.05 LAL : Limulus amebocyte lysate. NS : non-significatif.

#### 3.3. Endotoxémie métabolique, suite des études

#### 3.3.1. Endotoxémie et consommation d'un régime obésogène

#### a) <u>Chez l'homme</u>

La majorité des études (5/6) montre que la consommation d'un repas hyperlipidique entraîne une augmentation de l'endotoxémie par rapport au seuil à jeun (Tableau 2). En revanche, l'étude récente de Moreira et collaborateurs, sur une plus grande cohorte de 65 volontaires sains contre 20 dans les autres études, n'a pas montré d'élévation de l'endotoxémie après la consommation d'un repas à 50% de l'énergie totale apportée par les lipides (Moreira *et al.*, 2016). En revanche, dans une cohorte de sujets obèses, la consommation d'un repas riche en lipides induit une augmentation de l'endotoxémie postprandiale (Clemente-Postigo *et al.*, 2012).

Concernant l'effet d'un régime hyperlipidique à plus long terme, Pendyala et collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime à 40% de lipides pendant 1 mois augmente de 71% l'endotoxémie par rapport à un régime à 10% de lipides (Pendyala *et al.*, 2012). De la même manière, chez des hommes sains, les taux plasmatiques de LPS sont significativement corrélés à une alimentation riche en lipides (Amar *et al.*, 2008). A l'inverse, Laugerette et collaborateurs ont montré que la consommation d'un repas à 81% de lipides pendant 55 jours n'a pas d'impact sur l'endotoxémie (Laugerette *et al.*, 2014).

Chez l'homme, il est difficile de conclure sur l'impact d'une consommation d'un régime hyperlipidique à long terme sur l'élévation de l'endotoxémie.

#### b) Chez l'animal

Après la publication des travaux de Cani, la majorité des études a confirmé la corrélation entre DIO et élévation de l'endotoxémie (Tableau 3-4).

De façon intéressante, l'élévation de l'endotoxémie ne semble pas dépendante du taux de lipides dans le régime. En effet, la consommation pendant 3 semaines d'un régime à 45 % de lipides est suffisante pour doubler l'endotoxémie (Geurts *et al.*, 2013) alors que 4 semaines de régime à 78% de lipides n'induisaient pas d'élévation de l'endotoxémie chez les mêmes souches de souris (Kless *et al.*, 2015). De la même manière, les taux de LPS ne semblent pas être dépendants du temps de régime puisque 18 semaines de régime à 60% de lipides induisent une augmentation de 70% de l'endotoxémie (Luck *et al.*, 2015) tandis qu'après 4 et 8 semaines l'endotoxémie augmentait de 100% et 78%, respectivement (Everard *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Cependant, ces valeurs proviennent d'études séparées. Uniquement une étude a réalisé un suivi longitudinal pendant 12, 24, 36 et 48 semaines de régime à

	Ref	(Geurts et al., 2013)	(Everard <i>et al.</i> , 2013)	(Cani <i>et al.</i> , 2008)	(Cani <i>et al.</i> , 2007)	(Kless et al., 2015)	(Kim et al., 2012)	(Gruber et al., 2013)	(Kim et al., 2014)	(Sellmann <i>et al.</i> , 2015)	(Laugerette <i>et al.</i> , 2012)	(Sellmann <i>et al.</i> , 2015)	(Chang et al., 2015)	(Serino <i>et al.</i> , 2012)	(Carvalho <i>et al.</i> , 2012)	(Muller <i>et al.</i> , 2016)
	CTL vs WD	*	*	*	*	NS	*	*	*	*	1) NS 2) * 3) NS	*	*	* WD OB- R vs WD- OB-P	*	NS en SPF * en CV
SdT	Unités	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ML	EU/ml	EU/ML	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ML	EU/ml	Relative levels
Valeurs de	WD	2.0	1,8	5	5	HFD48: 1,40 HFD75:1,0 HFD78: 1,45	12,5	1,8	12,5	1,5	1) 0,025 2) 1,8 3) 1,25	2.6	3.8	WD OB-R: 6 WD OB- P:6,6	1,4	SPF : 1,1 CV : 3,1
	CTL	0.8	0,9	2	2	1,1	L	0,04	6,5	0,5	0,25	1.45	2.0	NC	0,3	SPF : 1 CV : 0,9
t Kits	Kit	LAL endosafe	LAL Endosafe	LAL Cambrex	ż	LAL Hycult	LAL Cape Cod	LAL Hycult	LAL Cape Cod	LAL Charles River	LAL Biogenic	LAL Charles River	LAL Cambrex	ż	LAL Cambrex	LAL Hycult
Echantillons e	Conditions de prélèvements	Plasma	Sérum	Plasma	ż	Plasma	Plasma	Plasma	ċ	Plasma	Plasma	Plasma	Sérum	ė	Sérum	Plasma
	Etat nutritionnel	A jeun	ć	i	ί	ί	ċ		٤	i	Nourri	A jeun	ż	A jeun		ż
	Durée	3 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	8 sem	8 sem	8 sem	8 sem	8 sem	8 sem	8 sem	12 sem	12 sem	12 sem
Régimes	WD % de lip	60 %	60%	72%	72%	48 % 75 % 78%	%09	48%	60%	30%	<ul><li>37 % huile de</li><li>1) Palme</li><li>2) Colza</li><li>3)Tournesol</li></ul>	60%	60%	72 %	55%	60%
	CTL % de lip	ċ	ż	ż	ċ	13%	10%	12%	10%	ė	9,6	7%	13.5%	NC	ż	11%

Tableau 3 : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez la souris C57Blck6.( Suite et légende page suivante)

70% de lipides et montrent que le taux de LPS est stable pour toute la durée de l'intervention (Zhou *et al.*, 2014).

Bien que la majorité des études montre une augmentation du taux de LPS suite à l'ingestion d'un régime hyperlipidique, certaines études ne trouvent pas de différence. Notamment, l'étude de Muller et collaborateurs montre qu'en fonction des conditions d'hébergement (souris conventionnelles ou provenant d'une animalerie « exempt d'organisme pathogène spécifique (EOPS) »), les animaux répondent différemment au régime obésogène : hébergées dans une animalerie conventionnelle, les souris nourries avec un régime obésogène montrent une augmentation de l'endotoxémie alors qu'hébergées dans une animalerie EOPS, les souris présentent des taux similaires de LPS aux animaux nourris avec un régime standard (Muller *et al.*, 2016). L'induction d'une endotoxémie métabolique pourrait alors être dépendante du microbiote d'origine de l'animal.

A l'inverse de chez l'homme, les résultats chez l'animal montrent des résultats plutôt homogènes : la consommation chronique d'un régime obesogène induit une élévation de l'endotoxémie.

#### 3.3.2. Endotoxémie et obésité

#### a) <u>Chez l'homme</u>

La plupart des études montrent une corrélation positive entre obésité et taux sanguin de LPS. Dans une cohorte de femmes enceintes, les taux plasmatiques d'endotoxines sont doublés chez les femmes obèses (IMC moyen avant grossesse de 38.4 kg/m<sup>2</sup>) comparés à des femmes d'un IMC moyen avant grossesse de 22 kg/m<sup>2</sup> (Basu *et al.*, 2011). L'endotoxémie est également corrélée à l'apparition de troubles métaboliques tels que le DBT2 (Creely *et al.*, 2007). Enfin, dans une cohorte finlandaise de 2 452 personnes, une corrélation significative a été observée entre syndrome métabolique et endotoxémie (Kallio *et al.*, 2015).

Selon les études, après une perte de poids importante, les taux sanguins de LPS diminuent ou restent inchangés. En effet, 6 mois après un by-pass gastrique Roux-en Y l'endotoxémie était réduite d'une moyenne de 20 % (Monte *et al.*, 2012). De même, une perte de poids suite à 12 mois d'intervention diététique chez des adolescents ou une supplémentation en prébiotiques chez l'adulte, diminue le poids et l'endotoxémie (Lira *et al.*, 2012; Dehghan *et al.*, 2014). Au contraire, une troisième étude ne montre pas d'effet d'une chirurgie bariatrique (Roux-en Y ou Sleeve gastrectomy) 6 mois après l'intervention (Ortiz *et al.*, 2014).

D'autres facteurs tels que la sédentarité (Lira et al., 2010) ou le genre (Varma et al., 2015) peuvent influencer l'endotoxémie.

	Ref	(Chen et al., 2014)	(Benoit <i>et al.</i> , 2015)	(Hartmann et al., 2016)	(Sellmann et al., 2015)	(Gu et al., 2014)	(Kawano et al., 2016)
	CTL vs WD	*	NS	*	*	*	*
e LPS	Unités	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml	ng/ml
Valeurs de	WD	6	$22 \ \% : 0.75$ 45% : 0.40	59	2,1	1	190
	CTL	5,5	0,45	25	0,5	0,59	50
Kits	Kit	ELISA Uscn Life Science	LAL Biogenic	ELISA Cloud- Cone	LAL Charles River	LAL Lonza	ELISA Chondrex
Echantillons e	Conditions de prélèvements	Sérum	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Sérum
	Etat nutritionnel	A jeun	ċ	ċ	ż	A jeun	A jeun
	Durée	12 sem	12 sem	16 sem	16 sem	18 sem	21 sem
Régimes	WD % de lip	48%	22% 45%	59%	30%	%09	40%
	CTL % de lip	5,28%	2,6	13%	ż	10%	11%

Tableau 3 (suite) : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez la souris C57Blck6.

<u>% de lip</u> :% de lipides de l'énergie totale du régime. <u>2</u>: non indiqué dans l'étude <u>CTL</u> :Régime contrôle. <u>LAL :</u> Limulus amebocyte lysate. <u>NS :</u> non-significatif. <u>WD-OB-P</u> : WD Obese-prone. <u>WD-OB-R :</u> WD obèses résistant <u>Sem :</u> Semaines. <u>WD :</u> Western diet / Régime obésogène

#### b) Chez l'animal

Peu d'études ont comparé l'endotoxémie d'animaux génétiquement obèses à celle d'animaux sauvages. Brun et collaborateurs ont montré que les souris Ob/Ob et db/db présentaient une endotoxémie respectivement 2 à 3 fois supérieure à celle des souris sauavges (Brun *et al.*, 2007). A l'inverse, les rats Zucker obèses (fa/fa) ont une endotoxémie similaire à celle des Zucker maigres (fa/-) (Plaza-Diaz *et al.*, 2014).

#### 3.4. Variabilité des valeurs de LPS

Les valeurs d'endotoxémie retrouvées dans la littérature sont très hétérogènes que ce soit chez l'homme ou chez l'animal et dans les groupes standards ou obèses (Cf tableaux 2-3-4). Par exemple, chez des rats Sprague-Dawley nourris avec un régime standard, alors que de La serre et collaborateurs ont mesuré l'endotoxémie à 0.2 EU/ml, Marques et collaborateurs décrivent une valeur de 10 EU/ml (de La Serre *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2016).

Cette variabilité peut s'expliquer par la difficulté du dosage de LPS (Explications plus précises dans le chapitre 2) et la présence d'un nombre important de kits commerciaux. De plus, le LPS interagit avec de nombreuses protéines plasmatiques réduisant ainsi la présence de LPS libre sanguin. Le type de prélèvement (portal, cardiaque ou au niveau caudal) ainsi que les conditions (présence d'anticoagulant) peuvent interférer avec le dosage. Enfin, l'état nutritionnel de l'animal est un facteur à prendre en compte, puisque l'absorption intestinale de LPS est dépendante du taux de lipides du repas.

Ainsi, il est difficile de définir l'endotoxémie métabolique avec une valeur absolue. A l'inverse, ce qui est homogène entre la plupart des études est que l'endotoxémie augmente chez la personne ou l'animal obèse (génétique ou DIO) et qu'elle est corrélée avec les désordres métaboliques de l'obésité (Boutagy *et al.*, 2015). Il a alors été proposé par Boutagy et collaborateurs qu'une augmentation de 0.5 à 2 fois le taux circulant d'endotoxine comparé aux standards de la même étude seraient un meilleur indicateur qu'un seuil chiffré (Boutagy *et al.*, 2015).

#### 3.5. Autres marqueurs d'endotoxémie

La demi-vie du LPS dans la circulation sanguine est très courte puisqu'il est rapidement lié avec ses transporteurs spécifiques tels que la lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) et CD14 sous sa forme soluble (sCD14). Ainsi, mesurer la concentration plasmatique de ses transporteurs permet également d'évaluer l'endotoxémie.

	Ref	(Mao <i>et al.</i> , 2015)	(Mao <i>et al.</i> , 2015)	(Wang <i>et al.</i> , 2014)	(Peng et al., 2015)	(de La Serre <i>et al.</i> , 2010)	(Zhou <i>et al.</i> , 2014)	(Mao <i>et al.</i> , 2015)	(Marques <i>et al.</i> , 2016)	(Marques <i>et al.</i> , 2016)	(Oliveira <i>et al.</i> , 2011)	(Zhou <i>et al.</i> , 2014)
	CTL vs WD	*	*	*	*	WD vs C *	*	* toutes semaines	NS	NS	*	* toutes semaines
SdT	Unités	µg/L	µg/L	EU/ml	EU/ml	EU/ML	EU/ml	µg/L	EU/ml	EU/ml	EU/ml	EU/ml
Valeurs de	WD	4 Sem = 25	8 sem = 30	50	48.71	OB-R = 0,1 OB-P = 1,2	Sem 12 = 0,67	12  sem = 37,5	12.5	7.5	0,5	Sem 24,36,48 = 0,74
	CTL	4	4	0	4.03	0,2	0,07	4	15	10	0,04	Moyenne semaines = 0,07
lits	Kit	LPS Elisa Sigma	LPS Elisa Sigma	LAL Endosafe	6	Pyrochrome Cape Cod	LAL Clinical Sciences Inc	LPS Elisa Sigma	LAL Cape Codd	LAL Cape Codd	LAL test Cambrex	LAL Clinical Sciences Inc
chantillons et l	Conditions de prélèvements	Plasma	Plasma	Sérum	ż	Plasma	ċ	Plasma	Sérum	Sérum	Plasma	ć
Ec	Etat nutritionnel	A jeun	A jeun	A jeun	ė	Gavage avec 1ml d'émulsion de lipides	A jeun	A jeun	A jeun	A jeun	ė	A jeun
	Durée	4 sem	8 sem	8 sem	10 sem	12 sem	12 sem	12 sem	17 sem	17 sem	20 sem	24,36 et 48 sem
Régime	WD % de lip	Régime ctl + 10g de lard	Régime ctl + 10g de lard	ż	60%	45%	25 %	Régime ctl + 10g de lard	45 %	45%	55%	25 %
	CTL % de lip	ė	ė	i	ė	10%	7%	ė	ė	ċ	ė	7%
	Souches de Rats	Rats Wistar	Rats Wistar	Rats SD	Rats SD	Rats SD	Rats SD	Rats Wistar	Rats Wistar	Rats SD	Rats Wistar	Rats SD

Tableau 4 : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur l'endotoxémie chez le rat.

 $\frac{\% \ de \ lip ides \ de \ l'énergie \ totale \ du \ régime. 2: non indiqué \ dans l'énde \ \underline{*} \ P<0.05$   $\underline{CTL}: Régime \ contrôle. \ \underline{LAL:} \ Limulus \ amebocyte \ lysate. \ \underline{NS:} \ non-significatif. \ \underline{OB-P}: \ Obese-prone. \ \underline{OB-R:} \ obeses \ résistant$   $\underline{SD:} \ Sprague-Dawley \ \underline{WD:} \ Western \ diet / \ Régime \ obésogène$ 

#### 3.5.1. La LBP

La production hépatique de la LBP est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires produites en réponse au LPS. La LBP est ensuite sécrétée dans le sang. La mesure plasmatique de la LBP est alors classiquement utilisée comme marqueur de l'endotoxémie à plus long terme.

#### a) LBP et consommation d'un régime obesogène

Chez l'homme sain, 2 heures après la consommation d'un régime enrichi en graisses et en glucides, la concentration plasmatique de LBP augmente jusqu'à atteindre 14,7  $\mu$ g/ml puis rejoint son seuil initial à 10,5  $\mu$ g/ml 3 heures après le repas (Ghanim et al., 2009). En revanche, la consommation d'un repas hyper énergétique par jour (+3180 KJ/jour) pendant 56 jours n'augmente pas les concentrations plasmatiques de LPS et LBP.

Chez l'animal, la majorité des études montre que la consommation d'un régime hyperlipidique induit une élévation de la concentration plasmatique de LBP (Moreno-Navarrete et al., 2009; Naito et al., 2011; Laugerette et al., 2012; Benoit et al., 2015; Hamilton et al., 2015; Wang et al., 2015) (Tableau 5). Comme pour les niveaux plasmatiques de LPS, l'élévation des taux circulants de LBP ne semble pas être proportionnelle à la durée ou à la quantité de lipides dans le régime. En revanche, un régime enrichi en huile de palme induit une augmentation plus importante de la LBP que la consommation d'un régime enrichi en matières grasses laitières ou huile de tournesol (Laugerette et al., 2012).

#### b) LBP et obésité

Chez l'homme, une élévation de la concentration plasmatique de LBP a été fortement associée à l'IMC (Gubern et al., 2006; Sun et al., 2010; Gonzalez-Quintela et al., 2013; Vors et al., 2015). De plus, la concentration plasmatique de LBP a été corrélée à la présence de troubles métaboliques tels que l'insulino-résistance et le DBT2 (Sun et al., 2010; Moreno-Navarrete et al., 2012; Gonzalez-Quintela et al., 2013; Liu et al., 2014). Enfin, après une perte de poids ou une chirurgie bariatrique, la concentration plasmatique de LBP est diminuée pour atteindre des valeurs proches de celles de personnes maigres (Moreno-Navarrete et al., 2012; Clemente-Postigo et al., 2015).

Les souris génétiquement obèses ob/ob et db/db présentent des concentrations plasmatiques de LBP augmentées (Naito *et al.*, 2011; Stenman *et al.*, 2013) (Tableau 6). Par ailleurs, Stenman et collaborateurs ont montré que cette augmentation n'était pas associée à une expression génique élevée de LBP au niveau hépatique suggérant soit un mécanisme post-transcriptionnel ou une production extra-hépatique de LBP augmentée (Stenman *et al.*, 2013).

	Ref		(Naito <i>et al.</i> , 2011)	(Laugerette <i>et al.</i> , 2012)	(Benoit et al., 2015)	(Wang <i>et al.</i> , 2015)		(Hamilton <i>et al.</i> , 2015)
	CTL vs WD		*	*	NS *	*		* *
aleurs de LPS	WD		75 μg /ml	50 µg/ml	22 ng / ml 13 ng /ml	28 μg/ml		760 ng/ml 990 ng/ml
Λ	CTL		5 µg/ml	28 μg/ml	9 ng/ml	22 μg/ml		500 ng/ml 600 ng /ml
S	kit	SI	HyCult Biotechnology	Enzo Life sciences	Enzo Life sciences	Cell science	S	Biometec
chantillons et ki	Conditions prélèvement	SOUR	Plasma	Plasma	Plasma	Sérum	RAT	Sérum
E	Etat nutritionnel		A jeun	Nourris	Nourris	A jeun		Nourris
	durée		7 sem	8 sem	12 sem	12 sem		3 sem 6 sem
Régime	WD % lip		% 09	22 %	22 % 45 %	60 %		45 %
	CTL % lip		ż	9.6 %	2.6 %	ż		13 %
	Espèces		Souris c57Blck 6	Souris c57Blck 6	Souris c57Blck 6	Souris c57Blck 6		Rats Wistar

Tableau 5 : Etudes sur l'impact d'une consommation d'un régime obésogène sur la concentration de LBP dans le sang chez la souris et le rat.

<u>% de lip</u>ides de l'énergie totale du régime. <u>?</u>: non indiqué dans l'étude <u>\*</u> P<0.05 <u>CTL</u>:Régime contrôle. <u>LAL</u>: Limulus amebocyte lysate. <u>NS</u>: non-significatif. <u>WD-OB-P</u>: WD Obese-prone. <u>WD-OB-R</u>: WD obèses résistant . <u>WD</u>: Western diet / Régime obésogène

#### 3.5.2. sCD14

L'expression génique de CD14 est régulée positivement par le LPS, cependant aucun travail n'a pu montrer une corrélation positive entre expression génique de CD14 et concentration plasmatique de sCD14. Malgré cette absence de corrélation, le sCD14 est parfois utilisé comme marqueur de l'endotoxémie.

#### a) sCD14 et consommation d'un régime obésogène

Chez l'homme, cette augmentation de sCD14 semble liée aux habitudes alimentaires puisque chez des personnes obèses à IMC égal, celles qui avaient des habitudes alimentaires plus saines (plus forte consommation de fruits et légumes) présentaient un taux plasmatique de sCD14 plus bas que les personnes ayant un comportement alimentaire plus délétère (Kong *et al.*, 2014). A l'inverse, Laugerette et collaborateur montrent qu'un apport hyper énergétique pendant 8 semaines chez l'homme entrainerait une baisse des taux de sCD14 (Laugerette *et al.*, 2014).

Peu d'études utilisent sCD14 comme mesure d'endotoxémie chez l'animal. Une équipe à Lyon a montré, chez la souris, un régime enrichi en huile de colza augmente significativement la concentration plasmatique de sCD14 à la différence des régimes enrichis en huiles de palme ou tournesol (Laugerette *et al.*, 2012). Cette équipe utilise également le ratio LBP/sCD14 comme marqueur de l'endotoxémie métabolique, caractérisée par une augmentation de la concentration plasmatique de LBP et une diminution de sCD4 plasmatique. Chez la souris, un régime hyperlipidique augmente également le ratio LBP/sCD14 (Laugerette *et al.*, 2012).

#### b) sCD14 et obésité

Plusieurs études chez l'homme ont montré que la concentration plasmatique de sCD14 était augmentée chez des personnes obèses comparées à des personnes maigres (Fernandez-Real *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2014; de Courten *et al.*, 2016). Dans une cohorte de personnes présentant un IMC supérieur à 33.45 kg/m<sup>2</sup>, les niveaux systémiques de sCD14 étaient également positivement corrélés aux taux circulants de LPS et de LBP (de Courten *et al.*, 2016). A l'inverse, dans une étude sur une cohorte espagnole de 420 personnes, aucune différence au niveau de la concentration plasmatique de sCD14 n'est observée entre les personnes obèses ou normo-pondérées (Gonzalez-Quintela *et al.*, 2013).

Aucune étude ne s'est intéressée à l'obésité chez l'animal et la concentration plasmatique de sCD14.

Compte tenu des résultats divergents quant à l'augmentation ou la diminution du taux circulant de sCD14 lors de l'obésité, peu d'études l'utilisent comme marqueur d'endotoxémie.

Concentration plasmatique LBP souris obèses	Concentration plasmatique WT	Méthodes	Ref
<u>Ob/Ob</u> 32 µg/ml 10.7 µg/ml	<u>C57blck</u> 12 μg/ml 5 μg/ml	HyCult Biotechnology	(Stenman <i>et al.</i> , 2013) (Naito <i>et al.</i> , 2011)
<u>Db/db</u> 9 μg/ml	<u>C57blck</u> 5 µg/ml	HyCult Biotechnology,	(Naito et al., 2011)

 Tableau 6 : Etudes sur l'impact de l'obésité sur la concentration plasmatique de LBP chez des souris génétiquement obèses

#### 4. Implication du LPS dans le développement de l'obésité

Les LPS peuvent avoir des conséquences néfastes sur le fonctionnement de nombreux organes (Figure 3). Les LPS pourraient agir soit *via* l'induction de l'inflammation ou en interférant avec des voies de signalisation. Dans cette section, nous détaillerons les effets des LPS sur le TA soulignant la possible implication du LPS dans le développement précoce de l'obésité. Nous décrirons ensuite l'impact des LPS sur l'hypothalamus et le comportement alimentaire. Enfin, les conséquences de la présence de LPS au niveau du nerf vague seront détaillées dans le chapitre 4 section 5.4.3.

#### 4.1. Au niveau du tissu adipeux

Le LPS induit des modifications du métabolisme des lipides au niveau du TA bien que les effets semblent être dépendants de la dose et du temps d'exposition. En effet, alors qu'une injection aigüe de 15µg de LPS/kg de poids chez le porc diminue la lipolyse (Guo *et al.*, 2015), une dose plus forte de 1 à 30 mg /kg de poids chez le rat engendre à l'inverse une augmentation de la lipolyse (Zu *et al.*, 2009). De façon chronique, une infusion de LPS *in vivo* diminue la différentiation des pré-adipocytes en adipocytes (Luche *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2013).

Retrouvée dans la majorité des études, une injection chronique ou aigüe de LPS conduit à une inflammation au niveau des adipocytes, et plus particulièrement des pré-adipocytes, caractérisée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , Monocyte Chimioattractant Protein 1 (MCP1), IL-6 (Chung *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2009; Luche *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015; Nohr *et al.*, 2016). L'endotoxémie métabolique expérimentale (par implantation de mini-pompes) engendre une infiltration de macrophages au niveau du TA (Cani *et al.*, 2007; Luche *et al.*, 2013). La surproduction de MCP-1, cytokine qui joue un rôle majeur dans le recrutement de macrophages, induite par une exposition au LPS pourrait participer activement à l'infiltration de macrophages observée lors de l'obésité (Kopp *et al.*, 2009).

Le LPS modifie également la sécrétion d'adipokines par le TA. Cependant les résultats sont assez hétérogènes compte tenu de la variabilité des méthodes utilisées. *In vivo*, Guo et collaborateurs ont montré qu'une injection aigüe de LPS augmente la production d'adiponectine et ne modifie pas celle de leptine (Guo *et al.*, 2015). En revanche, une exposition chronique de LPS à 600  $\mu$ g/kg/jour chez la souris diminue la production d'adiponectine (Nohr *et al.*, 2016). De même, une infusion de LPS *in vitro* diminue la production de leptine, adiponectine et de résistine (Kopp *et al.*, 2009; Taira *et al.*, 2015).

#### Stéatose



Cani, 2007, Diabetes Cani, 2008, Diabetes Nolan, 2010, Hepathology



Cani, 2007, Diabetes

Luche, 2013, Molecular metabolism

#### Inflammation intestinale Augmentation de la perméabilité

Pasternak, IBD, 2010 Wellmann, Gut, 1986 Guo, AJP, 2013



#### Inflammation Altération de la sensibilité à la leptine

De lartigue et al, 2012 De la Serre, Physiol Behavior, 2015 Waise, Biochem Biophy Res Commun, 2015 Milanski, 2009, The journal of neurosciences De Souza, 2005, Endocrinology

Figure 3 : Effets du LPS sur l'intestin, le tissu adipeux, le foie, le cerveau et le nerf vague

Ces modifications de sécrétion d'adipokines associées à l'augmentation de l'inflammation pourraient contribuer au développement de la résistance à l'insuline dans le TA. Ainsi, il a été montré qu'une infusion de LPS sur des lignées cellulaires d'adipocytes pouvait entrainer une résistance à l'insuline de façon dose et temps dépendante (Chung *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2009).

Le LPS induit donc des changements notables au niveau de la physiologie des adipocytes et pourrait participer activement à l'induction de la résistance à l'insuline au niveau du TA, le point de départ du développement de l'obésité. Cependant, la distinction entre réel effet du LPS ou de l'inflammation induite par le LPS n'est pas évidente.

De même, lors de l'obésité il est difficile d'évaluer la part de l'inflammation liée à l'atrophie des adipocytes contre celle induite par le LPS.

#### 4.2. Sur le comportement alimentaire

En plus d'altérer la physiologie de nombreux tissus tels que le foie, le muscle et le TA, le LPS probablement *via* l'induction de l'inflammation impacte également les organes et tissus impliqués dans la régulation du comportement alimentaire.

La première étude montrant la présence d'une inflammation au niveau du cerveau d'animaux nourris avec un régime hyperlipidique a été publiée en 2005 (Zhang et al., 2005). Les auteurs ont montré que des rats nourris avec un régime hyperlipidique (45% de lipides) pendant 20 semaines présentaient une augmentation du stress oxydant et de prostaglandine E2 au niveau du cortex cérébral suggérant alors une inflammation neuronale (Zhang et al., 2005). Par la suite, d'autres études ont confirmé la présence d'inflammation, caractérisée par une surproduction de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-a, IL-6 and IL1-β dans le cerveau et plus particulièrement dans l'hypothalamus, le centre de régulation de la PA (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009). De plus, cette inflammation semble être associée à une perte de sensibilité aux signaux satiétogènes de l'insuline et la leptine, deux hormones anorexigènes (De Souza et al., 2005; de Git et al., 2015). Le LPS étant un puissant inducteur d'inflammation, des auteurs ont ensuite voulu connaître l'implication du LPS dans ces phénomènes de résistance à la leptine. Milanski et collaborateurs ont injecté en i.p. des rats DIO avec des anticorps anti-TLR4 (Milanski et al., 2009) et ont montré que les rats traités ne prenaient pas autant de poids que les animaux non-traités mais surtout ne présentaient pas d'inflammation ni de résistance à la leptine au niveau hypothalamique (Milanski et al., 2009). De plus, les souris portant une délétion spécifique au niveau central de Myd88 étaient protégées de l'obésité et toujours sensibles à la leptine (Kleinridders et al., 2009). Enfin, une injection aigüe en i.p de LPS (300µg/kg de poids) ou chronique augmente l'expression du Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), un marqueur de la résistance à la leptine, au niveau de l'hypothalamus (Yamawaki et al., 2010)(de La Serre et al., 2015) et des neurones afférents du vague (mécanismes développés dans le chapitre 4 section 5.4.3).

Ces résultats montrent l'implication forte du LPS dans le développement de la résistance à la leptine hypothalamique, et donc de l'altération du comportement alimentaire chez les personnes obèses.

#### En résumé :

Véritable problème de santé publique, l'obésité est une maladie chronique qui est associée à un grand nombre de troubles métaboliques. Ces complications seraient liées à l'installation d'une inflammation chronique de faible intensité dite de bas grade.

Les recherches de ces dernières années ont identifié les lipopolysaccharides, des composés des membranes des bactéries du microbiote intestinal, comme des potentiels déclencheurs de cette inflammation chronique de bas grade. Une fois dans le sang, ces LPS engendrent une inflammation et seraient ainsi à l'origine des troubles métaboliques et comportementaux associés à l'obésité.

En revanche, les mécanismes précis expliquant pourquoi, lors de l'obésité, les LPS sont capables de traverser la barrière intestinale et d'atteindre le système circulatoire ne sont pas encore connus. Comprendre par quelles voies les LPS traversent l'intestin et/ou les défauts de prise en charge hépatique et plasmatique seraient des atouts essentiels pour élaborer des stratégies de prévention efficaces contre l'obésité.

### Chapitre 2 :

### Mécanismes intestinaux et hépatiques limitant l'entrée et la diffusion du LPS dans l'organisme

La présence dans le sang de LPS due à la consommation d'un régime obesogène semble être un facteur important dans l'installation de l'obésité. De nombreuses études ont établi le lien entre consommation d'un régime obesogène et l'endotoxémie. De même, le LPS a été clairement identifié comme le facteur déclenchant du sepsis et du choc septique. Connaître les mécanismes de prise en charge du LPS dans l'organisme permettrait ainsi d'élaborer des stratégies de prévention et de traitement efficace contre ces deux pathologies.

Ce chapitre détaillera les différents mécanismes de prise en charge des LPS au niveau intestinal et hépatique afin de limiter sa diffusion dans le sang et les organes périphériques et centraux. Nous décrirons également les deux principales maladies associées avec le LPS qui sont le choc septique et l'endotoxémie métabolique.

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue de littérature, écrite durant ma thèse et publiée en mai 2016 dans American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology. J'ai choisi de présenter ce chapitre sous sa forme originale. C'est pourquoi certaines parties telles que la physiopathologie du sepsis sont légèrement éloignées de mon sujet. De même, certains paragraphes comme l'endotoxémie métabolique ont déjà été décrits dans le chapitre 1.

# Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation

#### Mathilde Guerville and Gaëlle Boudry

INRA UR1341 ADNC, Domaine de la Prise, Saint-Gilles, France

Submitted 7 March 2016; accepted in final form 30 April 2016

Guerville M, Boudry G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 311: G1-G15, 2016. First published May 5, 2016; doi:10.1152/ajpgi.00098.2016.-The human microbiota consists of 100 trillion microorganisms that provide important metabolic and biological functions benefiting the host. However, the presence in host plasma of a gut-derived bacteria component, the lipopolysaccharide (LPS), has been identified as a causal or complicating factor in multiple serious diseases such as sepsis and septic shock and, more recently, obesity-associated metabolic disorders. Understanding the precise mechanisms by which gut-derived LPS is transported from the gut lumen to the systemic circulation is crucial to advance our knowledge of LPS-associated diseases and elaborate targeted strategies for their prevention. The aim of this review is to synthetize current knowledge on the host mechanisms limiting the entry and dissemination of LPS into the systemic circulation. To prevent bacterial colonization and penetration, the intestinal epithelium harbors multiple defense mechanisms including the secretion of antimicrobial peptides and mucins as well as detoxification enzymes. Despite this first line of defense, LPS can reach the apical site of intestinal epithelial cells (IECs) and, because of its large size, likely crosses IECs via transcellular transport, either lipid raft- or clathrin-mediated endocytosis or goblet cell-associated passage. However, the precise pathway remains poorly described. Finally, if LPS crosses the gut mucosa, it is directed via the portal vein to the liver, where major detoxification processes occur by deacetylation and excretion through the bile. If this disposal process is not sufficient, LPS enters the systemic circulation, where it is handled by numerous transport proteins that clear it back to the liver for further excretion.

intestinal barrier function; metabolic endotoxemia; sepsis; antimicrobial peptides; liver LPS detoxification

THE GUT MICROBIOTA consists of bacteria, archaea, eukaryotes, and viruses totaling 100 trillion microbes. It is now established that the gut microbiota has a critical role in multiple biological functions. These microorganisms benefit the host by hydrolyzing undigestible carbohydrates, synthesizing vitamins, participating in immune system maturation, and protecting against pathogens (45). However, some bacteria can be highly pathogenic when they enter and colonize the gastrointestinal tract (GIT), and others, called pathobionts, become pathogenic under certain circumstances while normally symbiotic. Bacterial components can also be secreted or shed from the bacteria and have deleterious impact on the host. All bacteria including those colonizing the gut can be divided into two groups, Gram-negative and Gram-positive bacteria, depending on their cell wall structure and outer membrane. Gram-negative bacteria contain lipopolysaccharides (LPSs) coating their thin peptidoglycan cell wall. LPSs are the major lipidic components of the outer membrane and are vital for the structural and functional integrity of the bacteria. They form a barrier, permeable

only to small hydrophobic compounds, preventing penetration of bile salts and antimicrobial agents into the bacteria (112). Over the past decades, the presence of LPS, commonly referred to as endotoxin, in the plasma has been correlated to multiple diseases including sepsis and septic shock but also more recently to obesity and its associated metabolic disorders.

Gut microbiota is the major source of LPS, and it has been estimated that the host lives continuously with >1 g of LPS within the gut (49). In healthy conditions, multiple mechanisms are involved at different levels, from the gut mucosa to the liver, to keep LPS within the gut lumen and avoid its presence in the systemic circulation. The purpose of this review is to synthetize the current knowledge on these mechanisms. We first describe the general LPS structure characteristics and its distribution along the gut. In a second section, we focus on the pathophysiology of sepsis and metabolic endotoxemia, two LPS-associated diseases, which differ in the level of LPS circulating in the host plasma. Third, the mechanisms involved within the gut to limit LPS penetration are discussed with a focus on the precise LPS crossing pathways through intestinal epithelial cells (IECs). Finally, we discuss the principal LPS detoxification and disposal processes at the liver and plasma levels.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Boudry, INRA UR1341 ADNC, Domaine de la Prise, F-35590 Saint Gilles, France (e-mail: gaelle.boudry@rennes.inra.fr).

#### INTESTINAL AND HEPATIC HANDLING OF LPS

### Lipopolysaccharides: Structure, Biosynthesis, Distribution, and Quantification

*Structure.* LPS from all Gram-negative bacteria, either commensal or pathogenic, share essentially the same structure (Fig. 1): an O-polysaccharide chain, an R-core, and a lipid A moiety (27, 50).

The O-polysaccharide chain consists of repetitive subunits each containing one to eight sugars (Fig. 1). This chain varies by the number and composition of sugars (ribofuranose, acetamidoyl, xylose . . . ), the number of subunits, chemical linkage, and the nature of the terminal monosaccharide (27, 50). The number of O-polysaccharide subunits varies within a species: for example, *Escherichia coli* includes 170 various O-serotypes among multiple strains (128). Moreover, some enteric mucosal bacteria, such as strains of Enterobacteriaceae, lack this O-chain, and are called "rough-type" strains based on resulting colony morphology. The O-polysaccharide chain carries the LPS antigenic property targeted by the host complement system (128) and determines the serological specificity of a bacterium. The subsequent activation of the host complement and thereby the degree of bacteria lysis varies depending on the structure of this O-polysaccharide chain (64, 128). However, in some cases, the O-polysaccharide chain also protects the bacteria from the host response. Some bacteria harbor particular ramified O-chain conformations that prevent activation of the host complement and phagocytosis by host phagocytic cells (30). Other bacteria, like *Neisseria gonorrhoeae*, carry O-polysaccharide chains with antigen conformations similar to host antigens, enabling the bacteria to escape the host immune system (30). Finally, depending on its composition, the Ochain binds host proteins termed adhesins that help bacterial adhesion to the host tissue, thereby determining the bacteria colonization rate (30).

Attached to the O-polysaccharide chain, the R-core is often divided into two parts (Fig. 1): the outer core composed of common sugars such as glucose or galactose and the inner core



Fig. 1. Organization of the Gram-negative bacteria cell walls and structure of LPS. *Left:* Gram-negative bacteria walls are divided into 2 layers, the inner and the outer membranes, that are separated by the periplasm composed of a peptidoglycan layer. LPSs are endotoxins anchored to the outer membrane (27, 128). *Right:* LPS contains 3 major parts: the O-polysaccharide chain (*top*), the R-core (*middle*), and lipid A (*bottom*). The O-polysaccharide chain consists of repetitive subunits that contain 1–8 sugars. Linked to the O-chain, the R-core, less variable, is often divided into 2 parts: the outer and the inner core. The lipid A moiety consists of a disaccharide backbone carrying ester and amine-linked fatty acids (FA) (27, 128).

### Review
that contains unusual sugars such as 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid [also named keto-deoxyoctulosonate (Kdo)] and heptoses (27, 50, 128). Nonetheless, recent studies have shown that hexoses can be found in the outer core as well as heptoses on the inner part (30). The R-core links the O-chain structurally with the lipid A and does not activate the immune system.

The lipid A moiety, covalently linked to the inner core, carries the endotoxic activity of LPS (Fig. 1). Typically, it is composed of a disaccharide bearing two phosphate groups at positions 1 and 4'. The disaccharide is connected to four fatty acids attached via either an amide linkage at positions 2 and 2' or an ester linkage at positions 3 and 3'. These primary fatty acids can be hydroxylated and esterified by secondary fatty acids (27, 50, 128). The LPS lipid A moiety, more precisely its fatty acyl chains, is recognized by the host transmembrane receptors Toll-like receptors (TLRs), mainly TLR4 (124), and leads to immune system activation. Lipid A endotoxicity varies depending on several structural factors including the number and length of acyl chains and the phosphorylation state of the disaccharide backbone (27, 50). Nevertheless, because of the relative homogeneity of the gut environment compared with other ecosystems, lipid As from enteric bacteria present a relatively low variability (30). It is noteworthy, however, that Gram-negative bacteria are able to modulate the expression of lipid A-synthesizing enzymes in response to environmental signals such as inflammation, leading to reduced TLR4 induction as well as resistance to antimicrobial peptides (AMPs) (35).

Biosynthesis and LPS release from bacteria. The general LPS biosynthesis pathway is guite conserved within the bacterial world. At the cytoplasmic surface of inner membrane, the O-polysaccharide chain is synthesized by glycosyltransferases using nucleotide sugars as donors. The O-chain is then transported to the periplasm by the transporter Wzx and polymerized by the Wzy and Wzz enzymes. The lipid A biosynthetic pathway involves nine enzymes and occurs both at the inner membrane and in the cytoplasm (128). The inner and outer R-cores are synthesized and assembled on the lipid A at the cytoplasmic surface of the inner membrane by glycosyltransferases through a rapid and efficient process. The lipid A/R-core moiety is then flipped across the inner membrane to the periplasmic side by the ATP-binding cassette transporter MSba. The assembly of the O-polysaccharide chain on the lipid A/R-core moiety is mediated by the WaaL enzyme at the periplasm. Several other modifications can occur at the periplasmic side, including lipid A-specific modifications (127). LPS is then transported and assembled at the cell surface by the LPS transport pathway involving seven lipopolysaccharide transport proteins (LPTs), A to G (114).

LPS can be released from the bacteria outer membrane and circulate as a free molecule. LPS release occurs during both bacteria growth and death. The outer membrane is attached to the inner membrane by lipoproteins. However, these two membranes can separate, resulting in the release of outer membrane-contained LPS (30). This phenomenon may occur during normal bacterial division or abnormal growth of outer membrane (30). Moreover, LPS is also released during natural death of bacteria, but release can also be induced by antibiotic treatment. For example, chloramphenicol induces outer and inner membrane separation, leading to LPS shedding. The antibiotic polymixin B exhibits a high affinity to LPS and

exerts a potent pressure that detaches LPS from the outer membrane. Thus the amount of LPS released is dependent on the type of bacterial death, antibiotic concentration, and incubation (152).

Distribution along the gut and throughout life. The gut prokaryote microbiota represents 100 trillion microbes with >500 species, classified into 9 major phyla: Firmicutes (Gram positive), Bacteroidetes (Gram negative), Actinobacteria (Gram positive), Proteobacteria (Gram negative), Verrucomicrobia (Gram negative), Cyanobacteria (Gram negative), Fusobacteria (Gram negative), Spirochaetes (Gram negative), and TM7 (Gram positive) (45). Intestinal sections display differences in bacterial growing conditions due to pH and oxygen environment or the quality and quantity of mucus and AMPs, explaining the great bacterial diversity along the gut. Bacterial concentration increases gradually along the gut from 103-4 microbes per gram of content in the small intestine to  $\sim 10^{11-12}$ per gram of content in the colon (18). Besides this oral-aboral gradient in the quantity and quality of the microbiota, an intraluminal radial gradient of bacterial composition also exists, due to the distribution of oxygen and nutrients provided by the host tissues (4).

Because of technical constraints, microbiota composition along the human gut is not easily measurable. Data are scarce and rely on tissue samples collected from surgical procedures or biopsies and rarely on luminal content samples. However, the microbiota composition of duodenal digesta aspirate was recently studied in healthy adults. Duodenal digesta harbored mostly Gram-positive bacteria belonging to the phyla Firmicutes (60% of total bacteria) and Actinobacteria (25%), whereas Gram-negative bacteria were far less abundant (Proteobacteria 10% and other phyla 5%) (6). In jejunum and ileum tissues, biopsy microbiota analysis revealed that the Gram-positive Firmicutes remains the major phyla (43%); however, the quantity of Gram-negative Proteobacteria and Bacteroidetes increases gradually to reach 23% and 20%, respectively, from the jejunum to the ileum (33, 38). Biopsy analyses of large intestinal tissues highlight the larger microbial diversity in the large compared with the small intestine, with representatives from each of the nine phyla, yet the colon is still dominated by two major phyla, with 50% Gram-negative Bacteroidetes and 45% Gram-positive Firmicutes (56). Compared with human data, animal models allow a more precise quantification of the bacterial composition along the gut. The mouse microbiota Gram-negative-to-Gram-positive bacteria ratio seems relatively stable along the gut (70/30) from the duodenum to the colon (65), whereas a major shift in this ratio between the small and the large intestine occurs in pig (80/20 and 20/80 in the small and large intestine, respectively) (163). Despite the discrepancies and uncertainty, it remains clear that because of the increased concentration of bacteria along the gut the number of Gram-negative bacteria increases dramatically from the duodenum to the rectum.

Drastic changes in the gut microbiota also occur during life. Before birth the fetal intestine is sterile; colonization begins when the infant is exposed to maternal vaginal and colonic bacteria. At birth, human fecal microbiota contains equal quantities of Gram-negative and -positive bacteria (78). During the first 3 yr of life, the bacterial diversity increases, leading to a state of relative stability. The proportion of Gram-positive bacteria increases gradually to reach 85% at 2 yr of age (78).

During lactation, the diet is constituted exclusively of breast milk, which contains numerous factors that influence growth of commensal intestinal bacteria but can also bind LPS with high affinity, thus influencing possible dissemination of LPS to the neonatal host (77). Lactoferrin (LF), the major whey protein in breast milk, exhibits multiple functions including antimicrobial activity and immunomodulatory effects (41, 139). LF exhibits high affinity for LPS. Similarly, breast milk contains a high concentration of cluster of differentiation 14 (CD14; 20  $\mu$ g/ml at 5 days postpartum), which can also bind intraluminal LPS, enabling its dissemination in the neonatal host (90).

The fecal microbiota is relatively stable throughout adult life if no major dietary, metabolic, or inflammatory changes occur. However, modifications start to occur at advanced ages (70–90 yr), with the most noticeable changes in the fecal microbiota of elderly individuals being an increase in the abundance of Gram-negative bacteria due to an alteration in the relative ratio of Firmicutes to Bacteroidetes (105).

Detection and quantification of LPS-bearing bacteria and LPS. Although not really accurate, determination of the ratio of Gram-negative to -positive bacteria gives a rough estimation of the potential quantity of LPS in the intestinal microbiota, or at least allows evaluation the potential variation between different conditions. The well-known method of Gram coloration is based on the ability of the peptidoglycan layer to retain dyes. Gram-positive bacteria that have a thin layer will be colored purple by crystal violet dye, whereas Gram-negative bacteria that have a thick layer will be counterstained pink by safranin (9). In addition to this classical method, the polymerase chain reaction can also be used to quantify Gram-positive and -negative bacteria populations, using consensus sequence for Gram-negative or -positive bacteria (76). Moreover, metagenomic analysis of microbial genes now allows the determination of the expression of bacterial genes involved in LPS biosynthesis (53). However, many genes are involved in LPS biosynthesis, and the relationship between changes in biosynthesis gene expression and the actual number of Gram-negative bacteria or LPS concentration is not straightforward.

Ouantification of the concentration of LPS molecules is possible in various fluids, such as plasma but also fecal water, with different methods. Specific LPS components such as Kdo contained in the R-core or the hydroxymystiric acid contained in the lipid A moiety can be detected by colorimetric assays. However, these methods have limitations since Kdo does not have the same absorbance depending on its structure and the number of hydroxymystiric acids differs depending on the LPS. Another possibility is detection of LPS O-polysaccharide chains with competitive ELISA methods. Multiple companies have commercialized kits providing precoated plates with antibody against the LPS O-polysaccharide chain. However, there is not much information about the precoated antibodies and therefore about the type of LPS that is measured. Moreover, this method does not target the lipid A moiety involved in TLR4-mediated inflammation. Finally, another way to quantify LPS is to measure its endotoxic activity. The most widely used test is the Limulus amebocyte lysate (LAL) assay, based on the property of Limulus amebocytes of coagulating in contact with LPS. This coagulation process triggers a signaling cascade leading to the formation of two molecules that can be detected by either colorimetric or turbidimetric assays. Hence, LPS concentration is expressed in international endotoxin units

(EU), whereby 1 EU equals 100 pg of *E. coli* 0113:H10:K LPS. The LAL assay measures LPS biological activity and not the LPS still bound to plasma molecules such as soluble CD14 (sCD14) or lipopolysaccharide-binding protein (LBP). In addition, the LAL assay has been shown to interact with other factors including the various anticoagulants added during sample collection (17). These issues might explain the large range of endotoxin baseline values in healthy individuals (from 0.1 to 60 EU/ml) observed in the literature (17).

#### Endotoxin-Associated Diseases

LPS may be a causal or complicating factor of multiple serious diseases. The inflammatory bowel diseases (IBDs) ulcerative colitis and Crohn's disease are both characterized by an exaggerated mucosal inflammation leading to chronic diarrhea and abdominal pain. Plasma LPS levels are increased in IBD patients (24, 67, 117) and highly correlated with the severity of the disease (67). Furthermore, elevated plasma LPS has been correlated with other diseases including psychiatric disorders such as autism (48) or Alzheimer's disease (162) but also respiratory problems like asthma (42). Despite the increased plasma LPS levels in these diseases, the role of LPS in their etiology has not been firmly established. On the other hand, a central role of LPS in the pathophysiology of sepsis and septic shock has been described. Moreover, over the past decades, the presence of LPS at low concentrations in the blood has also been connected to metabolic disorders. This chronic low endotoxemia has been termed "metabolic endotoxemia." The pathogenesis of these two endotoxin-related conditions, sepsis and metabolic endotoxemia, are discussed below after a general overview of the mechanisms of inflammation triggered by endotoxin in immune-competent cells.

Endotoxin and inflammation. GENERAL OVERVIEW. One of the mechanisms by which the innate system prevents invasion of pathogenic bacteria is through TLRs, which recognize specific molecular patterns that are present on bacteria, including LPS (3, 123). Eleven members of the TLR family have been identified in mammals, whereas LPS binds mainly TLR4. Most immune-competent cells express TLR4 and activate the same signaling pathways triggered by LPS binding (153). Before TLR4 signal activation CD14, a glycosylphosphatidylinositolanchored membrane protein (mCD14) that also exists in a soluble form (sCD14), binds LPS. CD14 transfers LPS to Lymphocyte antigen 96 (MD2), a protein expressed on the cell surface complexed with TLR4 that dimerizes and triggers two different signaling pathways: the myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88) and the Toll interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-ß dependent pathways. Both lead to the recruitment of numerous downstream molecules, which results in the translocation of transcription factors nuclear factor-kB (NF-kB) and interferon regulatory factor 3 to the nucleus and the transcription of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, interferon (IFN)- $\gamma$ , and tumor necrosis factor (TNF)-α mRNA (3, 123).

PARTICULARITY OF INTESTINAL EPITHELIAL AND IMMUNE CELLS. Given the proximity between IECs and the gut commensal bacteria, the intestinal mucosa has evolved to maintain immunological tolerance (1, 2). The small and large intestine express TLR4 at low levels compared with other organs such as the

spleen (1). Moreover, one study showed that TLR4 is predominantly localized on the IEC basolateral side (58), thereby avoiding TLR4 interaction with luminal LPS. However, the precise localization of TLR4 remains inconsistent between studies (25, 72, 107). More importantly, IECs are poorly responsive to LPS (1). In vitro prolonged exposure of IEC cell lines to LPS results in a state of LPS tolerance that includes a decreased TLR4 surface localization (2) and increased expression of molecules inhibiting TLR4 signaling including the Toll/IL-1R domain-containing inhibitory protein (116) and single Ig IL-1R-related molecule (159). Similarly, immune cells from the lamina propria have developed protective mechanisms against continuous LPS stimulation. Dendritic cells (DCs) express TLR4 but are poorly responsive to LPS (29). Isolated macrophages from lamina propria are devoid of surface CD14, leading to a considerable downregulation of LPSinduced proinflammatory activity (140).

Pathophysiology of sepsis. One of the most challenging tasks in critical care medicine is the treatment of serious infections associated with multiple organ failure, termed sepsis, severe sepsis, or septic shock depending on the severity of the infection. Sepsis was originally described as systemic inflammation in response to microbial infection that can progress to septic shock, a catastrophic syndrome characterized by refractory hypotension and multiple organ failure (7, 115). Both Gram-negative and Gram-positive bacteria can play a role in causing sepsis (115), and the presence of bacteria or bacterial toxin is recognized to be the most potent mediator implicated in the pathogenesis of sepsis and septic shock. Among bacterial toxins, early clinical experiments have described the role of high doses of LPS in the pathogenesis of sepsis. High endotoxemia can be detected in 20-89% of septic patients (89). A single injection of LPS to healthy volunteers triggers symptoms similar to sepsis shock (142, 151). C3H/HeJ mice, which have a loss of function in TLR4, showed resistance to sepsis after a high dose of LPS, whereas their wild-type littermates died after the same or even lower doses of LPS (124). These experimental and clinical data confirm the involvement of high plasma LPS concentrations in sepsis and septic shock. Although the origin of endotoxemia might be via a trauma or severe infection, a defective intestinal barrier function allowing enteric LPS to cross the intestine makes an important contribution to the onset and maintenance of the inflammatory state (133).

The pathogenesis of sepsis consists of three phases. First, LPS binds its specific receptor TLR4, expressed in most immune-competent cells (153), leading to the release of proinflammatory cytokines contributing to the generalized inflammation ("cytokine storm"). This inflammation promotes disseminated intravascular coagulation and formation of microthrombi that exacerbate the intensity of sepsis (115). Second, the localized process becomes systemic, leading potentially to multiple organ failure (115). In this second phase, the body responds by a balanced release of pro- and anti-inflammatory molecules. Finally, during the later phase the innate immune system develops an endotoxin-tolerant phenotype (15): the anti-inflammatory process overwhelms the proinflammatory one. This phase is characterized by a downregulation of proinflammatory cytokines and TLR expression, associated with an increase in anti-inflammatory cytokines such as IL-10, reducing the immune response against LPS (15, 115). However, cells from other tissues and organs (like liver, kidney, lung, brain, or the GIT) can still be hyperreactive to LPS, causing hyperinflammation in these tissues. This later state is correlated to high risks of mortality (15).

*Metabolic endotoxemia.* Unlike acute inflammation observed in sepsis, metabolic syndrome is characterized by a chronic low-grade inflammation and endotoxemia with LPS plasma levels five times lower than those observed in sepsis.

The incidence of obesity worldwide has increased drastically during recent years. According to the World Health Organization, 39% of adults over 18 yr old were overweight and 13% were obese in 2014. Obesity is associated with multiple metabolic disorders described as the metabolic syndrome including type II diabetes, cardiovascular diseases, and nonalcoholic fatty liver disease (74, 79). Over the years, it has become clear that obesity is associated with a state of chronic low-grade inflammation characterized by increased inflammatory marker circulating levels such as TNF- $\alpha$ , C-reactive protein, IL-1- $\beta$ , plasminogen activated protein, IL-6, IL-8, IL-10 or macrophage chemotactic protein-1 (74, 79). The adipose tissue seems to be the starting point of this general low-grade inflammation (79). At the onset of obesity, the adipose tissue rapidly shows infiltration by macrophages (74, 79). This local inflammation rapidly reaches the systemic circulation and activates a stress pathway that disrupts metabolic cascades in host tissues, especially insulin signaling, leading to insulin resistance (IR). In this IR state, insulin fails to increase glucose uptake by target tissues, to inhibit liver glucose production and adipose tissue lipolysis. To counteract this lack of effects, pancreatic  $\beta$ -cells constantly increase their insulin secretion until they fail, resulting in insulin production deficiency (74, 79). Since insulin is involved in several metabolisms, IR leads to multiple metabolic disorders. For instance, IR reduces the inhibition of adipose tissue lipolysis, thereby increasing free fatty acid (FFA) release in the bloodstream. Hence, FFAs reach the liver, where they are esterified and stored as triglycerides in hepatocytes (40). This steatosis is tightly associated with chronic hepatic inflammation and can progress to more dramatic states influenced by additional factors including inflammatory cytokines or adipokines (40).

Although the low-grade inflammation state and downstream consequences were widely accepted, the original source of the adipose tissue inflammation was unknown until Cani et al. hypothesized that enteric LPS could be an early factor in the triggering of low-grade inflammation. By measuring plasma LPS, they showed a perturbation of the circadian rhythm of LPS circulating levels as well as a small, yet significant (1.4-fold), increase of endotoxemia in mice fed for 4 wk with a high-fat diet (72% fat of total calories) compared with chow-fed animals (21, 22). They confirmed the key role of LPS in diet-induced low-grade inflammation using osmotic minipumps delivering small amounts of LPS continuously to mice over 4 wk in order to mimic chronic metabolic endotoxemia (21). High-fat diet and experimental endotoxemia induced the same metabolic disorders, i.e., inflammation, weight gain, and hepatic steatosis (21). In addition, using mice knocked out for TLR4 signaling molecules, multiple studies demonstrated that a deletion of TLR4 or CD14 prevented diet-induced weight gain and metabolic disorders (21, 36, 52, 54, 121, 126, 132, 145). On the other hand, deletion of Myd88 showed various results depending on the site of deletion: while specific deletion

#### INTESTINAL AND HEPATIC HANDLING OF LPS

in IECs or in the central nervous system partially protected the animals from diet-induced obesity, a whole body deletion of Myd88 as well as specific deletion in immune cells did not show protection (51, 73, 85). It is noteworthy that although the correlation between metabolic syndrome and elevated endotoxemia has been confirmed in multiple animal studies either in diet-induced obesity or genetic models of obesity, some studies also failed to detect increased plasma LPS in obese animals (12, 86). Thus, because of differences in protocols in terms of diet composition, length of diet consumption, and animal models, it still remains unclear when, where, and how precisely elevated endotoxemia occurs during consumption of a high-fat diet. In humans, obese phenotype is associated with elevated endotoxemia (34, 81) and elevated TLR4 expression in several tissues (17) including adipose tissue (34). In addition, a rapid weight loss obtained after bariatric surgery is accompanied by decreased endotoxemia and TLR4 and CD14 expressions in mononuclear cells (108). However, the relationship between consumption of high-fat diet and elevated endotoxemia is still unclear (17). While two studies showed a correlation between high-fat diet consumption and elevated fasted endotoxemia (5, 119), fat overconsumption (+760 kcal/day) for 8 wk did not change endotoxemia in healthy volunteers (93).

#### Intestinal Barrier Function and LPS

Gut microbiota is the major source of LPS, and the primary site of LPS entry is through the gut. Nevertheless, the mechanisms and the place of passage of LPS across the intestinal mucosa are not fully understood. In this section, we first describe the mechanisms that limit the presence of LPS at the apical side of IEC and then focus on the transport of LPS across IEC.

Luminal mechanisms limiting access of LPS to intestinal epithelial layer. A wide range of molecules, including mucins and AMPs are secreted by enterocytes, goblet cells (GCs), and Paneth cells along the intestine. They can all act on luminal bacteria, including Gram-negative bacteria, thus limiting the number of LPS-bearing bacteria and LPS molecules coming in close contact with the apical side of the IEC.

MUCINS. The mucus is composed of complex carbohydrates forming a gel lining the epithelium. The mucus is hydrophobic, providing a physical barrier that protects the epithelial cells by acting as a diffusion barrier with its bound water. The organization of the mucus differs along the gut: the small intestine harbors a single layer, while the colon displays an outer layer, normal habitat for commensal bacteria, and an inner layer densely packed with small pores that physically prevent bacteria penetration (118). The major components of the mucus that give the mucus its gel-like properties are mucins. These proteins, synthesized by GCs, form a gel with their heavily O-glycosylated residues (118). Up to 20 different mucin genes have been described: Muc1 to Muc20. Muc5 is one of the most abundant proteins in the stomach mucus, whereas Muc2 is in greater quantity in the intestine, especially in the large intestine (131). Several factors can regulate Muc2 expression including proinflammatory cytokines, bile acids (125), as well as LPS itself, which upregulates Muc2 expression through NF-KB activation (99).

ANTIMICROBIAL PEPTIDES. Paneth cells are epithelial secretory cells confined to the bottom of the crypts in the small intestine.

They release large granules containing a wide variety of AMPs and enzymes in the crypts that disseminate into the mucus layer. These proteins are synthesized in response to Grampositive or -negative bacteria but also LPS itself detected in the lumen (8). However, as the small intestine is constantly exposed to bacteria, Paneth cells likely secrete granules continuously. AMPs have different mode of actions toward LPS, either targeting LPS directly or inducing bacterial death, and therefore LPS release. Their direct action on LPS is due to their cationic nature. AMPs bind the negatively charged LPS (13), which, once bound to AMPs, is no longer able to trigger TLR-mediated inflammation. AMPs also target bacteria by binding to their cell membrane. The most abundant AMPs released into the crypt lumen by Paneth cells are defensins, divided into two subgroups depending on their cysteine residues:  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensing. Defensing permeabilize cell membranes, leading to bacteria death (13). Moreover, defensins are able to bind lipid II, a key precursor in bacterial cell wall biosynthesis, which leads to a perturbation in the biosynthesis machinery, resulting in lesions in the cell wall (134). In addition to their antimicrobial activities, a number of defensins have a role in innate immunity, since most of them are chemoattractant for monocytes or T cells (136).

Paneth cells also secrete enzymes: lysozyme C and group IIA phospholipase A2 (PLA2). Both disrupt bacterial cell wall homeostasis, leading to bacteria death. Lysozyme C cleaves the peptidoglycan of the bacteria cell wall, whereas PLA2 degrades bacteria membrane phospholipids (88, 110). Lysozyme C exhibits antimicrobial activity against both Gram-negative and -positive bacteria, whereas PLA2 has a preferential activity against Gram-positive bacteria (13). Enterocytes, but also Paneth cells, secrete type C lectins: regenerating family member (Reg)3 $\alpha$  and Reg3 $\beta$ . The rodent ortholog to Reg3 $\alpha$ , Reg3 $\gamma$ , has antimicrobial activity toward Gram-positive bacteria only (28) and is involved in mucus organization (101). Conversely, Reg3 $\beta$  binds the LPS O-polysaccharide chain (149). Both C-lectins' expressions are highly induced by LPS through the TLR pathway (148).

INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE. Besides their primary roles in nutrient absorption, enterocytes and colonocytes exhibit a secretory activity. Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is one of the gut mucosal proteins secreted by the enterocytes and colonocytes to maintain gut barrier function. IAP is a brush-border enzyme secreted along the intestine predominantly in the small intestine (91) in a bidirectional secretion into the lumen as well as into the bloodstream (47). This enzyme has several biological roles including the regulation of lipid absorption and duodenal pH but also LPS detoxification. The first evidence of the role of IAP in defense against LPS came from Poelstra and colleagues, who demonstrated that an IAP inhibitor decreased the survival rate in a rat model of septic shock (146). It was then confirmed, with the zebrafish model, that IAP prevents excessive intestinal inflammation by dephosphorylating LPS (10). In vitro, IAP transfection of the human colorectal cell line HT-29 confirmed that IAP dephosphorylates LPS, reducing NF-kB activation and thereby inflammation (63). IAP cleaves the phosphate groups in positions 1 and 4 of lipid A, leading to a nontoxic molecule no longer able to trigger TLR4 signaling. Moreover, dephosphorylated LPS competes with intact LPS to bind TLR4 (92). IAP expres-

sion is regulated by several factors including LPS itself as well as the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (10, 92).

LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEIN. LBP is an acutephase protein synthesized in response to proinflammatory cytokines by multiple cell types including IECs (157). LBP has a high affinity for the LPS lipid A moiety (135) and modulates LPS-induced inflammation (164). LBP is able to remove LPS bound to mCD14 or MD2, forming a large LBP-LPS complex with a reduced ability to trigger TLR4 signaling (135). Nevertheless, at low concentration, LBP potentiates LPS recognition by transferring it to the mCD14-TLR4/MD2 complex triggering the inflammatory signal (160).

Passage of LPS across the intestinal epithelial layer. GEN-ERALITY ON MOLECULE PASSAGE ACROSS INTESTINAL EPITHELIAL CELLS. Even with this potent luminal mechanism to prevent LPS from reaching IECs, LPS might still face the apical side of IECs and cross the epithelial layer. The controlled passage of immunogenic substances by the epithelium involves several mechanisms: transcellular passage across M cells located in Peyer's patches, projections from DCs, and transepithelial passage across enterocytes or GCs (16). In this section, we focus on the passage across enterocytes and/or colonocytes, which involves two routes depending on the size and the charge of the molecules crossing the epithelium.

Paracellular permeability refers to the passage of smalldiameter, i.e., <3.6 Å, molecules between adjacent IECs. This pathway is regulated by junctional complexes including tight junctions, adherens junctions, and desmosomes. The communication and adhesion between cells are provided by adherens junctions and desmosomes, whereas tight junctions regulate the paracellular permeability. Tight junctions are protein complexes including claudins, occludin, and zonula occludens associated with cytosolic proteins. IECs are also able to transport molecules of higher diameter via a transcellular pathway through transcytosis. Multiple transcytosis mechanisms have been described, including clathrin-mediated endocytosis, micropinocytosis, and caveolin-mediated endocytosis. The most extensively studied type of endocytosis is clathrin-mediated endocytosis (39). This mechanism involves a specific receptorligand interaction occurring in the clathrin-coated pits at the plasma membrane. The recruitment of adaptor proteins leads to the formation of clathrin-coated vesicles. Dynamin disconnects the vesicles from the plasma membrane, allowing them to traffic toward early endosomes or the Golgi apparatus (39). A second transcytosis mechanism is micropinocytosis, an active but nonselective uptake of soluble agents, nutrients, and antigens initiated from surface membrane ruffles forming large uncoated endocytic vesicles called macropinosomes (39). One other clathrin-independent pathway is the caveola/lipid raft endocytosis pathway that occurs in cholesterol- and sphingolipid-enriched domains in the plasma membrane called lipid rafts (138). This particular composition leads to the formation of flask-shaped invaginations of the plasma membrane (50-80)nm in diameter) called caveolae. Two major proteins are involved in caveola endocytosis: the coat protein caveolin, which stabilizes the complex, and the dynamin that separates invaginations from the membrane (39). This pathway concerns molecules that have receptors in lipid rafts or lipophilic molecules.

ROUTE OF PASSAGE OF LPS ACROSS IEC. In vivo, LPS is able to be internalized as a free molecule into the enterocytes (11, 94)

of each intestinal section (60) and reach the lamina propria (60). However, the precise mechanisms by which LPS is translocated in each intestinal section remain a controversial area. The passage of E. coli LPS across rat colon tissues mounted in an Ussing chamber is temperature dependent (144). In addition, transport of LPS from Shigella typhimurium across Caco-2 monolayer is ion and pH independent but inhibited by a metabolic inhibitor, 1,2-dinitrophenol, and a microtubule disruptor, colcemid (144), suggesting active transport. Some studies suggest that the paracellular pathway might be involved in LPS transport, based on the parallel increase in plasma LPS and in vivo permeability to fluorescently tagged dextran 4000 in models of obesity (22). However, LPS molar mass is  $\sim 10$ kDa and can reach 15-20 kDa depending on the length of the O-polysaccharide chain. It spontaneously forms microaggregates in aqueous solutions that can reach a size of 300-1,000 kDa (120). With this size, LPS likely crosses IECs through an active transcellular pathway. Along these lines, electron microscopy pictures revealed the internalization of Shigella LPS into polarized T84 monolayer cells after incubation with LPS for 2 h (11). More precisely, LPS clustered into coated pits and coated vesicles at the apical membrane, suggesting clathrinmediated endocytosis, and was not colocalized with fluidphase marker (11). However, Mani et al. recently showed in pig ileal tissue mounted in Ussing chambers that lipid raft disruption by methyl-β-cyclodextrin decreased E. coli LPS permeation coefficient without any change in paracellular permeability, suggesting the involvement of caveola-dependent mechanisms (104). Taken together, these results suggest that LPS crosses the intestine via a transcytosis pathway via either lipid raft- or clathrin-mediated endocytosis but that further research is needed to precisely identify the actual mechanisms. Moreover, a recent study using in vivo imaging also identified passage of LPS through GCs in mouse small intestine (75). Recently, this goblet cell-associated antigen passage (GAP) has been described as a pathway delivering luminal antigen to underlying lamina propria DCs (87). In the small intestine, the GAP formation is activated by acetylcholine (ACh). Conversely, despite the presence of abundant GCs and mucus secretion, colonic GCs are not responsive to ACh to form GAP. Consequently, in healthy colonic cells, no GAP occurs. This unresponsiveness of GC to ACh is regulated, through a Myd88-dependent pathway, by bacterial components contained in the gut microbiota (87). Whether this route of passage is also involved in LPS crossing of the epithelium therefore must be confirmed.

PUTATIVE TRANSPORTERS INVOLVED IN PASSAGE OF LPS ACROSS IEC. As mentioned above, LPS likely crosses the gut via clathrin- and lipid raft-mediated endocytosis, mechanisms that both require a specific receptor for LPS. We propose that TLR4 and scavenger receptor (SR)-BI could both be involved.

By immunohistochemistry, several in vivo studies localized TLR4 on the plasma membrane of small and large intestine, without determining whether it was at the apical or basolateral side, however (26, 116). In vitro, Cario et al. have localized TLR4 at the apical side of T84 cells (25), whereas TLR4 was localized on the basolateral surface of crypts of human fetal small intestinal enterocytes (58). However, other studies have found TLR4 in the intracellular compartment (107), more specifically in the Golgi apparatus of small intestinal epithelial cells (72). In vitro, using multiple IEC lines, Suzuki et al.

described a correlation between TLR4 expression and LPS uptake based on the observations that IFN- $\gamma$  increased both TLR4 expression and LPS uptake (141). Tomita et al. confirmed, in rat colonic tissues in Ussing chambers, that adding antibodies against TLR4 and CD14 decreased LPS permeation by half, suggesting that TLR4 and CD14 are involved but not essential to LPS transport (144). It is noteworthy that TLR4mediated intracellular uptake is not ubiquitous in all types of cells since macrophages and endothelial cells from TLR4knockout mice exhibit the same LPS uptake as wild-type mice (43). Along this line, one study using the mCLcl2 intestinal cell line showed that LPS crosses the apical membrane independently from TLR4 and binds TLR4 localized at the Golgi apparatus (71), triggering TLR4 signaling. Although these results need to be confirmed in vivo and in vitro in other IEC cell lines, they suggest that LPS apical uptake and internalization might also involve a TLR4-independent pathway.

Another possible family of receptors involved in LPS apical uptake is the scavenger receptor (SR) family. These receptors were first identified by their ability to bind and internalize modified, i.e., oxidized or acetylated, lipoprotein in macrophages. They can bind a variety of ligands including LPS. SR-A, expressed in macrophages, including Kupffer cells, is able to bind and internalize LPS, helping its clearance (122). SR-BI is expressed in the liver but also in intestinal brushborder membrane of IECs from the duodenum to the rectum as well as in Caco-2 cells (20, 98, 100). The primary intestinal role of SR-BI is to mediate cholesterol and triglyceride absorption (14). In macrophages, SR-BI is also able to bind LPS (68) and might be, similarly to SR-A, involved in the uptake and internalization of LPS in HeLa cells (155) and hepatocytes (19). However, to date the role of SR-BI in the passage of LPS across IECs has not been investigated.

SPECIAL ROLE OF CHYLOMICRONS IN INTESTINAL EPITHELIAL TRANSLOCATION OF LPS DURING POSTPRANDIAL PHASE. In vivo, gavage with oil increased LPS intestinal absorption in rodents (21, 95). In vitro, incubation of Caco-2 cells mounted on Transwell membranes with lipid micelles increased LPS crossing through the monolayer (95). The lipid physicochemical structure (emulsified vs. nonemulsified oil) and the fatty acid composition of the oil also impact endotoxin uptake. During the postprandial period, dietary lipids are efficiently absorbed by the small intestine through incorporation into triglyceriderich lipoproteins-chylomicrons-and transported in the bloodstream to target tissues. Recent evidence identified that, in addition to lipid transport, chylomicrons are also able to bind and transport LPS independently of chylomicron size (95). Indeed, in healthy men, endotoxemia increased after a mixed meal (fat 33% of total energy) to reach its maximum concentration at 60 min. At this peak time, endotoxemia tended to be higher in the chylomicrons than in the remaining lipoprotein fraction (95). Moreover, Ghoshal et al. observed that inhibiting chylomicron formation reduced the quantity of LPS in the blood, suggesting a key role of chylomicrons in postprandial LPS intestinal crossing (61). Lipid absorption occurs mainly in the small intestine, and chylomicrons are not synthesized in the large intestine. Although probably important in metabolic endotoxemia, chylomicron-mediated LPS absorption is therefore probably limited to the small intestine and might not occur in the large intestine, where high concentrations of LPS are present.

CONCLUSION. Likely because of the differential environments within the small and large intestine, LPS might not cross via the same pathway. In the small intestine, the GAP has been identified as the major pathway for presenting antigen to lamina propria DCs (87). Howe et al. suggested that LPS reaches the lamina propria by crossing through the GAP pathway (75). However, pictures from electron microscopy (94) and immunochemistry (60) revealed that LPS localized in cell types other than GCs, suggesting other routes of passage. Finally, during the postprandial phase, chylomicrons are able to bind and transport LPS from the intestinal lumen to the blood (61, 95). LPS might take three different pathways to cross the small intestine: GAPs, clathrin- or caveolin-dependent transcytosis in enterocytes, or the chylomicron pathway after a lipid-rich meal (Fig. 2). In contrast to the small intestine, the colon harbors a higher quantity of LPS-bearing Gramnegative bacteria. No colonic GAP is observed in a healthy colon (75). Similarly, chylomicrons are not synthesized in the large intestine. Those two ways of passage can therefore be excluded. However, electron microscopy pictures from Beatty et al. revealed that LPS crossed T84 colonocytes through clathrin-dependent transcytosis (11). In addition, two studies on IEC cell lines and colonic tissues have described the major role of TLR4 in LPS permeation (141, 144). It is therefore likely that LPS crosses the colonocytes through transcytosis partly mediated by TLR4 and possibly other undetermined transporters (Fig. 2).

Particularity of LPS itself in modulating intestinal epithelial permeability. One particularity of LPS is that it is able to alter gut permeability when present in the basolateral but not the apical side of IECs. Models of septic shock demonstrate altered gut permeability 4 h after intraperitoneal LPS injection in rodents (66). However, in this model the direct role of LPS cannot be demonstrated and increased permeability could be due to release of proinflammatory cytokines. In vitro, IEC-6 monolayers exposed to low-dose LPS (1 ng/ml) for 5 days in the basolateral but not the apical compartment displayed increased monolayer permeability compared with monolayers incubated with medium (55, 66). Moreover, LPS-induced increased permeability involved a TLR-4-dependent upregulation of mCD14 expression (66). This specificity of LPS action on the intestinal epithelium might play a great role in the perpetuation of inflammation since it suggests that once LPS has crossed the IEC barrier it can induce epithelium hyperpermeability.

Lamina propria immune cells. The lamina propria, a layer of connective tissue below the epithelial barrier, contains many immune cells constituting an immunological barrier behind the chemical and physical barrier just described (109). Those cells are the first immune cells to encounter LPS in the body and respond to LPS via TLR4-mediated response, yet some of these immune cells also exhibit specific proteins and enzymes with binding or detoxification properties against LPS.

DENDRITIC CELLS AND MACROPHAGES. DCs and macrophages are found in the lamina propria and express the enzyme acyloxyacyl hydrolase (AOAH) involved in modulating LPS endotoxicity.  $AOAH^{-/-}$  mice show persistent inflammation after subcutaneous LPS injection, suggesting that AOAH plays a key role in modulation of LPS toxic activity (102). Indeed, AOAH inactivates LPS by removing the secondary fatty acyl chains on the lipid A moiety. Deacylated LPS is no longer able



Downloaded from http://ajpgi.physiology.org/ by 10.220.33.2 on September 20, 2016

Review

Fig. 2. Putative pathways of LPS translocation across the small and large intestine. LPS molar mass is  $\sim 10-20$  kDa, and it spontaneously forms aggregates that can reach a size from 300 to 1,000 kDa (120), which unlikely crosses the intestinal epithelial barrier through a paracellular route in healthy individuals. *A*: in the small intestine, LPS might take 3 different pathways to cross the epithelial barrier: goblet cell-associated passage (GAP), specific receptor-mediated transcytosis in enterocytes, or the chylomicron pathway after a lipid-rich meal. *B*: in a healthy colon, GAP and chylomicron absorption do not occur and LPS likely crosses the colonocytes through transcytosis partly mediated by TLR4 and other undetermined transporters.

to initiate TLR4 signaling and even competitively inhibits signaling by the active form of LPS (111). LBP as well as sCD14 both induce a rearrangement of LPS that leads to a better exposure of its lipid A for AOAH detoxification (62).

POLYNUCLEAR NEUTROPHILS. Polymorphonuclear leukocytes, especially neutrophils, release numerous proteins such as LF or AMPs: lysozymes or defensins. Because of their cationic nature, each of these proteins shows high affinity to the anionic LPS, which, once bound, is no longer able to interact with the MD2/TLR4 complex, preventing downstream signaling.

LF, released by neutrophil granules during inflammatory response, exhibits antibacterial activity that can protect the host from septic shock (41, 96). By binding LPS lipid A with high

affinity with LPS (Table 1), LF reorganizes the bacterial cell wall, leading to the release of free LPS (41). Nevertheless, LF is able to sequester LPS (161), preventing it from interacting with mCD14/TLR4 complex (96). Moreover, LF is able to block the binding of NF- $\kappa$ B to the TNF- $\alpha$  promotor, leading to reduced TNF- $\alpha$  release (70).

Bactericidal permeability-increasing protein (BPI) is another major constituent of the granules of polymorphonuclear leukocytes. Because of its strong affinity for LPS lipid A moiety (Table 1), BPI exhibits a high selectivity toward Gram-negative bacteria (59). BPI is expressed in human intestinal cell lines as well as murine intestine, with decreasing levels along the intestinal tract (highest in the small intestine and lowest in

	Binding Affinity (K <sub>d</sub> ), nM	References
BPI	0.2–5	33, 52
LBP	1–3.5	26, 132, 142
Lactoferrin	3.6-390	41
	depending on fixation site	
Serum amyloid P	3.9	33
Lectins	<1	26
Gelsolin	<1	26
Hemoglobin	3.1-6.3	72
sCD14	30–74	39, 142

Table 1. LPS binding protein affinities

For comparison, the antibiotic polymixin B exhibits a higher affinity for LPS binding ( $K_m = 0.5 \ \mu M$ ) (135).

the colon) (23). Once LPS is bound to BPI, it will no longer interact with TLR4, preventing the inflammation cascade.

#### Beyond the Gut

Despite the various gut mechanisms limiting the entry of enteric LPS, the latter can still cross the intestine. It then spreads into the portal vein and reaches the liver, where major detoxification and disposal processes occur. Yet some LPS can still escape these detoxification processes and reach the systemic circulation. Several mechanisms are also present in the plasma to detoxify and/or transport LPS back to the liver (Fig. 3). In this section, we review the principal mechanisms of liver detoxification and describe the major transport proteins involved in LPS clearance to the liver.

The liver: the major LPS-detoxifying organ. The major role of the liver is to take up nutrients from the portal vein and distribute them to the other organs. At the same time, the liver is continuously exposed to a variety of gut-derived antigens, bacteria, and endotoxins and has to clear these toxic components. The liver is structurally heterogeneous with parenchymal and nonparenchymal cells. Hepatocytes, parenchymal cells, represent the majority (60%) of the total liver cells, while nonparenchymal cells compose 40% of the liver cells including 15% of Kupffer cells, liver macrophages that reside in the lumen of the liver sinusoids. The liver is the major organ involved in LPS detoxification, although the mechanisms are not fully understood. In mice, 45% and 35% of a single intravenous injection of LPS (700 ng) is found in the liver after 5 and 60 min, respectively (32). Moreover, Mimura et al. showed that after intravenous injection of fluorochrome-labeled LPS fluorescence was found after 5 min in the hepatocytes and after 20 min in the bile (106). However, within the liver, LPS localization seems dynamic: during the first 5 min after portal injection radiolabeled LPS is found in Kupffer cells, and then it is redirected to hepatocytes and excreted into the bile (150) (Fig. 3). Despite the description of this dynamic process of LPS disposal, the precise mechanisms of transfer of LPS from Kupffer cells to hepatocytes and then to the bile are poorly described, although it clearly involves lipoproteins and apolipoprotein E (129, 130). Similarly, the cosecretion of LPS with bile acids seems to involve hydrophobic interactions of LPS with bile acids (57) before secretion into the duodenum (103, 106). Finally, besides disposal of LPS through bile secretion, the liver is also endowed with enzymes that detoxify LPS. As macrophages, Kupffer cells express the leukocyte AOAH that detoxifies LPS by deacetylation (137) after phagocytosis by SR (150). Hepatocytes also express a particular isoform of alkaline phosphatase that dephosphorylates the phosphate groups in positions 1 and 4, forming a nontoxic LPS molecule (124a).

*Plasma LPS transport proteins.* Either in host biological fluids or in cells, LPS is mainly attached to binding proteins (31). In the plasma multiple proteins with various affinities (Table 1) have been described: LBP, sCD14, lipoproteins, BPI, adiponectin, serum amyloid P, lectins, gelsolin, and hemoglobin (30). The most LPS specific, LBP and sCD14, as well as lipoproteins that are involved in LPS detoxification are presented next.

LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEIN. As already mentioned, LBP is an acute-phase protein synthesized by hepatocytes (82) and intestinal cells (157) in response to proinflammatory cytokines and released into the bloodstream. The concentration of LBP in healthy human serum ranges from 5 to 15  $\mu$ g/l and exhibits a 30-fold increase 2–3 days after the onset of the acute phase of the inflammation reaction (135, 164). In an aqueous solution such as blood, the amphipathic LPS aggregates and binds poorly to immune cells. LBP facilitates LPS monomerization by inserting into aggregates, thereby helping LPS transfer to immune cells and degradation by these later (135). Second, LBP catalyzes the transfer of LPS to lipoproteins such as chylomicron or high-density lipoproteins (HDLs), promoting its clearance by the liver (156, 158). Nonetheless, at low concentration LBP potentiates LPS-induced inflammation by transferring LPS to the TLR4-MD2 complex (160).

SOLUBLE CD14. CD14 exists in two forms: membrane CD14 (mCD14) and soluble CD14 (sCD14). As already mentioned, mCD14 binds LPS-LBP complexes, resulting in TLR4 activation. The soluble form is released by the phagocyte immune cells monocytes and macrophages and released into the blood-stream. In healthy individuals, sCD14 concentration in the blood is  $\sim 2$  mg/l (113) and increases during infection.

The binding affinity of sCD14 for LPS is moderate (Table 1) but enhanced by LBP (83). sCD14 has a dual role, either inhibiting or enhancing LPS cellular activation. It is able to



Fig. 3. Summary of the mechanisms limiting the entry and dissemination of LPS into the circulation. Gut microbiota is the major source of LPS, and the primary site of LPS entry is through the intestine. The gut mucosa provides numerous proteins [mucins, antimicrobial peptides (AMPs), intestinal alkaline phosphatase (IAP)] that prevent LPS-bearing bacteria or LPS from coming in close contact with the apical side of intestinal epithelial cells or that detoxify LPS within the mucosa [acyloxyacyl hydrolase (AOAH), bactericidal permeability-increasing protein (BPI)]. Despite this mucosal gut barrier, LPS might reach the liver through the portal vein. The liver participates in LPS detoxification via 2 major processes: either detoxification of LPS through specific enzymes (AOAH) or alkaline phosphatase (ALP) or coexcretion with bile popolysaccharide-binding protein (LBP), soluble cluster of differentiation 14 (sCD14), or lipoproteins, are also involved in the clearance of LPS to the liver.

20

, 2016

Review G11

#### INTESTINAL AND HEPATIC HANDLING OF LPS

transfer LPS either to mCD14 anchored to the membrane or directly to TLR4/MD2 complex when mCD14 is absent, thereby triggering LPS-induced TLR4 activation (83). However, sCD14 can also transfer free LPS or mCD14-bound LPS to lipoprotein, thus reducing LPS cellular stimulation (83). Like LBP, this dual sCD14 action is concentration dependent: at concentrations below physiological level sCD14 enhances LPS cellular activation, whereas it exhibits inhibiting effects at high concentrations (83).

PLASMA LIPOPROTEINS. The primary function of plasma lipoproteins is lipid transport between tissues and organs, but they are also involved in LPS detoxification. All lipoprotein classes (very low-density lipoproteins, HDL, low-density proteins, and chylomicrons) bind LPS and reduce LPS-induced inflammation (69) (156). When incubated with human plasma, >90% of LPS is associated to lipoproteins, the majority (60%) with HDL (97). However, chylomicrons might have the most potent detoxifying effects (156). Transfer of LPS to the lipoprotein membrane is catalyzed by several plasma proteins such as phospholipid transfer protein or cholesteryl ester transfer protein. They mediate the exchange of LPS between micelles and help the transfer of LPS to lipoproteins only and not to TLR4/CD14 complexes (135).

Lipoproteins increase the clearance of LPS by formation of LPS-lipoprotein complexes preventing LPS binding to TLR4, thereby reducing cytokine secretion. Moreover, lipoproteins are able to take up LPS already bound to monocytes, reducing LPS-induced inflammation (84). When bound to lipoproteins, LPS is transferred to the liver, where it is excreted into the bile.

#### Conclusions

For bacteria, LPS is vital for structural and functional integrity. Conversely, in humans LPS induces a large array of deleterious effects that can progress from fever to death in the case of sepsis. Recently the presence of LPS in the plasma has been linked to obesity-associated metabolic disorders, increasing the scientific interest for this molecule. As a major component of the bacteria cell wall, LPS originates primarily from the gut microbiota. The host is endowed with multiple and overlapping mechanisms to avoid the presence of LPS in the systemic circulation that we have just reviewed. At the intestinal level, these mechanisms limit the close contact of LPS or LPS-bearing bacteria with IECs or reduce LPS toxicity by modifying its structural components, limiting further interactions with TLR4. If LPS spreads into the portal vein and reaches the liver, this later harbors major detoxification and disposal processes (Fig. 3). Finally, plasma LPS is also rapidly complexed to transport proteins that limit LPS interaction with host TLR4 and bring LPS back to the liver for disposal through the bile (Fig. 3). However, many mechanisms are not fully described, especially at the gut epithelium and liver levels. The precise pathway by which LPS is transported through the gut barrier remains a controversial area. Likely because of the differential LPS density within the small and large intestine, LPS might not penetrate via the same pathway. To cross the small intestine, LPS might take three different routes of passage: GAPs, clathrin- or caveolin-dependent transcytosis in enterocytes, or the chylomicron pathway after a lipid-rich meal. Conversely, in a healthy colon, LPS might cross the colonocytes through a clathrin- or caveolin-dependent transcytosis mediated by TLR4 and other undetermined transporters. Moreover, whether or not different structural types of LPS follow the same route to cross the gut is not known. Similarly, it is established that the liver is the major detoxifying organ, although the precise mechanisms of LPS disposal through the bile are poorly described. In addition to these gaps in the literature on the basic mechanisms of LPS translocation and disposal in healthy individuals, the reasons why these multiple, overlapping, and even redundant mechanisms are overwhelmed in several diseases, especially obesity and metabolic related disorders, is still poorly understood. Yet their understanding is crucial to the design of efficient and targeted solutions for the prevention and cure of LPS-associated diseases.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Isabelle Le Huerou-Luron and Dr. Véronique Douard for their critical reading of the manuscript.

#### GRANTS

M. Guerville is funded by an INRA-Région Bretagne Fellowship.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.G. prepared figures; M.G. drafted manuscript; M.G. and G.B. edited and revised manuscript; M.G. and G.B. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

- Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10: 131–144, 2010.
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. J Immunol 174: 4453–4460, 2005.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 4: 499–511, 2004.
- Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, Grunberg S, Baldassano RN, Lewis JD, Li H, Thom SR, Bushman FD, Vinogradov SA, Wu GD. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterol*ogy 147: 1055.e8–1063.e8, 2014.
- Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, Chamontin B, Ferrieres J. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 87: 1219–1223, 2008.
- Angelakis E, Armougom F, Carriere F, Bachar D, Laugier R, Lagier JC, Robert C, Michelle C, Henrissat B, Raoult D. A metagenomic investigation of the duodenal microbiota reveals links with obesity. *PloS One* 10: e0137784, 2015.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 369: 840–851, 2013.
- Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1: 113–118, 2000.
- Bartholomew JW, Mittwer T. The Gram stain. Bacteriol Rev 16: 1–29, 1952.
- Bates JM, Akerlund J, Mittge E, Guillemin K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe* 2: 371–382, 2007.
- Beatty WL, Meresse S, Gounon P, Davoust J, Mounier J, Sansonetti PJ, Gorvel JP. Trafficking of *Shigella* lipopolysaccharide in polarized intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 145: 689–698, 1999.
- Benoit B, Laugerette F, Plaisancie P, Geloen A, Bodennec J, Estienne M, Pineau G, Bernalier-Donadille A, Vidal H, Michalski MC. Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice. *Nutr Res* 35: 346–356, 2015.

#### INTESTINAL AND HEPATIC HANDLING OF LPS

- Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9: 356–368, 2011.
- Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F, Collet X. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. J Biol Chem 281: 7214–7219, 2006.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30: 475–487, 2009.
- Boudry G, Hamilton MK. Milk formula and intestinal barrier function. In: *Handbook of Dietary and Nutritional Aspects of Bottle Feeding*, edited by Preedy VR, Watson RR, Zibadi S. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic, 2014, p. 571–586.
- Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: is it real and is it relevant? *Biochimie* 124: 11–20, 2016.
- Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol* 14: 660–667, 2013.
- Cai L, Ji A, de Beer FC, Tannock LR, van der Westhuyzen DR. SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *J Clin Invest* 118: 364–375, 2008.
- Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. J Lipid Res 42: 902–909, 2001.
- 21. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761– 1772, 2007.
- 22. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470–1481, 2008.
- Canny G, Cario E, Lennartsson A, Gullberg U, Brennan C, Levy O, Colgan SP. Functional and biochemical characterization of epithelial bactericidal/permeability-increasing protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G557–G567, 2006.
- Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 6: 205–214, 2000.
- Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK. Commensal-associated molecular patterns induce selective Toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 160: 165–173, 2002.
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68: 7010–7017, 2000.
- Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. Carbohydr Res 338: 2431–2447, 2003.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313: 1126–1130, 2006.
- Cerovic V, Jenkins CD, Barnes AG, Milling SW, MacPherson GG, Klavinskis LS. Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol* 182: 2405–2415, 2009.
- Chaby R. Des Endotoxines aux Lipopolysaccharides. Paris: Lavoisier, 2010.
- Chaby R. Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell Mol Life Sci* 61: 1697–1713, 2004.
- Chaby R, Pedron T, Girard R. Nontoxic forms of lipopolysaccharides, poorly cleared in vivo, are present in variable amounts in phenolextracted endotoxins. J Infect Dis 167: 131–140, 1993.
- 33. Chung CS, Chang PF, Liao CH, Lee TH, Chen Y, Lee YC, Wu MS, Wang HP, Ni YH. Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 51: 410–419, 2016.
- 34. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher FM, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in

obesity and type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab 292: E740-E747, 2007.

- 35. Cullen TW, Schofield WB, Barry NA, Putnam EE, Rundell EA, Trent MS, Degnan PH, Booth CJ, Yu H, Goodman AL. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science* 347: 170–175, 2015.
- Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity* 16: 1248–1255, 2008.
- de Haas CJ, Haas PJ, van Kessel KP, van Strijp JA. Affinities of different proteins and peptides for lipopolysaccharide as determined by biosensor technology. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 492–496, 1998.
- 38. Dlugosz A, Winckler B, Lundin E, Zakikhany K, Sandstrom G, Ye W, Engstrand L, Lindberg G. No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *Sci Rep* 5: 8508, 2015.
- Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem 78: 857–902, 2009.
- Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. QJM 103: 71–83, 2010.
- Drago-Serrano ME, de la Garza-Amaya M, Luna JS, Campos-Rodriguez R. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immunopharmacol* 12: 1–9, 2012.
- 42. Dubin W, Martin TR, Swoveland P, Leturcq DJ, Moriarty AM, Tobias PS, Bleecker ER, Goldblum SE, Hasday JD. Asthma and endotoxin: lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in bronchoalveolar compartment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270: L736–L744, 1996.
- Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J Immunol* 173: 1166– 1170, 2004.
- Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. J Biol Chem 273: 8680–8690, 1998.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635–1638, 2005.
- 46. Elass-Rochard E, Roseanu A, Legrand D, Trif M, Salmon V, Motas C, Montreuil J, Spik G. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28–34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem J* 312: 839–845, 1995.
- 47. Eliakim R, Mahmood A, Alpers DH. Rat intestinal alkaline phosphatase secretion into lumen and serum is coordinately regulated. *Biochim Biophys Acta* 1091: 1–8, 1991.
- Emanuele E, Orsi P, Boso M, Broglia D, Brondino N, Barale F, di Nemi SU, Politi P. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci Lett* 471: 162–165, 2010.
- 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* 86: 1286–1292, 2007.
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 4: 837–851, 2002.
- 51. Everard A, Geurts L, Caesar R, Van Hul M, Matamoros S, Duparc T, Denis RG, Cochez P, Pierard F, Castel J, Bindels LB, Plovier H, Robine S, Muccioli GG, Renauld JC, Dumoutier L, Delzenne NM, Luquet S, Backhed F, Cani PD. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nat Commun* 5: 5648, 2014.
- 52. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, Francois P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J, Cani PD. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and dietinduced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60: 2775–2786, 2011.
- 53. Everard A, Lazarevic V, Gaia N, Johansson M, Stahlman M, Backhed F, Delzenne NM, Schrenzel J, Francois P, Cani PD. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J* 8: 2116–2130, 2014.
- 54. Fernandez-Real JM, Perez del Pulgar S, Luche E, Moreno-Navarrete JM, Waget A, Serino M, Sorianello E, Sanchez-Pla A, Pontaque FC, Vendrell J, Chacon MR, Ricart W, Burcelin R, Zorzano A. CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance. *Diabetes* 60: 2179–2186, 2011.

39

Review

- 55. Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 17: 180–184, 2002.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13780–13785, 2007.
- Fukuoka S, Richter W, Howe J, Andra J, Rossle M, Alexander C, Gutsmann T, Brandenburg K. Biophysical investigations into the interactions of endotoxins with bile acids. *Innate immun* 18: 307–317, 2012.
- Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: Toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res* 49: 589–593, 2001.
- Gazzano-Santoro H, Parent JB, Conlon PJ, Kasler HG, Tsai CM, Lill-Elghanian DA, Hollingsworth RI. Characterization of the structural elements in lipid A required for binding of a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein rBPI23. *Infect Immun* 63: 2201–2205, 1995.
- Ge Y, Ezzell RM, Warren HS. Localization of endotoxin in the rat intestinal epithelium. J Infect Dis 182: 873–881, 2000.
- Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 50: 90–97, 2009.
- 62. Gioannini TL, Teghanemt A, Zhang D, Prohinar P, Levis EN, Munford RS, Weiss JP. Endotoxin-binding proteins modulate the susceptibility of bacterial endotoxin to deacylation by acyloxyacyl hydrolase. *J Biol Chem* 282: 7877–7884, 2007.
- 63. Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millan JL, and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3551–3556, 2008.
- Grossman N, Leive L. Complement activation via the alternative pathway by purified *Salmonella* lipopolysaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length. *J Immunol* 132: 376–385, 1984.
- Gu S, Chen D, Zhang JN, Lv X, Wang K, Duan LP, Nie Y, Wu XL. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PloS One* 8: e74957, 2013.
- 66. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol* 182: 375–387, 2013.
- Guo Y, Zhou G, He C, Yang W, He Z, Liu Z. Serum levels of lipopolysaccharide and 1,3-beta-D-glucan refer to the severity in patients with Crohn's disease. *Mediators Inflamm* 2015: 843089, 2015.
- Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352: 342–344, 1991.
- Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxininduced death in mice. J Clin Invest 86: 696–702, 1990.
- Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappaB. *Cell Immunol* 220: 83–95, 2002.
- Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 195: 559–570, 2002.
- Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. J Exp Med 198: 1225–1235, 2003.
- Hosoi T, Yokoyama S, Matsuo S, Akira S, Ozawa K. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice. *PloS One* 5: e12537, 2010.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860–867, 2006.
- 75. Howe SE, Lickteig DJ, Plunkett KN, Ryerse JS, Konjufca V. The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine. *PloS One* 9: e86656, 2014.
- Hu Y, Peng J, Tai N, Hu C, Zhang X, Wong FS, Wen L. Maternal antibiotic treatment protects offspring from diabetes development in nonobese diabetic mice by generation of tolerogenic APCs. *J Immunol* 195: 4176–4184, 2015.

- 77. Jakaitis BM, Denning PW. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol* 41: 423–435, 2014.
- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Bjorksten B, Engstrand L, Andersson AF. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 63: 559– 566, 2014.
- Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev* 249: 218–238, 2012.
- Kaca W, Roth RI, Levin J. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem* 269: 25078–25084, 1994.
- Kallio KA, Hatonen KA, Lehto M, Salomaa V, Mannisto S, Pussinen PJ. Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol* 52: 395–404, 2015.
- Kirschning C, Unbehaun A, Lamping N, Pfeil D, Herrmann F, Schumann RR. Control of transcriptional activation of the lipopolysaccharide binding protein (LBP) gene by proinflammatory cytokines. *Cytokines Cell Mol Ther* 3: 59–62, 1997.
- Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 11: 225–229, 2005.
- Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem* 274: 34116–34122, 1999.
- Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, Wunderlich FT, Medzhitov R, Bruning JC. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab* 10: 249–259, 2009.
- Kless C, Muller VM, Schuppel VL, Lichtenegger M, Rychlik M, Daniel H, Klingenspor M, Haller D. Diet-induced obesity causes metabolic impairment independent of alterations in gut barrier integrity. *Mol Nutr Food Res* 59: 968–978, 2015.
- Knoop KA, McDonald KG, McCrate S, McDole JR, Newberry RD. Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunol* 8: 198–210, 2015.
- Koprivnjak T, Peschel A, Gelb MH, Liang NS, Weiss JP. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 277: 47636–47644, 2002.
- 89. Kritselis I, Tzanetakou V, Adamis G, Anthopoulos G, Antoniadou E, Bristianou M, Kotanidou A, Lignos M, Polyzos K, Retsas T, Sassopoulou P, Papaioannou AI, Sinapidis D, Sereti K, Vittoros V, Ghanas P, Gogos C, Giamarellos-Bourboulis EJ. The level of endotoxemia in sepsis varies in relation to the underlying infection: impact on final outcome. *Immunol Lett* 152: 167–172, 2013.
- 90. Labeta MO, Vidal K, Nores JE, Arias M, Vita N, Morgan BP, Guillemot JC, Loyaux D, Ferrara P, Schmid D, Affolter M, Borysiewicz LK, Donnet-Hughes A, Schiffrin EJ. Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *J Exp Med* 191: 1807–1812, 2000.
- Lalles JP. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr Rev* 68: 323–332, 2010.
- Lalles JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev* 72: 82–94, 2014.
- 93. Laugerette F, Alligier M, Bastard JP, Drai J, Chanseaume E, Lambert-Porcheron S, Laville M, Morio B, Vidal H, Michalski MC. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol Nutr Food Res* 58: 1513–1518, 2014.
- 94. Laugerette F, Furet JP, Debard C, Daira P, Loizon E, Geloen A, Soulage CO, Simonet C, Lefils-Lacourtablaise J, Bernoud-Hubac N, Bodennec J, Peretti N, Vidal H, Michalski MC. Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 302: E374–E386, 2012.
- Laugerette F, Vors C, Geloen A, Chauvin MA, Soulage C, Lambert-Porcheron S, Peretti N, Alligier M, Burcelin R, Laville M, Vidal H, Michalski MC. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. J Nutr Biochem 22: 53–59, 2011.

#### Review

G14

#### INTESTINAL AND HEPATIC HANDLING OF LPS

- Lee WJ, Farmer JL, Hilty M, Kim YB. The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. *Infect Immun* 66: 1421–1426, 1998.
- Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun* 69: 2821–2828, 2001.
- Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L, Bendayan M. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 117: 327–337, 2004.
- 99. Li JD, Feng W, Gallup M, Kim JH, Gum J, Kim Y, Basbaum C. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5718–5723, 1998.
- 100. Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeiro E, de la Cueva P, Celdran A, Martin-Hidalgo A, Vega MA, Bragado R. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. J Histochem Cytochem 49: 1253–1260, 2001.
- 101. Loonen LM, Stolte EH, Jaklofsky MT, Meijerink M, Dekker J, van Baarlen P, Wells JM. REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunol* 7: 939–947, 2014.
- 102. Lu M, Zhang M, Takashima A, Weiss J, Apicella MA, Li XH, Yuan D, Munford RS. Lipopolysaccharide deacylation by an endogenous lipase controls innate antibody responses to Gram-negative bacteria. *Nat Immunol* 6: 989–994, 2005.
- Maitra SK, Rachmilewitz D, Eberle D, Kaplowitz N. The hepatocellular uptake and biliary excretion of endotoxin in the rat. *Hepatology* 1: 401–407, 1981.
- Mani V, Hollis JH, Gabler NK. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr Metab (Lond)* 10: 6, 2013.
- 105. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Dore J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9: 123, 2009.
- Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M, Tanikawa K. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* 109: 1969–1976, 1995.
- 107. Mollen KP, Gribar SC, Anand RJ, Kaczorowski DJ, Kohler JW, Branca MF, Dubowski TD, Sodhi CP, Hackam DJ. Increased expression and internalization of the endotoxin coreceptor CD14 in enterocytes occur as an early event in the development of experimental necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 43: 1175–1181, 2008.
- Monte SV, Caruana JA, Ghanim H, Sia CL, Korzeniewski K, Schentag JJ, Dandona P. Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surgery* 151: 587–593, 2012.
- 109. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14: 667–685, 2014.
- Muller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 62: 1297–1307, 2005.
- 111. **Munford RS, Hall CL.** Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 234: 203–205, 1986.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 593–656, 2003.
- Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 96: 15–19, 1994.
- 114. Okuda S, Sherman DJ, Silhavy TJ, Ruiz N, Kahne D. Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. *Nat Rev Microbiol* 14: 337–345, 2016.
- 115. **Opal SM.** Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib Nephrol* 167: 14–24, 2010.
- Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126: 1054–1070, 2004.
- 117. Pasternak BA, D'Mello S, Jurickova II, Han X, Willson T, Flick L, Petiniot L, Uozumi N, Divanovic S, Traurnicht A, Bonkowski E, Kugathasan S, Karp CL, Denson LA. Lipopolysaccharide exposure is linked to activation of the acute phase response and growth failure in

pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 16: 856-869, 2010.

- 118. Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schutte A, van der Post S, Svensson F, Rodriguez-Pineiro AM, Nystrom EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 260: 8–20, 2014.
- 119. **Pendyala S, Walker JM, Holt PR.** A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* 142: 1100.e2–1101.e2, 2012.
- Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol 76: 97–119, 2000.
- 121. Pierre N, Deldicque L, Barbe C, Naslain D, Cani PD, Francaux M. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. *PloS One* 8: e65061, 2013.
- 122. Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional?—the mouse's tale. J Clin Invest 108: 649–654, 2001.
- 123. Plociennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzecka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* 72: 557–581, 2015.
- 124. 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. Defective LPS signaling in C3H/ HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085–2088, 1998.
- 124a.**Poupon R.** Liver alkaline phosphatase: a missing link between choleresis and biliary inflammation. *Hepatology* 61: 2080–2090, 2015.
- 125. Pyo JS, Ko YS, Kang G, Kim DH, Kim WH, Lee BL, Sohn JH. Bile acid induces MUC2 expression and inhibits tumor invasion in gastric carcinomas. J Cancer Res Clin Oncol 141: 1181–1188, 2015.
- 126. Radin MS, Sinha S, Bhatt BA, Dedousis N, O'Doherty RM. Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia* 51: 336–346, 2008.
- 127. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. Annu Rev Biochem 76: 295–329, 2007.
- Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem 71: 635–700, 2002.
- Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Calhoun MC, Kane JP, Rapp JH. Chylomicrons enhance endotoxin excretion in bile. *Infect Immun* 61: 3496–3502, 1993.
- 130. Rensen PC, Oosten M, Bilt E, Eck M, Kuiper J, Berkel TJ. Human recombinant apolipoprotein E redirects lipopolysaccharide from Kupffer cells to liver parenchymal cells in rats in vivo. *J Clin Invest* 99: 2438–2445, 1997.
- 131. Rodriguez-Pineiro AM, Bergstrom JH, Ermund A, Gustafsson JK, Schutte A, Johansson ME, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G348–G356, 2013.
- 132. Roncon-Albuquerque R Jr, Moreira-Rodrigues M, Faria B, Ferreira AP, Cerqueira C, Lourenco AP, Pestana M, von Hafe P, Leite-Moreira AF. Attenuation of the cardiovascular and metabolic complications of obesity in CD14 knockout mice. *Life Sci* 83: 502–510, 2008.
- Rowlands BJ, Soong CV, Gardiner KR. The gastrointestinal tract as a barrier in sepsis. *Br Med Bull* 55: 196–211, 1999.
- 134. Sass V, Schneider T, Wilmes M, Korner C, Tossi A, Novikova N, Shamova O, Sahl HG. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infect Immun* 78: 2793–2800, 2010.
- Schumann RR, Latz E. Lipopolysaccharide-binding protein. Chem Immunol 74: 42–60, 2000.
- Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6: 551–557, 2005.
- 137. Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, Ojogun N, Rockey DC, Dematteo RP, Munford RS. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem* 282: 13726–13735, 2007.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31–39, 2000.

- Siqueiros-Cendon T, Arevalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF, Garcia-Montoya IA, Salazar-Martinez J, Rascon-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. Acta Pharmacol Sin 35: 557–566, 2014.
- 140. Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. J Immunol 167: 2651–2656, 2001.
- 141. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 71: 3503–3511, 2003.
- 142. Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner RL. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin. *N Engl J Med* 328: 1457–1460, 1993.
- 143. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 264: 10867–10871, 1989.
- 144. Tomita M, Ohkubo R, Hayashi M. Lipopolysaccharide transport system across colonic epithelial cells in normal and infective rat. *Drug Metab Pharmacokinet* 19: 33–40, 2004.
- 145. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986–1998, 2007.
- 146. Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G377–G385, 2006.
- 147. Vaara M, Viljanen P. Binding of polymyxin B nonapeptide to gramnegative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 27: 548–554, 1985.
- 148. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20858–20863, 2008.
- 149. van Ampting MT, Loonen LM, Schonewille AJ, Konings I, Vink C, Iovanna J, Chamaillard M, Dekker J, van der Meer R, Wells JM, Bovee-Oudenhoven IM. Intestinally secreted C-type lectin Reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice. *Infect Immun* 80: 1115–1120, 2012.
- 150. Van Bossuyt H, De Zanger RB, Wisse E. Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts. *J Hepatol* 7: 325–337, 1988.
- 151. van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine

release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 76: 2520-2526, 1990.

- 152. van Langevelde P, Kwappenberg KM, Groeneveld PH, Mattie H, van Dissel JT. Antibiotic-induced lipopolysaccharide (LPS) release from *Salmonella typhi*: delay between killing by ceftazidime and imipenem and release of LPS. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 739–743, 1998.
- Vaure C, Liu Y. A comparative review of Toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* 5: 316, 2014.
- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. J Biol Chem 276: 38044–38051, 2001.
- 155. Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman TL, Patterson AP. Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. J Biol Chem 278: 22771–22780, 2003.
- Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JW, van't Veer C, Buurman WA. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol* 170: 1399–1405, 2003.
- 157. Vreugdenhil AC, Snoek AM, Greve JW, Buurman WA. Lipopolysaccharide-binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice. J Immunol 165: 4561–4566, 2000.
- Vreugdenhil AC, Snoek AM, van't Veer C, Greve JW, Buurman WA. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest* 107: 225–234, 2001.
- 159. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4: 920–927, 2003.
- 160. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431–1433, 1990.
- 161. Zhang GH, Mann DM, Tsai CM. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin-derived peptide. *Infect Immun* 67: 1353–1358, 1999.
- 162. Zhang R, Miller RG, Gascon R, Champion S, Katz J, Lancero M, Narvaez A, Honrada R, Ruvalcaba D, McGrath MS. Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). J Neuroimmunol 206: 121–124, 2009.
- 163. Zhao W, Wang Y, Liu S, Huang J, Zhai Z, He C, Ding J, Wang J, Wang H, Fan W, Zhao J, Meng H. The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PloS One* 10: e0117441, 2015.
- 164. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 98: 3800–3808, 2001.

G15

# Chapitre 3 :

# Les mécanismes de prise en charge du LPS sont-ils modifiés lors de l'obésité ?

# 1. Modulation du microbiote

Le microbiote intestinal est maintenant reconnu comme un facteur clé dans la physiopathologie des troubles métaboliques liés à l'obésité. Il a été décrit comme un organe endocrine à part entière impliqué dans le maintien de l'homéostasie énergétique *via* des communications bidirectionnelles avec l'hôte. Ainsi des perturbations du microbiote altèrent la relation symbiotique hôte-microbiote pouvant conduire au développement de maladies métaboliques telles que l'obésité et ses complications.

# 1.1. Premières études montrant l'importance du microbiote dans l'obésité

L'importance du microbiote dans la régulation du poids corporel a été décrite grâce à l'utilisation de souris Germ-Free (GF), exemptes de microbiote dès la naissance. En effet, nourries avec un régime standard ou obesogène, les souris GF présentent une prise de poids et de masse grasse inférieures à celle des souris conventionnelles (CV) soumises au même régime (Backhed *et al.*, 2004; Backhed *et al.*, 2007; Swartz *et al.*, 2013). De plus, l'inoculation chez des souris GF de contenus caecaux de souris CV induit une prise de poids et d'adiposité associée à une augmentation des niveaux d'insuline et de leptine comparés à des souris GF (Backhed *et al.*, 2004). Ces premiers résultats montrent bien le rôle clé du microbiote dans la régulation du poids corporel et les métabolismes qui en dépendent.

Par la suite, Turnaugh et collaborateurs ont montré que la composition en bactéries du microbiote pouvait influencer la régulation du poids corporel. Pour cela, ils ont transféré le microbiote de souris génétiquement obèses (ob/ob) à des souris sauvages GF. Ils ont montré que les souris sauvages possédant le microbiote des souris obèses présentaient un gain de poids supérieur aux souris inoculées avec le microbiote de souris maigres (Turnbaugh *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent alors la présence d'un microbiote « obèse » *versus* un microbiote « maigre », capable d'induire l'obésité.

Afin de transposer ces découvertes à l'humain, des études sur des souris humanisées, transplantées avec un microbiote humain (dont les compositions en bactéries sont différentes de celles de la souris), ont été réalisées. Dans une première étude, des souris GF ont été colonisées avec le microbiote de souris humanisées nourries avec un régime pauvre ou riche en lipides. Les souris inoculées avec le microbiote provenant de donneuses nourries avec un régime hyperlipidique présentaient un gain de

poids significativement supérieur aux souris inoculées avec le microbiote de souris nourries avec un régime standard (Turnbaugh *et al.*, 2009). Plus récemment, Ridaura et collaborateurs ont colonisé des souris GF avec le microbiote de paires de jumelles dont l'une était obèse et l'autre normo-pondérée (Ridaura *et al.*, 2013). Ils ont montré que les souris colonisées avec le microbiote de jumelles obèses présentaient un gain de poids et une masse grasse supérieurs aux souris inoculées avec le microbiote de jumelles de jumelles maigres.

L'ensemble de ces études montre l'importance de la composition bactérienne du microbiote dans la physiopathologie de l'obésité.

# 1.2. Le concept de dysbiose lors de l'obésité

La dysbiose se définit comme un déséquilibre du microbiote intestinal qui est associé à une pathologie. De par les premières études de transplantation de microbiote, il a été émis l'hypothèse d'une dysbiose lors de l'obésité.

Chez l'animal, Ley et collaborateurs ont montré que le microbiote caecal de souris obèses ob/ob présentait une réduction de 50% des bactéries du phylum Bacteroidetes associée à une augmentation de 30 % de Firmicutes comparé aux souris maigres WT (Ley *et al.*, 2005). Par la suite, d'autres études ont confirmé cette augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes chez la souris obèse (Turnbaugh *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2010). De plus, le microbiote « obèse » présenterait également une diversité microbienne inférieure à celui d'une souris maigre (Turnbaugh *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2013). En revanche, dans des modèles animaux de DIO, les résultats sont plus hétérogènes. Plusieurs études chez le rongeur montrent une augmentation de l'abondance des Firmicutes et/ou une diminution des Bacteroidetes après la consommation d'un régime obesogène (Cani *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2009; de La Serre *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2010) alors que d'autres décrivent une augmentation des Bacteroidetes associées ou non à une augmentation des Firmicutes (Daniel *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2015; Lecomte *et al.*, 2015).

De la même manière, chez l'homme les résultats sont divergents. Alors que certaines études retrouvent les résultats observés dans des modèles animaux (Turnbaugh *et al.*, 2006; Armougom *et al.*, 2009; Schwiertz *et al.*, 2010), Schwiertz et collaborateurs ont montré, à l'inverse, une augmentation de l'abondance des Bacteroidetes chez les personnes obèses (Schwiertz *et al.*, 2010). D'autres travaux ne montrent aucune différence en termes de phyla entre les personnes obèses et minces (Duncan *et al.*, 2008; Jumpertz *et al.*, 2011).

Des modifications de la composition du microbiote à différentes échelles taxonomiques ont également été associées à l'obésité (Gerard, 2016). Une méta-analyse de 2014 a compilé et analysé les données de composition du microbiote chez des patients obèses et non obèses mais les auteurs n'ont pas réussi

à identifier un marqueur homogène entre ces études (Walters *et al.*, 2014). Il est donc difficile de définir précisément la composition d'un microbiote « obèse », probablement en raison des nombreux facteurs confondants pouvant avoir une influence importante sur le développement de l'obésité et du microbiote.

## 1.3. Nouvelles méthodes d'analyses du microbiote et obésité

Les grandes avancées en biologie moléculaire ont contribué à l'essor considérable de la compréhension des rôles essentiels du microbiote intestinal dans la régulation des métabolismes et de la physiologie de l'hôte. En effet, grâce au séquençage haut-débit, il est possible de séquencer les copies du gène 16S d'un échantillon et donc de déterminer les abondances de toutes les communautés bactériennes. Cependant ceci ne renseigne pas sur la fonctionnalité du microbiote intestinal.

En complément de la mesure de l'abondance des genres bactériens, il est également possible d'étudier l'intégralité des gènes bactériens d'un échantillon, en séquençant l'intégralité de l'ADN bactérien d'un échantillon renseignant ainsi sur son métagénome (Mandal et al., 2015). Connaissant la fonction de la majorité de ces gènes, on peut ainsi raisonner en termes de fonctions plutôt qu'en termes d'espèces bactériennes. Malgré une variation importante au niveau de l'abondance d'espèces bactériennes entre individus, les profils fonctionnels restent relativement stables mais pourraient être modifiés lors de l'obésité (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Arumugam et collaborateurs ont montré, dans une cohorte de plus de 200 individus, que l'IMC était significativement corrélé à deux clusters de bactéries dont les fonctions étaient impliquées dans l'extraction d'énergie (Arumugam et al., 2011). De même, dans une cohorte 292 personnes saines et obèses, les auteurs ont pu séparer les individus par leur richesse bactérienne i.e. le nombre de gènes bactériens (Le Chatelier et al., 2013). Les individus possédant une faible richesse bactérienne présentent une adiposité plus importante, une insulino-résistance et un phénotype plus inflammatoire (Le Chatelier et al., 2013). Par ailleurs, les approches de métatranscriptomique et métaprotéomique qui déterminent les ARNm ou protéines exprimées par le microbiote respectivement, permettent d'analyser également les caractéristiques fonctionnelles du microbiote. Ces approches sont en plein développement méthodologique et peu de travaux sur l'obésité sont actuellement publiés (Ferrer et al., 2013; Hernandez et al., 2013; Daniel et al., 2014)

Cependant, le microbiote exerce une fonction métabolique importante dans l'intestin et toutes ces données ne fournissent pas d'informations sur cette interaction microbiote-hôte. La métabolomique étudie le profil métabolique des bactéries en évaluant les métabolites qu'elles produisent. Grâce à cette technique, les auteurs ont pu mettre en évidence que la consommation d'un régime hyperlipidique augmentait le métabolisme des acides aminés et la traduction des protéines associée à une baisse des fonctions de production et conversion d'énergie (Daniel et al., 2014)

		Régime					
Espèces	CTL % lip	WD % lip	Durée	Effet sur le mucus	Section intestinale	Méthode de mesure	Ref
				SOURIS			
Souris C57blck6	12.3%	60%	1 jour	↑ expression de muc2	Côlon distal	Histologie	(Waise <i>et al.</i> , 2015)
Souris C57blck6	11.5%	61%	4 sem	Accumulation de muc2 dans les GC	Iléon	Histologie	(Tomas et al., 2016)
Souris Swiss	6%	60%	8 sem	↔ le nombre de cellules à mucus	Duodénum Jéjunum	Histologie	(Soares <i>et al.</i> , 2015)
Souris Swiss	9%6	60%	8 sem	↓ nombre de cellules à mucus	lléon	Histologie	(Soares et al., 2015)
Souris C57blck6	12.2 %	40%	10 sem	↔ expression de muc2 ↑ quantité protéique muc2	Côlon	RT-qPCR Western Blot	(Enos <i>et al.</i> , 2016)
Souris C57blck6	2.6 %	22%	12 sem	↔ nombre de cellules à mucus	Iléon et côlon	Histologie	(Benoit <i>et al.</i> , 2015)
Souris C57blck6	2.6 %	45%	12 sem	↑ nombre de cellules à mucus	Iléon et côlon	Histologie	(Benoit <i>et al.</i> , 2015)
Souris C57blck6	3%	22% (+ALA)	12 sem	↑ nombre de cellules à mucus	Iléon et côlon	Histologie	(Benoit <i>et al.</i> , 2014)
Souris C57blck6	14%	60%	22-26 sem	↓ l'expression de muc2	Jéjunum	RT-qPCR	(Andres <i>et al.</i> , 2015)
				RATS			
Rats SD	9.3%	47.5%	2 sem	↓ nombre de cellules à mucus	Jéjunum	Histologie	(Lalles et al., 2012)
Rats Wistar	13%	45%	1 sem	↓ nombre de cellules à mucus	Caecum	Histologie	(Hamilton <i>et al.</i> , 2015)
Rats Wistar	13%	45%	3 sem	$\leftrightarrow$ expression de muc2	lléon et caecum	RT-qPCR	(Hamilton <i>et al.</i> , 2015)
Rats Wistar	13%	45%	6 sem	↔ nombre de cellules à mucus	Caecum	Histologie	(Hamilton <i>et al.</i> , 2015)
Tableau 7 : Etu dans l'intestin c	des monti thez la sou	rant l'imp: uris et le ra	act de la c t.	onsommation d'un régime obésogène s	ur le nombre de	cellules à mucus,	, l'expression de muc2

↑/↓/↔ augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. % de lip :% de lipides de l'énergie totale du régime. ALA : Acide α-linolénique

# 1.4. Quantité de LPS dans la lumière intestinale

Une augmentation de la quantité de bactéries Gram-négatif qui contiennent du LPS, pourrait être une hypothèse expliquant l'élévation de l'endotoxémie observée lors de l'obésité. Cependant, en raison des résultats divergents sur la composition d'un microbiote « obèse », il est difficile de conclure sur l'abondance des bactéries Gram-négatif et donc de la quantité potentielle de LPS présente dans la lumière intestinale de personnes obèses. Néanmoins, supportant cette hypothèse, deux études ont montré que la quantité d'endotoxines était augmentée dans les fèces de souris DIO comparées à des souris standards (Kim *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent donc que la consommation d'un régime hyperlipidique pourrait augmenter la quantité de LPS dans les contenus intestinaux. Cependant, le prélèvement de fèces induit une lyse bactérienne libérant donc le LPS. Ainsi il est difficile d'interpréter ces augmentations de LPS dans les contenus.

# 2. Mécanismes de protection au niveau de la muqueuse

### 2.1. Mucus

La sécrétion de mucus est un mécanisme intestinal essentiel pour limiter le contact du LPS avec les entérocytes et donc le passage du LPS à travers la barrière intestinale.

Il est possible d'évaluer la sécrétion de mucus par une technique d'histologie, qui consiste à colorer les cellules à mucus. Il est supposé qu'une augmentation du nombre de cellules à mucus est le reflet d'une augmentation de la quantité de mucus au niveau de la barrière intestinale. Les travaux sur l'impact d'un régime hyperlipidique sur la quantité de cellules à mucus montrent des résultats divergents (Tableau 7). En effet, trois études montrent une augmentation, trois autres décrivent une diminution et les trois dernières ne trouvent aucune différence entre des animaux DIO et standards. Toutefois, le manque d'homogénéité dans les méthodes ne permet pas d'émettre d'hypothèses concernant les possibles effets des teneurs en lipides du régime, de la durée d'expérimentation ou de la localisation intestinale.

La mesure par RT-qPCR (Real time quantitative Polymerase chain reaction) de l'expression de muc2 dans les tissus intestinaux est également une technique permettant d'évaluer la quantité de mucus. Comme avec l'histologie, les résultats sont divergents. Par exemple, Andres et collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime à 60% de lipides pendant 22-26 semaines diminuait l'expression génique de muc2 dans le jéjunum (Andres *et al.*, 2015). A l'inverse, chez des rats Wistar nourris avec un régime à 45% de lipides pendant 1,3 et 6 semaines, les expressions iléale et caecale de muc2 ne sont pas différentes de celles de rats standards (Hamilton *et al.*, 2015). Néanmoins, on peut noter que ces adaptations de la muqueuse semblent précoces puisqu'un jour de régime à 60% de

lipides est suffisant pour augmenter l'expression génique de muc2 au niveau colique (Waise *et al.*, 2015).

Cependant, étudier la sécrétion de mucus par muc2 ne serait pas la méthode la plus appropriée. En effet, d'une part, la mesure de l'expression génique de muc2 en RT-qPCR ne corrèle pas toujours avec le nombre de cellules à mucus. Dans l'étude d'Hamilton et collaborateurs, les rats DIO et standards présentaient une expression caecale de muc2 similaire alors que les rats DIO montraient une augmentation de la quantité de cellules à mucus dans le caecum (Hamilton *et al.*, 2015). De même, aucune corrélation entre la quantité d'ARNm et la quantité protéique de muc2 dans le contenu caecal n'a été montrée (Enos *et al.*, 2016). D'autre part, pour étudier la défense intestinale par le mucus il est essentiel de pouvoir mesurer la sécrétion de mucus par immunohistochimie ou histologie. Grâce à de l'immunohistochimie sur de l'iléon ciblant la protéine muc2, Tomas et collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime obésogène diminue l'expression de la Merpin-B, une peptidase nécessaire à la libération de muc2 dans la lumière induisant alors une accumulation de muc2 dans les cellules à mucus.

En parallèle de ces changements, Mastrodonato et collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime hyperlipidique modifiait la composition des chaînes oligo-saccharidiques des mucines en augmentant le ratio salio/sulfomucins et altérant l'organisation des lectines. L'ensemble de ces modifications pourrait conduire à une réduction de la longueur des chaînes oligo-saccharidiques des mucines (Mastrodonato *et al.*, 2014).

Pour évaluer la défense intestinale par le mucus, il est également important d'étudier le microbiote intestinal. En effet, plusieurs bactéries et notamment *Akkermansia muciniphila* sont capables de dégrader le mucus. Cette bactérie vit dans la couche de mucus et semble essentielle à la formation d'un mucus de qualité via un turn-over efficace des mucines (Belzer *et al.*, 2012). Everard et collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime riche en lipides induisait une diminution de la couche de mucus à la surface des entérocytes qui pouvait être restaurée par un gavage d'*Akkermansia muciniphila* (Everard *et al.*, 2013). Ainsi avec moins *d'Akkermansia muciniphila* au sein du microbiote, la couche de mucus serait diminuée malgré l'augmentation du nombre de cellules à mucus, conduisant à une perte de la barrière intestinale.

Alors que l'augmentation de la quantité de mucus semble être une adaptation bénéfique dans le but réduire le passage des bactéries, et donc du LPS à travers l'intestin, de façon étonnante, Hartmann et collaborateurs ont montré que les souris déficientes pour le gène muc2 présentaient une inflammation intestinale mais étaient protégées contre l'obésité induite par la consommation d'un régime obesogène (Hartmann *et al.*, 2016). Ces résultats remettent alors en cause l'aspect bénéfique d'une barrière de mucus au niveau intestinal.
	Régime							
Espèces	CTL	WD	Durée	Effet sur l'IAP	Section intestinale	Réf		
			S	SOURIS				
Souris C57Blc6	15%	45 %	5 sem	<b>↑</b>	Uniqt jéjunum Pas d'effet duodénum	(Lynes <i>et al.</i> , 2011)		
RATS								
Rats SD	9.3%	47.5%	2 sem	↑ (	Jéjunum	(Lalles <i>et al.</i> , 2012)		
Rats SD	9.5%	30 %	4 sem	↑	Duodénum Jéjunum	(Sefcikova <i>et al.</i> , 2008)		
Rats SD	10%	60 %	6 sem	$\downarrow$	Iléon	(Jiang <i>et al.</i> , 2016)		
Rats SD	10%	45 %	8 sem	↓ chez OB-P vs CTL et OB-R	Duodénum	(de La Serre <i>et al.</i> , 2010)		
Rats SD	7%	22%	12,24, 36 et 48 sem	↑	Intestin grêle	(Zhou <i>et al.</i> , 2014)		

 Tableau 8 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'activité de l'IAP dans l'intestin chez la souris et le rat.

 $\uparrow/\downarrow/\leftrightarrow$  augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. % de lip :% de lipides de l'énergie totale du régime. SD : Sprague-Dawley OB-P : Obese-prone. OB-R : obèses résistant Pour conclure, l'impact de la consommation d'un régime obesogène sur la défense mucosale *via* la sécrétion de mucus reste un sujet controversé. L'étude de Thomas et collaborateurs souligne l'importance d'étudier la dynamique de sécrétion de mucus plutôt que l'expression de protéines ou le nombre de cellules à mucus.

#### 2.2. Phosphatase alcaline intestinale (IAP)

Grâce à l'utilisation de souris déficientes pour le gène Akp3, codant pour l'IAP au niveau duodénal, deux études ont révélé l'importance de l'IAP lors de l'installation de l'obésité (Kaliannan et al., 2013; Yang et al., 2015). En effet, les souris akp3<sup>-/-</sup> nourries avec un régime standard présentent une obésité et un syndrome métabolique associés à une endotoxémie élevée (Narisawa et al., 2003; Kaliannan et al., 2013; Yang et al., 2015) suggérant un rôle majeur de l'IAP dans l'endotoxémie métabolique. De plus, une supplémentation orale avec de l'IAP atténue l'obésité et ses troubles métaboliques associés (Kaliannan et al., 2013). Cependant, les études s'intéressant à l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'activité de l'IAP montrent des résultats hétérogènes (Tableau 8). Quatre études montrent une augmentation de l'activité de l'IAP suite à un régime obesogène (Sefcikova et al., 2008; Lynes et al., 2011; Lalles et al., 2012; Zhou et al., 2014), tandis que deux autres décrivent le résultat inverse, à savoir une diminution de l'activité duodénale et iléale de l'IAP (de La Serre et al., 2010; Jiang et al., 2016). De plus, Kalliannan et collaborateurs ont montré que les souris transgéniques fat-1, qui synthétisent de façon endogène les oméga-3 sont résistantes à l'obésité et présentent à la fois une modification de la composition du microbiote et en parallèle une élévation de l'activité et la sécrétion d'IAP dans l'intestin grêle. Les auteurs suggèrent que les effets positifs des oméga-3 pourraient être la conséquence d'une modulation bénéfique de la composition du microbiote induite par l'augmentation de l'activité et de la sécrétion d'IAP dans l'intestin grêle (Kaliannan et al., 2015)

Par ailleurs, l'IAP est régulée négativement par TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , deux cytokines pro-inflammatoires (Malo *et al.*, 2006). Observée lors de l'obésité, l'inflammation chronique, notamment au niveau intestinal (Hotamisligil, 2006) pourrait diminuer l'activité de l'IAP réduisant ainsi la détoxification de LPS.

Régime							
Espèces	CTL	WD	Durée	Effet sur les AMPs	Section intestinale	Méthode de mesure	Ref
Souris C57Blck6	?	60 %	8 sem	$\downarrow \text{ Reg3-}\gamma \downarrow \text{PLA-2}$ $= \text{LyzC} = \text{Defa}$	Jéjunum Côlon	RT-qPCR	(Everard <i>et al.</i> , 2014)
Souris C57Blck6	?	60%	8 sem	↓ Reg3-γ	Jéjunum Côlon	RT-qPCR	(Everard <i>et al.</i> , 2014)
Souris C57Blck6	?	45 %	2,4 et 8 sem	↓ Reg3-γ	Duodénum Jéjunum Ө Côlon	RT-qPCR	(de Wit <i>et al.</i> , 2008)
Souris C57Blck6	3%	22% (+ALA)	12 sem	↑ LyzC	Duodénum	Immuno- histochimie	(Benoit <i>et al.</i> , 2014)
Souris C57Blck6	13%	60%	16 sem	$= \operatorname{Reg3-\beta} = \operatorname{Reg3-\gamma}$	Iléon	RT-qPCR	(Hartmann <i>et al.</i> , 2016)
Souris C57Blck6	14%	60%	22-23 sem	↑ LyzC ↑ DEFA-1	Jéjunum	Immuno- histochimie	(Andres <i>et al.</i> , 2015)

 Tableau 9 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur l'expression protéique ou génique d'AMPs dans l'intestin chez la souris

↑/↓/↔ augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. % de lip :% de lipides de l'énergie totale du régime. ? : non indiqué dans l'étude ⊖ : Absent LyzC : Lysozyme C . Reg3-β et γ : Regenerating islet-derived protein β et γ. Defa1-5 : Défensines 1 ou 5 PLA-2 : Phospholipase A2. ALA : Acide α-linolénique



Figure 4 : La modulation de l'expression génique des AMPs est dépendante du site intestinal considéré.

Expression génique d'AMPs de souris nourries avec un régime obésogène pendant 4 semaines (40% lipides). L'expression génique a été exprimée relativement à celle des animaux contrôles. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM. (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001). NS, non significatif.

De Tomas et collaborateurs, 2016

#### 2.3. Peptides antimicrobiens (AMPs)

La plupart des AMPs dégradent l'intégrité de la membrane bactérienne conduisant à la mort des bactéries (Bevins *et al.*, 2011). De ce fait, *via* la régulation de la quantité de bactéries Gram-négatif, les AMPs sont indirectement impliqués dans la détoxification mucosale du LPS (Guerville *et al.*, 2016). De plus, il a été montré que Reg3- $\gamma$  était essentiel à la séparation spatiale entre les entérocytes et les bactéries Gram-négatif contenant du LPS (Vaishnava *et al.*, 2011).

Chez l'homme et la souris obèses, les études mesurant l'expression d'AMPs sont peu nombreuses (seulement deux études) et divergents (Hodin *et al.*, 2011; Rajala *et al.*, 2014). Chez l'homme, les expressions géniques de LyzC et DEFA-5 étaient augmentées chez les personnes obèses comparées aux normo-pondérées, malgré un nombre de cellules de Paneth identique (Hodin *et al.*, 2011). Chez la souris db/db, les expressions de Reg3- $\gamma$  et Reg3- $\beta$  étaient similaires aux animaux sauvages alors que celles des défensines 1 et 5 étaient diminuées (Rajala *et al.*, 2014).

Dans des modèles de DIO, les résultats sont également très hétérogènes et dépendants de l'AMP étudié (Tableau 9). Les travaux d'Everard et collaborateurs chez la souris montrent une réduction de l'expression génique de Reg3- $\gamma$  et PLA-2 suite à la consommation d'un régime hyperlipidique pendant 8 semaines (Everard *et al.*, 2014; Everard *et al.*, 2014) alors que les expressions du LyzC et DEFA n'étaient pas modifiées par le régime (Everard *et al.*, 2014). De la même manière, une étude longitudinale regardant les effets d'un régime à 45% de lipides durant 2,4 et 8 semaines chez la souris montrent qu'à chacun de ces temps, l'expression génique de Reg3- $\gamma$  était diminuée (de Wit *et al.*, 2008). A l'inverse, 16 semaines de régime hyperlipidique n'induisent aucun changement au niveau des expressions géniques de Reg3- $\gamma$  et Reg- $\beta$ . Ces résultats suggèrent un potentiel effet de la durée de régime.

De même, la consommation d'un régime obésogène induit des modifications de l'expression d'AMPs dépendante du site intestinal (Figure 4). En effet, les souris DIO présentent une sous-expression de Reg3- $\gamma$  dans le duodénum et le jéjunum comparés aux animaux contrôles (Figure 4) (Tomas *et al.*, 2016). En revanche, dans l'iléon, l'expression de Reg3- $\gamma$  est inchangée alors que celle des défensines est diminuée (Tomas *et al.*, 2016).

Pour expliquer la réduction d'expression de reg3- $\gamma$ , plusieurs hypothèses ont été proposées. Tout d'abord, Everard et collaborateurs proposent que la bactérie intestinale *Akkermansia muciniphila*, dont l'abondance est réduite lors de l'obésité, est capable de stimuler l'expression de Reg3- $\gamma$  (Everard *et al.*, 2013). Ainsi les animaux consommant un régime obesogène présenteraient une faible abondance d'*Akkermansia muciniphila* et donc une baisse de l'expression de Reg3- $\gamma$  (Everard *et al.*, 2013). D'autres études révèlent également l'implication de Myd88 dans la régulation de l'expression de Reg3- $\gamma$  malgré des conclusions différentes (Vaishnava *et al.*, 2011; Frantz *et al.*, 2012; Everard *et al.*,

2014): Chez des souris Myd88-déficientes spécifiquement au niveau des IEC, Everard et collaborateurs décrivent une diminution de l'expression génique de Reg3- $\gamma$  alors qu'inversement, une augmentation de Reg3- $\gamma$  a été décrite dans deux autres études (Vaishnava *et al.*, 2011; Frantz *et al.*, 2012).

Ainsi, il est clair que l'introduction d'un régime obesogène chez le rongeur altère l'expression génique des AMPs. Il semblerait que cette altération soit dépendante du temps de régime ainsi que la localisation intestinale.

#### 3. Neutrophiles polynucléaires

Les neutrophiles polynucléaires ne sont pas spécifiques à l'intestin, néanmoins ils jouent un rôle important dans la détoxification du LPS au sein de cet organe. En l'absence de données spécifiques à l'intestin, nous présenterons ici les résultats sur les variations de permeability-increasing protein (BPI) et lactoferrine circulantes lors de l'obésité.

#### 3.1. BPI

La BPI, protéine libérée dans les granules des neutrophiles, est capable de lier et de neutraliser le LPS (Guerville *et al.*, 2016). Dans une cohorte d'hommes sains et intolérants au glucose, la BPI circulante est négativement corrélée à l'IMC ainsi qu'au taux plasmatique de LPS (Gubern *et al.*, 2006). La BPI serait également un marqueur de sensibilité à l'insuline puisque sa concentration est inversement proportionnelle à la glycémie et l'insulinémie à jeun (Gubern *et al.*, 2006). La perte de poids suite à une chirurgie bariatrique ne modifie pas les niveaux plasmatiques de BPI (Manco *et al.*, 2007).

#### 3.2. Lactoferrine

La lactoferrine est une protéine des granules de neutrophiles possédant des activités anti-inflammatoire et bactéricide contre, entre autres, les bactéries Gram-négatif (Guerville *et al.*, 2016). Chez l'homme, le taux de lactoferrine circulante est inversement proportionnel à l'IMC (Moreno-Navarrete *et al.*, 2008; Fernandez-Real *et al.*, 2010) ainsi qu'à la triglycéridémie et glycémie à jeun (Moreno-Navarrete *et al.*, 2008). Dans une cohorte d'hommes sévèrement obèses (IMC > 52 kg/m<sup>2</sup>), la concentration plasmatique de lactoferrine était également négativement corrélée à la lipémie postprandiale et l'inflammation induite par un repas hyperlipidique (Fernandez-Real *et al.*, 2010). De plus, Morreno-Navarrete et collaborateurs ont montré, *ex vivo*, que la capacité des neutrophiles à libérer de la lactoferrine suite à une stimulation au LPS était diminuée chez des patients atteint de DBT2 (Moreno-Navarrete *et al.*, 2009).

Cependant, une supplémentation en lactoferrine bovine ne suffit pas pour prévenir de la dyslipidémie (Takeuchi *et al.*, 2004) et gain de masse grasse (McManus *et al.*, 2015) induits par la consommation d'un régime hyperlipidique chez la souris. En revanche, elle permet le rétablissement de la leptinémie à des seuils comparables à ceux observés chez des animaux nourris avec un régime standard (McManus *et al.*, 2015). Associée à une restriction énergétique, la lactoferrine induit également une perte de poids plus prononcée que d'autres sources de protéines ( $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline) (Pilvi *et al.*, 2009).

#### 4. Perméabilité intestinale et régime obesogène

#### 4.1. Méthodes pour mesurer la perméabilité intestinale

De nombreuses méthodes existent pour évaluer la perméabilité intestinale. La technique de mesure « *in vivo* » consiste à administrer un ou plusieurs marqueurs qui traverseront l'intestin et qui seront mesurés dans le sang ou l'urine. Ces marqueurs ne sont pas métabolisés par les bactéries intestinales ni par l'hôte et traversent les IEC par voie passive. Cette technique est peu invasive et très utilisée dans les études chez l'homme. Les marqueurs utilisés sont majoritairement des sucres tels que le sucrose, le lactulose ou le mannitol qui sont absorbés au niveau de sites intestinaux différents (Verdam *et al.*, 2013). Le sucrose est utilisé pour décrire la perméabilité gastroduodénale, le lactulose et le mannitol représentent la perméabilité de l'intestin grêle tandis que le sucralose est un marqueur de la perméabilité du gros intestin mais la localisation de son passage reste très imprécise. Chez l'animal, le FITC-Dextran 4 kDa (FD4) est utilisé comme marqueur de la perméabilité. Il est administré par voie orale et quantifié par la mesure de la fluorescence dans le sang.

La technique des Chambres d'Ussing « *ex vivo* » mesure le passage de molécules de différentes tailles et le passage ionique du tissu à travers une section précise de l'intestin. Majoritairement, le fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran 4 kDa (FD4) est utilisé comme marqueur de la perméabilité paracellulaire tandis que la Horseradish Peroxydase (HRP) représente la perméabilité transcellulaire. Par la mesure de la conductance électrique, les chambres d'Ussing mesurent le transport paracellulaire d'ion et de molécules chargées. Cette méthode invasive permet également d'étudier plusieurs sites intestinaux simultanément et la perméabilité suite à une stimulation par des produits chimiques.

Ces données peuvent être complétées par l'étude de l'expression de protéines de jonctions serrées (Claudine1-3 / Occludine / Zonula-Occludens 1 / Junctional Adhesion Molecule 1) par RT-qPCR, Western Blot ou immunohistochimie.

Par ailleurs, il est possible d'étudier les effets d'une infusion chronique de lipides ou l'effet d'eaux fécales sur des modèles de cellules intestinales *in vitro* telles que les cellules Caco-2, T84, m-ICcl2.

			PI	ERMEABILITE		
Espèces	Section intestinale	Méthode	Para- cellulaire	Paracellulaire- conductance	Trans- cellulaire	Ref
	Jéjunum	Ussing C Ussing C	$\leftrightarrow (FD4) \\ \uparrow (FD4)$	$\leftrightarrow$		(Stenman <i>et al.</i> , 2013) (Johnson <i>et al.</i> , 2015)
Souris Ob/Ob	Iléon	Ussing C	↑ (FD4)	$ \underset{\longleftrightarrow}{\uparrow}$	↑ (HRP)	(Brun <i>et al.</i> , 2007) (Johnson <i>et al.</i> , 2015)
	Côlon	Ussing C	$\leftrightarrow (\mathrm{FD4})$			(Stenman <i>et al.</i> , 2013)
	Intestin	In vivo	↑ (FD4)			(Johnson <i>et al.</i> , 2015)
Souris Db/db	Iléon	Ussing C		¢	↑ (HRP)	(Brun <i>et al.</i> , 2007)
Rats OLETF	Intestin	In vivo	↔ (PSP-Cr EDTA)			(Suzuki et al., 2010)

#### Tableau 10 : Etudes montrant l'impact de l'obésité sur la perméabilité intestinale mesurée en chambres

**d'Ussing.** La perméabilité paracellulaire correspond au passage de petites molécules entre les cellules. La conductance correspond au passage d'ions et de molécules chargées. Enfin, la perméabilité transcellulaire correspond au passage de grosses molécules à travers les entérocytes.

↑/↓/↔ augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. FD4 : FITC-Dextran 4 HRP : Horseradish peroxidase PSP: phenolsulfonphthalein CR-EDTA : Chromium radioactive complexé avec de l'acide éthylène diamine tetracétique

	Régime			Pern	néabilité	
Espèces	CTL	WD	Durée	Marqueur	Paracellulaire	Réf
Souris C567Blck6	13%	60 %	1,2,3 jrs	FD4	1	(Johnson <i>et al.</i> , 2015)
Souris C567Blck6	15.8%	60 %	3,9,15 sem	PSP-Cr- EDTA	↑	(Suzuki et al., 2010)
Souris C567Blck6	?	72 %	4 sem	FD4	1	(Cani <i>et al.</i> , 2008)
Souris C567Blck6		40%	8 sem	FD4	1	(Murakami <i>et al.</i> , 2016)
Rats SD	10 %	45 %	10 sem	FD4	↑	(de La Serre <i>et al.</i> , 2010)

Tableau 11 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la perméabilité intestinale mesurée *in vivo*.

↑/↓/↔ augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. FD4 : FITC-Dextran 4 HRP : Horseradish peroxidase PSP: phenolsulfonphthalein CR-EDTA : Chromium radioactif complexé avec de l'acide éthylène diamine tetracétique

#### 4.2. Obésité et barrière intestinale

Les études portant sur l'état de la barrière épithéliale intestinale (BEI) lors de l'obésité montrent des résultats divergents que ce soit chez l'animal (Tableau 10) ou chez l'homme. Certaines études montrent que les rongeurs génétiquement obèses (souris Ob/Ob et rats OLETF) présentent une BEI intacte (Suzuki et al., 2010; Stenman et al., 2013) alors que d'autres travaux décrivent une augmentation de la perméabilité para et transcellulaire chez les souris ob/ob génétiquement obèses comparées aux souris sauvages (Brun et al., 2007; Johnson et al., 2015). Chez l'homme, la majorité des résultats associe l'obésité avec une perte de la fonction de barrière (Brignardello et al., 2010; Gummesson et al., 2011; Moreno-Navarrete et al., 2012; Teixeira et al., 2012; Verdam et al., 2013). Dans une cohorte néerlandaise de 28 adultes, la perméabilité au sucrose était augmentée chez les patients présentant un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> par rapport aux personnes normo-pondérées (Verdam et al., 2013). De même, dans une cohorte de femmes normo-pondérées et en surpoids, le ratio sucralose/mannitol était corrélé à la graisse viscérale et indépendant de la masse grasse totale (Gummesson et al., 2011). Enfin, Morreno-Navarette et collaborateurs ont évalué la perméabilité intestinale par la mesure de la zonuline circulante (Moreno-Navarrete et al., 2012), une protéine dont la concentration plasmatique augmente lors d'une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées (Fasano, 2011). Ils ont montré que la zonuline circulante est proportionnelle à l'IMC et négativement corrélée à la sensibilité à l'insuline (Moreno-Navarrete et al., 2012). En revanche, Brignardello et collaborateurs ont montré que des patients obèses (IMC moyen de 35.9 kg/m<sup>2</sup>) et normo-pondéraux (IMC moyen de 23.5kg/m<sup>2</sup>) présentaient une perméabilité similaire à trois différents sucres : lactulose, mannitol et sucralose (Brignardello et al., 2010).

Alors que chez l'animal obèse les résultats sont assez divergents, les mesures chez l'homme montrent en majorité une augmentation de la perméabilité intestinale chez les personnes obèses relativement aux normo-pondéraux.

#### 4.3. Consommation d'un régime hyperlipidique et barrière intestinale

Les études chez l'animal utilisant la technique de mesure de perméabilité *in vivo* avec le FD4 comme marqueur de perméabilité montrent majoritairement une augmentation de la perméabilité paracellulaire suite à la consommation d'un régime obesogène (Tableau 11) (Cani *et al.*, 2008; de La Serre *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2016). Cependant, le manque de précision de cette méthode ne permet pas de déterminer exactement la section intestinale qui est devenue perméable. Grâce à la technique des Chambres d'Ussing, il a été montré que la perte de fonction de barrière intestinale était très dépendante du site intestinal considéré et de la durée de régime (Tableau 12) (Stenman *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2015; Muller *et al.*, 2016). Toutefois, face au manque d'homogénéité des protocoles d'études (durée et composition du

		Régime			Perméabilité			
Section intestinale	Espèces	CTL % lip	HFD % lip	Durée	Para- cellulaire	Condu- ctance	Trans- cellulaire	Ref
Duodénum	Souris C57blck6	10%	60%	15 sem	Ť			(Stenman <i>et al.</i> , 2012)
Jéjunum		13%	60%	4 sem	↑	$\leftrightarrow$		(Johnson et al., 2015)
	Souris	13%	48-75%	4 sem	$\leftrightarrow$			(Kless et al., 2015)
	C57blck6	10%	60%	15 sem	<b>↑</b>	$\leftrightarrow$		(Stenman et al., 2012)
		13%	60%	12 sem	$\leftrightarrow$			(Kless et al., 2015)
	Rats	13%	78 %	4 sem	↑	$\leftrightarrow$		(Kless et al., 2015)
	Wistar	13%	45%	1,3,6 sem	$\leftrightarrow$		$\leftrightarrow$	(Hamilton et al., 2015)
Iléon	~ ·	13%	60%	4 sem	1	1		(Johnson et al., 2015)
	Souris C57blck6	10%	60%	12 sem	$\leftrightarrow$			(Stenman et al., 2012)
		13%	60%	12 sem	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$		(Kless et al., 2015)
	Rats	13%	45%	1 sem	↑		$\leftrightarrow$	(Hamilton et al., 2015)
	Wistar	13%	45%	3,6 sem	$\leftrightarrow$		$\leftrightarrow$	(Hamilton <i>et al.</i> , 2015)
Côlon-	Qi.r	13%	48%	4,12 sem	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$		(Kless et al., 2015)
Caecum	C57blck6	10%	60%	12 sem	↑			(Stenman et al., 2012)
		10%	60%	12 sem	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$		(Kless et al., 2015)
		13%	78%	4 sem	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$		(Kless et al., 2015)
	AKR/J SWR/J	13%	45%	4 sem	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$		(Kless et al., 2015)
	Rats Wistar	13%	45%	1,3,6 sem	1		1	(Hamilton <i>et al.</i> , 2015)

# Tableau 12 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la perméabilité intestinale mesurée en chambre d'Ussing.

↑/↓/↔ augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. % de lip :% de lipides de l'énergie totale du

régime différentes) il reste difficile de déterminer précisément quand et où la perméabilité est augmentée. Concernant la perméabilité transcellulaire, une seule étude chez le rat a montré que le gros intestin présentait une perméabilité augmentée suite à 3 et 6 semaines de régime hyperlipidique à 45% de lipides (Hamilton *et al.*, 2015).

Par ailleurs, de nombreux autres facteurs inhérents à l'utilisation de modèles animaux, tels que les conditions d'hébergement, peuvent impacter la fonction de BEI (Muller *et al.*, 2016). En effet, des souris nourries avec un régime obesogène et hébergées dans une animalerie conventionnelle ont une conductance augmentée suite à 12 semaines de régime hyperlipidique alors que les souris nourries avec le même régime mais dans une animalerie « exempte d'organisme pathogène spécifique» ne présentent aucune perte de barrière intestinale (Muller *et al.*, 2016). Ces résultats montrent l'importance du microbiote avant l'intervention nutritionnelle dans l'altération de la BEI induite par la consommation d'un régime obesogène (Muller *et al.*, 2016).

#### 4.4. Mécanismes possibles

Les mécanismes expliquant la perte de barrière intestinale suite à la consommation d'un régime obesogène ne sont pas totalement élucidés (Teixeira *et al.*, 2012).

L'utilisation de pré et probiotiques a permis de mettre en évidence l'importance du microbiote dans ces dérèglements. Plusieurs études ont montré que l'ingestion de pré ou probiotiques restaure la fonction de barrière intestinale chez des animaux consommant un régime obesogène (Cani *et al.*, 2009; Everard *et al.*, 2013). De plus, des corrélations ont été décrites entre certaines populations bactériennes et des paramètres de BEI telles que les niveaux d'expression de protéines de jonctions serrées (Lam *et al.*, 2012). La résistance transépithéliale du côlon proximal de souris est positivement corrélée avec l'abondance de *Lactobacille* et négativement avec celle d'*Oscillibacter* (Lam *et al.*, 2012). De même, l'abondance d'*Oscillispira* ainsi que celle de *Butyricimonas* sont significativement corrélées avec la perméabilité paracellulaire de l'intestin grêle et transcellulaire du caecum, respectivement, chez le rat (Hamilton *et al.*, 2015). Une supplémentation en certaines bactéries telles qu'*Akkermansia muciniphila* est également associée à une amélioration de la BEI par des mécanismes qui ne sont pas encore totalement connus (Reunanen *et al.*, 2015). L'ensemble de ces bactéries pourrait agir positivement ou négativement *via* la production d'acides gras volatiles (AGV) comme le butyrate, l'acétate ou le propionate qui seraient capable d'influencer la barrière intestinale (Suzuki *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009).

Les acides biliaires (AB), dont la production et l'excrétion sont augmentées lors de la consommation d'un régime obesogène (Stenman *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2016), pourraient être également impliqués dans l'altération de la BEI *via* une modulation de l'expression des protéines des jonctions serrées (Raimondi *et al.*, 2008; Stenman *et al.*, 2013). Une corrélation positive entre la perméabilité

caecale paracellulaire et la quantité d'AB primaires et secondaires a été décrite chez la souris (Murakami *et al.*, 2016).

Des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et glucides pourraient aussi moduler la BEI. La leptine augmente la perméabilité colique en altérant l'expression des protéines de jonctions serrées (Le Drean *et al.*, 2014). Ainsi, l'hyperleptinémie observée lors de DIO (Lin *et al.*, 2000) pourrait être un facteur contribuant à la perte de la BEI. De même, l'insuline dont les concentrations sont élevées lors de certains stades de l'obésité, pourrait augmenter la perméabilité paracellulaire (McRoberts *et al.*, 1990).

Enfin, l'inflammation systémique et locale observée lors de l'obésité est un facteur contribuant également à la perte de barrière intestinale (Teixeira *et al.*, 2012).

#### 4.5. Perméabilité intestinale spécifique au LPS

Malgré l'implication importante de l'endotoxémie métabolique lors de l'obésité, aucune étude n'a mesuré le passage transépithelial du LPS. Les mécanismes par lesquels le LPS traversent l'intestin n'étant pas totalement compris, il est difficile de conclure précisément de l'impact d'un régime obesogène sur la perméabilité intestinale au LPS (Guerville *et al.*, 2016). Cependant, plusieurs voies de passage du LPS selon le site intestinal ont été suggérées nous permettant ainsi d'émettre des hypothèses (Guerville *et al.*, 2016).

Le LPS pourrait traverser l'intestin grêle par trois mécanismes différents: la voie transcellulaire, le passage *via* les cellules à mucus (GAP pour Goblet-Associated Passage) et enfin grâce aux chylomicrons (Guerville *et al.*, 2016). Concernant la perméabilité transcellulaire, un régime obesogène à 45 % de lipides durant 1, 3 et 6 semaines chez le rat ne modifie pas la perméabilité transcellulaire (Hamilton *et al.*, 2015). Aucune étude n'a été réalisée sur l'impact de l'obésité sur le passage d'antigènes *via* les cellules à mucus dans l'intestin grêle. Les mécanismes de passage postprandial du LPS *via* les chylomicrons seront développés dans la section suivante.

A l'inverse, la perméabilité transcellulaire du gros intestin est augmentée et significativement corrélé avec la concentration plasmatique de LBP après 3 et 6 semaines de régime obesogène chez le rat (Hamilton *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que le LPS pourrait traverser les colonocytes. Bien que les GAP ne soient présents dans un côlon sain, il a été montré qu'une altération de l'équilibre du microbiote par l'administration d'antibiotiques engendrait l'ouverture de GAP (Knoop *et al.*, 2015). Les modifications du microbiote intestinal induites par l'obésité (Daniel *et al.*, 2014) pourraient ainsi augmenter les GAP coliques laissant ainsi traverser le LPS.

Physiologiquement, le LPS ne peut traverser l'intestin grêle ou le gros intestin *via* la voie paracellulaire du fait de sa grosse taille. En revanche, des études ont montré que sous certaines

conditions qui augmentent la perméabilité paracellulaire telles que l'hypoxie ou l'inflammation, le LPS pouvait traverser l'intestin *via* les jonctions serrées (Drewe *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2005). La consommation d'un régime obesogène entraînerait une élévation de la perméabilité paracellulaire (Cani *et al.*, 2008; de La Serre *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2016) pouvant permettre au LPS de traverser la BEI. Cependant, l'augmentation de la perméabilité dans les tissus enflammés ou hypoxiés est nettement supérieure à celle observée chez les animaux et patients obèses. Ainsi, il est alors peu probable que le LPS emprunte la voie paracellulaire lors de l'obésité.

#### 4.6. Passage postprandial via les chylomicrons

L'absorption des lipides se déroule au niveau de l'intestin grêle via les chylomicrons. Lors de la consommation d'un régime hyperlipidique, la quantité de chylomicrons secrétée est donc plus importante afin de permettre une absorption plus efficace des lipides. Or les chylomicrons sont capables de lier et transporter les LPS à travers l'intestin (Ghoshal *et al.*, 2009; Laugerette *et al.*, 2011).

Ce parallèle entre consommation de régimes hyperlipidiques et augmentation de l'endotoxémie postprandiale a été montré dans plusieurs études. Chez la souris, un gavage de lipides augmente l'endotoxémie (Cani *et al.*, 2007; Ghoshal *et al.*, 2009). Comme déjà vu dans le chapitre 1, chez l'homme, la consommation d'un repas enrichi en lipides induit une augmentation transitoire de l'endotoxémie (Erridge *et al.*, 2007; Amar *et al.*, 2008; Laugerette *et al.*, 2011).

Par ailleurs, la structure des lipides modifierait la cinétique de l'endotoxémie post-prandiale. Chez l'homme, une ingestion de lipides sous forme d'émulsion augmente de façon plus importante l'endotoxémie en comparaison avec l'ingestion de lipides non émulsionnés (Laugerette *et al.*, 2011). *In vitro*, en culture Transwell de Caco-2, une infusion de LPS en présence de micelles lipidiques augmente le passage du LPS du côté apical au basolatéral (Laugerette *et al.*, 2011).

Pour conclure, lors de la consommation d'un régime obesogène, la translocation du LPS au niveau de l'intestin grêle serait facilitée par la surproduction post-prandiale de chylomicrons. Au niveau du gros intestin, la perméabilité transcellulaire est augmentée chez des rats DIO, on peut alors supposer que le LPS traverserait les colonocytes. Ainsi, une perte de BEI pourrait être l'un des facteurs responsables de l'augmentation de l'endotoxémie lors de l'obésité. Cependant, aucune étude n'a mesuré le passage à travers l'intestin du LPS spécifiquement chez des animaux ou patients obèses.



#### Figure 5 : Schéma simplifié des voies de synthèse des acides biliaires.

Les AB sont synthétisés à partir du cholestérol initiée par l'enzyme limitante cholestérol- $\alpha$  hydroxylase (CYP7A1) conduisant aux acides primaires : l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA). La plupart des AB primaires sont ensuite conjugués avec de la glycine et de la taurine au niveau hépatique : l'acide taurochénodéoxycholique, l'acide glycodéoxycholique, l'acide taurocholique et l'acide glycholique. Une fois dans le tractus digestif, les AB primaires CA et CDCA peuvent être déconjugués et déhydroxylés par les bactéries du microbiote pour produire des AB secondaires comme l'acide déoxycholique et l'acide lithocholique.

## 5. Prise en charge hépatique

#### 5.1. Enzymes hépatiques de détoxification du LPS

Deux enzymes sont présentes au niveau hépatique pour détoxifier le LPS : l'Acyloxylacylhydroxylase (AOAH) et la phosphatase alcaline (ALP). L'élévation de l'endotoxémie observée lors de l'obésité pourrait résulter, en partie, d'une diminution de la capacité hépatique à détoxifier le LPS. Cependant, aucune étude ne décrit l'effet de la consommation d'un régime hyperlipidique ou de l'obésité sur l'expression et l'activité de l'AOAH.

Chez l'homme, les personnes obèses présentent une ALP plasmatique élevée comparée aux personnes maigres suggérant une augmentation de la production d'ALP par le foie (Khan *et al.*, 2015) (Verrijken *et al.*, 2010) (Kim *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude n'a encore montré de corrélation directe entre l'ALP hépatique et plasmatique. De plus, tout comme l'intestin, le tissu adipeux est également capable de produire de l'ALP (Khan *et al.*, 2015). Par ces mesures plasmatiques il est donc difficile de conclure de l'effet de l'obésité et/ou de la consommation de régimes hyperlipidiques sur la modulation de l'expression de l'ALP au niveau hépatique spécifiquement.

De façon importante, il a été montré que l'activité de l'ALP était diminuée chez les rats Zucker obèses comparés aux Zucker maigres et sauvages (Bertone *et al.*, 2011).

#### 5.2. Bile

#### 5.2.1. Métabolisme de la bile et des acides biliaires

La bile est un fluide constitué en majorité d'eau, d'AB, de phospholipides, de bilirubine et de cholestérol. La bile exerce deux fonctions principales : elle aide à la digestion des lipides et permet l'excrétion de molécules toxiques telles que les endotoxines. La bile est formée dans les hépatocytes et sera ensuite stockée dans la vésicule biliaire jusqu'à l'excrétion dans le duodénum durant un repas.

#### a) Les acides biliaires (AB)

Les AB sont des molécules amphipatiques dérivées du cholestérol, synthétisés selon deux voies prédominantes. La voie classique conduit à la production de deux AB : l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA). Ces deux AB représentent 90% de la production d'AB primaires. Cette voie classique est initiée par l'enzyme limitante cholestérol- $\alpha$  hydroxylase (CYP7A1), exprimée dans les hépatocytes. La voie alternative ne représente que 10% de la production d'AB primaire et mène également à la production de CDCA. La plupart des AB primaires seront ensuite conjugués avec de la glycine et de la taurine au niveau hépatique (Figure 5).



#### Figure 6 : Schéma du cycle enterohépatique

Le pool d'AB est maintenu grâce à une circulation entéro-hépatique efficace permettant de préserver 95% des AB conjugués. La réabsorption active des AB conjugués se passe au niveau de l'iléon distal. Les AB non conjugués peuvent être réabsorbés de façon passive dans l'intestin grêle et le gros intestin. 5% des AB seront éliminés par les fèces.

De (Brestoff et al, 2013)

Une fois dans le tractus digestif, les AB primaires CA et CDCA peuvent être déconjugués et déhydroxylés par les bactéries du microbiote pour produire des AB secondaires comme l'acide déoxycholique et l'acide lithocholique.

Le pool d'AB est maintenu grâce à une circulation entéro-hépatique efficace permettant de préserver 95% des AB conjugués (Figure 6). La réabsorption active des AB conjugués se passe au niveau de l'iléon distal *via* plusieurs transporteurs tels que l'Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter (ASBT aussi connu comme IBAT) ou Organic Soluble Transporter. Les AB non conjugués (formés après déconjugaison de la taurine et de la glycine par les bactéries intestinales) peuvent être réabsorbés de façon passive dans l'intestin grêle et le gros intestin. Cependant, leur transport par cette voie est beaucoup moins efficace. Enfin, 5% des AB seront éliminés par les fèces.

Le métabolisme de la bile diffère en plusieurs points entre la physiologie humaine et celle des rongeurs. Tout d'abord, en termes d'anatomie l'homme et la souris possèdent une vésicule biliaire alors que le rat n'en possède pas. De plus, l'homme possède deux AB primaires (CA et CDCA) alors que la souris et le rat en possèdent 5 (CA, CDCA, l'acide ursodéoxycholique et les acides murideoxycholique  $\beta$  et  $\alpha$ ) (Sayin *et al.*, 2013). Enfin, la prise en charge hépatique des xénobiotiques est plus efficace chez le rat comparé à l'homme (Yang *et al.*, 2015), tout comme l'hydrophobicité des AB qui est augmentée chez le rat (Heuman, 1989).

#### b) <u>Régulation de la synthèse d'AB</u>

Les AB sont des puissants régulateurs de leur propre synthèse *via*, entre autres, l'activation de plusieurs récepteurs dont le majoritaire est le farnesoid X receptor (FXR). De nombreuses voies d'action de la régulation de la synthèse des AB ont été décrites dans la littérature, sont présentées seules les actions majeures de FXR dans cette voie de régulation. Au niveau hépatique, la liaison des AB sur FXR augmente la conjugaison des AB et l'expression de gènes impliqués dans l'efflux des AB jusqu'à la bile. L'activation de FXR va également induire la transcription du Small Heterodimer Partner qui inhibe l'expression de Cyp7A1. Au niveau intestinal, l'activation de FXR induit la sécrétion de fibroblast growth factor-15/19 (FGF19 chez l'homme et FGF15 chez le rongeur) dans la veine porte. FGF15 va ensuite interagir avec son récepteur Fibroblast Growth Factor-15/19 Receptor 4 exprimé au niveau des hépatocytes, et inhiber la synthèse d'AB en réduisant la transcription de Cyp7a1. FGF15 augmente également le remplissage de la vésicule biliaire par la bile.

#### 5.2.2. Composition et excrétion de bile pendant l'obésité.

L'obésité induite par la consommation d'un régime obesogène et génétique augmente la quantité d'AB au niveau caecal (Stenman et al., 2013; Muller et al., 2016; Murakami et al., 2016) et fécal (Stenman et al., 2012; Stenman et al., 2013; Muller et al., 2016). Plus précisément, l'obésité est caractérisée par une augmentation de la concentration dans le caecum de l'AB secondaire : DCA (Stenman et al., 2012; Stenman et al., 2013; Duparc et al., 2016; Muller et al., 2016; Murakami et al., 2016). De plus, l'expression des transporteurs iléaux d'AB, l'ASBT et l'organic soluble transporter est augmentée chez les animaux DIO comparés aux standards et cela de 2 semaines de régime (de Wit *et al.*, 2008; Duparc *et al.*, 2016) De plus, l'étude de Muller et collaborateurs a montré que suivant la composition du microbiote avant la consommation du régime obesogène, la composition en AB en réponse au régime était différente, soulignant ainsi l'importance du microbiote dans le métabolisme des AB lors de l'obésité (Muller *et al.*, 2016). Une étude publiée dans Nature en 2013 a même suggéré qu'une bactérie particulière *C. sordellii* serait responsable de l'augmentation d'acide déoxycholique lors de l'obésité (Yoshimoto *et al.*, 2013).

Lors de l'obésité, l'excrétion de la bile est augmentée suggérant alors une excrétion hépatique de LPS facilitée. De plus, une augmentation de la concentration caecale de CA, comme observée lors de l'obésité (Stenman *et al.*, 2012; Stenman *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2016; Murakami *et al.*, 2016), induit une réduction de la proportion des Gram-négatif Bacteroides suggérant alors une baisse de la quantité de LPS dans le contenu.

#### 5.3. Prise en charge plasmatique : Lipoprotéines

Une fois dans la circulation sanguine, le LPS est rapidement pris en charge par des molécules de transport dont la principale est la LBP, synthétisée au niveau hépatique (Cf chapitre 1). Lors de l'obésité, le foie s'adapte en augmentant la synthèse de LBP, permettant ainsi de prendre en charge l'afflux de LPS dans la circulation sanguine. Le foie synthétise également des lipoprotéines, qui transportent le cholestérol et des lipides mais également de façon minoritaire le LPS.

La dyslipidémie est l'un des troubles métaboliques associés à l'obésité et reconnue pour être un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires (Jung *et al.*, 2014). Elle se caractérise par un niveau anormal de lipides (cholestérol ou triglycérides) dans la circulation sanguine. Lors de l'obésité, les concentrations plasmatiques d'acides gras libres et de triglycérides augmentent tandis que la concentration d'High densitiy lipoprotein (HDL) diminue (Jung *et al.*, 2014).



# Figure 7 : Schéma récapitulatif du chapitre 3

- ? : Résultats divergents dans la littérature
- t : augmentée comparé aux animaux nourris avec un régime standard
- $\mathcal{O}$ : Pas de données disponibles dans la littérature

Les HDL sont les principales lipoprotéines impliquées dans la détoxification du LPS puisqu'elles le transportent de la circulation sanguine vers le foie. Ainsi une baisse de la concentration de HDL plasmatique diminuerait ce transport du LPS, participant au maintien de l'endotoxémie élevée observée lors de l'obésité. Cependant, la détoxification du LPS par les HDL ne semblent pas être la voie majeure de détoxification puisqu'aucune corrélation entre la concentration plasmatique d'HDL n'a été trouvée (Amar *et al.*, 2008).

En résumé :

Les principaux mécanismes de prise en charge du LPS qui sont modifiés lors de l'obésité induite par la consommation d'un régime obésogène, sont résumés dans la figure 7.



Figure 8 : Schéma représentant l'axe intestin-cerveau. Les hormones synthétisées par la périphérie interagissent avec les neurones de l'ARC. Les neurones POMC/NPY sont activés par les hormones anorexigènes alors qu'à l'inverse, les neurones AgRP/NPY sont stimulés par les hormones orexigènes. Par la suite, les neurones de l'ARC, du premier ordre, projettent sur les neurones du second ordre pour induire une inhibition ou stimulation de la PA.

Modifié de Niswender et al, 2003

## Chapitre 4 :

# Régulation de la prise alimentaire

## 1. Notion de balance énergétique

La balance énergétique se définit comme un état métabolique correspondant à un équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Plusieurs facteurs sont pris en compte dans la régulation de l'homéostasie énergétique : les niveaux de nutriments présents dans les organes de stockage (TA et foie), les quantités de nutriments reçus par l'alimentation et enfin les besoins en énergie des tissus. L'intégration de ces nombreux facteurs implique donc une communication étroite entre de nombreuses structures à la fois périphériques et centrales.

# 2. Structures centrales impliquées dans le contrôle de la balance énergétique

#### 2.1. L'hypothalamus

Au niveau central, de nombreuses structures sont impliquées dans l'homéostasie énergétique. Il est actuellement admis que les principaux centres du contrôle homéostatique de la prise alimentaire se trouvent au niveau de l'hypothalamus, organisé en plusieurs noyaux agissant en synergie : le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire, le noyau ventromédian, le noyau dorsomédian et l'aire latérale hypothalamique.

#### 2.1.1. Le noyau arqué (ARC)

L'ARC est accolé à l'éminence médiane, structure sans barrière hémato-encéphalique (BHE) et donc perméable aux signaux périphériques. Cette localisation fait de l'ARC un relais entre les organes périphériques et le SNC permettant l'intégration des signaux périphériques systémiques nécessaires au maintien de l'homéostasie (Figure 8). L'ARC est ainsi le premier noyau à intégrer leurs informations avant de les relayer vers d'autres noyaux. Il contient des populations neuronales sensibles aux signaux périphériques, appelées de premier ordre, projetant vers les neurones de second ordre (détaillés dans la section suivante).

#### a) Populations neuronales orexigènes NPY/AgRP

Cette première population de neurones de première ordre co-exprime deux puissants stimulateurs de la PA (Figure 8) : le neuropeptide Y (NPY) et l'agouti-gene related peptide (AgRP). Leur effet orexigène a été montré grâce à des injections centrales et l'utilisation de souris transgéniques. En effet, une injection intracerebroventriculaire de NPY et d'AgRP induit une prise alimentaire (Geerling *et al.*, 2013) (Rossi *et al.*, 1998). De plus, une ablation des neurones AgRP induit une faible mais significative réduction du gain de poids liée en majorité à une diminution de la masse grasse (Xu *et al.*, 2005). A l'inverse, des souris sur-exprimant NPY et AgRP spécifiquement au niveau du SNC développent une obésité associée à une hyperphagie comparées à des souris WT (Kaga *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2013) ; (Ollmann *et al.*, 1997).

#### b) Populations neuronales anorexigéniques POMC/CART

La deuxième population neuronale co-exprime la pro-piomélanocortine (POMC) et la Cocaïne and Amphetamine Regulated Transcript (CART) (Figure 8). La POMC est la protéine précurseur des mélanocortines ( $\alpha$ -MSH et  $\beta$ -MSH) qui exercent un rôle inhibiteur sur la PA (Edwards *et al.*, 2000).

Les souris déficientes pour POMC développent une obésité et une hyperphagie, qu'elles soient soumises à un régime standard ou obesogène (Yaswen *et al.*, 1999). Une ablation des neurones POMC conduit à une hyperphagie et une augmentation des masses grasses et maigres (Xu *et al.*, 2005). Chez l'homme, des cas d'obésité sévère ont également été associés à des mutations des gènes exprimant POMC (Krude *et al.*, 1998).

Le neuropeptide CART est co-exprimé avec POMC. Chez le rongeur, des injections intracerebroventriculaires de CART diminuent la PA (Aja *et al.*, 2001) tandis que des souris KO pour CART soumises à un régime standard présentent un surpoids et une perte de sensibilité à l'insuline à 40 jours d'âge (Wierup *et al.*, 2005).

#### 2.1.2. Autres noyaux hypothalamiques

Les neurones du premier ordre de l'ARC vont agir sur les neurones du second ordre localisés au niveau des autres noyaux hypothalamiques en particulier le noyau paraventriculaire et l'aire hypothalamique latérale (Figure 8). Le noyau paraventriculaire possède des neurones anorexigènes à Corticotropin-Realeasing Hormone et Thyrotropin-Releasing Hormone, alors que l'aire hypothalmique latérale possède des neurones orexigènes à orexines et Melanocortin Hormone (MCH). Ces neurones de second ordre projettent ensuite vers des régions extra-hypothalamiques.

#### 2.2. Régions extra-hypothalamiques

La régulation de l'homéostasie énergétique fait également intervenir d'autres structures cérébrales connectées à l'hypothalamus telles que le complexe dorso vagal, le système limbique ou le thalamus. Parmi ces structures extra-hypothalamiques, le noyau du tractus solitaire (NTS) est un site majeur pour l'intégration des informations périphériques. Comme l'ARC, le NTS reçoit directement des signaux hormonaux de par sa proximité avec l'area postrema, région présentant une BHE incomplète. Il reçoit également des signaux périphériques provenant des fibres afférentes du nerf vague (VANs), mécanismes détaillés dans la section 5.

# 3. Les principales hormones impliquées dans la régulation de la PA

Parmi les structures périphériques, le tractus gastro-intestinal (GIT pour gastro-intestinal tractus) joue un rôle majeur dans le contrôle de la PA à court terme, i.e. dans l'initiation et la terminaison des repas. En effet, les cellules entéroendocrines (EECs) du GIT libèrent des hormones en réponse à la présence ou à l'absence de nutriments dans le tube digestif, qui vont stimuler ou inhiber la PA à l'échelle d'un repas. Les hormones communiquent avec le SNC soit *via* la circulation sanguine soit par le nerf vague (Berthoud, 2008). Les différentes hormones seront détaillées dans la première partie de cette section.

La régulation de l'homéostasie énergétique implique également les fonctions endocrines du tissu adipeux et du pancréas dont les mécanismes d'action des hormones seront détaillés dans la section 3.

#### 3.1. Les cellules entéroendocrines – détection des nutriments

L'intestin est le lieu où les nutriments sont digérés et absorbés. Parmi les différents types de cellules intestinales, les EECs sont spécialisées dans la détection des nutriments et la libération d'hormones. Elles sont localisées dans la muqueuse du GIT et représentent moins de 1% des cellules épithéliales totales. Le pôle apical des EECs, recouvert de microvillosités est ouvert sur la lumière intestinale. Les hormones sont libérées dans des granules de sécrétion au niveau basolatéral pour agir soit sur les neurones entériques et vagaux, sur d'autres organes *via* la circulation sanguine, ou sur les cellules intestinales voisines de façon paracrine. Il existe plus de 20 types d'EECs différents, toutes réparties dans le GIT et libérant une ou plusieurs hormones.

Compte tenu de leur faible quantité et de leur dispersion dans le GIT, les EECs sont difficiles à étudier. Le recours à des lignées cellulaires telles que STC-1, GLUTag ou BON cells est donc nécessaire. Cependant, les EECs sont entourées d'autres types cellulaires, ce qui ne peut pas être reproduit avec les lignées cellulaires. Plus récemment, l'utilisation de souris transgéniques exprimant

un rapporteur fluorescent GFP (pour Green Fluroscent Protein) sous le contrôle d'un promoteur pour le précurseur d'hormone a permis d'étudier les EECs *in vivo* (Bohorquez et al., 2011).

Les EECs adaptent leur réponse sécrétoire en fonction de la composition du contenu luminal. Grâce aux modèles cellulaires et ces souris transgéniques, plusieurs mécanismes de détection des nutriments par les EECs ont été mis en évidence. La détection du glucose impliquerait des transporteurs et notamment le sodium/glucose cotransporter 1, des canaux potassiques et des récepteurs couplés à des protéines G plus spécifiquement l' $\alpha$ -gustducine. Concernant la détection des acides aminés, le Gq-coupled calcium-sensing receptor semble être l'un des récepteurs majeurs impliqués. La détection de peptides plus larges s'effectuerait *via* le transporteur peptide transporter 1 ainsi que le glysophosphatic acid receptor 5. Enfin, *via* leurs interactions avec ces récepteurs, les lipides ainsi que les AGV produits par le microbiote sont des puissants stimulants de la production d'hormones intestinales (Sleeth *et al.*, 2010).

#### 3.2. L'hormone orexigène majeure: la ghréline

La ghréline, peptide de 28 acides aminés, a été initialement décrite, par l'équipe de Kojima en 1999, comme un ligand endogène du récepteur de l'hormone de croissance (Kojima et al., 1999). Cependant, elle est maintenant reconnue pour être l'hormone majeure stimulant la PA (Tschop et al., 2000). La ghréline est issue de la maturation d'un peptide, la pré-pro-ghréline qui, dans sa maturation, produit également un autre peptide l'obestatine (Muller et al., 2015). Bien que provenant du même précurseur, ces deux hormones présenteraient cependant des effets opposés sur la PA (Zhang et al., 2005). Le tractus digestif et en particulier les EECs A de l'épithélium gastrique, sont les sites majeurs de production de ghréline (Date et al., 2000; Gnanapavan et al., 2002). Elle est également synthétisée par d'autres organes périphériques tels que les poumons ou le pancréas (Gnanapavan et al., 2002) mais aussi centraux comme l'hypothalamus et l'hypophyse (Kojima et al., 1999; Gnanapavan et al., 2002). La ghréline peut exister sous deux formes : la forme acylée ou des-acylée. La réaction d'acylation est effectuée par l'enzyme ghréline 0-acyl-Transferase (GOAT), exprimée dans les mêmes tissus que la ghréline (Yang et al., 2008). L'acylation de la ghréline régule son activité biologique. Seule la forme acylée se lie au récepteur Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR) et exerce des effets sur l'homéostasie énergétique. Néanmoins, la ghréline non acylée, forme majoritaire présente dans la circulation sanguine, a été récemment décrite comme un inhibiteur fonctionnel de la ghréline acylée (Delhanty et al., 2014).

L'absence de nutriments augmente la sécrétion de ghréline tandis que leur présence diminue la ghrélinémie (Camina *et al.*, 2003). La ghréline atteint donc un pic de sécrétion durant la phase préprandiale puis retourne à son niveau basal quelques heures après un repas [10, 26, 27]. La magnitude de réduction de ghrélinémie est proportionnelle à la quantité calorique du repas (Monteleone *et al.*, 2003) et la présence en forte quantité de lipides augmente la durée de sécrétion

comparé à un repas riche en glucides (Monteleone *et al.*, 2003). Les mécanismes de suppression de la production de ghréline ne sont pas encore totalement connus (Muller *et al.*, 2015). Récemment, il a été suggéré que l'expression de la GOAT était régulée par la présence de nutriments faisant varier le ratio ghréline acylée sur ghréline dés-acylée pouvant ainsi expliquer les fluctuations de la ghrélinémie en fonction du statut nutritionnel (Kirchner *et al.*, 2009).

La ghréline acylée joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Elle agit en activant principalement les neurones AgRP/NPY et inhibant les neurones POMC localisés au niveau de l'ARC (Cowley *et al.*, 2003). *Via* ces effets hypothalamiques, la ghréline stimule la PA, induisant sur le long terme une augmentation du gain de poids et de l'adiposité (Tschop *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2001; Wren *et al.*, 2001). Pour atteindre le SNC, la ghréline peut traverser la BHE (Banks *et al.*, 2002) et agir au niveau du NTS (Muller *et al.*, 2015). En revanche, l'implication des VANs dans l'action orexigène de la ghréline reste un sujet controversé dans la littérature (Muller *et al.*, 2015).

D'autre part, de nombreuses fonctions périphériques et centrales lui ont été attribuées comme la stimulation de la motricité gastrique, le raccourcissement du temps d'endormissement, la suppression de la thermogénèse du tissu adipeux brun ou encore l'amélioration des fonctions cardiovasculaires comme la contractilité des vaisseaux (Muller *et al.*, 2015).

#### 3.3. Hormones majeures de la satiété

#### 3.3.1. Cholécystokinine

La cholécystokinine (CCK) a été la première hormone découverte ayant un effet inhibiteur sur la PA (Gibbs *et al.*, 1973). La CCK est secrétée par les EECs I de l'intestin, principalement au niveau du duodénum et jéjunum en réponse à la présence de lipides et de protéines dans la lumière intestinale. Un des rôles principaux de la CCK est de faciliter la digestion (Dockray, 2006). La CCK stimule la sécrétion exocrine du pancréas conduisant à la libération d'un suc pancréatique riche en enzymes digestives hydrolysant les nutriments du bol alimentaire (Dockray, 2006). Elle entraine également une augmentation de la production biliaire en stimulant la contraction de la vésicule biliaire et le relâchement du sphincter d'Oddi libérant ainsi la bile dans le duodénum (Dockray, 2006). La CCK inhibe également la vidange gastrique, augmentant la digestion mécanique des nutriments par l'estomac (Dockray, 2006). Mais, une fonction primordiale de la CCK est d'inhiber la PA (Gibbs *et al.*, 1973; Ballinger *et al.*, 1995; Degen *et al.*, 2001; Raybould, 2007). Plus précisément, la CCK agit en diminuant la taille des repas et en augmentant l'intervalle entre chaque repas (Degen *et al.*, 2001). L'importance de la CCK dans la régulation de la PA a été confirmée grâce à un modèle de rat (OLETF rats) KO pour le récepteur CCK1-R qui développe une hyperphagie et une obésité (Moran *et al.*, 2006) (Chapitre 5 section 1.2).

La CCK ne peut pas traverser la BHE, elle agit donc majoritairement au niveau périphérique *via* le nerf vague (Owyang *et al.*, 2011). En effet, une vagotomie physique ou chimique supprime ses effets anorexigènes (Smith *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 2011) et une administration intraveineuse de CCK induit une décharge calcique au niveau des VANs gastriques (Date *et al.*, 2002). La CCK se fixe à son récepteur CCK1-R présent sur les VANs (Donovan *et al.*, 2007) activant ainsi le NTS qui va rediriger les informations vers l'hypothalamus (Raybould, 2007). Le signalling intracellulaire précis sera développé dans la section 5.3 de ce chapitre. La CCK est également synthétisée au niveau central par l'hypothalamus et le NTS, en moindre quantité que dans l'intestin, *Via* l'activation de ses deux récepteurs CCK1R et CCK2R, la CCK endogène centrale pourrait également diminuer la PA (Clerc *et al.*, 2007) (Reidelberger *et al.*, 2004).

#### 3.3.2. Le peptide YY

Le peptide YY (PYY) appartient à la famille des protéines « PP-fold » comme le NPY et le polypeptide pancréatique (PP). Le PYY est synthétisé sous sa forme primaire PYY <sub>1-36</sub> par les cellules L de l'intestin en réponse à la présence d'aliments dans la lumière intestinale (Stadlbauer *et al.*, 2015) (Manning *et al.*, 2014). La synthèse de PYY atteint un plateau 1 à 2 heures après un repas et varie en fonction de la composition nutritionnelle du repas (Stanley *et al.*, 2004). En effet, la synthèse de PYY est plus importante suite à un repas riche en lipides et protéines par rapport à un repas riche en glucides (Stanley *et al.*, 2004) (Batterham *et al.*, 2006). Une fois libéré dans la circulation sanguine, PYY<sub>1-36</sub> sera clivé par la dipeptidyl-peptidase IV formant ainsi le PYY <sub>3-36</sub> (Manning *et al.*, 2014; Stadlbauer *et al.*, 2015). A l'état à jeun, la forme PYY<sub>1-36</sub> est prédominante, tandis qu'en postprandial, PYY<sub>3-36</sub> est la forme majeure dans la circulation (De Silva *et al.*, 2012).

Les deux formes du PYY peuvent se fixer à leurs 5 récepteurs spécifiques : Y1R à Y5R. Cependant, la forme PYY <sub>3-36</sub> présente une forte affinité pour Y2R. Le PYY<sub>3-36</sub> a un rôle majeur dans l'inhibition de la sécrétion gastrique (Yang, 2002) mais est largement impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Manning *et al.*, 2014; Stadlbauer *et al.*, 2015). En effet, il a été montré dans de nombreuses espèces animales qu'une administration centrale ou périphérique de PYY <sub>3-36</sub> réduisait la PA (Stadlbauer *et al.*, 2015). De même, des souris déficientes pour PYY présentent une hyperphagie et une obésité (Batterham *et al.*, 2006; Boey *et al.*, 2006) qui pouvaient être restaurées par l'injection exogène de PYY (Batterham *et al.*, 2006).

Les mécanismes précis d'action de PYY sur la régulation de la PA ne sont pas complètement élucidés. Il est connu que PYY peut traverser la BHE et activer son récepteur Y2R situé, entre autres, au niveau de l'hypothalamus (Stadlbauer *et al.*, 2015). Il est suggéré que PYY inhiberait la PA en réduisant l'activation de neurones orexigènes NPY et en augmentant l'activité des neurones anorexigènes POMC de l'ARC (De Silva *et al.*, 2012). En plus de son action centrale, PYY agit *via* son récepteur
Y2R exprimé au niveau du nerf vague pour inhiber la PA (Iwasaki *et al.*, 2013) (Koda *et al.*, 2005) (mécanismes développés dans la section 5.3).

#### 3.3.3. Dérivés du pré-pro-glucagon

Le pré-pro-glucagon est une hormone synthétisée dans les cellules L de l'intestin, dans les îlôts pancréatiques et au niveau central. Cette pré-hormone est ensuite clivée en glucose-like peptide 1 (GLP-1), GLP-2, et oxyntomoduline qui interviennent tous dans la régulation de la PA.

Une des fonctions majeures du GLP-1 est la régulation du métabolisme glucidique, mais il est également impliqué dans la régulation de la PA. En effet, une administration périphérique de GLP-1 chez l'homme réduit la PA et augmente la sensation de satiété (Naslund *et al.*, 1999). La demi-vie du GLP-1 étant inférieure à deux minutes, il agirait principalement au niveau vagal *via* notamment l'activation de son récepteur GLP-1R (Kakei *et al.*, 2002; Ronveaux *et al.*, 2014).

A l'inverse du GLP-1, l'action inhibitrice du GLP-2 sur la PA est principalement centrale. Une administration centrale de GLP-2 diminue la PA (Guan, 2014) et il a été même suggéré que le GLP-2 soit un neurotransmetteur impliquée dans la régulation de la PA (Guan, 2014). Il est cependant plus connu pour son action périphérique majoritaire qui est d'augmenter la capacité d'absorption au niveau intestinal en augmentant l'activité d'enzymes de la bordure en brosse et en inhibant la vidange gastrique (Guan, 2014).

L'oxyntomoduline peut passer la BHE et stimuler les neurones du noyau arqué *via* l'activation du récepteur au GLP1. Une administration centrale et périphérique d'oxyntomoduline diminue la PA et la prise de poids chez le rat (Dakin *et al.*, 2002).

#### 3.3.4. La leptine

La découverte de la leptine par l'équipe de Zhang en 1999 (Zhang *et al.*, 1994) a constitué une avancée majeure dans la compréhension de la régulation de l'homéostasie énergétique. Cette hormone, principalement synthétisée par les adipocytes, est considérée comme le reflet de la masse grasse d'un individu (Munzberg *et al.*, 2015). Cependant, elle est également exprimée dans de nombreux tissus et notamment dans l'estomac où sa production joue un rôle important dans la régulation de la PA (Bado *et al.*, 1998).

Le gène db codant pour le récepteur à la leptine a été identifié en 1995 par l'équipe de Tartaglia (Tartaglia *et al.*, 1995). Ce gène subit des mécanismes d'épissage alternatif conduisant à 6 isoformes différents leur conférant chacun des rôles précis : Ob-Ra à Ob-Rf. Suite à l'épissage, l'isoforme Ob-Re ne possède pas de domaine transmembranaire, il est donc une forme soluble du récepteur et serait impliqué dans le contrôle de la leptinémie (Munzberg *et al.*, 2015). L'isoforme le plus court, Ob-Ra, permet le transport de la leptine à travers la BHE (Bjorbaek *et al.*, 1998). Enfin, l'isoforme le plus



#### Figure 9 : Cascade de signalisation de la leptine.

La fixation de la leptine sur son récepteur Ob-Rb induit l'activation de plusieurs voies de signalisation (Jak2/STAT3, MAPK, PI3K, AMPK). La signalisation de la leptine est négativement correlée par le Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) et le stress du réticulum endoplasmique mais positivement régulée par Src homology 2 B adaptor protein 1.

Adapté de Morris et al, 2009

long, Ob-Rb, possède un domaine intracellulaire lui permettant d'activer différentes voies de signalisation suite à sa liaison avec la leptine (Park *et al.*, 2014). La liaison de la leptine sur son récepteur Ob-Rb active 5 voies différentes de signalisation (Figure 9). La cascade de signalisation se termine par l'induction des facteurs de transcription Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) et STAT5 (Park *et al.*, 2014). Deux protéines sont impliquées dans le rétrocontrôle négatif : suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) et protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1b) (Park *et al.*, 2014).

La leptine peut-être caractérisée comme une hormone multifonctionnelle qui régule non seulement l'homéostasie énergétique mais également d'autres fonctions physiologiques tels que les fonctions gastro-intestinales (Guilmeau *et al.*, 2004). L'effet de la leptine sur la régulation du comportement alimentaire a été mis en évidence grâce à l'utilisation de modèles d'animaux mutés soit pour la leptine (ob/ob (Zhang *et al.*, 1994)) soit pour son récepteur (db/db (Lee *et al.*, 1996) et le rat Zucker (Zucker *et al.*, 1972) qui présentent tous une obésité (Chapitre 5 section 1.1). De la même manière, chez l'homme, une mutation du gène db conduit à une hyperphagie et une obésité morbide (Clement *et al.*, 1998).

Même si les leptines adipocytaire et gastrique sont structurellement identiques, leur processus de sécrétion sont différents. Au niveau du TA, la leptine est secrétée de façon continuelle, à l'inverse de la leptine gastrique qui est secrétée rapidement et de façon transitoire en réponse à certains stimuli tels qu'un repas (Guilmeau et al., 2004). Ainsi, on peut suggérer que la leptine gastrique serait majoritairement impliquée dans la régulation de la PA à court terme, tandis que la leptine adipocytaire agirait comme indicateur de stockage pour réguler la PA à plus long terme (Cammisotto et al., 2012). A court terme, à l'état nourri, plusieurs facteurs tels que la CCK ou des stimulations provenant du nerf vague augmentent la production de leptine gastrique (Sobhani et al., 2002; Guilmeau et al., 2004; Cammisotto et al., 2012). Une fois produite, la leptine gastrique peut agir au niveau de l'estomac mais peut également entrer dans la lumière intestinale (Guilmeau et al., 2004). Tout d'abord, au niveau des VANs gastriques et intestinaux la leptine potentialise l'activité anorexigène de la CCK (Guilmeau et al., 2004) dont le mécanisme sera développé dans la section X. La leptine gastrique agit également au niveau des EECs en augmentant la production et la sécrétion de CCK (Guilmeau et al., 2004). Tout comme la leptine adipocytaire, la leptine gastrique peut se retrouver dans la circulation sanguine pour agir au niveau central où, via l'interaction avec son récepteur OB-Rb, elle active les neurones anorexigènes POMC/CART et inhibe les neurones oréxigènes AgRP/NPY de l'ARC (Schwartz et al., 2000).

#### 3.3.5. Polypeptide pancréatique (PP)

Le polypeptide pancréatique (PP) appartient également à la famille des PP-fold. Le PP est secrété par cellules endocrines du pancréas en réponse à l'ingestion d'un repas (Woods *et al.*, 2006) ainsi que la CCK (Kojima *et al.*, 2007). Le PP exerce une multitude d'actions régulatrices telles que l'inhibition de la sécrétion exocrine du pancréas et de la motricité gastrique (Woods *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2007) mais également la réduction de la PA (Malaisse-Lagae *et al.*, 1977; Asakawa *et al.*, 2003; Batterham *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2007). En effet, une administration intraveineuse de PP réduit la PA chez des souris obèses et normales (Malaisse-Lagae *et al.*, 1977; Asakawa *et al.*, 2003) ainsi que chez l'homme (Batterham *et al.*, 2003). Le PP, libéré dans la circulation sanguine, peut passer la BHE et activer son récepteur Y4R exprimé au niveau des régions du complexe dorso-vagal dont le NTS et le noyau dorsal moteur du vague. Le PP va ainsi moduler les fonctions gastro-intestinales *via* les neurones efférents du vague (Kojima *et al.*, 2007). Cependant, il a été également suggéré que le PP pourrait agir au niveau des VANs puisqu'une injection de PP en i.p. induit une décharge calcique au niveau du ganglion noueux (Iwasaki *et al.*, 2013).

#### 3.3.6. Insuline

L'insuline est sécrétée par les cellules béta des îlots de Langerhans du pancréas en réponse à une hyperglycémie. Outre son rôle dans le métabolisme glucidique, l'insuline diminue la PA (Filippi *et al.*, 2013). Après avoir traversé la BHE, l'insuline *via* ses récepteurs (Insulin Receptor IR) inhibe l'activité des neurones NPY et active les neurones POMC de l'ARC réduisant ainsi la PA (Filippi *et al.*, 2013).

# 4. L'obésité et la régulation de la PA

Vu le rôle majeur des hormones du GIT et de la leptine dans la régulation de la PA, l'hypothèse d'une dérégulation de leur synthèse ou de leur fonctionnement lors de l'obésité a été suggérée. Dans cette section, nous allons détailler l'impact de la consommation d'un régime obesogène ou de l'obésité sur la physiologie de ces hormones.

#### 4.1. La ghréline

Les taux plasmatiques de ghréline, hormone orexigène, sont inversement proportionnels à l'IMC et au pourcentage de masse grasse (Tschop *et al.*, 2001). En conséquence, la ghrélinémie à jeun est inférieure lors de l'obésité chez l'homme et le rongeur (Tschop *et al.*, 2001; Batterham *et al.*, 2003; Gueugnon *et al.*, 2012) (Ariyasu *et al.*, 2002). De même, la consommation chronique d'un régime obesogène induit une diminution de l'expression et de la sécrétion de ghréline quel que soit l'état nutritionnel (à jeun ou nourri) (Lee *et al.*, 1996; Beck *et al.*, 2002; Moesgaard *et al.*, 2004; Briggs *et al.*, 2010; Naznin *et al.*, 2015). Les expressions génique et protéique de son récepteur GHSR sont également diminuées dans l'hypothalamus et les VANs (Briggs *et al.*, 2010; Naznin *et al.*, 2015).

Les mécanismes expliquant cette réduction de ghréline plasmatique ne sont pas totalement connus mais semblent impliquer la leptine et l'insuline malgré des résultats contradictoires selon les études. En effet, Kamegai et collaborateurs ont montré que la leptine ou l'insuline infusées sur un estomac de rat sain isolé diminuait la production de ghréline (Kamegai et al., 2004). A l'inverse, des injections i.p. d'insuline ou de leptine augmentent les niveaux protéiques de ghréline dans l'estomac de rats normopondérés (Toshinai et al., 2001). In vitro, sur des cultures primaires de nerf vague, Kentish et collaborateurs ont montré qu'une infusion de leptine induisait une augmentation de l'expression de GHSR chez des animaux sains et une diminution de GHSR chez des animaux DIO (Kentish et al., 2013). De même, la ghréline effectue soit un rétrocontrôle négatif sur l'expression de son récepteur chez des animaux sains soit un rétrocontrôle positif chez des animaux DIO alors qu'ils présentaient une ghrélinémie normale (Kentish et al., 2013). Enfin, Qi et collaborateurs ont utilisé des rats nourris avec un régime obesogène traités ou non avec l'hormone thyroïdienne T3, connue pour limiter l'adiposité induite par le régime (Qi et al., 2008). Ils ont montré que les animaux traités présentaient une adiposité et une leptinémie diminuées par rapport aux animaux non traités. En revanche, la ghrélinémie à jeun était diminuée chez les deux groupes de rats suggérant que la réduction de la ghrélinémie observée lors de l'obésité ne serait pas due à une adiposité et/ou une leptinémie élevées (Qi et al., 2008). Bien qu'une diminution de la ghrélinémie lors de l'obésité soit retrouvée dans la majorité des études, les mécanismes impliqués restent incompris.

Briggs et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence une résistance à la ghréline dans l'hypothalamus de souris nourries avec un régime obesogène (à 24% de lipides) pendant 12 semaines. En effet, chez ces souris DIO, des injections i.p. et i.c.v. de ghréline n'induisaient pas d'augmentation des expressions d'AgRP/NPY, neuropeptides hypothalamiques orexigènes. Par conséquent, la ghréline n'était plus capable de stimuler la PA (Briggs *et al.*, 2010). Dans un deuxième article, les auteurs ont confirmé ces résultats et montré qu'un régime restrictif pouvait restaurer la sensibilité à la ghréline (Briggs *et al.*, 2013). Récemment, Naznin et collaborateurs ont montré que cette perte de sensibilité à la ghréline serait localisée également au niveau vagal, mécanisme développé dans la section 5.4.2 de ce chapitre (Naznin *et al.*, 2015). Cependant, cette perte de sensibilité à la ghréline n'est pas retrouvée chez l'homme puisque la ghréline diminue toujours la PA chez des personnes souffrant d'une obésité modérée (moyenne IMC=31.9kg/m<sup>2</sup>) (Druce *et al.*, 2005).

	CCK Tissus Réf		s les cellules L Intestin énats de tissus grêle	génats de tissu Gros intestin (Kıchards <i>et al.</i> , 2016)	uement dans les Intestin (Richards <i>et al.</i> , 2016) grêle		otéines ?? (Duca <i>et al.</i> , 2013) arés aux OB-R	DB-R comparé aux     Plasma       égime standard     (Duca <i>et al.</i> , 2013)	tux rats OB-R et Plasma (Li <i>et al.</i> , 2011)		Plasma (Boyd <i>et al.</i> , 2003)	Plasma (Little <i>et al.</i> , 2008)		Plasma Woelnerhanssen <i>et al.</i> , 2016)
	Effet sur la	SOURIS	<ul> <li>↔ CCK spécifique dan</li> <li>↔ mRNA dans homog</li> </ul>	↔ mRNA dans homog ↓ CCK spécifique dans	↓ CCK protéine spécifiq cellules I	RATS	↓ mRNA et pr chez rats OB-P comp	↓ CCK production chez C OB-P nourris avec un 1	↑ chez OB-P comparé a CTL	HOMMES SAINS	↔ CCK	↑ CCK	HOMMES OBESES	
	Etat nutritionnel			A Jeun ou nourri ?	A jeun ou nourri ?		Gavage avec solution riche lipides et sucres	Gavage avec une solution riche en lipides	Gavage avec gel carboxyl- methylcellulose		A jeun	A jeun		A jeun
	Durée régime			2 sem	16 sem		3 sem	4 sem	8 sem		14 jours	21 jours		0 kg/m²) =21.7
	WD % lip			60%	60%		31 %	45 %	45 %		42 %	44 %		moyen =4 MI moyen
Régime	CTL % lip	lip 11 %		11 %	11 %		ί	10%	12 %		11 %	9%6		ses (BMI 1 ndérés (Bl ko/m²
	Modèle		Souris	C57blck6	Souris C57blck6		Rats SD	Rats SD	Rats SD		Hommes sains	Hommes sains		Hommes obè et normopo

Tableau 13 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la sécrétion de CCK chez l'animal et l'homme.

 $\uparrow / \downarrow / \leftrightarrow$  augmenté, diminué ou sans effet, respectivement. % de lip :% de lipides de l'énergie totale du régime. SD : Sprague-Dawley OB-P : Obese-prone OB-R : obèses résistant

### 4.2. Cholécystokinine

La consommation d'un régime hyperlipidique modifie la sécrétion intestinale de CCK et l'expression génique de son récepteur majoritaire, mais les résultats des études chez l'animal et chez l'homme sont contradictoires. (Tableau 13).

L'expression du principal récepteur à la CCK, CCK-1R au niveau du ganglion noueux est également modifiée par la consommation d'un régime obesogène. Comme pour la production de CCK, les résultats des études ne sont pas homogènes quant à son augmentation ou sa diminution (Tableau 14).

Enfin, comme pour la ghréline, les études chez l'animal montre que la consommation chronique d'un régime obesogène induit une perte de sensibilité à la CCK notamment au niveau du nerf vague (de Lartigue *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2013; Duca *et al.*, 2013). Chez les animaux DIO, une plus forte dose de CCK est nécessaire pour inhiber la PA comparée à des animaux contrôles (de Lartigue *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2013). De même, chez des rats obèses Zucker, la CCK n'est plus capable d'inhiber la PA (de Lartigue *et al.*, 2012). Les mécanismes de cette perte de sensibilité à la CCK au niveau du ganglion noueux seront développés dans la section 5.4.2 de ce chapitre.

#### 4.3. Peptide YY

Une fois de plus, **les études sur l'impact de l'obésité ou de la consommation d'un régime obesogène sur la production de PYY montrent des résultats divergents** (Tableau 15-16). Alors que certaines études montrent une augmentation de sa production, d'autres ne décrivent aucun effet ou une diminution.

## 4.4. Polypeptide pancréatique

Les études chez l'homme concernant les variations de taux circulant de PP lors de l'obésité montrent des résultats divergents. Plusieurs études ne décrivent aucune différence entre des personnes maigres et obèses (Pieramico *et al.*, 1990; Wisen *et al.*, 1992) alors que d'autres montrent une diminution des taux plasmatiques à jeun de PP chez les patients obèses (Lassmann *et al.*, 1980; Marco *et al.*, 1980; Glaser *et al.*, 1988). Une étude plus récente de 2006 montre que des enfants obèses ont des taux plasmatiques à jeun de PP significativement plus bas que les enfants normo-pondérés (Reinehr *et al.*, 2006). Par analyse de régression linéaire, les concentrations de PP étaient négativement corrélées à l'IMC (Reinehr *et al.*, 2006).

	Régime											
Modèle	CTL WD Durée % lip % lip		Etat nutritionnel Effets sur le récepteur à la CCK		Tissus	Réf						
SOURIS												
Souris BalBc	$\frac{15}{c}$ 16 % 30% $\frac{15}{jours}$ A jeun				↓ CCK 1R chez HFD comparé aux CTL	Ganglion noueux	(Nefti <i>et al.</i> , 2009)					
Souris C57B16	45 %	45 % 10 % 20 sem		?	$\leftrightarrow$	Hypo- thalamus	(Montgomery <i>et al.</i> , 2013)					
	RATS											
Rats SD	10 % 45% 8 sem		Gavage avec une émulsion de lipides	age avec une lsion de pides CCK 1R chez DIO-P comparés aux CTL et DIO-R		(Paulino <i>et</i> <i>al.</i> , 2009)						
Rats SD	45 %	10 %	4 sem	?	↓CCK 1R chez OP-HF comparé aux OP nourris avec un régime standard	Ganglion noueux	(Duca <i>et al.</i> , 2013)					
RATS GENETIQUEMENT OBESES												
Rats Zucker Régime standard				?	↑ CCK 1R chez Zucker <i>vs</i> lean	Hypo- thalamus	(Hays <i>et al</i> ., 1981)					

# Tableau 14 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène et de l'obésité sur l'expression génique de CCK1R chez l'animal.

 $\uparrow/\downarrow/\leftrightarrow augmenté, diminué ou sans effet, respectivement.$ % de lip :% de lipides de l'énergie totale du régime. SD : Sprague-Dawley OB-P : Obese-prone. OB-R : obèses résistant

#### 4.5. Dérivés du pré-pro-glucagon

Les résultats chez l'homme comme chez l'animal concernant les effets de l'obésité sur la synthèse de GLP-1 sont contradictoires. Certains travaux montrent que la production endogène de GLP-1 est atténuée (Verdich *et al.*, 2001; Lugari *et al.*, 2004; Adam *et al.*, 2005) alors que d'autres études ne décrivent aucune différence entre les personnes obèses et normo-pondérées (Feinle *et al.*, 2002; Vilsboll *et al.*, 2003). Chez l'animal, les souris obèses ob/ob présentent le même nombre de cellules à GLP-1 que les souris WT (Aranias *et al.*, 2015). Au contraire, des souris nourries avec un régime obesogène (34% de lipides) pendant 8 semaines montrent une augmentation du nombre de cellules et de la sécrétion de GLP-1(Aranias *et al.*, 2015). Dans une cohorte de patients obèses, les personnes consommant majoritairement une nourriture grasse (40% de l'énergie totale de la journée provenant des lipides) présentent un plus grand nombre de cellules à GLP-1 que les personnes consommant moins de lipides (27 % de lipides) (Aranias *et al.*, 2015). Plutôt que l'obésité, la consommation d'un régime hyperlipidique pourrait être donc à l'origine de l'augmentation de la production de GLP-1.

# 4.6. Leptine et résistance à la leptine

Les découvertes sur la leptine ont apporté de grands espoirs à la communauté scientifique pour traiter efficacement l'obésité. Cependant, bien que les personnes déficientes en leptine soient extrêmement obèses, la plupart des personnes obèses présentent des taux de leptine très élevés (Mantzoros et al., 2000). En effet, l'obésité est associée à une surexpression du gène de la leptine au niveau du tissu adipeux (Lonnqvist et al., 1995) conduisant à une élévation du taux circulant de leptine (Considine et al., 1996; van Dielen et al., 2001; Al Maskari et al., 2006; Monti et al., 2006). Par ailleurs, la leptine gastrique est également augmentée lors de l'obésité chez l'homme et chez l'animal DIO (Le Bevec et al., 2014). De plus, chez l'animal DIO, l'élévation de la production de leptine gastrique précède celle de leptine adipocytaire puisqu'elle apparait dès la première semaine de régime contre 4 semaines pour la leptine adipocytaire (Le Beyec et al., 2014). Ainsi, la concentration plasmatique de leptine est proportionnelle à l'IMC ainsi qu'au pourcentage de masse grasse (Considine et al., 1996; van Dielen et al., 2001; Al Maskari et al., 2006; Monti et al., 2006). Des injections exogènes de leptine chez des animaux ou personnes déficientes en leptine réduisent significativement la PA et le poids (Farooqi et al., 1999). En revanche, lors d'une obésité induite par un régime obésogène, la leptine exogène ne provoque aucune diminution de la PA ni de perte de poids (Mantzoros et al., 2000). Ces résultats suggèrent donc une résistance à la leptine dont les mécanismes ne sont pas encore totalement expliqués.

Réf		(Aranias et al., 2015)		(Batterham <i>et al.</i> , 2003)	(Gueugnon et al., 2012)	(Ukkola <i>et al.</i> , 2011)	(Kim et al., 2005)	(Kim <i>et al.</i> , 2005)	(le Roux <i>et al.</i> , 2006)	(Cahill <i>et al.</i> , 2014)	(Pfluger et al., 2007)	(Federico et al., 2016)	(Major <i>et al.</i> , 2015)
Tissus		Côlon		Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Sérum	Plasma	Plasma	Sérum
Effet sur la sécrétion de PYY	<b>DURIS GENETIQUEMENT OBESES</b>	densité de cellules positives à PYY	HOMMES	$\rightarrow$	$\rightarrow$	↑ chez les patients diabétiques	Pas de corrélation entre concentration de PYY et IMC	↔ Sécrétion de PYY	↓ PYY à jeun chez obèses vs NP ↓ de la sécrétion de PYY en postprandial chez obèses vs NP	Pas de corrélation entre concentration de PYY et IMC	Pas de corrélation entre IMC et concentration de PYY Pas de différence entre les personnes obèses et NP ↓ niveaux plasmatiques de PYY après une perte de poids (ΔBMI, -1.9 kg/m2)	Concentration PYY chez obèses vs normo-pondéraux     î concentration PYY chez obèses après chirurgie vs     avant chirurgie	1 Obèses après chirurgie vs avant chirurgie
Etat nutritionnel	S	i		A jeun	A jeun		A jeun	Après une solution de glucose	A jeun 90 min après un repas à 2000-kcal (72% lip)	A jeun	A jeun	ć	A jeun
IMC		uvages		29 kg/m² 27.3 kg/m²	35.6 kg/m² 21.7 kg/m²	MCV+DBT MCV DBT	$28.4 \text{ kg/m}^2$	>30 kg/m² <25 kg/m²	40.3 kg/m² 21.7 kg/m²	$26.8 \text{ kg/m}^2$	32.7 kg/m² 48.4 kg/m² 22.1 kg/m²	obèses (après riatrique) NP	obèses avant gie
Cohorte		Souris Ob/Ob et sa		12 personnes obèses 12 personnes NP	22 personnes obèses 15 personnes NP	428 patients 440 patients	151 personnes saines	19 personnes obèses 19 personnes NP	20 personnes obèses 20 personnes NP	2094 personnes	66 personnes obèses 16 personnes obésité sévère 66 personnes NP	28 personnes sévèrement et avant chirurgie ba 28 personnes l	28 personnes sévèrement et après chirur,

Tableau 15 : Etudes montrant l'impact de l'obésité la production de PYY chez l'homme et l'animal

 $\uparrow / \downarrow / \leftrightarrow$  augmenté, diminué ou sans effet, respectivement.

<u>NP : Normo-pondérés</u>

Les études chez l'animal et notamment les travaux de Lin et collaborateurs ont permis de démontrer ce phénomène et d'en évaluer la chronologie (Lin *et al.*, 2000). Les auteurs ont soumis des souris à un régime obesogène ou standard pendant 1, 8 ou 12 semaines et ont étudié les effets d'injections périphériques et centrales de leptine sur la PA et le poids de ces animaux (Lin *et al.*, 2000). Après 1 semaine de régime, tous les animaux réduisaient leur PA suite à une injection intra-péritonéale de leptine. Après 8 semaines de régime, les souris HFD développaient une résistance à une injection périphérique de leptine, tout en restant sensible à la leptine centrale (Lin *et al.*, 2000). Enfin, après 19 semaines, ces souris développaient également une résistance à une injection de leptine au niveau central (Lin *et al.*, 2000).

Plusieurs hypothèses décrivant les mécanismes impliqués dans la résistance à la leptine ont déjà été formulées : une BHE défective empêchant la leptine d'atteindre ses récepteurs centraux et d'inhiber la PA.

Le passage de la leptine est un phénomène actif, saturable et unidirectionnel qui semble dépendre d'un transporteur spécifique : le récepteur Ob-Ra (Gonzalez-Carter *et al.*, 2016), bien que certains auteurs suggèrent l'existence d'autres transporteurs (Gonzalez-Carter *et al.*, 2016). Il a été montré que le passage de la leptine à travers la BHE était diminué de moitié chez les animaux obèses soit génétiquement ou par la consommation de régime hyperlipidique (Burguera *et al.*, 2000). Chez l'homme, ce transport est évalué par la mesure du ratio concentration de leptine dans le liquide céphalo-rachidien / concentration plasmatique de leptine. Comme montré chez l'animal, le ratio est diminué chez les personnes obèses comparés à des personnes normo-pondérées (Caro *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1996). La majorité des actions de la leptine s'exerçant au niveau central, une réduction de son transport à travers la BHE pourrait être à l'origine de la perte de sensibilité à la leptine observée lors de l'obésité.

De plus, la résistance à la leptine peut également résulter d'une désensibilisation voire une inhibition de la cascade de signalisation de la leptine. En effet, la leptine exerce son pouvoir anorexigène via l'interaction avec son récepteur Ob-Rb. Ainsi une baisse de l'expression de ce récepteur pourrait résulter en une réduction de l'activité de la leptine. Plusieurs études décrivent une diminution de l'expression génique d'Ob-Rb au niveau hypothalamique lors de la consommation d'un régime obesogène (Wilsey *et al.*, 2003; Wilsey *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). De plus, une corrélation négative a été trouvée entre la concentration plasmatique de leptine et l'expression d'Ob-Rb (Liu *et al.*, 2007). Par ailleurs, in vitro, la leptine exercerait un rétrocontrôle négatif sur l'expression de son récepteur au niveau du ganglion noueux (Kentish *et al.*, 2013). Ainsi, l'hyperleptinémie observée lors de l'obésité pourrait être à l'origine de la réduction de l'expression d'Ob-Rb. Cependant, en parallèle d'une diminution d'ObR, deux études ont décrit une augmentation de la signalisation de la leptine suggérant des mécanismes plus complexes (Wilsey et al., 2003; Wilsey et al., 2003; Wilsey et al., 2004).

	Réf		(Aranias <i>et al.</i> , 2015)	(Chandarana <i>et al.</i> , 2011)			(le Roux <i>et al.</i> , 2006)		(Li <i>et al.</i> , 2011)	(Yang <i>et al.</i> , 2005)		(Little et al., 2008)	
	Tissu		Côlon	Plasma	Côlon	Plasma	Colon		Plasma	Plasma		Plasma	
	Effet sur PYY	SOURIS	<ul> <li>↔ niveau d'ARNm</li> <li>↔ densité de cellules positives à PYY à 2 et 8 sem</li> </ul>	<ul> <li>↓ de PYY dès 8 semaines</li> <li>↓ Restauration des taux de PYY après perte de poids</li> <li>(par Bypass gastrique ou restriction calorique)</li> </ul>	$\leftrightarrow$ niveau d'ARNm entre les groupes	↓ de PYY chez DIO vs CTL	↑ niveau protéique de PYY ↔ niveau d'ARNm	RATS	$\leftrightarrow$ entre CTL, DIO et DR	↑ chez DIO-R vs DIO-P et CTL $\leftrightarrow$ Niveau plasmatique entre DIO-P et CLT	HOMMES	↔ Niveau plasmatique	
	Etat nutritionnel		ė	A jeun			A jeun et nourri		Gavage avec gel carboxyl- methylcellulose	6		A jeun	
	Durée régime		2, 8 sem	4,8,12, 16 sem			16 sem		8 sem	15 sem		21 jours	
Régime	WD % lip		4.2 %	10 %			2.6 %		12 %			6%	
	CTL % lip		34 %	45 %			% 09		45 %			44 %	
	Modèle		Souris C567B6	Souris C567B6		Souris	C567B6		Rats SD	Rats SD		Hommes sains	

Tableau 16 : Etudes montrant l'impact de la consommation d'un régime obésogène sur la sécrétion de PYY chez l'animal et l'homme.

 $\uparrow / \downarrow / \leftrightarrow$  augmenté, diminué ou sans effet, respectivement.

<u>% de lip</u> :% de lipides de l'énergie totale du régime. <u>SD :</u> Sprague-Dawley <u>OB-P</u> : Obese-prone. <u>OB-R :</u> obèses résistant.

Enfin, le dernier mécanisme proposé pour induire une résistance à la leptine est le défaut de signalisation de la leptine. Dans un modèle murin de DIO, El Haschimi et collaborateurs ont été les premiers à décrire une perte de signalisation de la leptine au niveau de l'hypothalamus. Après 4 semaines de régime obesogène, l'activation hypothalamique de STAT3 en réponse à une injection i.p. de leptine était comparable entre les animaux DIO et contrôles. En revanche après 15 semaines, la leptine n'entrainait plus d'activation hypothalamique de STAT3 qu'elle soit injectée de façon périphérique ou centrale. Ces résultats montrent donc que la réduction de l'activité anorexigène de la leptine observée lors de l'obésité pourrait également être due à une perte de la signalisation intracellulaire (El-Haschimi et al., 2000). Deux molécules ont été identifiées comme les principaux inhibiteurs de la signalisation de la leptine : SOCS3 et PTP1b. La perte de signalisation de la leptine pourrait donc être liée à une surexpression de ces molécules. En effet, il a été montré que l'expression protéique de SOCS3 était augmentée au niveau de l'ARC de souris génétiquement obèses (Bjorbaek et al., 1998) et DIO (Munzberg et al., 2004). De plus, une délétion neuronale de SOCS3 prévient d'une obésité induite par un régime HFD et une délétion de SOCS3 dans toutes les cellules exprimant Ob-R restaure la sensibilité à la leptine au niveau hypothalamique (Pedroso et al., 2014). De même, une délétion de PTP1b protège les souris d'une obésité et d'une résistance à la leptine induite par la consommation d'un régime obesogène (Elchebly et al., 1999).

Enfin, cette perturbation de la signalisation de la leptine a également été décrite au niveau du ganglion noueux, qui sera décrit dans la section 5.4.2.

# 5. Rôle spécifique du nerf vague dans la régulation de la prise alimentaire

# 5.1. Anatomie et physiologie du nerf vague

Le nerf vague (Nerf X, pneumogastrique) est la voie majeure de communication bidirectionnelle entre le SNC et les organes périphériques (Figure 10). L'axone distal du nerf vague innerve les organes viscéraux tandis que l'axone proximal établit une synapse avec le NTS. Le nerf vague est un nerf mixte possédant à la fois des fibres afférentes (sensitives) et efférentes (moteur). Les fibres afférentes, majoritaires à 80 %, véhiculent les informations du tube digestif jusqu'au SNC. Elles sont impliquées dans la perception de signaux mécaniques, chimiques, osmotiques, thermiques et probablement nociceptifs (Berthoud *et al.*, 2000). Les corps cellulaires des fibres afférentes se regroupent au niveau de deux ganglions situés en dessous de la base du crâne : le ganglion jugulaire et le ganglion plexiforme, plus volumineux. L'utilisation de techniques de traçages neuro-anatomiques a pu montrer que les nerfs vagues gauche et droit décrivent le même trajet jusqu'à atteindre l'abdomen puis se divisent en plusieurs branches innervant différents organes. Les nerfs vagues gauche (ventral) et droit (dorsal) innervent tous les deux l'estomac et le duodénum proximal. Puis le nerf ventral innerve le foie



Figure 10 : Anatomie et organes innervés par le nerf vague

tandis que le nerf dorsal innerve principalement la partie distale du tube digestif (Berthoud *et al.*, 2000). Les afférences vagales se terminent au niveau du SNC, plus particulièrement dans le NTS dont les neurones projettent ensuite, entre autres, vers l'hypothalamus ou le système limbique. Plusieurs études ont montré que le principal neurotransmetteur transmettant l'information des VANs vers les neurones du NTS était le glutamate agissant *via* son récepteur N-méthyl-D-aspartate (NDMA) (de Lartigue, 2014). En effet, 60 % des corps cellulaires du ganglion noueux sont immuno-réactifs au glutamate, tout comme les axones projetant vers le NTS (Saha *et al.*, 1995).

Les fibres efférentes représentent 20 % des fibres totales du nerf vague. A l'inverse des fibres afférentes, elles sont impliquées dans les fonctions motrices et relayent les signaux du SNC aux organes viscéraux. Les neurones vagaux moteurs sont localisés au niveau de deux noyaux : le noyau ambigu et le noyau dorsal moteur à l'origine du reflexe vago-vagal.

La multitude d'information provenant des organes périphériques perçue par le nerf vague font de lui un acteur majeur dans de nombreuses fonctions telles que le contrôle des rythmes cardiaque et respiratoire, de la satiation, des fonctions digestives ou de l'inflammation (Berthoud *et al.*, 2000).

### 5.2. Neuropeptides et nerf vague

Le ganglion noueux synthétise de nombreux neuropeptides tels que le glutamate, l'acétylcholine ou la dopamine dont les réponses physiologiques ne sont pas encore toutes élucidées. Parmi ces neuropeptides, deux semblent particulièrement impliqués dans la régulation de la prise alimentaire : CART et MCH.

CART est présent dans environ la moitié des neurones du ganglion noueux et peut être transporté le long du nerf vague (de Lartigue, 2014). Des fibres neuronales CART positives sont également retrouvées au niveau du NTS (Zheng *et al.*, 2002). Cependant, aucun récepteur pour CART n'ayant été identifié, les mécanismes par lesquels CART agit sur le NTS restent imprécis. Il a été suggéré que CART pourrait agir au niveau postsynaptique sur les neurones du NTS en activant les récepteurs NMDA, les rendant sensibles au glutamate conduisant ainsi à la dépolarisation des neurones du NTS (de Lartigue, 2014).

A l'état à jeun, le peptide MCH est synthétisé par le ganglion noueux et libéré au niveau du NTS (de Lartigue, 2014). MCH pourrait diminuer la PA *via* des actions en pré et post-synaptique (de Lartigue, 2014). En pré-synaptique, MCH inhibe la libération de glutamate (Zheng *et al.*, 2005). MCH pourrait également agir en inhibant l'activation des récepteurs NMDA diminuant ainsi la dépolarisation des neurones post synaptiques du NTS, *via* l'activation de ses récepteurs exprimés sur les membranes post-synaptiques (de Lartigue, 2014).

Hormones	Récepteurs	Références
ССК	CCK-1R	(Donovan <i>et al.,</i> 2007; Paulino <i>et al.,</i> 2009)
ΡΥΥ	Y2R	(Koda <i>et al.,</i> 2005)
РР	Y4R ?	?
GLP-1	GLP-1R	(Ronveaux <i>et al.,</i> 2014)
МСН	MCHR	(Burdyga <i>et al.,</i> 2006)
Leptine	Ob-Ra Rb and Re	(Paulino <i>et al.,</i> 2009)
Orexine A	Orex-1R	(Burdyga <i>et al.,</i> 2003)
Ghréline	GHSR	(Naznin <i>et al.,</i> 2015)
Cannabinoïdes	CB1R	(Cluny <i>et al.,</i> 2013)

Tableau 17 : Principaux récepteurs exprimés sur le nerf vague

### 5.3. Implication du nerf vague dans le contrôle de la prise alimentaire

Le rôle majeur du nerf vague dans le contrôle de la PA a été mis en évidence grâce aux techniques de vagotomie. En effet, une déafférentation subdiaphragmique, c'est-à-dire une section ciblant l'intégralité des fibres afférentes du vague, atténue les effets anorexigènes d'hormones intestinales telles que la CCK (Smith *et al.*, 1985; Moran *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2011), le PYY (Koda *et al.*, 2005) ou le PP (Kojima *et al.*, 2007).

Au niveau de l'estomac, les VANs expriment des récepteurs méchanosensibles (Zagorodnyuk *et al.*, 2001) qui répondent à la tension de l'estomac en envoyant des signaux de satiété au SNC (Phillips *et al.*, 1998; Zagorodnyuk *et al.*, 2001). De plus, les VANs sont proches des EECs de l'estomac qui libèrent des hormones telles que la ghréline ou la leptine pouvant agir directement sur leurs récepteurs exprimés sur le nerf vague (de Lartigue, 2016). La ghréline, hormone orexigène réduit, *via* son récepteur GHSR, la réponse des récepteurs méchanosensibles des VANs limitant ainsi les signaux de la satiété (Kentish *et al.*, 2012). Au niveau intestinal, on retrouve ces mêmes fibres afférentes méchanosensibles qui coordonnent la motricité intestinale (de Lartigue, 2016).

Les VANs innervant les cryptes et villosités du duodénum proximal sont très proches des EECs et des hormones qu'elles synthétisent en réponse à la présence de nutriments dans la lumière intestinale (Berthoud *et al.*, 2000). Les récepteurs de ces hormones sont exprimés à la surface des VANs (Burdyga *et al.*, 2002; Burdyga *et al.*, 2008; Paulino *et al.*, 2008; Duca *et al.*, 2013) (Tableau 17). En fonction des nutriments dans la lumière, les EECs vont adapter leur sécrétion hormonale et ainsi moduler l'activité des VANs et donc les signaux envoyés au SNC.

#### 5.3.1. Plasticité des VANs en fonction du statut nutritionnel

En fonction du statut nutritionnel, les VANs peuvent présenter deux phénotypes neurochimiques différents : orexigène ou anorexigène. Dans un état à jeun, les expressions des récepteurs aux peptides orexigènes vont augmenter et ceux de peptides anorexigènes diminuer. Le phénomène inverse se produit à l'état nourri (Dockray *et al.*, 2011).

La CCK est l'hormone clé qui permet le changement de phénotype des VANs. Suite à une injection de CCK, les VANs présentent un phénotype anorexigène et l'administration d'un antagoniste de CCK1R bloque les VANs dans un phénotype orexigène (Dockray, 2014). Dans un état à jeun, les taux de CCK sont bas, les expressions de MCH, MCH-1R, Orexine-1R, GHSR et Cannabinoid-1R sont augmentées (de Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2010). Dans un état nourri, la production de CCK est stimulée conduisant à l'augmentation des expressions de Y2R et CART et une répression de celles des récepteurs aux peptides orexigènes (de Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2007; Burdyga *et al.*, 2008; De Lartigue *et al.*, 2010).

# **ETAT OREXIGENE**



Figure 11 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la plasticité du nerf vague suivant l'état suivant l'état nutritionnel.

*OX-R1* : Orexin Receptor 1 / CB1R : Cannabinoid Receptor 1 / MCH : Melanocortin hormone MCH : Melanocortin hormone receptor / CART : Cocaïne-Amphetamine Regulated Transcript CREB: C-AMP Response Element-binding protein / EGR : Early Growth Response Protein 1 Y2R : PYY Receptor 2 / CCK : cholécystokinine Grâce à l'utilisation de cultures primaires de ganglion noueux, il a été montré que l'effet satiétogène de la CCK était médié par CART (de Lartigue et al., 2010). La CCK stimule la synthèse de CART qui a son tour va augmenter les expressions de Y2R et CART via un mécanisme impliquant deux facteurs de transcription C-AMP Response Element-binding protein (CREB) et Early Growth Response Protein 1 (EGR-1) (Burdyga et al., 2008; De Lartigue et al., 2010; de Lartigue et al., 2010). Plus précisément, CART induirait une délocalisation d'EGR-1 du cytoplasme vers le noyau et l'ADN (de Lartigue et al., 2010). De plus, la délocalisation d'EGR-1 nécessite des concentrations supraphysiologiques de CCK (10 nM) alors que co-infusée avec la leptine, la CCK, à seulement 1 nM, induit ces mêmes effets (de Lartigue et al., 2010). En effet, la leptine, via la phosphorylation de STAT3, induit une augmentation de l'expression d'EGR-1 qui augmente la quantité de ce dernier dans le cytoplasme, élevant ainsi le pool d'EGR-1 disponible (de Lartigue et al., 2010). A l'inverse, la ghréline va inhiber l'action de CART sur CART et Y2R. Elle limite le pool nucléaire de CREB (de Lartigue et al., 2007) et diminue la phosphorylation de STAT3 réduisant ainsi le pool d'EGR-1 disponible (de Lartigue et al., 2010). L'ensemble de ces processus sont schématisés en figure 11. Les mécanismes précis régulant la diminution des récepteurs aux peptides orexigènes via CCK ne sont pas encore connus.

Enfin, les VANs expriment de nombreux récepteurs aux hormones gastro-intestinales autres que le CCK-1R. Il a été montré que le GLP-1 agit directement sur son récepteur GLP-1R, exprimé au niveau des VANs uniquement à l'état nourri, pour diminuer la PA (Ronveaux *et al.*, 2014). De même, PP et PYY induisent une décharge calcique au niveau du VANs (Iwasaki *et al.*, 2013). Cependant, les mécanismes précis d'action ne sont pas encore connus.

Par ailleurs, grâce à un modèle original de souris KO pour le récepteur à la leptine spécifiquement au niveau des VANs, de Lartigue et collaborateurs ont confirmé l'importance de la leptine dans l'inhibition de la PA par les VANs (de Lartigue *et al.*, 2014). Ces animaux, nourris avec un régime standard, prenaient plus de poids et d'adiposité que les animaux sauvages (de Lartigue *et al.*, 2014). Ils présentaient également une hyperphagie due principalement à une augmentation de la taille des repas durant la nuit (de Lartigue *et al.*, 2014). Ces résultats montrent qu'une modification de la signalisation de la leptine au niveau des VANs peut être suffisante pour induire des changements phénotypiques à plus long terme.

# 5.4. Dysfonctionnement des VANs lors de l'obésité

Les VANs sont essentiels au contrôle de la PA à court terme. De ce fait, l'altération du comportement alimentaire chez les personnes obèses pourrait être une conséquence d'un dysfonctionnement de la physiologie des VANs.

#### 5.4.1. Diminution de la sensibilité aux signaux mécaniques

La sensibilité à des stimuli mécaniques i.e. la distension de l'estomac et de l'intestin est diminuée chez les animaux ayant été nourris avec un régime obesogène (Daly *et al.*, 2011; Kentish *et al.*, 2012). Ainsi, les signaux de satiété arrivant au SNC sont réduits, induisant la consommation de repas plus larges. Les mécanismes conduisant à cette perte de sensibilité mécanique ne sont pas totalement connus mais semblent impliquer le récepteur transient receptor potential vanilloide 1, également impliqué dans les phénomènes de nociception (Kentish *et al.*, 2015).

De plus, la leptine potentialise les récepteurs intestinaux méchanosensibles (Gaige *et al.*, 2004), ainsi une perte de sensibilité de la leptine (Cf section suivante) diminuerait également les signaux de distension vers le SNC.

#### 5.4.2. Résistance aux hormones intestinales

Lors de l'obésité, tout comme au niveau hypothalamique (Sainz *et al.*, 2015), les VANs pourraient devenir résistants aux actions de la leptine (de Lartigue *et al.*, 2012) et de la ghréline (Naznin *et al.*, 2015).

La résistance à la leptine est caractérisée, dans les VANs, par l'augmentation de l'expression de SOCS3, le principal inhibiteur de la signalisation de la leptine, associée à une diminution de la phosphorylation de STAT3 en réponse à la leptine, conduisant ainsi à une baisse de l'action biologique de la leptine (de Lartigue *et al.*, 2011; de Lartigue *et al.*, 2012). Cette dérégulation de la signalisation à la leptine a été observée à la fois chez des animaux génétiquement obèses (de Lartigue *et al.*, 2012) mais également chez des rats DIO (de Lartigue *et al.*, 2011). La leptine étant essentielle pour potentialiser la synthèse de CART par la CCK, les VANs d'animaux obèses ne seraient donc plus capables d'inhiber leur PA en réponse à des doses physiologiques de CCK (de Lartigue, 2016). En effet, comparés à des animaux standards, les animaux DIO ne réduisent plus leur PA suite à une faible dose de CCK. Une dose plus importante est alors nécessaire pour induire une réponse (Swartz *et al.*, 2010; Daly *et al.*, 2011; de Lartigue *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2013). Ainsi, l'activité excitatrice des VANs (Daly *et al.*, 2011) ainsi que l'activation neuronale du NTS (Covasa *et al.*, 2000) en réponse à la CCK sont réduits chez des animaux DIO. En conséquence, les VANs d'animaux obèses perdraient leur plasticité. Même à l'état nourri, le phénotype des VANs reste bloqué dans un état orexigène, caractérisé par une augmentation des récepteurs orexigènes et une réduction des récepteurs



# Figure 12 : Hypothèse d'altération de la physiologie du nerf vague lors de l'obésité

La cholécystokinine (CCK) ou la prise alimentaire (PA) diminue l'expression du récepteur aux cannabinoïdes (CBR), de la mélanocortine hormone (MCH) et de son récpteur MCH1R. La CCK augmente l'expression de Cocaïne-amphétamine regulated transcript (CART) et du récepteur de PYY (Y2R). Ainsi, le phénotype des neurones afférents du vague est dans un état «anorexigène », envoyant des signaux de satiété au SNC. Ce phénomène est dépendant de la CCK, potentialisé par la leptine et inhibé par la ghréline.

Lors de l'obésité, il a été suggéré que ce mécanisme était altéré. A cause d'une résistance à la leptine, les neurones afférents du vague restent bloqués dans un état orexigène caractérisé par une augmentation de CB1R, MCH1R et MCH conduisant alors à une augmentation continue de la PA.

De (de Lartigue et al, 2011)

anorexigènes (Paulino *et al.*, 2008; de Lartigue *et al.*, 2012). Cette perte de plasticité des VANs pourrait être à l'origine de l'hyperphagie observée lors de la consommation d'un régime obsesogène (Figure 12).

L'action orexigène de la ghréline sur les VANs et la présence d'une résistance à la ghréline au niveau des VANs n'est pas reconnue au sein de la communauté scientifique. Une étude récente a montré que la ghréline n'induisait plus de décharge nerveuse vagale et que l'activation de l'ARC en réponse à l'injection de ghréline, mesurée par l'expression de Fos, était diminuée chez des animaux DIO (Naznin *et al.*, 2015). Les auteurs suggèrent que la perte de sensibilité à la ghréline serait majoritairement due à la réduction de l'expression de GHSR au niveau hypothalamique et vagal (Naznin *et al.*, 2015). A l'inverse, Kentish et collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime obesogène améliorerait l'action inhibitrice de la ghréline sur les VANs (Kentish *et al.*, 2012). Avec une activité inhibitrice augmentée, la ghréline serait ainsi plus active pour inhiber la phosphorylation de STAT3 et réduire la synthèse de CART. De même, elle renforcerait l'inhibition sur les tensiorécepteurs de l'estomac, diminuant les signaux de distension envoyés au SNC (Kentish *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces résultats montrent l'importance des dysfonctions du nerf dans les altérations du comportement alimentaire chez l'obèse. Cependant, les mécanismes précis conduisant à ces dérégulations ne sont pas totalement élucidés.

# 5.4.3. Quels sont les facteurs pouvant modifier la physiologie des VANs lors de l'obésité ?

L'obésité est caractérisée par une élévation du taux plasmatique de plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI) (De Taeye *et al.*, 2005). Cette protéine, majoritairement impliquée dans les phénomènes de thrombose, pourrait également modifier la physiologie des VANs. Les travaux de Kenny et collaborateurs ont montré qu'une surexpression de PAI-1 au niveau de l'estomac induisait une hyperphagie et une obésité (Kenny *et al.*, 2013). Les animaux présentaient également une perte de sensibilité à la CCK réduisant l'effet inhibiteur sur la PA (Kenny *et al.*, 2013) et la vidange gastrique (Gamble *et al.*, 2013). Plus précisément, la PAI-1 inhiberait la translocation nucléaire d'EGR-1, empêchant ainsi la synthèse de CART et le basculement des VANs vers un phénotype anorexigène (Kenny *et al.*, 2013).

Il est maintenant reconnu que la consommation d'un régime obesogène conduit à une réponse inflammatoire à la fois systémique et hypothalamique. L'inflammation semblerait être le point de départ de la résistance à la leptine comme le conclut de Git, dans un revue récemment publiée (de Git *et al.*, 2015) (Cf chapitre 1. Section 4.2). Se basant sur ces observations, Waise et collaborateurs ont mesuré l'inflammation dans les VANs suite à un régime obésogène. Ils ont montré que chez la souris,

un jour de régime hyperlipidique à 60% de lipides induit une augmentation des marqueurs d'inflammation (ionized calcium-binding adapter molecule 1 Iba-1 et cluster of differentiation 86 CD86) et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) (Waise *et al.*, 2015). Cet état inflammatoire du ganglion noueux est également présent chez des souris ayant consommé un régime obesogène (60% de lipides) pendant 12 semaines (Naznin *et al.*, 2015).

Un deuxième facteur biologique caractéristique de l'obésité et pouvant être à l'origine de l'inflammation systémique est la présence dans le sang d'un composé des membranes bactériennes intestinales : le LPS. Etant donné leurs localisations proches de la muqueuse intestinale, les VANs, qui expriment TLR4 (Hosoi et al., 2005), sont des tissus avec lesquels le LPS pourrait interagir. En effet, une infusion de LPS produit une décharge de calcium sur des cultures primaires de nerf vague (Riley et al., 2013) et une administration intra-jéjunale ou plasmatique de LPS active les neurones du NTS (Gakis et al., 2009). De plus, une infusion de LPS sur des cultures primaires de nerf vague augmente la quantité de cellules positives à TLR4 (de Lartigue et al., 2011). De même, un régime hyperlipidique (60% de lipides) pendant 12 semaines augmente l'expression génique de TLR4 au niveau du ganglion noueux (Naznin et al., 2015). Sur des cultures primaires de ganglion noueux, une infusion de LPS induit une dérégulation de la signalisation de la leptine caractérisée par une augmentation dose-dépendante de l'expression SOCS3 (de Lartigue et al., 2011). Une infusion chronique de LPS pendant 8 semaines (12 µg/kg de poids) à l'aide de mini-pompes implantées chez le rat induit une résistance à la leptine au niveau de VANs (de La Serre et al., 2015). En conséquence, ces animaux présentaient une perte de sensibilité à la CCK conduisant à une hyperphagie et une obésité (de La Serre et al., 2015). Ainsi, l'élévation de l'endotoxémie, pourrait être un facteur responsable de la perte de sensibilité à la CCK et de l'hyperphagie observée lors de l'obésité.

#### En résume :

La régulation du comportement alimentaire a fait l'objet d'un grand nombre de recherches, il est ainsi connu que des hormones périphériques agissent au niveau central ou *via* le nerf vague pour réguler la PA. De plus, l'obésité est caractérisée par une perturbation de la régulation du comportement alimentaire notamment au niveau hormonal. Cependant, les altérations en termes de production, d'expression de récepteurs ou de sensibilité ne sont pas homogènes entre les études.

A l'inverse, la présence d'une résistance à la leptine dans l'hypothalamus et les VANs semble être un résultat consensuel de la littérature. Au niveau du nerf vague, la leptine n'est plus capable de potentialiser l'action anorexigène de la CCK diminuant ainsi les signaux de satiété envoyés à l'hypothalamus. Bien que la résistance à la leptine induite par la consommation d'un régime obesogène ait largement été décrite dans la littérature, les éléments conduisant à cette résistance ne sont pas encore clairs. Le LPS a été proposé comme un facteur déclencheur de la résistance à la leptine dans les VANs même si les mécanismes précis ne sont pas encore totalement élucidés.

# Chapitre 5 :

# Modèles d'étude de l'obésité

La mise en place de modèles animaux développant des symptômes les plus proches de ceux retrouvés chez l'homme est essentielle pour étudier la physiopathologie de l'obésité. Ces modèles sont utilisés à la fois pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de l'obésité mais également pour tester de nouvelles pistes thérapeutiques. Je présenterai dans un premier temps les principaux rongeurs génétiquement obèses. Dans un deuxième temps, je décrirai les différents régimes obésogènes ainsi que l'importance du régime témoin.

# 1. Animaux génétiquement obèses et transgéniques

# 1.1. Déficience en leptine

Un des modèles animaux d'obésité le plus utilisé est la souris Ob/Ob. Ces souris sont porteuses d'une mutation autosomique sur le gène de la leptine conduisant à une absence de production de la leptine. Les souris vont alors présenter une hyperphagie engendrant une obésité et une sévère résistance à l'insuline dès la 4<sup>ème</sup> semaine de vie (Zhang *et al.*, 1994; Lindstrom, 2007). La déficience en leptine induit également des perturbations au niveau des systèmes immunitaire, cardiovasculaire et reproductif (Zhang *et al.*, 1994; Beck, 2000; Lindstrom, 2007).

Les souris db/db possèdent une leptine fonctionnelle mais une mutation sur le gène du récepteur à la leptine. La perte de la signalisation de la leptine au niveau central engendre une hyperphagie induisant une obésité et une sévère résistance à l'insuline. A l'inverse des animaux ob/ob, les db/db présentent une hyperleptinémie et une dyslipidémie (Beck, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000). Chez le rat, les homologues des souris db/db sont les rats Zucker (fa/fa) (Zucker *et al.*, 1972). Leurs contrôles homozygotes (+/+) et hétérozygotes (+/-) sont normo-pondérés et ne présentent aucun trouble métabolique. Comme les souris, l'obésité et ses maladies associées apparaissent très tôt dès 3 à 5 semaines de vie (Zucker *et al.*, 1972).

#### 1.2. Mutations au niveau des peptides régulant la prise alimentaire

Les souris Yellow Agouti présentent une mutation sur le gène Agouti impliqué dans la régulation de la production des pigments de mélanine mais qui code également pour la protéine orexigène AgRP. Les souris Yellow Agouti peuvent présenter deux allèles différents du gène Agouti : « Yellow lethal A<sup>y</sup> » et « Yellow viable A<sup>vy</sup> »qui conduisent à une surexpression de l'expression du gène Agouti et donc de la production de la protéine AgRP (Graham *et al.*, 1997). La surexpression de la protéine orexigène

Employe	En dotoménie	Sécrétion	TAD	A MD~	Perméabilité			
Especes	Endotoxemie	de mucus	IAP	AIVIPS	Paracellulaire	Transcellulaire		
Ob/ob	LPS : ↑ LBP : ↑	Cellules remplies de mucus	?	?	Jéju : ↔ / ↑ selon études Iléon : ↔ Côlon : ↔	Jéju : ? Iléon : ↑ Côlon :?		
Db/db	LPS : ↑ LBP : ↑	?	?	↓ DEFA-1 et DEFA 5 ↔ Reg3γ et Reg3β ↔ LyzC	Iléon : ? Jéju, Côlon : ?	Iléon : ↑ Jéju, Côlon : ?		
Rats Zucker	↔ <i>vs</i> Zucker maigres	?	?	?	?	?		
Rats OLETF	?	?	?	?	=	?		

Tableau 18: Physiologie intestinale et endotoxémie chez des animaux génétiquement obèses

 $\uparrow/\downarrow/\leftrightarrow$  augmenté/ diminuée/ similaire relativement aux animaux sauvages ? : aucune donnée disponible

*LyzC* : *Lysozyme C* . *Reg3-\beta et \gamma* : *Regenerating islet-derived protein*  $\beta$  *et*  $\gamma$ . *Defa1-5* : *Défensines 1 ou 5* 

AgRP induit alors hyperphagie modérée engendrant à l'âge de 8 à 17 mois une obésité (Graham *et al.*, 1997; Ollmann *et al.*, 1997).

Les souris Tub/Tub possèdent une mutation au niveau du gène Tub qui code pour les protéines TULP1-TULP3, essentielles au bon fonctionnement neuronal. Par cette mutation, les souris Tub/Tub présentent une altération de l'expression de POMC et NPY ce qui conduit à une obésité à l'âge de 9-12 semaines associée à une insulino-résistance (Coleman *et al.*, 1990).

Les rats OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) présentent une déficience au niveau des récepteurs à la CCK, puissante hormone anorexigène. L'absence d'inhibition de la PA par la CCK va donc engendrer une hyperphagie puis une obésité (Moran *et al.*, 2006). Agés de 20 semaines, ces rats seront 30 à 40% plus gros que leurs contrôles LETO (Long-Evans-Tokushima-Otsuka) (Moran *et al.*, 2006). A 24 semaines, ils présenteront une hyperglycémie et développeront un diabète à 65 semaines (Moran *et al.*, 2006).

Enfin, un grand nombre de souris transgéniques a été développé, les mutations ciblant principalement des protéines impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.

# 1.3. Obésité génétique et endotoxémie métabolique

Peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'obésité sur l'endotoxémie métabolique. J'ai récapitulé dans le tableau 18 les informations connues dans la littérature sur l'obésité génétique et les principaux paramètres impliquées dans le développement de l'endotoxémie métabolique (Endotoxémie, AMPs, mucus, IAP, perméabilité). Aucune étude ne s'est intéressée à l'impact de l'obésité sur les mécanismes hépatiques de prise en charge de LPS, c'est pourquoi ils ne sont pas indiqués dans le tableau.

# 2. Induction de l'obésité par un régime obésogène

# 2.1. Différents régimes et modèles animaux

Induire l'obésité par l'alimentation se rapproche le plus du développement de l'obésité chez l'homme. La majorité des régimes utilisés pour induire l'obésité chez l'animal proviennent d'une fabrication synthétique. Ils sont hypercaloriques et le plus souvent enrichis en lipides et/ou en sucres ainsi que pauvres en fibres. Les différents régimes varient en fonction du % de calories apportées par les nutriments. L'origine des nutriments, et notamment des lipides, peut également varier en fonction des régimes.

# 2.2. Les régimes enrichis en glucides :

La majorité des régimes riches en glucides sont enrichis en fructose ou sucrose, disaccharide contenant une molécule de fructose et une de glucose.

### 2.2. Les régimes enrichis en glucides :

La majorité des régimes riches en glucides sont enrichis en fructose ou sucrose, disaccharide contenant une molécule de fructose et une de glucose.

Chez le rongeur, la consommation chronique d'un régime riche en fructose ou glucose augmente le gain de poids, l'adiposité, la leptinémie et l'adiponectinémie, et induit une résistance à l'insuline (Melanson *et al.*, 2008; Bray, 2010). Les régimes riches en glucides modifient également le comportement alimentaire puisqu'ils diminuent la sécrétion et l'expression de peptides et neuropeptides anorexigènes (Lowette *et al.*, 2015). La consommation de fructose pendant 6 semaines augmente également l'endotoxémie chez le primate (Kavanagh *et al.*, 2013). Cependant, peu d'études nse sont intéressées aux effets du fructose sur l'homéostasie intestinale.

#### 2.3. Régime riche en lipides et en glucides.

L'utilisation de régimes riches à la fois en lipides et en glucides permet de se rapprocher au mieux des habitudes alimentaires de l'homme. Le principal modèle de régime utilisé est un régime synthétique hyperlipidique et hyperglucidique appelé HF/HS ou HFHC, appelé également « Western Diet ». Par ailleurs, la majorité des régimes appelés hyperlipidiques dans les études sont en réalité également riches en sucre.

Dans la majorité des études, les régimes Western contiennent un pourcentage de lipides entre 30 et 60% de l'énergie totale. L'origine des lipides utilisés peut-être animale (lard, huile de poisson...) ou végétale (huile d'olive, tournesol...). L'origine des lipides fait ainsi varier la nature des acides gras et est utile pour étudier l'effet spécifique d'acides gras saturé, mono-insaturé ou polyinsaturés. L'utilisation de % de lipides différents dans le régime permet d'obtenir des modèles d'obésité variés qui se développent plus ou moins rapidement avec des degrés de sévérité différents. La majorité des régimes synthétiques de type Western sont également pauvres en fibres solubles. Dans la majorité des cas, ils sont composés en majorité de fibres insolubles telles que la cellulose.

Le second modèle de régime riche en lipides et en glucides est le régime cafétéria. Ce régime est composé d'un mélange d'aliments hypercaloriques consommés par l'homme, telles que des cacahuètes, des biscuits, du saucisson ou encore du fromage. Il est hypercalorique et souvent également enrichi en sel. Le régime cafétéria est également considéré comme plus palatable et induirait une hyperphagie tout le long du régime (Sampey *et al.*, 2011; Higa *et al.*, 2014). Cependant, l'utilisation de ce régime ne permet pas une standardisation de la PA puisqu'il est possible que certains animaux préfèrent un certains types d'aliments au détriment de l'autre. Il est encore plus difficile de comparer les régimes Cafétéria entre études puisqu'elles utilisent toutes des aliments différents. De
plus, la texture de l'aliment est également très différente de celle des animaux contrôles nourris avec des croquettes.

Quelques études ont comparé les effets d'un régime cafétéria contre un régime synthétique de type western. Chez la souris et le rat, le régime Cafétéria induit une hyperphagie et plus rapidement une intolérance au glucose (Sampey *et al.*, 2011; Higa *et al.*, 2014). A l'inverse, le régime synthétique HF/HS induit une hyperphagie transitoire dans la majorité des études (Cf Chapitre 1 section 1.3.2). Chez le rat Wistar, le régime Cafétéria induit une obésité ainsi qu'une stéatose plus rapidement que le régime hyperlipidique synthétique (Sampey *et al.*, 2011).

### 2.4. Variabilité de la réponse au régime obesogène

Suivant la souche de rongeur, la réponse au régime obésogène peut être différente. Par exemple, les animaux Wistar présentent une réponse plus forte au régime obésogène puisqu'ils prennent plus de poids et développent une hyperleptinémie et une hypertriglycéridémie plus importantes que les animaux Sprague-Dawley (Marques *et al.*, 2016). Chez les souris, une étude réalisée par le Jackson Laboratory sur 43 souches de souris nourries avec un régime Western pendant 18 semaines, a montré une forte variabilité dans la réponse phénotypique (Svenson *et al.*, 2007). Plus récemment, une étude de Montgomery a comparé les principales caractéristiques métaboliques de 5 souches de souris soumises à un régime obésogène (Montgomery *et al.*, 2013). Ils ont montré que chaque souche répondait différemment au régime (Montgomery *et al.*, 2013). Plus particulièrement les souris de la souche BALB/C nourries avec un régime obésogène ne prenaient pas significativement plus de poids, ne présentaient pas d'intolérance au glucose malgré une augmentation de l'adiposité et un niveau élevé d'inflammation dans le TA, comparé aux souris BALB/C standard (Montgomery *et al.*, 2013).

Au sein de la même souche, les rongeurs peuvent également répondre différemment au régime obésogène. Certains animaux développent une obésité plus prononcée : les animaux prônes à l'obésité (OB-P) tandis que d'autres semblent protégés : animaux résistants à l'obésité (OB-R). Ce phénomène a été montré chez des rats Sprague-Dawley et les souris C57blck6 (Leibowitz *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2015). Leibowitz et collaborateurs ont montré, chez le rat Sprague-Dawley, que le développement de l'obésité chez les OB-P pourrait être due à une diminution de la sensibilité à l'insuline, une diminution de la capacité des muscles à oxyder des lipides, ainsi qu'une augmentation de l'expression de peptides orexigènes au niveau central (Leibowitz *et al.*, 2007). Par ailleurs, la susceptibilité à développer une obésité pourrait également être due à une baisse des signaux de satiété envoyés par le GIT (Wald *et al.*, 2016)





Adapté de Warden et al, 2008

	« Chow »	Régime synthétique
Protéines	Farines de poisson Farines de porc	Caséines Protéines de soja
Lipides	Huiles végétales Lard	Huile de soja Lard
Glucides	Maïs Blé Avoine Soja	Maltodextrine Sucrose
Fibres alimentaires	Sources multiples	Cellulose

 Tableau 19 : Origines de nutriments des principaux régimes standard

 utilisés dans les études sur l'impact d'un régime obesogène chez le rongeur

De plus, par une sélection et croisements sur plusieurs générations de rats Sprague-Dawley, Levin et collaborateurs ont réussi à sélectionner deux populations de rats prônes ou totalement résistants à l'obésité (Levin *et al.*, 1997). Les rats OB-P développent une obésité et ses troubles métaboliques associés tandis que les OB-R présentent le même phénotype que des animaux nourris avec un régime Contrôle (Levin *et al.*, 1997).

# 3. L'importance du régime témoin

Pour étudier les effets d'un régime obésogène, il est essentiel de se référer à un groupe d'animaux dit « témoin » consommant un régime standard d'animalerie. Le choix de ce régime standard est donc crucial.

Dans la majorité des études (43%, figure 13), le régime standard « chow » d'animalerie, composé de produits de l'agriculture est utilisé. Un tiers des études utilisent comme régime témoin, un régime « Low-fat » synthétique provenant du même procédé de fabrication que le régime obésogène, Les origines de chaque nutriment sont décrites dans le tableau 19. Pour résumer, le régime « chow » est riche en fibres contenant des glucides complexes, lipides et protéines provenant de sources très diverses dans des proportions variables entre chaque lot et difficile à mesurer, à la différence de la composition des régimes synthétiques qui est beaucoup moins variable et facilement mesurable (Warden *et al.*, 2008) (Tableau 19).

Les régimes « chow » et synthétiques contiennent approximativement les mêmes quantités de fibres. Cependant, la nature des fibres est totalement différente entre les deux régimes. Le régime « chow » est composé d'un mélange de céréales lui conférant un ratio équilibré de fibres solubles/insolubles. En revanche, les régimes synthétiques ont pour unique source de fibres : la cellulose, une fibre insoluble. Les fibres insolubles, à l'inverse des fibres solubles, sont peu fermentées par le microbiote. Ainsi il est clair que l'impact du régime sur le microbiote sera différent.

De plus, les régimes « chow » sont composés en majorité de céréales qui peuvent contenir certains facteurs antinutritionnels tels que des inhibiteurs de protéases ou des phytostérols. Ces facteurs antinutrionnels peuvent réduire la digestibilité des protéines contenues dans le régime. A l'inverse, les régimes synthétiques ne contiennent comme céréales que de la fécule de maïs qui est pauvre en facteurs antinutritionnels. En parallèle, les protéines sont purifiées et sont donc très digestibles. Enfin, les produits issus de l'agriculture qui composent le régime « chow » peuvent être contaminés chimiquement par des phyto-œstrogènes, dont l'implication dans de nombreuses pathologies endocriniennes a été montrée (Thigpen *et al.*, 2004).

En raison de grandes différences de composition, chaque régime impacte différemment la physiologie du rongeur. Comparé au régime « chow », la consommation sur une même période de temps d'un régime synthétique au même pourcentage de lipides et de glucides, augmente la masse grasse et donc le poids corporel (Apolzan *et al.*, 2012; Benoit *et al.*, 2013; Chassaing *et al.*, 2015). Après 11 semaines de consommation, les rats nourris avec un régime synthétique montrent une perturbation du métabolisme des lipides et du glucose caractérisée par des concentrations plasmatiques de triglycérides et d'insuline élevées (Benoit *et al.*, 2013). Ils présentent également une inflammation au niveau du TA epididymal (Benoit *et al.*, 2013). Le régime synthétique altère également la physiologie de l'intestin, probablement due aux différences du type de fibres comparés au régime « chow » (Chassaing *et al.*, 2015). La consommation d'un régime synthétique diminue les poids des tissus intestinaux et modifie la composition du microbiote intestinal (Chassaing et al., 2015).

Ainsi, en fonction du groupe standard choisi, les conclusions sur les effets d'un régime obesogène sont complétement différentes (Benoit *et al.*, 2013).

### En résumé :

L'utilisation de modèles animaux pour étudier l'obésité est nécessaire pour une compréhension avancée de la physiopathologie de l'obésité. Le rongeur, de par sa facilité d'élevage est le modèle animal le plus utilisé en recherche. Pour se rapprocher le plus possible de la physiopathologie de l'homme, le rongeur est rendu obèse par la consommation chronique d'un régime riche en lipides et en glucides.

Pour étudier les effets de ce régime obésogène, il est essentiel de se référer à un groupe d'animaux dit « témoin » consommant un régime standard d'animalerie. Deux régimes standards sont majoritairement utilisés dans la littérature: le régime « chow » et le régime synthétique « Low-Fat ». La composition de ces deux régimes se différencie en termes de type de fibres, protéines et de lipides impactant donc différemment, entre autres, le microbiote intestinal. Il est ainsi essentiel de prendre en compte ces aspects nutritionnels dans l'analyse des résultats obtenus.

# Objectifs de thèse

L'incidence croissante de l'obésité et de ses complications est un enjeu mondial de santé publique. Le caractère pathologique de l'obésité est attribué à la présence de co-morbidités qui sont, dans la majorité des cas, une conséquence d'un état d'inflammation chronique de bas-grade. Les travaux de ces dernières années ont mis en évidence l'importance du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité et de ses troubles métaboliques associées. Des composants des bactéries du microbiote, les LPS, ont été décrits comme des déclencheurs de l'inflammation, caractéristique première de l'obésité et de ses troubles métaboliques associés. Depuis les travaux initiateurs de Cani, de nombreuses études ont montré une corrélation entre élévation de l'endotoxémie, appelée « endotoxémie métabolique » et obésité. Cependant, les mécanismes expliquant pourquoi ces LPS traversent la barrière intestinale et atteignent le système circulatoire ne sont pas encore totalement élucidés. Le premier objectif de ma thèse était de comprendre quels mécanismes intestinaux et hépatiques de prise en charge des LPS étaient altérés lors de la prise de poids, permettant ainsi d'expliquer l'endotoxémie métabolique. Pour répondre à ce premier objectif, nous avons utilisé un modèle de rats Wistar soumis à un régime de type Western pendant 6 semaines dans le but d'obtenir une obésité modérée. Nous avons ensuite comparé les mécanismes intestinaux et hépatiques de prise en charge des LPS des rats DIO à ceux des rats soumis à un régime « chow ». De plus, il est connu que l'introduction d'un régime de type western chez le rat induit une hyperphagie transitoire. Afin de s'affranchir de ce facteur confondant, un troisième groupe de rat nourris avec un régime Western en pair-feeding et donc sans hyperphagie a été analysé. Grâce à cette étude, nous avons pu identifier les mécanismes de prise en charge du LPS qui étaient altérés lors de la prise de poids et donc potentiellement à l'origine de l'endotoxémie métabolique.

En parallèle de l'inflammation, des troubles du comportement alimentaire sont également observés lors de l'obésité. Il a été suggéré qu'une altération du microbiote pouvait également être à l'origine des troubles du comportement alimentaire associés à l'obésité. Le nerf vague, une voie majeure de communication entre l'intestin et le cerveau, est très impliqué dans le contrôle de la PA. Le second objectif de ma thèse était d'évaluer le rôle de l'altération du microbiote dans la régulation de la satiété par le système leptine-CCK au niveau des VANs lors de l'obésité. Pour cela, nous avons choisi de modifier la composition du microbiote en modulant le pourcentage de lipides et le type de fibres dans des régimes synthétiques. En gardant un groupe de rats contrôle nourri avec un régime « chow », nous avons également pu contrôler l'impact de l'introduction d'un régime synthétique sur le microbiote et la sensibilité à la CCK. Ces résultats nous ont permis d'identifier l'homéostasie intestinale comme un facteur contribuant à la perte de sensibilité aux signaux satiétogènes observée lors de l'obésité.

Enfin, les travaux du laboratoire d'Helen Raybould montrent que les LPS sont capables d'induire une résistance à la leptine au niveau des VANs conduisant alors à une baisse des signaux de satiété envoyés au SNC. Mon troisième objectif de thèse était de progresser dans la compréhension du développement de la résistance à la leptine au niveau des VANs par les LPS. Plus particulièrement, nous avons testé l'effet du LPS sur une protéine inhibitrice de la signalisation de la leptine, PTP1b, au niveau des VANs. Les résultats obtenus suggèrent que PTP1b pourrait être une protéine impliquée dans la résistance à la leptine au niveau des VANs induite par le LPS et serait potentiellement une nouvelle piste thérapeutique pour limiter l'hyperphagie liée à l'obésité.

Des avancées majeures ont été réalisées sur l'origine et le développement de l'obésité depuis 10 ans avec notamment la mise en évidence du rôle du microbiote et de ses composés LPS dans la physiopathologie des troubles métaboliques et comportementaux liés à l'obésité. Mes travaux de thèses apportent des données supplémentaires sur les possibles voies d'intervention pour limiter l'endotoxémie métabolique et les troubles de la satiété observés chez la personne obèse.

# Article 1 :

# L'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime obésogène est la conséquence d'une altération de la prise en charge intestinale des LPS.

Mon premier objectif de thèse était de comprendre les mécanismes conduisant à l'endotoxémie métabolique lors du développement de l'obésité induite par la consommation d'un régime obesogène. Comme décrit dans la synthèse bibliographique précédente, l'hôte possède de nombreux mécanismes de prise en charge et de transport du LPS afin de limiter sa dissémination dans l'organisme. Plusieurs études se sont intéressées à l'impact de la consommation d'un régime obesogène sur certains de ces mécanismes au niveau intestinal ou circulant. Cependant, chacun de ces travaux a étudié les mécanismes de façon isolée. Notre étude est la première à s'intéresser à l'impact de la consommation d'un régime obesogène sur l'ensemble des mécanismes de prise en charge du LPS.

Pour répondre à cette question, des rats ont été nourris ad libitum avec un régime chow (Cal) ou obésogène (45% de lipides, WDal) durant une et six semaines. Nous avons également inclus deux groupes de rats nourris avec un régime obésogène (WDpf) ou standard (Cpf) au même niveau énergétique que les rats Cal durant la première semaine puis ad libitum avec leur régime respectif pendant 5 semaines. La consommation d'un régime obésogène induit un phénotype d'obésité modérée caractérisée par une augmentation de l'adiposité, du taux sérique de LPS-Binding Protein et du niveau de bactéries Gram-négative dans le contenu caecal. Au niveau iléal, la sécrétion de mucus ainsi que le passage trans-épithelial de LPS étaient augmentés et associés à une baisse de l'expression génique d'AMPs, suite à la consommation d'un régime WD pendant 6 semaines. En revanche, les niveaux d'ARNm d'enzymes hépatiques impliquées dans la prise en charge du LPS n'étaient pas influencés par le régime. Enfin, les animaux WDpf présentaient le même phénotype iléal mais montraient, en plus, une augmentation de la perméabilité caecale au LPS qui était associée, chez les animaux présentant une forte abondance de protéobactéries, à une augmentation de l'endotoxémie. Ainsi, l'élévation de la perméabilité iléale au LPS ainsi que la diminution des défenses iléales (Mucus et AMPs) induite par la consommation d'un régime obésogène pourrait contribuer à l'endotoxémie métabolique.

Ce travail a été réalisé en intégralité au laboratoire ADNC, à l'INRA de Saint-Gilles. J'ai bénéficié de l'aide de deux stagiaires : Annaëlle Sinquin (Master 1) pour la partie expérimentation animale et Anaïs Leroy (Master 2) pour l'analyse des échantillons notamment sur le foie, le microbiote et l'histologie du TA. Nous avons également associé à ce travail Marie Caroline Michalski et Fabienne Laugerette, du laboratoire CARMEN de Lyon, qui ont réalisé le dosage du LPS et participé à l'analyse et l'interprétation de ces données.

La majeure partie de ces résultats font partie d'un article soumis à AJP-Endocrinology and metabolism début octobre 2016. Cependant, j'ai choisi de vous présenter également des résultats préliminaires obtenus sur le métabolisme des acides biliaires, données présentées en français, après l'article.

# Western diet-induced metabolic endotoxemia is a consequence of altered lipopolysaccharides intestinal handling

Guerville Mathilde<sup>1</sup>, Leroy Anaïs<sup>1</sup>, Sinquin Annaëlle<sup>1</sup>, Laugerette Fabienne<sup>2</sup>, Michalski Marie-

Caroline<sup>2</sup> and Boudry Gaëlle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA UR1341 ADNC, Domaine de la Prise, 35590 Saint-Gilles, France <sup>2</sup>INRA, UMR1397, Université Lyon 1, INSERM U1060, INSA-Lyon, IMBL, CarMeN laboratory, F-69621 Villeurbanne, France

RUNNING TITLE: LPS handling in diet-induced metabolic endotoxemia

CORRESPONDING AUTHOR: Dr Boudry Gaëlle INRA UR1341 ADNC Domaine de la Prise 35590 Saint-Gilles Tel: +33 (0)2 23 48 59 76 gaelle.boudry@inra.fr

# Abstract

Obesity and its related disorders have been associated to the presence in the blood of gut bacteriaderived lipopolysaccharides (LPS). However, the factors underlying this low-grade elevation in plasma LPS, so-called metabolic endotoxemia, are not fully elucidated. We aimed to investigate the effects of Western diet (WD) feeding on intestinal and hepatic LPS handling mechanisms in a rat model of diet-induced obesity (DIO). Rats were fed ad libitum either a standard chow diet (Cal) or a Western Diet (45% fat) (WDal) for 1 and 6 weeks. We included two groups of rats fed with the WD (WDpf) or standard chow diet (Cpf) matched to the caloric intake of the Cal for the first week then fed ad libitum with respective diets for 5 weeks. 6-week WD feeding led to a mild obese phenotype with increased adiposity, elevated LPS-binding protein serum levels and increased caecal Gram-negative bacteria levels relative to C rats. Increased ileal mucus secretion and decreased anti-microbial peptides gene expression along with high ileal permeability to LPS was induced by 6-wk WD feeding. 6-week WD consumption did not impact mRNA levels of LPS-handling hepatic enzymes. WDpf rats showed the same ileal phenotype but presented, in addition, a disrupted caecal barrier function which was associated in those that exhibited high caecal levels of Proteobacteria to increased endotoxemia. The increased ileal LPS permeability associated to ileal mucosal defense impairment induced by WD feeding contribute to metabolic endotoxemia. In the caecum, the WD-induced hyperphagia triggers signals protecting against the DIO-induced caecal barrier dysfunction.

# Introduction

Obesity-associated metabolic disorders (type 2 diabetes, cardiovascular diseases and non-alcoholic fatty liver disease) are clearly related to chronic low-grade inflammation observed in obesity(32, 36). Although this obesity-associated low-grade inflammation is widely accepted, its etiology was unknown until Cani *et al* hypothesized that component from the gut microbiota, lipopolysaccharides (LPS), could be inflammatory triggering factors(8). Often referred to as endotoxins, LPS are a constituent of the cell wall of Gram-negative bacteria present in the gut microbiota(10, 20). It contains a pathogen associated molecular pattern, the lipid A (10, 20) which when recognized by Toll-Like receptor 4 (TLR4) initiates signaling cascades resulting in the production of pro-inflammatory

cytokines including Interleukine-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) or Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (64). In a series of experiments on genetically obese or diet-induced obese (DIO) mice, Cani *et al* described a condition of chronically elevated plasma LPS levels 5 times lower than during sepsis but significantly greater than in lean mice termed as "metabolic endotoxemia" (8, 9). They demonstrated that experimental metabolic endotoxemia, performed with subcutaneous infusions of LPS in mice, induces obesity and metabolic disorders i.e. inflammation, weight gain and hepatic steatosis, similar to Western diet (WD) feeding(8). The correlation between elevated plasma levels of LPS or LPS-binding protein (LBP) i.e. the main LPS transporter and longer-term marker of endotoxemia, and obesity-associated metabolic disorders has been confirmed in multiples animal and human studies(3, 7, 11, 15, 30, 38, 44, 50, 54, 56, 59, 83, 89). Nevertheless, because of differences in protocols in terms of diet composition, duration of diet consumption but also of the difficulty to quantify LPS, the mechanisms explaining why endotoxemia is increased during DIO are still unclear.

The gut microbiota is the major source of LPS and it has been roughly estimated that the host lives continuously with around 1 g of LPS within the gut (28). Diet-induced obesity has profound effects on gut microbiota composition (12, 14, 30, 31, 46, 58). Diet-induced increase in abundance of LPS-bearing Gram-negative bacteria within the host gut could be the primary factor influencing endotoxemia. Yet the absence of consistency between the different studies makes it difficult to draw firm conclusion on the relative proportions of Gram-negative and positive bacteria in DIO. Additionally, the gut epithelium secretes numerous proteins e.g. mucus, antimicrobial peptides (AMPs) or intestinal enzymes into the lumen, ensuring primary line of defense against noxious stimulus, including LPS (5, 28). There are also conflicting evidences regarding how the intestine adapts mucus and AMPs secretions to WD feeding (1, 3, 4, 30, 82) with either protective or deleterious effects of WD feeding on mucosal barrier defense mechanisms (1, 3, 4, 30, 82). Furthermore, increased gut permeability has been hypothesized to be the main cause of elevated endotoxemia observed in DIO, based on parallel increase in *in vivo* permeability to fluorescently-tagged small molecules and plasma LPS level (9, 15, 35, 53, 73). In the small intestine, LPS crosses the enterocytes through the chylomicrons pathway, increased after a lipid-rich meal (43). Conversely,

in the large intestine or during inter-prandial periods, the precise mechanisms by which LPS crosses epithelial cells are unknown (28), making the use of conventional paracellular and transcellular markers to evaluate LPS permeability probably not relevant. Finally, once LPS crosses the intestine, it spreads into the portal vein and reaches the liver where major detoxification processes through specific enzymes (acyloxyaclyhydroxylase and alkaline phosphatase) or scavenger-receptor-mediated excretion to the bile occurs. Likewise, DIO impacts on these hepatic mechanisms of LPS detoxification or disposal are overlooked.

Deciphering the exact mechanisms that normally limit the entry and dissemination of LPS into the host but are altered in DIO would constitute a critical step to further design efficient strategies preventing metabolic endotoxemia. Therefore our primarily aim was to investigate the effects of WD feeding on hepatic, ileal and caecal LPS handling mechanisms in a rat model of DIO. We observed increased caecal Gram-negative bacteria levels as well as ileal mucosa defense mechanisms impairment together with alteration of ileal permeability to LPS after 6 weeks of WD. Because a switch to a WD in rodents lead to overconsumption of calories during the first days of feeding(30, 85, 86), we included a group of pair-fed animals fed the WD without initial hyperphagia to avoid confounding factors. Unexpectedly, we observed that the latter rats exhibited a pronounced disruption of caecal barrier function which was associated in those that exhibited high intestinal levels of Proteobacteria to further caecal barrier alteration and increased endotoxemia, suggesting that early hyperphagia may trigger signals activating protective mechanisms against DIO-induced barrier dysfunction in the large intestine.

## Materials and methods

### Animals

All experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines for Animal Care and Use under #APAFIS#903-2015061809202358V3. Male Wistar Rats (8-9 week old;  $380 \pm 25$  g; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed individually in a 12-h light/dark cycle and maintained at 22°C  $\pm$  2°C. They had free access to water and standard chow (Special Diets Services, Rat and Mouse N°3 Breeding, Witham, UK) during a 1-week acclimatization period prior to the diet intervention.

After acclimatization, rats were split into 4 weight-matched groups. Two groups of 12 rats were provided *ad libitum* access to either the standard chow diet (Cal) or a Western Diet (WDal) (Research diets D12451, fat 45% of total energy, 11% gm cellulose, 3.73 kcal/g) for 1 and 6 weeks. Because WD and chow fed rats consume different amounts of calories per day during the first week, a WD-pair fed (WDpf) group was included as a control (n=12) to ensure that the observed effects were not due to greater energy intake. For the pair-feeding procedure, each WDpf animal was weight-paired with one Cal rat. The caloric intake of each Cal rats was measured daily. WDpf animals were given the respective amounts of WD to equal the amount of calories ingested by their pair-feeding procedure alters the natural feeding pattern, we added a fourth group of rats (Cpf, n=6). These latter were fed a standard chow at the same caloric level than their weight-paired Cal rat and with the same feeding pattern than WDpf rats. Cpf and WDpf rats were pair-feed during the first week exclusively and fed *ad libitum* with their respective diets for 5 weeks. Body weight and food intake were measured daily the first week and twice a week for the remaining diet intervention.

### Plasma and tissue collection

After 1 or 6 weeks on respective diets and after an overnight fast and 2-hr refeed, rats were euthanized using deep anesthesia induced by CO<sub>2</sub> asphyxia and cardiac puncture. Serum was obtained after centrifugation (4°C; 10 000 RPM, 15 min) and frozen at -80°C. Fat pads (mesenteric, epididymal and

retroperitoneal) weight was measured and adiposity was calculated as the sum of fat pad weights / body weight \* 100. Luminal contents, tissue sections and mucosa scrapping from ileum and caecum were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Segments of ileum and caecum were collected and stored in cold DMEM for Ussing chambers measurements. Liver were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For histological measurement, sections of mesenteric fat, liver, ileum and colon were fixed in 4% formaldehyde for 24h and stored in 70% ethanol for further analysis.

### Ex vivo permeability

Intestinal tissues were opened along the mesenteric border and mounted in Ussing chamber (Physiologic Instrument, San Diego, USA). The chamber opening exposed 0.5 cm<sup>2</sup> of tissue surface area to 2.5 mL of circulating oxygenated Krebs-glucose (10nM) and Krebs-mannitol (10nM) buffers at 37°C on the serosal and luminal sides, respectively. Tissues were short-circuited and Conductance (G) was determined at baseline as an indicator of paracellular ion flux and expressed as mS/cm<sup>2</sup>. The transcellular and LPS permeabilities were determined as the flux of horseradish peroxidase (HRP Type II;Sigma-Aldrich) and FITC-LPS (Lipopolysaccharide from Escherichia coli 0111:B4, Sigma-Aldrich), respectively. FITC-LPS (40µg/ml) and HRP (200µg/ml) were added into the mucosal chamber at t0. Two hundred microliters samples were collected at 30-min intervals during 120 minutes from the serosal chambers and replaced with Krebs-glucose to maintain a constant volume within chambers. Concentration of FITC-LPS was measured by fluorimetry (fluorimeter LB940 Mithras; Berthold Technologies, Thoiry, France), whereas concentration of HRP was determined using spectrophotometry (Multiskan spectrum; Thermo Labsystem, Midland, Canada) after enzymatic reaction using o-dianisidine as substrate (Sigma-Aldrich). Mucosal-to serosal fluxes were then calculated and expressed as nanograms per square centimeter per hours.

### Serum analyses

Lipopolysaccharide-binding protein levels were measured in serum samples via ELISA kit according to manufacturer's recommendations (Biometec, Greifswald, Germany). Aspartate aminotransferase activity (ASAT) and Alanine aminotransferase activity (ALAT) measurements were done on a

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
REG3b	ATCACAGGTGCAAGGAGAAG	TGAAACAGGGCATAGCAGTAG
PLA2glla	GCTGTGTGACTCATGACTGTT	CTCGGTAGGAGAACTTGTAGGT
LYZ-C	GAATGGGATGTCTGGCTACTATG	GTCTCCAGGGTTGTAGTTTCTG
DEFA1	AGAGGCAGAGGAAGAGACTAAA	AGGACTACAGGGCTCATCTAC
LBP	AGTCTGCAGAGAGAGCTGTA	CCAGGCTATGAAACTCGTACTG
ALPL	GACATCGCCTATCAGCTAATGC	CCACATCAGTTCTGTTCTTGGG
SCARB-1	GCAGTGATGATGGAGGACAA	GGGAACATGCCTGGGAAATA
MD2	CCGAAGCGCAAGGAAATTG	TATGGTGGTGAATGATGGTGAA
TLR4	GGTCGAATTGTATCGCCTTCT	CACAGCAGAAACCCAGATGA
AOAH	ATGAAGGCTGATGTGGTGTG	AGGACTTCCTGAGGACTTGT
IL-1β	ATCTATACCTGTCCTGTGTGATG	GACAGGTCTGTGCTCTGC
HPRT1	TAGGTCCATTCCTATGACTGTAGA	TGGCCTGTATCCAACACTTC
ACTIN	CCCTAAGGCCAACCGTGAAA	CATACAGGGACAACACAGCCT
GAPDH	GGTCGGTGTGAACGGATTT	TGGAAGATGGTGATGGGTTTC
PROTEOBACTERIA	AACGCGAAAAACCTTACCTACC	TGCCCTTTCGTAGCAACTAGTG
VERRUMICROBIOTA	TCAKGTCAGTATGGCCCTTAT	CAGTTTTYAGGATTTCCTCCGCC
FIRMICUTES	TGAAACTYAAAGGAATTGACG	ACCATGCACCACCTGTC
BACTEROIDETES	ATACGCGAGGAACCTTACC	AGCTGACGACAACCATGCAG
BIFIDOBACTERIA	TCGCGTC(CT)GGTGTGAAAG	CCACATCCAGC(AG)TCCAC
UNIVERSAL	AAACTCAAAKGAATTGACGG	CTCARRCACGAGCTGAC
Table 1: Primers sequ	uences used in this study	

Roche/Hitachi system using adapted kits (Cobias) and kindly performed by Dr Nicolas Collet from Pontchaillou Rennes CHU, Biochemistry Laboratory.

Serum endotoxemia was determined using the LAL assay in kinetic chromogenic conditions (Associate of Cape Cod) as previously described (45).

### Histology

Mesenteric fat samples and liver were embedded in paraffin and cut in 10µm and 5µm sections respectively. Sections were then stained with hematoxylin and eosin. Mesenteric fat sections were examined under a light microscope (Nikon DS-Ri2) and images were taken at 100x magnification using NIS-Elements software. The area of adipocytes was measured with ImageJ 1.50i digital imaging processing software. Images from liver sections were taken at 20x magnification under a light microscope (Nikon DS-Ri2).

Ileum and colon samples were embedded in paraffin and cut in 5-µm sections. Both sections were then stained with periodic acid-Schiff-alcian blue (PAS/AB) and examined under a light microscope (Nikon ECLIPSE E400; Nikon Instrument) equipped with image analysis software (NIS-Elements AR3.0 software; Nikon Instruments). Villi length, crypt depth and goblet cell (GC) number were measured and counted in 20 well-oriented crypt-villus units. Presence of mucus secretion in the lumen was scored visually from 0 to 3. All the measurements were done blinded for dietary group.

### Triglycerides liver analysis

Liver lipids were extracted from 100 mg of liver tissue by the Folch method using chloroform and methanol. Triglycerides contents were then determined by colorimetric method according to manufacturer's recommendations (Triglyceride Quantification Assay Kit, abcam).

### Tissue RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA from ileal, caecal and liver samples was extracted *via* the Trizol method (15596-018; Fischer scientific) and quantified using a spectrophotometer (Denovix). 2µg RNA was converted to cDNA using a High Capacity Complementary DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)





# Figure 1: Obesity phenotype and hepatic function

6 weeks. Representative Hematoxylin & Eosin histological pictures of liver (I) from Cal, Cpf, WDal and WDpf rats at 6 weeks. Data are WDpf rats. Liver triglycerides concentration (E), ASAT concentration (F), ALAT concentration (G) of Cal, Cpf, WDal and WDpf rats at Weight gain (A) and food intake (B) evolution for control ad libitum (Cal), control pair-fed (Cpf), WD ad libitum (WDal) and WD pairfed (WDpf) rats during 6 weeks. Adiposity index (C) and mesenteric adipocyte average size (D) at 6 weeks in Cal, Cpf, WDal and expressed as mean  $\pm$  SEM. \* P<0.05. following manufacturer's protocol. Real-Time PCR was performed with the StepOnePlus real-time PCR machine using SyberGreen master mix (Fischer Scientific) for detection. Primers for selected genes (Table 1) were designed using Integrated DNA Technologies Primer Quest. HPRT-1, GAPDH and Actin were used as housekeeping genes.

### Microbial DNA extraction and quantitative RT-PCR

Total DNA was extracted from caecal luminal contents using the ZR Fecal DNA MiniPrep kit (Zymo research). Then, DNA was quantified using a spectrophotometer (Denovix). Real-Time PCR was performed with the StepOnePlus real-time PCR machine using SyberGreen master mix (Fischer Scientific) for detection. Primers for selected 16S genes specific to each phylum are recapitulated in Table 1. Universal 16S rRNA was used to normalize data.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed on Graphpad Prism software (v5, San Diego, CA) and data are expressed as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed using two-ways ANOVA testing diet, feeding pattern and diet X feeding pattern, with Bonferroni post hoc tests. Data for WDpf subgroups were analyzed using T-test compared to either WDal or Cal. For body weight and food intake analysis, diet, feeding pattern, time, diet X feeding pattern effects were analyzed by ANOVA using R software. P<0.05 was considered significant.

# Results

### Obesity phenotype

Western diet-fed rats exhibited a 31% increased weight gain (diet P < 0.0002) compared to control rats, irrespective of the first week energy intake (Fig 1 A). WDal rats had a greater energy intake during the first week of diet (P = 0.04) and similar energy intake from wk 2 to wk 6 compared to Cal animals (Fig 1 B). As designed, WDpf rats had comparable energy intake than Cal rats during the whole diet intervention, thus avoiding the WD-induced first week hyperphagia (Fig 1 B). Surprisingly, the Cpf

CalCplWD alWD pfDierliver $th'4$ $3.62 \pm 0.91$ $3.38 \pm 1.14$ $4.60 \pm 1.25$ $4.90 \pm 1.57$ $0.02$ md2 $1.28 \pm 0.22$ $1.39 \pm 0.13$ $1.52 \pm 0.46$ $1.78 \pm 0.56$ $0.07$ myd88 $1.30 \pm 0.11$ $1.35 \pm 0.26$ $1.78 \pm 0.56$ $0.07$ myd88 $1.30 \pm 0.11$ $1.35 \pm 0.26$ $1.78 \pm 0.56$ $0.07$ myd88 $1.30 \pm 0.11$ $1.35 \pm 0.26$ $1.28 \pm 0.16$ $0.07$ $il-l\beta$ $1.14 \pm 0.45$ $0.61 \pm 0.33$ $1.09 \pm 0.33$ $1.30 \pm 0.10$ $il-l\beta$ $1.14 \pm 0.45$ $0.61 \pm 0.33$ $1.09 \pm 0.33$ $1.30 \pm 0.10$ $il-l\beta$ $1.14 \pm 0.45$ $0.61 \pm 0.33$ $1.09 \pm 0.33$ $1.30 \pm 0.10$ $il-l\beta$ $1.14 \pm 0.45$ $0.61 \pm 0.33$ $1.09 \pm 0.33$ $1.30 \pm 0.10$ $il-l\beta$ $0.55 \pm 2.17$ $7.41 \pm 1.36$ $8.08 \pm 3.36$ $7.34 \pm 2.22$ $0.77$ $md2$ $0.55 \pm 0.16a$ $0.91 \pm 0.38b$ $0.57 \pm 0.14a$ $0.53 \pm 0.12a$ $0.72$ $myd88$ $0.55 \pm 0.16a$ $0.99 \pm 0.25$ $0.92 \pm 0.466$ $0.91 \pm 0.366$ $0.74$ $il-l\beta$ $0.52 \pm 0.24$ $0.64 \pm 0.25$ $0.92 \pm 0.466$ $0.91 \pm 0.366$ $0.74$ $il-l\beta$ $0.52 \pm 0.24$ $0.99 \pm 0.12$ $1.48 \pm 0.91$ $1.19 \pm 0.42$ $0.44$ $il-l\beta$ $0.71 \pm 0.29$ $0.99 \pm 0.12$ $0.91 \pm 0.66$ $0.14 \pm 0.06$ $0.14$ $myd88$ $0.18 \pm 0.05$ $0.18 \pm 0.26$ $0.18 \pm 0.26$ $0.14 \pm 0.26$ $0.14 \pm 0.26$ $md2$ $0$								P-value	
liver $llr4$ $3.62 \pm 0.91$ $3.38 \pm 1.14$ $4.60 \pm 1.25$ $4.90 \pm 1.57$ $0.02$ $md2$ $1.28 \pm 0.22$ $1.39 \pm 0.13$ $1.52 \pm 0.46$ $1.78 \pm 0.56$ $0.07$ $myd88$ $1.30 \pm 0.11$ $1.35 \pm 0.26$ $1.28 \pm 0.16$ $1.33 \pm 0.26$ $0.82$ $njr48$ $1.14 \pm 0.45$ $0.61 \pm 0.33$ $1.09 \pm 0.33$ $1.30 \pm 0.10$ $0.23$ $njr48$ $1.14 \pm 0.45$ $0.61 \pm 0.33$ $1.09 \pm 0.33$ $1.30 \pm 0.10$ $0.23$ caecum $tlr4$ $5.55 \pm 2.17$ $7.41 \pm 1.36$ $8.08 \pm 3.36$ $7.34 \pm 2.22$ $0.17$ md2 $3.22 \pm 1.15$ $4.32 \pm 1.11$ $4.03 \pm 1.22$ $3.55 \pm 1.34$ $0.92$ myd88 $0.55 \pm 0.16$ $0.91 \pm 0.38$ $0.57 \pm 0.14$ $0.53 \pm 0.12$ $0.02$ myd88 $0.55 \pm 0.16$ $0.91 \pm 0.38$ $0.57 \pm 0.14$ $0.53 \pm 0.12$ $0.74$ myd88 $0.55 \pm 0.16$ $0.91 \pm 0.38$ $0.57 \pm 0.14$ $0.92 \pm 0.46$ $0.91 \pm 0.36$ $0.07$ myd88 $0.55 \pm 0.16$ $0.91 \pm 0.38$ $0.57 \pm 0.14$ $0.53 \pm 0.12$ $0.74$ number $tlr4$ $2.15 \pm 1.67$ $0.99 \pm 0.25$ $0.92 \pm 0.46$ $0.91 \pm 0.36$ $0.07$ md2 $0.71 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.58 \pm 0.34$ $0.68 \pm 0.98$ $0.64$ md2 $0.71 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.91 \pm 0.56$ $0.74$ $0.74$ md2 $0.71 \pm 0.29$ $0.18 \pm 0.06$ $0.16 \pm 0.08$ $0.14 \pm 0.06$ $0.14$ md2 $0.18 \pm 0.05$ $0.18 \pm 0.26$ $0.70 \pm 0.40$			C al	Cpf	WD al	WD pf	Diet	FP	Diet X FP
$ \begin{array}{l lllllllllllllllllllllllllllllllllll$	liver	tlr4	$3.62 \pm 0.91$	$3.38 \pm 1.14$	$4.60 \pm 1.25$	$4.90 \pm 1.57$	0.02	0.94	0.60
$ \begin{array}{l lllllllllllllllllllllllllllllllllll$		md2	$1.28\pm0.22$	$1.39 \pm 0.13$	$1.52\pm0.46$	$1.78\pm0.56$	0.07	0.28	0.65
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$		myd88	$1.30 \pm 0.11$	$1.35\pm0.26$	$1.28\pm0.16$	$1.33 \pm 0.26$	0.82	0.56	0.95
caecum $tlr4$ $5.55 \pm 2.17$ $7.41 \pm 1.36$ $8.08 \pm 3.36$ $7.34 \pm 2.22$ $0.17$ md2 $3.22 \pm 1.15$ $4.32 \pm 1.11$ $4.03 \pm 1.22$ $3.55 \pm 1.34$ $0.92$ myd88 $0.55 \pm 0.16$ $0.91 \pm 0.38$ $0.57 \pm 0.14$ $0.53 \pm 0.12$ $0.02$ myd88 $0.55 \pm 0.16$ $0.91 \pm 0.38$ $0.57 \pm 0.14$ $0.53 \pm 0.12$ $0.02$ il-1 $\beta$ $0.52 \pm 0.24$ $0.64 \pm 0.25$ $0.92 \pm 0.46$ $0.91 \pm 0.36$ $0.09$ il-um $tlr4$ $2.15 \pm 1.67$ $0.99 \pm 0.12$ $1.48 \pm 0.91$ $1.19 \pm 0.42$ $0.44$ md2 $0.71 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.58 \pm 0.34$ $0.68 \pm 0.98$ $0.05$ Myd88 $0.18 \pm 0.05$ $0.18 \pm 0.06$ $0.16 \pm 0.08$ $0.14 \pm 0.06$ $0.14$ il-1 $\beta$ $2.63 \pm 1.13$ $1.94 \pm 0.56$ $2.70 \pm 0.40$ $2.03 \pm 1.04$ $0.73$		$il-I\beta$	$1.14\pm0.45$	$0.61\pm0.33$	$1.09\pm0.33$	$1.30 \pm 0.10$	0.23	0.55	0.17
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	caecum	tlr4	$5.55 \pm 2.17$	$7.41 \pm 1.36$	$8.08 \pm 3.36$	$7.34 \pm 2.22$	0.17	0.40	0.14
myd88 $0.55 \pm 0.16a$ $0.91 \pm 0.38b$ $0.57 \pm 0.14a$ $0.53 \pm 0.12a$ $0.02$ $il-l\beta$ $0.52 \pm 0.24$ $0.64 \pm 0.25$ $0.92 \pm 0.46$ $0.91 \pm 0.36$ $0.009$ $ileum$ $tlr4$ $2.15 \pm 1.67$ $0.99 \pm 0.12$ $1.48 \pm 0.91$ $1.19 \pm 0.42$ $0.44$ $md2$ $0.71 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.58 \pm 0.34$ $0.68 \pm 0.98$ $0.44$ $md2$ $0.71 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.58 \pm 0.34$ $0.68 \pm 0.98$ $0.05$ $md2$ $0.11 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.58 \pm 0.34$ $0.68 \pm 0.98$ $0.05$ $md2$ $0.18 \pm 0.05$ $0.18 \pm 0.06$ $0.16 \pm 0.08$ $0.14 \pm 0.06$ $0.14 \pm 0.06$ $il-l\beta$ $2.63 \pm 1.13$ $1.94 \pm 0.56$ $2.70 \pm 0.40$ $2.03 \pm 1.04$ $0.73$		md2	$3.22 \pm 1.15$	$4.32 \pm 1.11$	$4.03 \pm 1.22$	$3.55 \pm 1.34$	0.92	0.50	0.06
		myd88	$0.55\pm0.16~a$	$0.91\pm0.38~\mathrm{b}$	$0.57 \pm 0.14$ a	$0.53 \pm 0.12$ a	0.02	0.03	0.008
ileum $tlr4$ 2.15 ± 1.67 0.99 ± 0.12 1.48 ± 0.91 1.19 ± 0.42 0.44 md2 0.71 ± 0.29 1.00 ± 0.22 0.58 ± 0.34 0.68 ± 0.98 0.05 Myd88 0.18 ± 0.05 0.18 ± 0.06 0.16 ± 0.08 0.14 ± 0.06 0.14 $il-l\beta$ 2.63 ± 1.13 1.94 ± 0.56 2.70 ± 0.40 2.03 ± 1.04 0.73		$il$ -I $\beta$	$0.52 \pm 0.24$	$0.64\pm0.25$	$0.92 \pm 0.46$	$0.91\pm0.36$	0.009	0.69	0.58
md2 $0.71 \pm 0.29$ $1.00 \pm 0.22$ $0.58 \pm 0.34$ $0.68 \pm 0.98$ $0.05$ Myd88 $0.18 \pm 0.05$ $0.18 \pm 0.06$ $0.16 \pm 0.08$ $0.14 \pm 0.06$ $0.14$ il-l $\beta$ $2.63 \pm 1.13$ $1.94 \pm 0.56$ $2.70 \pm 0.40$ $2.03 \pm 1.04$ $0.73$	ileum	tlr4	$2.15 \pm 1.67$	$0.99 \pm 0.12$	$1.48 \pm 0.91$	$1.19 \pm 0.42$	0.44	0.02	0.15
$Myd88$ $0.18 \pm 0.05$ $0.18 \pm 0.06$ $0.16 \pm 0.08$ $0.14 \pm 0.06$ $0.14$ $il-l\beta$ $2.63 \pm 1.13$ $1.94 \pm 0.56$ $2.70 \pm 0.40$ $2.03 \pm 1.04$ $0.73$		md2	$0.71 \pm 0.29$	$1.00 \pm 0.22$	$0.58\pm0.34$	$0.68\pm0.98$	0.05	0.09	0.39
<i>il-1<math>\beta</math></i> 2.63 ± 1.13 1.94 ± 0.56 2.70 ± 0.40 2.03 ± 1.04 0.73		Myd88	$0.18\pm0.05$	$0.18\pm0.06$	$0.16\pm0.08$	$0.14\pm0.06$	0.14	0.88	0.53
		$il$ -I $\beta$	$2.63 \pm 1.13$	$1.94\pm0.56$	$2.70\pm0.40$	$2.03 \pm 1.04$	0.73	0.06	0.92

Table 2 : TLR4, MD2, Myd88 and IL-1ß gene expression in liver, caecum and ileum after 6-week WD or C feeding.

Results are presented as means  $\pm$  SEM. FP=feeding pattern.

rats, which were pair-fed with Cal for the first week, ate significantly more kilocalories per day at wk 2 (P = 0.04) than Cal rats (Fig 1 B).

Irrespective of the first week energy intake, WD animals exhibited marked adiposity with an 87% greater adiposity index compared to C animals (diet P < 0.0001, Fig 1 C). This enhanced adiposity was due to elevated mesenteric, retroperitoneal and epididymal fat pad weights (data not shown). Relative to Cal rats, Cpf rats had a 38 % greater adiposity index (P = 0.02, Fig 1 C). Six weeks of WD increased mesenteric fat adipocyte average surface (diet P = 0.01, Fig 1 D). Cpf rats exhibited similar adipocyte surface than WD fed animals (Fig 1 D).

Hepatic steatosis was evaluated by liver histological slides examination and quantification of liver triglyceride content. Serum levels of ALAT, ASAT were used to evaluate hepatic function. WD rats exhibited a slight hepatic steatosis, mainly macro-vesicular, irrespective of initial energy intake (Fig 1 I). Steatosis was confirmed in WDal and WDpf rats by greater liver triglycerides content than C rats (diet P < 0.0001, Fig 1 E). Cpf rats displayed some signs of steatosis on histological sections (Fig 1 I), yet this was not confirmed by liver triglycerides concentration (Fig 1 E). In WDal and WDpf rats, ASAT serum levels were increased (diet P = 0.02, Fig 1 F). ALAT levels were not influenced by WD (Fig 1 G).

Diet-induced obesity is characterized by chronic low grade inflammation likely originating from LPSinduced TLR4 signaling. Therefore, we measured the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokine IL1- $\beta$  in the main LPS handling tissues: two sections (caecum and ileum) and the liver.

Six-week WD consumption significantly increased IL1- $\beta$  gene expression in caecum whereas similar caecal and hepatic IL-1 $\beta$  mRNA levels were observed between WD and C fed rats. Interleukin-1 $\beta$  is one of the downstream cytokine induced by LPS-mediated TLR4 signaling. Therefore, we measured the gene expression of three TLR4 signaling molecules (*tlr4*, *md2* and *myd88*) in the same tissues. Six-week WD consumption significantly increased *tlr4* (+35%, *P* =0.02, Table 2) and tended to increase *md2* (+23%; *P* =0.07, Table 2) expressions in the liver, irrespective of initial energy intake. No differences in *tlr4* and *md2* caecal expressions were observed between WD and C rats (Table 2). *Myd88* mRNA levels were decreased in the caecum of WD fed rats compared to C rats but this effect was mainly driven by high level in Cpf rats with no significant difference between Cal and WDal or



### Figure 2: Endotoxemia

Serum concentration of LBP (A) and mRNA levels of *lbp* (B) in the liver of control *ad libitum* (Cal), control pair-fed (Cpf), WD *ad libitum* (WDal) and WD pair-fed (WDpf) rats at 6 weeks. Correlation between hepatic *lbp* gene expression and plasma LBP levels (C). Serum concentration of LPS (D) of Cal, Cpf, WDal and WDpf rats at 6 weeks and heterogeneity in serum LPS concentrations in WDpf rats (insert). Serum concentration of LPS in WDpf<sup>highLPS</sup> and WDpf<sup>low LPS</sup> rats at 6 weeks compared to Cal and WDal rats (E). Data are presented as means  $\pm$  SEM. \* P<0.05.

WDpf rats (Table 2). Ileal *tlr4* and *myd88* gene expressions were not different between WD and C rats whereas *md2* mRNA levels was decreased (P = 0.05) in WD fed rats (Table 2). Hence, no correlation was found between TLR4 signaling molecules and IL-1 $\beta$  gene expressions, suggesting that LPS-induced inflammation might not be the main pathway involved in the upregulation of caecal IL-1 $\beta$  mRNA levels.

### Endotoxemia.

We measured serum LBP concentration, the main LPS circulating transporter involved in proinflammatory potential of LPS. WD-fed rats exhibited a 224 % increase (diet P = 0.003, Fig 2 A) in LBP serum concentration relative to C rats, irrespective of initial energy intake, suggesting exposure to LPS in these animals. Similarly, hepatic *lbp* mRNA level was greater in WD-fed animals compared to C rats (diet, P=0.006, Fig 2 B) and was significantly correlated with serum LBP concentration ( $r^2=0.5508$  and P < 0.0001, Figure 2 C). Despite serum LBP increase, endotoxemia was not significantly different between dietary groups (Fig 2 D). Yet, WDpf animals displayed high heterogeneity in endotoxemia (Fig 2 D, insert), with two sub-groups: some animals (WDpf<sup>high LPS</sup>) had elevated endotoxemia greater than 1.5 EU/mL (average: 5.72; min: 1.75; max: 25.85 EU/ml) while others (WDpf<sup>low LPS</sup>) had low endotoxemia levels (average: 0.17; min: 0.02; max: 0.61 EU/ml). Reanalyzing the data taking into account these sub-groups confirmed that WDpf<sup>high LPS</sup> exhibited a significantly greater endotoxemia than WDal (P=0.004) or C (P=0.003) rats whereas WDpf<sup>low LPS</sup> showed similar levels than WDal (P=0.47) or C (P=0.56) rats (Fig 2 E).

### Caecal microbiota

Obesity is associated with alteration in intestinal bacterial composition that might result in increased LPS-bearing Gram negative bacteria abundance in the lumen. We therefore seek to evaluate the level of the major phyla present in the caecum. Levels of Bacteroidetes (Fig 3 A), Firmicutes (Fig 3 B) and Proteobacteria (Fig 3 C) in caecal content were not altered by 6-week WD consumption, irrespective of the initial energy intake. However, the caecal content of WD fed rat had significantly greater Verrucomicrobia levels (+237%, diet P=0.004, Fig 3 D), irrespective of the initial energy intake. Due



### Figure 3: Caecal microbiota composition

Levels of Bacteroidetes (A), Firmicutes (B), Proteobacteria (C), Verrucomicrobia (D) and *Bifidobacteria* (E) in caecal content of control *ad libitum* (Cal), control pair-fed (Cpf), WD *ad libitum* (WDal) and WD pair-fed (WDpf) rats at 6 weeks. (E) Levels of gram-negative Proteobacteria in the WDpf subgroups separated according to their LPS plasma levels compared to WDal and C rats (F). Data are presented as means  $\pm$  SEM. \* P<0.05.

to technical problems, we were not able to amplify Actinobacteria phylum and we used the genus *Bifidobacterium* as a representative of this phylum. *Bifidobacteria* levels were increased by 760% in WD animals (diet P=0.001, Fig 3 E), irrespective of the initial energy intake.

We then sought to evaluate if the caecal microbiota composition differed between the two WDpf subgroups we had previously identified based on serum LPS concentrations. Only Proteobacteria abundance was different: WDpf <sup>high LPS</sup> exhibited greater abundance of Proteobacteria compared to the other groups (p=0.024, P=0.008 and P=0.01 compared to C, WDpf <sup>low LPS</sup> and WDal respectively, Fig 3 F).

### Goblet cell number.

Mucus secreted by GC is the first line of defense of the intestinal mucosa, limiting the presence of noxious molecules such as LPS on the apical side of epithelial cells. On the other hand, a GCassociated passage (GAP) for specific antigens has been recently identified (40). This route of epithelial crossing is activated after mucus secretion by GC. GAP has been identified as a possible pathway for LPS(33). We therefore evaluated the number of GC in ileal and large intestinal mucosa. In the ileum, villi length was decreased (diet P=0.0002, Fig 4 A) in WD-fed rats, irrespective of initial energy intake, while crypt depth was not altered by dietary treatment (Fig 4 B). The number of GC per villus or per crypt was reduced in WD rats (diet P<0.001, Fig 4 C, D) with a more pronounced reduction in WDpf rats (interaction diet x feeding pattern P=0.04 and P=0.07, for villi and crypts, respectively). PAS/AB staining also revealed large quantity of unorganized mucus in the ileal lumen of WD-fed rats (Fig 4 G) that was quantified by scoring the presence or absence of this luminal mucus. WD-fed rats exhibited a significantly greater score (diet P < 0.0001, Fig 4 E) than C rats, indicative of large amount of unorganized mucus in the lumen. WDpf rats had an even greater presence of mucus in the lumen compared to WDal and Cal (P=0.02, P=0.06, respectively, Fig 4 E). Similarly to the microbiota, we evaluated if GC number was different between our two subgroups of WDpf animals. No difference was observed between the two subgroups in the villi and crypts (data not shown). Similarly, no difference in the presence of mucus in the lumen was observed between the two subgroups.


### **Figure 4: Goblet cells**

Villus length (A), crypt depth (B), number of goblet cells (GC) per villus (C) or per crypt (D) of control *ad libitum* (Cal), control pair-fed (Cpf), WD *ad libitum* (WDal) and WD pair-fed (WDpf) rats at 6 weeks. Score of mucus secretion (E) and representative histological pictures of ileum sections stained with PAS/AB (I) of Cal, Cpf, WDal and WDpf rats at 6 weeks. Data are presented as means  $\pm$  SEM. \* P<0.05.

In the large intestine, no significant differences in colonic crypt depth and number of GC were observed between WD and C fed animals (data not shown). No mucus secretion in the lumen was noticed.

#### Intestinal alkaline phosphatase and antimicrobial peptides

IAP is a brush border enzyme that dephosphorylates LPS, thus limiting its endotoxin activity. Ingestion of WD diet, irrespective of initial hyperphagia, dramatically increased IAP activity in both ileum and caecum (diet effect P < 0.0001 and P = 0.0003, Table 3).

Ileal mucosa is also endowed with anti-microbial peptides (AMPs) secreted mainly by Paneth cells in the lumen, with Reg3- $\beta$  specifically targeting Gram-negative bacteria (78). WD-fed rats exhibited an 80 % decrease in ileal *reg3-\beta* expression after 6 weeks of diet compared to C rats (diet *P*=0.003, Table 3). We also measured the ileal gene expression of non-LPS specific AMPs: LyzC, PLA2 and DEFA-1. mRNA levels of the two mucosal enzymes *lyzC* and *pla-2* was decreased in WD-fed rats relative to C rats (P=0.03 and P=0.02) whereas *defa-1* gene expression was not influenced by the diet (Table 3).

#### *Epithelial permeability*

Intestinal passage of LPS was evaluated *ex vivo* in both ileum and caecum using Ussing chambers. Irrespective of initial energy intake, WD consumption increased ileal LPS flux by 50% in WD-fed rats compared to C rats (diet P=0.0006, Fig 5 A). WDpf rats exhibited a 100% increase in caecal LPS flux (P=0.0009, Fig 5 B) compared to WDal. Moreover, within the WDpf rats, WDpf <sup>high LPS</sup> presented a significantly greater caecal permeability to LPS (P=0.0004 and P<0.0001) than WDpf <sup>low LPS</sup> (P=0.01 and P=0.0005) compared to WDal and Cal (Fig 5 C). Paracellular and transcellular permeability measured by conductance and HRP flux, respectively were also increased in the ileum of WD rats, irrespective of the initial energy intake (diet P=0.04 and diet P=0.01, respectively, Fig 5 D-F). No differences were observed in caecal paracellular and transcellular permeability between WD and C animals (Fig 5 E-G).

						P-value	
	C al	C pf	WD al	WD pf	Diet	FP	Diet X FP
Ileal IAP activity	$3.78 \pm 1.74$	$2.57 \pm 1.21$	$44.87\pm36.85$	$39.79\pm34.88$	<0.0001	0.72	0.83
Caecal IAP activity	$2.78 \pm 1.33$	$3.21 \pm 2.43$	$9.63 \pm 6.88$	$10.23\pm6.09$	0.0003	0.76	0.96
Reg3-β	$0.48\pm0.40^{a}$	$0.18 \pm 0.11$ <sup>ab</sup>	$0.08\pm0.05^{\rm b}$	$0.11\pm0.10^{\rm b}$	0.003	0.08	0.04
lyzc	$5.85 \pm 4.86$	9.37 ± 1.92	$4.85 \pm 3.26$	$4.05 \pm 2.70$	0.03	0.37	0.06
defa-1	$0.74\pm0.35$	$0.52 \pm .0.15$	$0.71\pm0.25$	$0.49 \pm 0.16$	0.83	0.02	0.91
pla-2	$4.10\pm3.82$	$8.20\pm3.70$	$2.04 \pm 1.05$	$4.17\pm4.17$	0.02	0.01	0.39

Table 3: Anti-microbial peptides gene expression in ileum and IAP activity in ileum and caecum.

Results are presented as means  $\pm$  SEM. FP=feeding pattern. Letters denotes significance in post-hoc tests.

#### ARTICLE 1

### Hepatic LPS detoxification protein and enzymes

Hepatic gene expression of the two majors enzymes involved in liver LPS detoxification, AOAH and ALPL, was not influenced by diet, nor was that of SCARB-1, a scavenger receptor involved in LPS endocytosis from circulation into Kupffer cells (Table 4).

### Intestinal TLR4 signaling and inflammation at week 1

To try to decipher the mechanisms leading to the more pronounced alteration of barrier function in WDpf rats at week 6, we investigated inflammation in the ileum and caecum at week 1. Irrespective of initial energy intake, one-week WD consumption, significantly increased mRNA levels of *IL-1β* (Cal 0.33±0.10, Cpf 0.58 ±0.16, WDal 0.35±0.17, WDpf 0.90±0.34\*, diet effect P=0.03, Feeding Pattern effect<0.001 and Diet X Feeding pattern P=0.06, \* p<0.05 WDpf vs WDal) in the caecum and tended to increase in the ileum (Cal 0.33±0.07, Cpf 0.28 ±0.04, WDal 0.24±0.11, WDpf 0.41±0.24#, diet effect P=0.85, Feeding pattern effect P=0.16 and Diet X Feeding pattern P=0.06, # p<0.10 WDpf vs WDal) of WDpf compared to WDal rats. Hence, we investigated the relation between LPS-induced TLR4 signaling and IL-1β upregulation. One-week WD feeding decreased caecal and ileal *md2* expressions (-58% and -36% *P*=0.008 and *P*<0.001, respectively Table 5), whereas no difference in *tlr4* mRNA levels was observed (Table 5).





LPS-FITC flux across ileum (A) and caecum (B) of control *ad libitum* (Cal), control pair-fed (Cpf), WD *ad libitum* (WDal) and WD pair-fed (WDpf) rats at 6 weeks and (C) in caecum of WDpf<sup>lowLPS</sup> and WDpf<sup>HighLPS.</sup> Rats. HRP flux in ileum (D) and caecum (E) and conductance in ileum (F) and caecum (G) of control *ad libitum* (Cal), control pair-fed (Cpf), WD *ad libitum* (WDal) and WD pair-fed (WDpf) rats at 6 weeks. Data are presented as means ± SEM. \*P<0.05.

# Discussion

Despite the numerous intestinal and hepatic mechanisms limiting the entry and dissemination of gutderived LPS into the systemic circulation, low, yet significant, amounts of LPS are found in the plasma of obese people, leading to low grade inflammation. We hypothesized that one or several of these mechanisms are impaired during DIO, resulting in elevated endotoxemia. We indeed demonstrate that mild obesity induced by 6 weeks of WD feeding increased Gram-negative bacteria levels in the caecal lumen, associated with disrupted ileal gut barrier function as demonstrated by reduced AMPs level, altered mucus secretion and increased LPS flux across the ileum. Despite this increased passage of LPS, hepatic LPS detoxification processes were not influenced by the diet. Surprisingly, we observed that without the WD-induced initial hyperphagia, the gut barrier disruption was more pronounced, especially in the caecum. Moreover, in WDpf rats that displayed high caecal levels of Proteobacteria, gut barrier was deeper altered and plasma LPS was elevated suggesting that WD-induced initial hyperphagia induces mechanisms of regulation of LPS handling at the caecal level.

Diet-induced obesity has been associated with drastic changes in the composition of the gut microbiota (26) as well as increased LPS level in feces (39, 42). By evaluating the levels of the main phyla in the caecum, we estimated the Gram negative/positive ratio after 6 weeks of WD feeding and observed increased levels of the phylum Verrucomicrobia and of the genus *Bifidobacterium* (representative of Actinobacteria). In healthy rats, Verrucomicrobia account for 2% of the caecal microbiota and Actinobacteria for less than 0.1% (30). Hence, the elevation in the Gram-positive Bifidobacterium level is probably irrelevant compared to the increase in the Gram-negative Verrucomicrobia. Thus, consumption of WD for 6 weeks increased the proportion of Gram-negative bacteria in the caecum content and might consequently induce an elevation of the quantity of luminal LPS. One member of the Verrucomicrobia phylum, *Akkermansia muciniphila*, is specialized in mucin degradation and their abundance is positively correlated with the amount of mucin (25, 80). Similarly, among members of the genus *Bifidobacterium*, some, like *B. bifidum* are able to hydrolyze the glycosidic bonds of mucins

 Table 4 : Hepatic detoxification enzymes and receptors gene expression

				_		P-value	
	C al	C pf	WD al	WD pf	Diet	FP	Diet X FP
aoah	$0.60\pm0.08$	$0.61\pm0.15$	$0.72\pm0.07$	$0.76\pm0.12$	0.31	0.84	0.93
alpl	$0.14\pm0.02$	$0.27\pm0.05$	$0.13\pm0.02$	$0.18\pm0.03$	0.16	0.01	0.28
scarb-1	$0.90\pm0.13$	$0.63\pm0.24$	$0.99\pm0.27$	$0.82\pm0.09$	0.19	0.05	0.64

Results are presented as means  $\pm$  SEM. FP=feeding pattern.

(67, 75). Hence, the elevated amount of mucus secreted into the ileum of WD-fed rats that we observed might migrate to the caecum and enhance levels of these two mucin-degrading bacteria.

The greater levels of Verrucomicrobia in response to WD feeding in our study and others (30) seems inconsistent with the observation that *Akkermansia muciniphila* (18) has been negatively correlated to obesity and diabetes in multiples studies (13, 21, 23, 68, 71). Changes in gut microbiota in WD-fed rats are dynamic in time(30). Therefore, Verrucomicrobia might be decreased in a mild obese phenotype as in the present study but increased with time in response to long-term WD consumption. Moreover, composition of diets, especially in fibers and polyphenols, highly modulate the gut microbiota(19), yet exact diet compositions are rarely similar within studies in literature. Finally, Verrucomicrobia phylum is composed of numerous genera, including *Akkermansia muciniphila*. The phylum and genus might evolve differently, as observed in Göttingen minipigs (61). Taken together, these data suggest that through impaired mucus secretion regulation, WD consumption increases Gram-negative population in the gut lumen that might participate to the WD-induced elevated endotoxemia.

Anti-microbial peptides and mucosal enzymes, secreted by Paneth cells and enterocytes protect against microbial attachment and invasion and participate to the regulation of the gut barrier function (6, 66). Enterocytes also secrete IAP, a gut mucosal protein that detoxifies LPS which is then unable to trigger TLR-induced inflammation (41). There is conflicting evidence regarding how the intestine adapts its mucosal defense i.e. AMPs secretion and IAP activity, to WD feeding. We showed that 6-week WD feeding led to a reduction of AMPs ileal gene expression, yet, upregulated ileal and caecal IAP activities. These mucosal defense mechanisms exhibited early adaptation in response to WD feeding since both IAP activity and AMPs mRNA levels were increased and decreased, respectively after only one week of diet (personal communication). Although DIO-induced reduction in AMPs secretion is widely accepted in the literature (17, 22, 23), the beneficial purpose of this decreased bacterial degradation capacity remains unclear since Reg3- $\gamma$  deficient mice exhibit elevated inflammatory responses to microbiota and enteric pathogen (49). Moreover, Reg3- $\gamma$  promotes bacterial segregation (76); hence the decreased AMPs expression (23) might lead to increased proportion of Gram-negative

	~	•	4			D		
							P-value	
		C al	C pf	WD al	WD pf	Diet	FP	Diet X FP
caecum	tlr4	$0.06\pm0.02$	$0.08\pm0.04$	$0.04\pm0.02$	$0.08\pm0.03$	0.71	0.007	0.26
	md2	$0.45\pm0.40$	$0.31 \pm 0.12$	$0.14\pm0.08$	$0.18\pm0.11$	0.008	0.57	0.23
	myd88	$0.75\pm0.70$	$0.72 \pm 0.18$	$0.35\pm0.23$	$0.41 \pm 0.18$	0.02	0.53	0.66
ileum	tlr4	$0.71 \pm 0.10$	$0.51 \pm 0.11$	$0.53\pm0.16$	$0.55\pm0.13$	0.11	0.04	0.01
	md2	$1.05\pm0.15$	$1.42 \pm 0.47$	$0.76\pm0.29$	$0.82 \pm 0.14$	<0.001	0.03	0.36
	myd88	$0.47 \pm 0.13$	$0.45\pm0.10$	$0.40\pm0.10$	$0.38\pm0.09$	0.04	0.42	0.72
Resul	ts are present	ted as means ± SEN	A. FP=feeding patte	3m. * P<0.05 WDp	f vs WDal. # P<0.10	WDpf vs WDal		

Table 5: TLR4, MD2 and Myd88 gene expression in caecum and ileum after 1-week WD or C feeding.

bacteria close to the enterocytes. The increased IAP activity in DIO has also already been described (51, 69, 89), and is probably intended to reduce toxic LPS activity within the gut wall. The beneficial effect of IAP on WD-induced endotoxemia has been revealed using mice deficient for IAP that exhibited greater endotoxemia and obesity compared to wild type animals after WD feeding(37). However, this upregulation might be specific to dietary intervention duration or intestinal section since opposite results have also been described with either longer or shorter duration of WD consumption (15, 34). Hence, while reduced AMPs levels probably result in increased presence of Gran negative bacteria in the vicinity of intestinal epithelial cells, rapid stimulation of IAP activity in the mucosa likely enhances host protection by increasing LPS intestinal detoxification.

Changes in the gut barrier function, evaluated *in vivo*, have been described in several animal models of obesity (9, 15, 35, 73) and humans (29, 55, 81) and has been suggested to be one of the cause of elevated endotoxemia. Our study is the first to show that consumption of WD leads to increased LPS flux across the ileum associated with elevated mucus secretion from GC into the gut lumen. Recently, GAP, an antigen crossing pathway through GC, has been identified in the mouse small intestine (40). Once the mucus has been secreted from GC, luminal antigens are able to cross and reach the underlying lamina propria (40). Conversely to the small intestine, microbial sensing inhibits formation of GAP in the large intestine (40). Interestingly, Howe et al suggested that LPS could use this pathway to cross the intestinal epithelial barrier (28, 33). Here, we observed a decreased number of PAS/AB stained GC in the ileal epithelium of our WD-fed rats together with large quantity of mucus in the lumen, suggesting recent mucus secretion(63). The increased ileal mucus secretion might allow LPS crossing through GAP, resulting in elevated LPS flux as observed in Ussing chambers. Mucus secretion can be stimulated by several factors, including leptin (63) and bile acids (65). Our WD-fed rats are most likely hyperleptinemic due to elevated fat mass (52). This enhanced leptinemia could trigger mucus secretion (63). Moreover, the alteration of the composition as well as increased quantity and excretion of bile acids (57) might be another factor contributing to mucus secretion observed during WD feeding. Furthermore, the AMP Reg3- $\gamma$  which is highly downregulated in response to WD feeding (23) has been recently identified as a potent regulator of mucus distribution and stabilization

(49). In the caecum of WDal rats, no increase in LPS permeability was noticed. For technical reasons, we were not able to measure caecal GC number nor mucus secretion and we studied the colon instead. No dietary effect on GC number or mucus secretion was noticed in the colon. Likewise, we had observed no difference in caecal GC number in the same DIO model in rats (30), suggesting that mucus secretion and consequently a hypothetical GAP-mediated LPS passage, is not impaired in the caecum of WDal rats.

The liver is the main internal organ involved in LPS detoxification and disposal processes. Within hepatocytes, LPS is endocytosed by Scavenger-Receptor (79) and detoxified by two majors enzymes: AOAH (70) and ALPL (2). Those two enzymes are both upregulated in sepsis, characterized by high concentration of LPS (60, 74). Our study is the first to investigate the impact of DIO on LPS liver detoxification enzyme expression. Consumption of WD for 6 weeks did not modify hepatic gene expressions of AOAH and ALPL despite hepatic LPS exposure as demonstrated by increased *lbp* mRNA and plasma LBP. This suggests either a dose effect, whereby a certain amount of LPS is needed to induce detoxification enzyme up-regulation or a location effect as gut-derived LPS in our model travels through the portal vein, thus achieving high intra-sinusoidal LPS concentrations as opposed to experimental model of sepsis were LPS is injected intravenously. Further research is needed to explore prolonged effects of metabolic endotoxemia on LPS detoxification mechanisms in the liver.

Because WD feeding in rodent is associated with caloric overconsumption during the first days of diet(30, 85, 86), we included a group of pair-fed rats fed the WD without the initial hyperphagia, thus avoiding confounding factors. Previous studies reported that reducing WD calories intake attenuated but did not prevent the development of obesity and associated metabolic disorders (16, 62, 85, 86). In addition to these results, we demonstrate that weight gain, increased adiposity and hepatic steatosis at week 6 are not dependent on initial energy intake. On the opposite, the latter seems to regulate gut barrier function since WDpf rats showed a more pronounced disruption of the gut barrier characterized by an elevated LPS flux across the caecum, in addition to the increased ileal LPS flux. The early

hyperphagia seen in WD fed rats when they are switched from chow to WD is probably due to the increased palatability of the diet (77, 85). Hypothalamic remodeling allows a progressive return to normal caloric intake (27). Recently, it was demonstrated that this early phase of hyperphagia is characterized by transient hepatic steatosis, inflammation and glucose intolerance that resolve before a second phase of metabolic disorders appears after prolonged WD consumption (47, 84, 85). Unlike in the adipose tissue or the liver, one-week WD *ad libitum* consumption does not trigger intestinal damages or inflammation in the ileum or caecum of rodents (30, 35). On the contrary, depletion in eosinophils has even been observed during the first few days of high-fat diet consumption in mice (35). Our WDpf rats exhibited increased caecal *il-1*  $\beta$  mRNA compared to WDal and C rats at 1 week, suggesting that hyperphagia is necessary to maintain homeostasis on the short term. Taken together, these data suggest that the natural early hyperphagia triggers signals that limit inflammation and gut barrier dysfunction also on the long-term.

In rodents, it is usual to observe variability in response to WD feeding (48, 87). In our study, despite the absence of significant difference in plasma LPS between WD and C-fed rats, irrespective of initial energy intake, it is noteworthy that the WDpf group presented a large variability in plasma LPS level and could be divided into two subgroups: WDpf <sup>high LPS</sup> (n=5) and WDpf <sup>low LPS</sup> (n=7). Those two subgroups exhibited the same intestinal phenotypes except that WDpf <sup>high LPS</sup> displayed increased Proteobacteria levels and LPS flux in the caecum. The Proteobacteria phylum has been described as a good marker of gut dysbiosis and might be a criterion for metabolic disorders diagnosis (72). Furthermore, dysbiosis observed in obesity and its associated metabolic disorders often includes an increased abundance of Proteobacteria (15, 23, 72, 88). Colonization of WD-fed germ-free mice with Enterobactercloacae B29, a species belonging to Proteobacteria that has been isolated from obese human gut, developed more a pronounced obese phenotype associated with greater endotoxemia, relative to non-colonized mice (24). Elevated endotoxemia has also been correlated to Proteobacteria abundance in two DIO rodent models (15, 23). These results suggest that a deleterious gut microbiota might participate to further gut barrier impairment resulting in increased endotoxemia.

In conclusion, we have demonstrated that 6-week WD feeding leads to increased caecal Gramnegative bacteria levels and disrupted ileal barrier function characterized by impairment in mucosa defense mechanisms associated to increased ileal permeability to LPS. Efficient strategy to reduce metabolic endotoxemia should therefore target the ileum. Surprisingly, we also observed that the rats fed WD without initial hyperphagia exhibited increased LPS permeability across the large intestine in addition to ileal barrier dysfunction. These results suggest that WD-induced initial hyperphagia may trigger signals that protect against DIO-induced barrier dysfunction in the large intestine. Further research is needed to decipher the pathways involved in these protective mechanisms.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Kristina Hamilton for technical assistance in Ussing chamber experiments and rats handling. We acknowledge Adelaïde Prevotel, Michèle Formal, Armelle Cahu, Gwenaëlle Randuineau, Sylvie Guérin and Paul Meurice for technical assistance in histological analysis. We thank Regis Janvier for technical assistance in rats handling. We thank Veronique Romé and Laurence Le Normand for her help on molecular biology data analysis and colorimetric assays.

### Grants

M. Guerville is funded by an INRA-Region Bretagne Fellowship.

### Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise are declared by the author(s).

## References

1.Andres SF, Santoro MA, Mah AT, Keku JA, Bortvedt AE, Blue RE, and Lund PK. Deletion of intestinal epithelial insulin receptor attenuates high-fat diet-induced elevations in cholesterol and stem, enteroendocrine, and Paneth cell mRNAs. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 308: G100-111, 2015.

2.Angelakis E, Armougom F, Carriere F, Bachar D, Laugier R, Lagier JC, Robert C, Michelle C, Henrissat B, and Raoult D. A Metagenomic Investigation of the Duodenal Microbiota Reveals Links with Obesity. *PloS one* 10: e0137784, 2015.

3.Benoit B, Laugerette F, Plaisancie P, Geloen A, Bodennec J, Estienne M, Pineau G, Bernalier-Donadille A, Vidal H, and Michalski MC. Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice. *Nutrition research* 35: 346-356, 2015.

4.Benoit B, Plaisancie P, Geloen A, Estienne M, Debard C, Meugnier E, Loizon E, Daira P, Bodennec J, Cousin O, Vidal H, Laugerette F, and Michalski MC. Pasture v. standard dairy cream in high-fat diet-fed mice: improved metabolic outcomes and stronger intestinal barrier. *The British journal of nutrition* 112: 520-535, 2014.

5.**Bevins CL, and Salzman NH**. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews Microbiology* 9: 356-368, 2011.

6.Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, and Wells JM. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC gastroenterology* 14: 189, 2014.

7.**Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, and Martines D**. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 292: G518-525, 2007.

8.Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, and Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772, 2007.

9.**Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, and Burcelin R**. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481, 2008.

10.**Caroff M, and Karibian D**. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate research* 338: 2431-2447, 2003.

11.Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher f M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, and Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292: E740-747, 2007.

12. Daniel H, Moghaddas Gholami A, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Bohm C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D, and Clavel T. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME journal* 8: 295-308, 2014.

13.Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser BD, Levenez F, Chilloux J, Hoyles L, Dumas ME, Rizkalla SW, Dore J, Cani PD, and Clement K. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 65: 426-436, 2016.

14.**de La Serre CB, de Lartigue G, and Raybould HE**. Chronic exposure to low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons. *Physiology & behavior* 139: 188-194, 2015.

15.**de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, and Raybould HE**. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 299: G440-448, 2010.

16.de Meijer VE, Le HD, Meisel JA, Akhavan Sharif MR, Pan A, Nose V, and Puder M. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism: clinical and experimental* 59: 1092-1105, 2010.

17.de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Jansen J, Muller M, and van der Meer R. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC medical genomics* 1: 14, 2008.

18. Derrien M, Belzer C, and de Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial pathogenesis* 2016.

19. Duenas M, Munoz-Gonzalez I, Cueva C, Jimenez-Giron A, Sanchez-Patan F, Santos-Buelga C, Moreno-Arribas MV, and Bartolome B. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed research international* 2015: 850902, 2015.

20. Erridge C, Bennett-Guerrero E, and Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4: 837-851, 2002.

21. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, and Cani PD. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 9066-9071, 2013.

22. Everard A, Geurts L, Caesar R, Van Hul M, Matamoros S, Duparc T, Denis RG, Cochez P, Pierard F, Castel J, Bindels LB, Plovier H, Robine S, Muccioli GG, Renauld JC, Dumoutier L, Delzenne NM, Luquet S, Backhed F, and Cani PD. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nature communications* 5: 5648, 2014.

23. Everard A, Lazarevic V, Gaia N, Johansson M, Stahlman M, Backhed F, Delzenne NM, Schrenzel J, Francois P, and Cani PD. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME journal* 8: 2116-2130, 2014.

24.**Fei N, and Zhao L**. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME journal* 7: 880-884, 2013.

25.**Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, and Forano E**. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes* 3: 289-306, 2012.

26.Gerard P. Gut microbiota and obesity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73: 147-162, 2016.

27.Gouaze A, Brenachot X, Rigault C, Krezymon A, Rauch C, Nedelec E, Lemoine A, Gascuel J, Bauer S, Penicaud L, and Benani A. Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *PloS one* 8: e72029, 2013.

28.**Guerville M, and Boudry G**. Gastro-intestinal and hepatic mechanisms limiting the entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* ajpgi 00098 02016, 2016.

29.Gummesson A, Carlsson LM, Storlien LH, Backhed F, Lundin P, Lofgren L, Stenlof K, Lam YY, Fagerberg B, and Carlsson B. Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women. *Obesity* 19: 2280-2282, 2011.

30.**Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, and Raybould HE**. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 308: G840-851, 2015.

31.**Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, and Wu GD**. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 137: 1716-1724 e1711-1712, 2009.

32. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867, 2006.

33. Howe SE, Lickteig DJ, Plunkett KN, Ryerse JS, and Konjufca V. The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine. *PloS one* 9: e86656, 2014.

34.**Jiang T, Gao X, Wu C, Tian F, Lei Q, Bi J, Xie B, Wang HY, Chen S, and Wang X**. Apple-Derived Pectin Modulates Gut Microbiota, Improves Gut Barrier Function, and Attenuates Metabolic Endotoxemia in Rats with Diet-Induced Obesity. *Nutrients* 8: 2016.

35.Johnson AM, Costanzo A, Gareau MG, Armando AM, Quehenberger O, Jameson JM, and Olefsky JM. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PloS one* 10: e0122195, 2015.

36.Johnson AR, Milner JJ, and Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological reviews* 249: 218-238, 2012.

37.Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, Malo NS, Ray M, Abtahi SM, Muhammad N, Raychowdhury A, Teshager A, Mohamed MM, Moss AK, Ahmed R, Hakimian S, Narisawa S, Millan JL, Hohmann E, Warren HS, Bhan AK, Malo MS, and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 7003-7008, 2013.

38.Kallio KA, Hatonen KA, Lehto M, Salomaa V, Mannisto S, and Pussinen PJ. Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta diabetologica* 52: 395-404, 2015.

39.Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, and Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PloS one* 7: e47713, 2012.

40.**Knoop KA, McDonald KG, McCrate S, McDole JR, and Newberry RD**. Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal immunology* 8: 198-210, 2015.

41. Lalles JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutrition reviews* 72: 82-94, 2014.

42.Lau E, Marques C, Pestana D, Santoalha M, Carvalho D, Freitas P, and Calhau C. The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutrition & metabolism* 13: 31, 2016.

43.Laugerette F, Alligier M, Bastard JP, Drai J, Chanseaume E, Lambert-Porcheron S, Laville M, Morio B, Vidal H, and Michalski MC. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Molecular nutrition & food research* 58: 1513-1518, 2014.

44.Laugerette F, Furet JP, Debard C, Daira P, Loizon E, Geloen A, Soulage CO, Simonet C, Lefils-Lacourtablaise J, Bernoud-Hubac N, Bodennec J, Peretti N, Vidal H, and Michalski MC. Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 302: E374-386, 2012.

45. Laugerette F, Pineau G, Vors C, and Michalski M. Endotoxemia Analysis by the Limulus Amoebocyte Lysate Assay in Different Mammal Species Used in Metabolic Studies. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* 6: 251, 2015.

46.Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, and Morris MJ. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PloS one* 10: e0126931, 2015.

47.Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, and Kim JB. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 60: 2474-2483, 2011.

48.**Leibowitz KL, Chang GQ, Pamy PS, Hill JO, Gayles EC, and Leibowitz SF**. Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight. *International journal of obesity* 31: 1210-1221, 2007.

49.Loonen LM, Stolte EH, Jaklofsky MT, Meijerink M, Dekker J, van Baarlen P, and Wells JM. REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal immunology* 7: 939-947, 2014.

50.Luck H, Tsai S, Chung J, Clemente-Casares X, Ghazarian M, Revelo XS, Lei H, Luk CT, Shi SY, Surendra A, Copeland JK, Ahn J, Prescott D, Rasmussen BA, Chng MH, Engleman EG, Girardin SE,

Lam TK, Croitoru K, Dunn S, Philpott DJ, Guttman DS, Woo M, Winer S, and Winer DA. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell metabolism* 21: 527-542, 2015.

51.Lynes M, Narisawa S, Millan JL, and Widmaier EP. Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 301: R1738-1747, 2011.

52. Monti V, Carlson JJ, Hunt SC, and Adams TD. Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. *Journal of the American Dietetic Association* 106: 822-828; quiz 829-830, 2006.

53. **Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, and Alfenas Rde C**. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *The British journal of nutrition* 108: 801-809, 2012.

54. **Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Bassols J, Ricart W, and Fernandez-Real JM**. Decreased circulating lactoferrin in insulin resistance and altered glucose tolerance as a possible marker of neutrophil dysfunction in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94: 4036-4044, 2009.

55. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, and Fernandez-Real JM. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PloS one* 7: e37160, 2012.

56.**Muller VM, Zietek T, Rohm F, Fiamoncini J, Lagkouvardos I, Haller D, Clavel T, and Daniel H**. Gut barrier impairment by high-fat diet in mice depends on housing conditions. *Molecular nutrition & food research* 60: 897-908, 2016.

57.**Murakami Y, Tanabe S, and Suzuki T**. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *Journal of food science* 81: H216-222, 2016.

58. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy F, Clarke SF, O'Toole PW, Quigley EM, Stanton C, Ross PR, O'Doherty RM, and Shanahan F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* 59: 1635-1642, 2010.

59.**Naito E, Yoshida Y, Makino K, Kounoshi Y, Kunihiro S, Takahashi R, Matsuzaki T, Miyazaki K, and Ishikawa F**. Beneficial effect of oral administration of Lactobacillus casei strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *Journal of applied microbiology* 110: 650-657, 2011.

60.**Ojogun N, Kuang TY, Shao B, Greaves DR, Munford RS, and Varley AW**. Overproduction of acyloxyacyl hydrolase by macrophages and dendritic cells prevents prolonged reactions to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *The Journal of infectious diseases* 200: 1685-1693, 2009.

61.Pedersen R, Ingerslev HC, Sturek M, Alloosh M, Cirera S, Christoffersen BO, Moesgaard SG, Larsen N, and Boye M. Characterisation of gut microbiota in Ossabaw and Gottingen minipigs as models of obesity and metabolic syndrome. *PloS one* 8: e56612, 2013.

62.**Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, and Surwit RS**. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism: clinical and experimental* 53: 454-457, 2004.

63. Plaisancie P, Ducroc R, El Homsi M, Tsocas A, Guilmeau S, Zoghbi S, Thibaudeau O, and Bado A. Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 290: G805-812, 2006.

64.**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, and Beutler B**. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088, 1998.

65.**Pyo JS, Ko YS, Kang G, Kim DH, Kim WH, Lee BL, and Sohn JH**. Bile acid induces MUC2 expression and inhibits tumor invasion in gastric carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology* 141: 1181-1188, 2015.

66. Rodriguez-Pineiro AM, Bergstrom JH, Ermund A, Gustafsson JK, Schutte A, Johansson ME, and Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal

mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 305: G348-356, 2013.

67.**Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernandez-Garcia M, de los Reyes-Gavilan CG, and Margolles A**. Mucin degradation by Bifidobacterium strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and environmental microbiology* 74: 1936-1940, 2008.

68.Schneeberger M, Everard A, Gomez-Valades AG, Matamoros S, Ramirez S, Delzenne NM, Gomis R, Claret M, and Cani PD. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific reports* 5: 16643, 2015.

69. **Sefcikova Z, Hajek T, Lenhardt L, Racek L, and Mozes S**. Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 57: 467-474, 2008.

70.Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, Ojogun N, Rockey DC, Dematteo RP, and Munford RS. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *The Journal of biological chemistry* 282: 13726-13735, 2007.

71.**Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, and Bae JW**. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 63: 727-735, 2014.

72.**Shin NR, Whon TW, and Bae JW**. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in biotechnology* 33: 496-503, 2015.

73.**Suzuki T, and Hara H**. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutrition & metabolism* 7: 19, 2010.

74.**Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, and Poelstra K**. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 290: G377-385, 2006.

75.**Turroni F, Duranti S, Bottacini F, Guglielmetti S, Van Sinderen D, and Ventura M**. Bifidobacterium bifidum as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in microbiology* 5: 437, 2014. 76.**Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, and Hooper LV**. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334: 255-258, 2011.

77. Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M, and Perello M. Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. *PloS one* 9: e87478, 2014.

78.van Ampting MT, Loonen LM, Schonewille AJ, Konings I, Vink C, Iovanna J, Chamaillard M, Dekker J, van der Meer R, Wells JM, and Bovee-Oudenhoven IM. Intestinally secreted C-type lectin Reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice. *Infection and immunity* 80: 1115-1120, 2012.

79. Van Bossuyt H, De Zanger RB, and Wisse E. Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts. *Journal of hepatology* 7: 325-337, 1988.

80.Van den Abbeele P, Gerard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Kleerebezem M, Zoetendal EG, Smidt H, Verstraete W, Van de Wiele T, and Possemiers S. Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environmental microbiology* 13: 2667-2680, 2011.

81.Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, Buurman WA, de Vos WM, and Rensen SS. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity* 21: E607-615, 2013.

82. Waise TM, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, and Nakazato M. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochemical and biophysical research communications* 464: 1157-1162, 2015.

83.Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, van-Hylckama Vlieg JE, Strissel K, Zhao L, Obin M, and Shen J. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The ISME journal* 9: 1-15, 2015.

84. Wiedemann MS, Wueest S, Item F, Schoenle EJ, and Konrad D. Adipose tissue inflammation contributes to short-term high-fat diet-induced hepatic insulin resistance. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 305: E388-395, 2013.

85.Williams LM, Campbell FM, Drew JE, Koch C, Hoggard N, Rees WD, Kamolrat T, Thi Ngo H, Steffensen IL, Gray SR, and Tups A. The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. *PloS one* 9: e106159, 2014.

86. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, and Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition* 133: 1081-1087, 2003.

87.Xia SF, Duan XM, Hao LY, Li LT, Cheng XR, Xie ZX, Qiao Y, Li LR, Tang X, Shi YH, and Le GW. Role of thyroid hormone homeostasis in obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high-fat diet. *Metabolism: clinical and experimental* 64: 566-579, 2015.

88.**Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, and Zhao L**. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *The ISME journal* 6: 1848-1857, 2012.

89. Zhou X, Han D, Xu R, Li S, Wu H, Qu C, Wang F, Wang X, and Zhao Y. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PloS one* 9: e115148, 2014.

# Supplément – Acides biliaires

## Introduction

L'obésité est associée à une modification du métabolisme de la bile caractérisée par une augmentation de la quantité d'acides biliaires (AB) dans la lumière intestinale ainsi qu'une modification de la composition de la bile en AB (Stenman *et al.*, 2012; Stenman *et al.*, 2013; Duparc *et al.*, 2016; Muller *et al.*, 2016; Murakami *et al.*, 2016). De nombreuses études expérimentales ont montré que les AB pouvaient interagir avec des mécanismes connus pour être impliqués dans la physiopathologie de l'obésité tels que l'altération du microbiote (Islam *et al.*, 2011; Yokota *et al.*, 2012; Duparc *et al.*, 2016), l'inflammation (Duboc *et al.*, 2014) ou l'hyperperméabilité intestinale (Stenman *et al.*, 2012; Stenman *et al.*, 2013; Stenman *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2016). La modification du métabolisme des AB pourrait alors être un facteur clé dans le développement de l'obésité.

Une deuxième caractéristique de l'obésité est l'élévation de la concentration circulante de LPS, décrit comme un état d'endotoxémie métabolique (Cani *et al.*, 2007). Le deuxième rôle essentiel de la bile est d'excréter les composés toxiques de l'organisme notamment les endotoxines (Guerville *et al.*, 2016). En cas de passage accru des LPS à travers l'intestin, ceux-ci arrivent dans le foie par la veine porte. Au niveau hépatique, ils sont internalisés par le Scavenger-Recptor 1 (SR-B1) dans les cellules de Kupffer puis redirigés vers les hépatocytes où ils peuvent se lier aux AB par des interactions hydrophobes. Les LPS, fixés aux AB sont ensuite co-excrétés avec la bile dans le duodénum (Guerville *et al.*, 2016).

Grâce à leurs nombreux récepteurs exprimés le long du tractus digestif et dans le foie, les AB sont capables de réguler leur synthèse *de novo* et leur réabsorption. Les 4 récepteurs majeurs impliqués dans cette régulation sont le Farnesoid X Receptor (FXR), Pregnane X Receptor (PXR), le membranebile acid receptor appelé également TGR5 et le liver X receptor (LXR). Alors que FXR, PXR et LXR réduirait la synthèse d'AB (Chiang, 2002), TGR5 aurait plutôt un effet stimulateur (Duboc *et al.*, 2014). Plus précisément, l'activation iléale de FXR par ses ligands (les AB) stimule la transcription du Fibroblast Growth Factors 15 (FGF19 chez l'homme) qui sera libéré dans la veine porte pour atteindre le foie. Au niveau hépatique, FGF15/19 inhibe la transcription de la Cholestérol-7- $\alpha$ -hydroxylase (Cyp7A1), enzyme limitante de la synthèse des AB. Parallèlement à ces mécanismes, l'activation au niveau hépatique de FXR et LXR par les AB induit la transcription du Small Heterodimer Partner (SHP) qui diminue également la transcription par la modulation de l'expression de transporteurs iléaux d'AB tels que l'apical sodium–bile acid transporter (ASBT), également sous le contrôle de FXR.

Gènes	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
FXR	GAAAGAGCGGCATCTCCGA	TGCTGTGAGCAGAGCGTACTCTT
PXR	CGATTTGCCCTCACCCTGAAGG	CGTCCGTGCTGCTGAATAACTCC
LXR	GCAACAGTGTAACAGGCGC	TGCAATGGGCCAAGGC
TGR5	AAAGGTGGCTACAAGTGCTTC	TTCAAGTCCAAGTCAGTGCTG
FGF15	CTACGTCTCCAACTGCTTCC	GCTGCTGACGTCCTTGAT
ASBT	GTGACATGGACCTCAGTGTTAG	GAGTCAACCCACATCTTGGTATAG
CYP7A1	CTGAGGGATTGAAGCACAAGA	GGAGAGCGTGTCATTGAGAAA
SCARB1	GCAGTGATGATGGAGGACAA	GGGAACATGCCTGGGAAATA
ACTIN	CCCTAAGGCCAACCGTGAAA	CATACAGGGACAACACAGCCT
GAPDH	GGTCGGTGTGAACGGATTT	TGGAAGATGGTGATGGGTTTC

Tableau 20 : Séquences des primers utilisées dans l'étude

Le but de notre étude était d'évaluer le métabolisme des AB dans un contexte d'obésité induite par un régime obesogène et ainsi d'observer si une perturbation du métabolisme des AB pourrait être un facteur contribuant au développement de l'endotoxémie métabolique. Pour évaluer le métabolisme des AB, nous avons mesuré l'expression des 4 récepteurs dans les principaux tissus cibles des AB : le foie, l'iléon distal et le caecum. Les expressions géniques de FGF15 et ASBT ont également été mesurées dans l'iléon. Enfin, les niveaux d'ARNm de Cyp7A1 dans le foie ont été déterminés.

### Matériels et méthodes

Le modèle animal utilisé est celui décrit dans l'article précédent.

#### RT-qPCR sur le foie, l'iléon et le caecum

Les ARN de foie, l'iléon et de caecum ont été extraits *via* la méthode au Trizol (15596-018 ; Fischer Scientific) puis quantifiés grâce au Denovix. Par l'utilisation du kit High Capacity Complementary DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), 2  $\mu$ g d'ARN ont ensuite été convertis en ADNc selon les recommandations du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée grâce à l'appareil StepOnePlus real-time PCR utilisant le SyberGreen master mix comme système de détection. Les primers utilisés sont listés dans le tableau 21, ils ont été désignés grâce au logiciel « Integrated DNA Technologies Primer Quest ». Les gènes Actine, GAPDH ont été utilisés comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en 2<sup>-dct</sup>.



Figure 14: Effets d'un régime obesogène avec ou sans hyperphagie sur l'expression de LXR (A), PXR (B), FXR (C), TGR5 (D), FGF15/19 (E) et ASBT (F) au niveau de l'iléon distal de rats Cal, Cpf, WDal et WDpf. FP=Feeding pattern. Les données représentent la moyenne ± SEM. \* P<0.05. Les lettres correspondent aux statistiques obtenues après l'anova à deux facteurs par un test de Bonferroni.

# Résultats

Après six semaines de régime WD, les expressions géniques de LXR, PXR, FXR et TGR5 n'étaient pas influencées par le régime WD dans l'iléon (Fig 14 A-D). En revanche, le niveau d'ARNm de FGF15 était augmenté chez les animaux WD relativement aux C (effet régime P=0.005, Fig 14 E). On peut également noter que les rats WDpf présentaient, relativement aux rats C, une augmentation de l'expression génique de FGF15 de 250% contre 117% chez les animaux WDal. L'expression génique d'ASBT était influencée par le régime mais également dépendante de l'hyperphagie (Interaction P=0.017, Fig 14 F). En effet, les rats WDpf présentaient une diminution de 72% par rapport aux rats Cal et Cpf (P=0.0085 et P=0.003, Fig 14 F).

Au niveau caecal, la consommation chronique pendant 6 semaines d'un régime WD ne modifie pas les expressions géniques de LXR, FXR, PXR et TGR5 (Fig 15 A-D).

En revanche, les niveaux hépatiques d'ARNm de LXR et FXR étaient augmentés chez les animaux WD comparés aux C (effet régime P=0.002, P=0.0088, Fig 16 A,C). Les expressions géniques de PXR et TGR5 dans le foie étaient similaires entre les animaux WD et C (Fig 16 B,D). Le niveau d'ARNm de Cyp7A1 était augmenté chez les rats WDpf comparé aux rats WDal (P=0.0156, Fig 16 E). Enfin, l'expression génique de SR-B1 n'était pas influencée par la consommation d'un régime WD pendant 6 semaines (Fig 16 F).

Au niveau caecal et hépatique, aucune différence n'est observée entre les deux sous-groupes de rats WDpf<sup>low endotoxemia</sup> et WDpf<sup>high endotoxemia</sup>. En revanche, l'expression iléale de FGF19 était augmentée chez les animaux WDpf<sup>low endotoxemia</sup> relativement aux animaux WDpf<sup>high endotoxemia</sup>, WDal et C (P=0.012, données non présentées). Les niveaux d'ARNm de LXR, FXR, PXR, TGR5 et ASBT étaient similaires dans l'iléon des 4 groupes d'animaux (données non présentées).



Figure 15 : Effets d'un régime obesogène avec ou sans hyperphagie sur l'expression de LXR (A), PXR (B), FXR (C), TGR5 (D) au niveau du caecum de rats Cal, Cpf, WDal et WDpf. FP=Feeding pattern. Les données représentent la moyenne ± SEM.

## Discussion

L'objectif de notre étude était d'évaluer le métabolisme des AB dans un contexte d'obésité induite par un régime obesogène dans le but de déterminer si une perturbation du métabolisme des AB pourrait être un facteur contribuant au développement de l'endotoxémie métabolique. Suite à la consommation d'un régime obesogène durant 6 semaines, les animaux ont développé une obésité modérée associée à une exposition chronique au LPS, évaluée par la mesure de la concentration sérique de LBP (Cf article 1). Nous avons montré que la consommation d'un régime obesogène pendant 6 semaines n'altère pas les expressions géniques iléale et caecale des récepteurs aux AB mais augmente celle de FGF15/19, le principal messager de FXR dans l'iléon. A l'inverse, les niveaux hépatiques d'ARNm de FXR et LXR sont augmentées chez les rats WD relativement aux C, indépendamment de l'hyperphagie initiale. En revanche, l'hyperphagie initiale semble réguler l'expression génique de Cyp7A1 et ASBT au niveau de l'iléon et du foie, respectivement.

L'obésité induite par la consommation d'un régime obesogène est associée à une augmentation de la quantité d'AB dans les fèces (Stenman et al., 2012; Stenman et al., 2013; Duparc et al., 2016; Muller et al., 2016; Murakami et al., 2016) qui peut résulter soit d'une augmentation de la synthèse, soit d'une diminution de la réabsorption iléale. Dans notre modèle, ainsi que dans l'étude de Duparc et collaborateurs, la consommation d'un régime obesogène induit une augmentation de l'expression génique de FGF15 au niveau iléal suggérant une activation plus importante de FXR par ses ligands. De plus, la consommation d'un régime obesogène a été associée à une augmentation des concentrations luminales des acides chénodéoxycholique et déoxycholique, deux puissants ligands de FXR nous confortant dans l'hypothèse d'une sur-activation iléale de FXR chez les rats nourris WD (Stenman et al., 2012; Stenman et al., 2013; Muller et al., 2016). D'autre part, bien que non significative (probablement due à la forte variabilité interindividuelle), l'expression hépatique de Cyp7A1 semble diminuée chez les animaux WDal comparé aux contrôles (-50%, p=0.04 Cal vs WDal par t-test). Cette réduction de Cyp7A1 a également été observée dans l'étude de Xia et collaborateurs chez des souris DIO comparées à des souris contrôles (Xia et al., 2015). Ainsi, la consommation d'un régime obesogène pendant 6 semaines induirait, dans notre modèle, la surexpression hépatique de FXR et LXR associée à l'induction de FGF15 dans l'iléon conduisant à l'inhibition de l'expression hépatique de Cyp7A1 et la réduction de la synthèse de novo des AB. Cependant, ces résultats ne sont pas homogènes dans toutes les études. A l'inverse, deux études montrent une augmentation de CYp7A1 dans le foie après 1,2,4,6,8 et 16 semaines (Duparc et al., 2016; Guillemot-Legris et al., 2016) associée à une augmentation de la présence d'AB dans le foie à 16 semaines de régime obésogène (Guillemot-Legris et al., 2016).


Figure 16 : Effets d'un régime obesogène avec ou sans hyperphagie sur l'expression de LXR (A), PXR (B), FXR (C), TGR5 (D), Cyp7A1 (E) et SR-B1 (F) au niveau du foie de rats Cal, Cpf, WDal et WDpf. FP=Feeding pattern Un second levier de régulation du métabolisme des AB est la modulation de la réabsorption iléale. Nos résultats montrent que l'expression iléale du transporteur ASBT est similaire chez les animaux C et WDal. A l'inverse, deux études ont montré une augmentation de l'expression de deux transporteurs d'AB dont ASBT chez des animaux DIO suggérant alors une augmentation de la réabsorption (de Wit *et al.*, 2008; Duparc *et al.*, 2016). De façon intéressante, de Wit et collaborateurs montrent que l'augmentation d'ASBT apparait uniquement au niveau de l'intestin grêle médial et non dans le distal. Or nos prélèvements ont été réalisés au niveau de l'intestin grêle distal pouvant expliquer l'absence de modifications dans notre étude.

Ainsi, il est clair que la consommation d'un régime obesogène induit des modifications du métabolisme des AB. Dans notre modèle, les rats WD présenteraient une diminution de la synthèse *de novo* des AB, sans modification de la réabsorption. Par conséquent, des mesures complémentaires telles que la détermination de la composition en AB du foie et des contenus luminaux seraient à effectuer, dans notre étude, pour confirmer notre hypothèse.

Les résultats obtenus dans l'article 1 montrent que l'hyperphagie initiale lors de l'introduction d'un régime obesogène chez le rongeur contrôle la fonction de barrière intestinale. De même, l'hyperphagie initiale semble être impliquée dans la régulation du métabolisme des AB. Alors que l'augmentation de l'expression iléale de FGF15 est observée chez les rats WD indépendamment de l'hyperphagie initiale, l'expression hépatique de Cyp7A1 est plus importante chez les rats WDpf comparée aux rats WDal. On peut donc suggérer qu'à l'inverse des WDal, en l'absence d'hyperphagie initiale, la synthèse *de novo* des AB ne serait pas inhibée. En parallèle, les rats WDpf présentaient une diminution de l'expression iléale d'ASBT, suggérant une baisse de la réabsorption des AB en comparaison avec les rats C et WDal. Ainsi, sans l'hyperphagie initiale, les rats WDpf présenteraient à la fois une synthèse *de novo* des AB non inhibée mais également une diminution de leur réabsorption augmentant alors la quantité d'AB dans la lumière intestinale. Par ailleurs, cette grande quantité d'AB pourrait contribuer à la perte de fonction de barrière intestinale observée dans l'intestin des animaux WDpf.

Une des explications possibles de régulation du métabolisme des AB par l'hyperphagie pourrait impliquer le facteur de transcription Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ). En effet, l'activation de PPAR- $\gamma$  diminue l'expression hépatique de Cyp7A1 et augmente celle d'ASBT au niveau iléal (Li *et al.*, 2009). De plus, de Meijer et collaborateurs ont montré que des souris nourries pendant 9 semaines avec un régime WD dont l'hyperphagie a été supprimée ne présentaient pas d'augmentation de PPAR- $\gamma$  à la différence des souris *ad libitum* nourries au même régime (de Meijer *et al.*, 2010). L'hyperphagie serait alors nécessaire à l'induction de signaux contrôlant le métabolisme des AB, et pourraient moduler les expressions géniques de Cyp7A1 et ASBT *via* l'induction de PPAR- $\gamma$ . Cependant des recherches sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse et comprendre les mécanismes associés.

En conclusion, notre étude montre qu'une consommation d'un régime obesogène pendant 6 semaines pourrait induire une diminution de la synthèse des AB, sans modification de la réabsorption. Tout comme lors du contrôle de la barrière intestinale, les signaux envoyés lors de la phase d'hyperphagie initiale seraient nécessaires au contrôle du métabolisme des AB. Des mesures complémentaires sont maintenant essentielles pour confirmer et développer cette hypothèse.

## Article 2 :

La consommation d'un régime synthétique induit des altérations du métabolisme du microbiote ainsi qu'une perte de sensibilité à la CCK, indépendamment du taux de lipides, du type de fibres du régime ou du statut d'obésité chez le rat.

Le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier l'implication du microbiote et des LPS dans la régulation de la satiété par le système CCK-leptine au niveau des VANs. Dans un premier article, nous avons déterminé l'impact d'une modification du microbiote intestinal induite par l'aliment sur la perte de la sensibilité à la CCK au niveau des VANs. Pour cela, nous avons choisi de modifier le microbiote en modulant le pourcentage de lipides et le type de fibres dans des régimes synthétiques. L'originalité de cette étude repose sur l'utilisation de plusieurs groupes témoins. En effet, des groupes des rats ont été nourris avec 5 régimes différents : un régime standard d'animalerie « chow », un régime synthétique (SD) avec une faible (LF) ou forte teneur en lipides (HF) et enrichi soit en cellulose (LFC et HFC) ou en inuline (LFI et HFI). Pour évaluer l'impact de ces régimes sur le microbiote, le métabolome caecal a été évalué par RMN. La sensibilité à la CCK a été évaluée en mesurant la réduction de la PA suite à des injections intra-péritonéales de CCK à deux doses différentes. Nous avons montré que l'introduction d'un régime synthétique (SD), indépendamment du taux de lipides du régime, altère le métabolome caecal, diminue le poids du caecum et l'activité caecale de l'IAP et réduit également la sensibilité à la CCK. Alors que chez les animaux nourris avec un régime LF, une supplémentation en inuline change profondément le métabolome caecal, sans pour autant le ramener au profil des animaux chow, chez les animaux nourris avec un régime HF les modifications sont minimes. En revanche, indépendamment du pourcentage de lipides dans le régime, l'inuline restore le poids du caecum et diminue l'activité de l'IAP mais n'améliore pas la sensibilité à la CCK. Ainsi, la consommation d'un SD, et non le taux de lipides ou l'obésité, altère le métabolisme du microbiote et induit une altération des signaux de satiété.

La majorité de ce travail a été réalisée à l'université de Californie Davis aux Etats-Unis, dans le laboratoire d'Helen Raybould (Expérimentations animales et test de sensibilité à la CCK) avec l'aide de Charlotte Ronveaux et Kristina Hamilton. Afin d'étudier l'altération du microbiote, nous avons réalisé une étude métabolomique sur les contenus caecaux grâce à la technique de 1H-RMN. Cette étude métabolomique a été réalisée au laboratoire Toxalim, à Toulouse avec la collaboration de Sandrine Ellero-Simantos.

Ces résultats sont présentés sous forme d'article en cours de préparation.

## Synthetic diets consumption induces alterations in gut microbiota metabolism and loss of CCK sensitivity, irrespectively of dietary fat content, fiber type or obesity

Mathilde Guerville<sup>1</sup>, M. Kristina Hamilton<sup>2</sup>, Charlotte C Ronveaux<sup>2</sup>, Sandrine Ellero-Simatos<sup>3</sup>, Helen E Raybould<sup>2</sup> and Gaëlle Boudry<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA UR1341 ADNC, Domaine de la Prise, 35590 Saint-Gilles, France

<sup>2</sup> Dep. of Anatomy, Physiology and Cell Biology, UC Davis School of Veterinary Medicine, Davis, CA 95616.

<sup>3</sup> Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France.

### Abstract

Loss of sensitivity of vagal afferent neurons (VANs) to the main gut satiating hormone, cholecystokinin (CCK) has been identified as a factor contributing to hyperphagia and weight gain observed in diet-induced obesity (DIO) in rodents. Alterations in host-microbiota interactions are also hypothesized to be involved in the development of DIO-associated metabolic and central disorders. Our aim was to investigate if DIO-induced impairment in gut microbiota triggers the loss of CCK sensitivity in VANs. Wistar rats were fed for 8 weeks a chow diet (C) or low fat (10%) or high fat (45%) synthetic diets (SD) either enriched in cellulose (LFC and HFC) or in inulin (LFI and HFI). Body weight, food intake and adiposity were measured. The caecal metabolome was assessed by <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics, caecal weight recorded and caecal intestinal alkaline phosphatase (IAP) activity measured. CCK sensitivity was evaluated by measuring the suppression of food intake induced by intraperitoneal CCK injection at two different doses (0.8nM/kg or 2.6nM/kg). Switching from C to cellulose-based SD, irrespective of fat percentage, altered caecal content metabolome, reduced caecal weight and increased caecal IAP activity and reduced sensitivity to CCK since SD-fed rats did not respond to the lowest dose of CCK. Replacing cellulose by inulin in SD diets strongly changed caecal metabolome in LF-fed rats, with less impact in HF-fed rats though, restored <weight of caecal content and tissue and decreased IAP activity but did not improve sensitivity to CCK that was even more deeply altered in LFI-fed rats. In conclusion, SD consumption and not dietary fat percentage or obesity alters gut microbiota metabolism and drives impairments in satiety signaling observed in DIO.

### Introduction

The gastro intestinal tract (GIT) releases more than 20 different hormones that contribute to the regulation of satiety and hunger. Hormones released from the gut in response to luminal content components such as nutrients are essential in the regulation of food intake and energy expenditure. Through the vagal afferent pathway, these hormones communicate information to brain structures involved in the control of energy homeostasis, including the hypothalamus (Dockray, 2014), thus forming the gut-brain axis. The most extensively studied satiating hormone is cholecystokinin (CCK), which is synthetized and secreted in the duodenum in response to the presence of fat and proteins in the lumen (Raybould, 2007; Dockray, 2014). CCK acts synergistically with leptin to enhance the activity of vagal afferent neurons (VANs), thereby relaying information to the hypothalamus (de Lartigue *et al.*, 2007). Integration of this signal leads to reduction of food intake and meal termination (Raybould, 2007).

Regulation of food intake by the CCK-leptin system is impaired in certain conditions such as dietinduced obesity (DIO) in rodents (de Lartigue *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2013). A western diet (WD), containing a high percentage of fat and decreased soluble/insoluble fibers ratio, is often associated with hyperphagia resulting from altered regulatory mechanisms including decreased sensitivity to the satiating peptide CCK (Covasa *et al.*, 1998; de Lartigue *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2013; Duca *et al.*, 2013). It is now clear that WD consumption is associated with a dysfunction of leptin signaling, termed as leptin resistance, in several tissues including the hypothalamus and VANs (de Lartigue *et al.*, 2012). WD-induced leptin resistance decreases the sensitivity to CCK in the VANs; thus, a higher dose of CCK is needed to inhibit food intake (de Lartigue *et al.*, 2012). Even though leptin resistance and reduced CCK sensitivity has been well described in DIO (de Lartigue *et al.*, 2014), the precise mechanisms by which WD causes VANs to loose their sensitivity to CCK remain to be elucidated.

It is widely accepted that obesity is characterized by a state of chronic low-grade inflammation, associated with increased expression of pro-inflammatory cytokines in tissues and systemic circulation (Hotamisligil, 2006; Johnson *et al.*, 2012). In the hypothalamus, development of leptin resistance is linked to increased inflammatory signals. Similarly to the hypothalamus, inflammation (Naznin *et al.*, 2015; Waise *et al.*, 2015) and impairment of leptin signalling (de Lartigue *et al.*, 2011) have been observed in VANs of DIO rats, suggesting that inflammation could be at the origin of VAN leptin resistance and downstream loss of CCK sensitivity. Yet, the origin of this inflammation in VANs is not fully understood. It is now acknowledged that altered host-microbiota interactions drive low-grade general inflammation in obesity (Everard *et al.*, 2013; Chassaing *et al.*, 2015) and it has therefore been suggested that altered host-microbiota interactions could also drive VANs dysfunction in obesity (de Lartigue *et al.*, 2011). Moreover, lipopolysaccharide (LPS), gut bacterial components that translocate

to the blood in DIO (Guerville *et al.*, 2016), have been identified as potential triggers of leptin resistance in VANs through its induction of SOCS3 expression, as observed in vitro (de Lartigue *et al.*, 2011) and in vivo (de La Serre *et al.*, 2015). Taken together, these data suggest that WD-induced gut microbiota alterations could trigger VANs dysfunction resulting in loss of CCK sensitivity.

Diet is the main modulator of gut microbiota composition and metabolism (David *et al.*, 2014). Many studies have shown that changing diet can modify bacterial abundance, diversity and function (David et al., 2014; Arora et al., 2016). Most obesity studies using DIO rodent models examined differences between animals fed a synthetic high fat (HF) compared to a control group fed either a synthetic low fat (LF) diet or a chow diet (Warden et al., 2008). The chow diet is composed of a large array of unrefined plants and animals products. Conversely, synthetic diets (SD) are processed with purified ingredients, each of them providing one main macronutrient, thereby exhibiting marked differences with the chow diet. Recent studies showed that switching from chow to SD, irrespective of their fat content, leads to modulation of gut microbiota metabolism, altered gut homeostasis (Chassaing et al., 2015) and adipose tissue inflammation(Benoit et al., 2013), suggesting that SD consumption, and not only fat content, could drive low-grade inflammation. Targeted microbiota modifications by specific nutrients including prebiotics (Anastasovska et al., 2012; Yan et al., 2013; Everard et al., 2014; Chassaing et al., 2015) have been tested to prevent DIO-induced inflammation and its downstream consequences. Prebiotics are soluble fibers that are largely fermented in the colon by bacteria, producing numerous metabolites that influence host metabolism and physiology. Inulin, a polysaccharide prebiotic composed of fructose molecules attached via  $\beta$  1-2 linkages, added to WD prevented gut microbiota alterations (Chassaing et al., 2015), increased short chain fatty acids (SCFA) production(Yan et al., 2013; Chassaing et al., 2015), improved gut homeostasis(Everard et al., 2014; Chassaing et al., 2015) and suppressed low grade chronic inflammation (Everard et al., 2014) in DIO.

Understanding and treating altered eating behavior observed in obesity constitutes a central issue in the fight against obesity. Loss of CCK sensitivity in DIO is not fully understood but we hypothesize that a central driver is altered host-microbiota interactions. Therefore, the aim of our study was to investigate if diet-induced alterations in gut microbiota and homeostasis are the main trigger of loss of CCK sensitivity in rats. We first determined the impact of switching from a chow diet to a SD, with either low or high fat content, on gut homeostasis and CCK sensitivity in a rat model. Then, we investigated the impact of inulin supplementation on DIO-induced loss of CCK sensitivity.

# Table 1 : Ingredient composition of the experiment chow diet and calories (kCal) for the macronutrients

### Ingredients (g/kf of diet)

Ground corn, dehulled soybean meal, dried beet pulp, fish meal, ground oats, brewers dried yeast, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, dried whey, wheat germ, porcine animal fat, porcine meat meal, wheat midlings, salt, vitamin mixture, mineral mixture *Energy from each* Protein 29 Lipid 13 Carbohydrates 58 Macronutrient levels are percentages.

Ingredients (g/kf of diet)	LFC	HFC	LFI	HFI			
Casein	200	200	200	200			
L-Cystine	3	3	3	3			
Corn starch	550	72.8	512	35			
Maltodextrin 10	150	100	150	100			
Sucrose	0	172.8	0	172.8			
Cellulose BW200	100	100	0	0			
Inulin	0	0	100	100			
Soybean Oil	25	25	25	25			
Lard	20	177.5	20	177.5			
Mineral Mix	10	10	10	10			
Vitamin Mix	10	10	10	10			
Energy (%)							
Protein	20	20	20	20			
Lipid	10	45	10	45			
Carbohydrates	70	35	70	35			
Values of ingredients are grams per kilogram of diet. Macronutrient levels are							
percentages.							

### Table 2 : Ingredient composition of the experimental synthetic diets : LFC, HFC, LFI and HFI

#### ARTICLE 2

### Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats (9 week old, 280-370g Harlan San Diego, n=40) were maintained and handled in accordance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (University of California, Davis). All animals were housed individually at 2°C with a 12:12 hour light-dark. Body weight and food intake were measured three times a week.

Rats were fed a chow diet (C; Purina Lab Diet 5001 rodent diet, 3.36 kcal/g, Table 1) for two weeks during acclimation to the animal facility. Rats were then split into 5 weight-matched groups and fed either chow, low fat (LFC; Research diets, 3.7 kcal/g, Table 2), LF-inulin (LFI; Research diets, 3.8 kcal/g, Table 2), high fat (HFC; Research diets, 4.5 kcal/g, Table 2) or HF-inulin (HFI; Research diets, 4.7 kcal/g, Table 2) diets for 8 weeks (n=8 per group). Inulin was purchased from Beneo (Orafti® GR; Belgium) and supplemented into the LF and HF diets by Research Diets. Inulin was extracted from chicory root and had an average chain length >10.

### Feeding studies

After 6 weeks on respective diets, rat sensitivity to the satiating effect of CCK was tested. Experiments were performed at night time, to respect rat feeding behavior. Rats were fasted on wire-bottom cages for 12h during the light phase. At the onset of the dark phase, CCK (octapeptide, sulfated, Bachem, Torrance, CA, 0.8 nM or 2.6 nM/kg; i.p.) or saline (400 µl; i.p.) were administered. Food was replaced in the cage and food intake recorded after 20 minutes. The dose of CCK was chosen based on previous work showing decreased sensitivity to CCK i.e. no satiating effect of the lowest CCK dose but intact effect of the highest dose in DIO rats compared to chow-fed rats (de Lartigue *et al.*, 2012). All rats received vehicle and CCK doses randomly, with a minimum of 1 day between each experiment.

### Serum and tissue collection

After 8 weeks on respective diets, rats were euthanized by cardiac puncture under deep anesthesia induced by isoflurane. Fat pad (mesenteric, epididymal and retroperitoneal) weights were measured. Adiposity was calculated as the sum of fat pad weights / body weight \* 100. Caecum and luminal contents were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### Intestinal alkaline phosphatase activity

After homogenization of caecal samples, the activity of alkaline phosphatase was assayed in caecal homogenates with commercial kits according the manufacturer's instructions (Sensolyte, Anaspec, San Jose, CA, USA).

#### 1H NMR metabolomics

Caecal extracts for NMR spectroscopy were prepared by mixing 50 mg of the caecal content with 500 µL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) containing 90% D<sub>2</sub>O, 1% (w/v) of sodium 3-(trimethylsilyl) propionate (TSP), and 0.3 mM NaN<sub>3</sub>. After vortex mixing, each sample was subjected to a freeze-thaw cycle in liquid nitrogen and subsequently homogenized with a tissue lyser (QIAGEN, Hilden, Germany) at 20 Hz for 40 s followed by centrifugation at 10000×g for 10 min at 4°C. The supernatants were collected, and the remaining pellet was extracted once more as described above. Supernatants obtained from the two extractions were combined and centrifuged at  $10000 \times g$  for 10 min at 4°C. A total of 600 µL of supernatant was transferred into an NMR tube (outer diameter, 5 mm) pending NMR analysis. All <sup>1</sup>H NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-600-Avance NMR spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) on the AXIOM metabolomics platform (MetaToul) operating at 600.13 MHz for <sup>1</sup>H resonance frequency using an inverse detection 5-mm <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N cryoprobe attached to a cryoplatform (the preamplifier cooling unit). The <sup>1</sup>H NMR spectra were acquired at 300K using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulse sequence with presaturation and a total spin-echo delay (2nt) of 100 ms. A total of 128 transients were collected into 64,000 data points using a spectral width of 12 ppm, a relaxation delay of 2.5 s, and an acquisition time of 2.28 s. Data were analyzed by applying an exponential window function with a 0.3-Hz line broadening prior to Fourier transformation. The resultant spectra were phased, baseline corrected, and calibrated to TSP ( $\delta$  0.00) manually using Mnova NMR (v9.0, Mestrelab Research). The spectra were subsequently imported into MatLab (R2014a, MathsWorks, Inc.) All data were analyzed using fullresolution spectra. The region containing the water resonance ( $\delta$  4.6–5.2ppm) was removed, and the spectra were normalized to the probabilistic quotient (Dieterle et al., 2006) and aligned using a previously published function (Veselkov et al., 2009).

Data were mean-centered prior to analysis using orthogonal projection on latent structure-discriminant analysis (O-PLS-DA). 1H NMR data were used as independent variables (X matrix) and regressed against a dummy matrix (Y matrix) indicating the class of samples (ad lib or CR). O-PLS-derived model was evaluated for goodness of prediction ( $Q^2Y$  value) using 8-fold cross-validation. The reliability of each model was established using a permutation test of the Y vector (1000 permutations) in order to determine a p-value for each  $Q^2Y$ , as previously described. Parameters of the final models are indicated in supplementary table 1. To identify metabolites responsible for discrimination between the animal groups, the O-PLS-DA correlation coefficients ( $r^2$ ) were calculated for each variable and back-scaled into a spectral domain, so that the shape of NMR spectra and the sign of the coefficients were preserved (Cloarec *et al.*, 2005). The weights of the variables were color-coded, according to the square of the O-PLS-DA correlation coefficients. Correlation coefficients extracted from significant models were filtered so that only significant correlations above the threshold defined by Pearson's critical correlation coefficient (P < 0.05; |r| > 0.49) were considered significant. For illustration





Weight gain of Chow, LFC and HFC-fed rats (A) and synthetic diets HFC, HFI, LFC and LFI-fed rats (B) for 8 weeks. Cumulative food intake after 8 weeks C, LFC and HFC (C) and synthetic (D) diets. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=8 rats per group. Letters denote significance (P<0.05) after Bonferonni's post-hoc test. \* denotes significance (P<0.05) between LF vs HF groups, irrespectively of the type of fibers. § denotes significance (P<0.05) between groups fed the inulin and cellulose-supplemented diets irrespectively of the fat percentage.

purposes, the area under the curve of several signals of interest was integrated and statistical significance was tested using univariate tests.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed on GraphPad Prism software (v5, San Diego, CA USA) and data were expressed as means +/- SEM. Significance was determined by either a one or two-way Anova followed by Bonferroni's post hoc tests. For the feeding studies, significance was determined by paired student's t-test between saline and CCK. For body weight and food intake, data were analyzed using two-ways ANOVA testing fat, fibers, time and interactions using R software.

### **Results**

### **Obese phenotype**

#### Body weight and food intake

HFC-fed rats gained more weight compared to C and LFC animals. This increase in weight gain was rapid as it was observed after two and four weeks on HFC diet, compared to C and LFC rats, respectively (Fig 1 A). HFC fed rats had the same energy intake throughout the experiment than C fed rats (Fig 1 C) However, HFC rats had a greater cumulative energy intake than LFC fed rats (+15%, P=0.004, Fig 1 C). Fibers and fat effects were tested by comparing the four SD together. Body weight was increased in rats fed high fat (HF) compared to low fat (LF) diet (fat effect P=0.004, Fig 1 B), irrespective of the type of fiber (fiber effect P=0.32, Fig 1 B). Both type of fibers (fibers effect p=0.0392) and fat percentage (fat effect p=0.0010) altered food intake (Fig 1 D). Indeed, HF consumption increased cumulative food intake whereas inulin supplementation decreased it (Fig 1 D).

### Adiposity

Relative to C rats, HFC fed rats exhibited marked adiposity with an increased adiposity index characterized by elevated retroperitoneal, mesenteric and epididymal fat pads (P<0.05 for all parameters, Fig 2 A,C,E,G). Adiposity of LFC-fed rats was not significantly different from the C or HFC-fed rats (Fig 2 A,C,E,G). Adiposity index and fat depots were influenced by the dietary fat content (P<0.05 for all parameters, Fig 2 B,D,E,H) with increased adiposity index and fat depots in HF relative to LF-fed rats, irrespective of the type of fibers (P<0.05 for all parameters, Fig 2 B,D,E,H)



### **Figure 2: Adiposity**

Adiposity index (sum of fat pads weight / body weight X 100) at 8 weeks of chow, LFC and HFC – (A) and synthetic diet-fed rats (B). Mesenteric (C-D), retroperitoneal (E-F) and epididymal (G-H) fat pads mass at 8 weeks of respective diets. Values are means  $\pm$  SEM of n=8 rats per group. Letters denotes significance (P<0.05). \* denotes significance (P<0.05) between LF and HF

#### Evaluation of gut microbiota alterations by 1H-NMR based metabolomics

We investigated the diet-induced alterations in gut microbiota metabolism using <sup>1</sup>H-NMR based metabolomics in caecal extracts. First, we tested whether switching from chow to a SD affected the caecal metabolome (Fig 3). The caecal metabolic profiles from C-fed rats were significantly different from those of HFC or LFC -fed rats as demonstrated by the O-PLS-DA scores showing clear clustering of C-fed vs SD-fed rats (Fig 3.A). Surprisingly, the caecal metabolome of HFC and LFC-fed rats were not significantly different from each other, as reflected by the non-significant O-PLS parameters (Supplementary Table 1) and the non-separation of the 2 groups on the O-PLS scores (Fig 3.B). We then analyzed the 2 O-PLS models discriminating the caecal metabolic profiles from C- vs. LFC-fed animals (Fig 3 C,D,E) and C- vs. HFC-fed animals (Fig 3 C;D;E) to identify metabolites responsible for the discrimination between chow and SD-diets. Consumption of the SD diets increased the caecal levels of many amino acids such as the branched-chain amino acids (valine, leucine and isoleucine), alanine, glutamine, lysine, tyrosine or phenylalanine, as well as lactate and several carbohydrates (mainly xylose) levels; whereas the levels of propionate, uracil, adenine, hypoxanthine, 4-hydroxyphenylacetate and several other unidentified metabolites decreased (Table 3).

To test if the type of fiber (inulin or cellulose) impacted the caecal metabolome, we compared the caecal metabolome of C, LFC and LFI-fed rats (Fig 4 A) and those of C vs HFC vs HFI rats (Fig 4 B). The discrimination between the caecal metabolome of C, LFC and LFI-fed rats was highly significant, as illustrated by a distinct clustering of the 3 groups on the O-PLS scores (P=0.001, Fig 4 A. and Supplemental Table 1). The first predictive PLS component discriminated LF-fed rats from C-fed rats, irrespective of the type of fiber. The second predictive PLS component discriminated the caecal metabolome of LFC-fed rats from those of C and LFI-fed rats. This suggests that addition of inulin to the LF diet significantly changed the caecal metabolic profiles by restoring some metabolites but also modifying others metabolites compared to the caecal metabolic profiles of C-fed rats. In HFD, the PLS model also strongly discriminated C from SD-diets (HFC and HFI) on the first predictive component (P=0.001, Fig 4.B and Supplemental Table 1). However, the caecal content metabolic profiles from HFC and HFI diets were not significantly different from each other (P=0.26, Supplemental Table1). Fig 4 C presents the OPLS model discriminating the 4 SD-diets and confirms the significant impact of inulin addition on the caecal metabolome, especially in the LF diets. Metabolites responsible for the difference between the metabolic profiles of LFC and LFI-fed animals are displayed in Fig 4 D: inulin addition increased the caecal content levels of BCAA, alanine, glutamate, aspartate, choline, tyrosine and phenylalanine and decreased butyrate and glucose levels (Table 4). Although the multivariate models were not significant because of higher intra-group variability, the addition of inulin in HF-diets induced similar trends in caecal metabolite changes as illustrated in Table 4.



Figure 3: NMR-based metabolomics analysis of the caecal content of rats fed synthetic diets vs Chow.

O-PLS-DA score plots showing the discrimination between 1H NMR spectra of caecal contents from rats fed (A) C vs synthetic (LFC+HFC), (B) HFC vs LFC, (C) C vs. LFC, (D) C vs HFC diets. Parameters of the O-PLS models are given in supplementary table 1. (E&F) O-PLS-DA correlation loading plots relative to the discrimination between 1H NMR spectra of caecal contents from rats fed C vs LFC (E) or HFC (F) diets. Metabolites are color coded according their correlation coefficient, red indicating a very strong positive correlation (R2=0.9). The direction of the metabolite indicates the group with which it is positively associated as labeled on the diagrams. BCAA: branched-chain amino acids, hpx: hypoxanthine, 4-HPA: 4-hydroxyphenylacetate, uk: unknown compound.

#### Gut homeostasis

To roughly evaluate gut homeostasis, we first weighted caecal tissues and content. We observed a decreased caecal tissue and caecal content weight in the LFC and HFC- compared to the C-fed rats (P=0.0002, P=0.0005 and P=0.04, P=0.027 respectively, Fig 5.A.C). Inulin supplementation increased caecum tissue and caecal content weights, irrespectively of the fat percentage (fibers effects p<0.001 and p=0.0086; fat effect p=0.6457 and p=0.8972 respectively, Fig 5 B,D). Relative to C-fed rats, LFC and HFC-fed rats exhibited a 1354% and 857% respectively increase in caecal IAP activity, a brush border enzyme that detoxifies LPS (P=0.0016 and P=0.0092, respectively Fig 6 A). Inulin supplementation of the SD decreased caecal mucosa IAP activity, irrespective of the fat content (fat effect p=0.4824; fiber effect p=0.0189, Fig 6 B).

#### CCK sensitivity

C, HFC and LFC-fed rats responded to the highest dose (2.6 nM/kg) of CCK injection by decreasing their food intake (Fig 7 A). However, at a lower dose (0.8 nM/kg), only the C-fed animals reduced their food intake suggesting that consumption of SD decreased CCK sensitivity, irrespective of the fat content (Fig 7 A). Similarly, HFI-fed rats decreased their food intake in response to 2.6 nM/kg of CCK but not to 0.8nM/kg (Fig7.B), suggesting that inulin supplementation to the HF diet did not restore sensitivity to CCK. Surprisingly, LFI fed rats did not respond to either dose of CCK, suggesting greater loss of sensitivity to CCK in these animals (Fig 7.B).

### Discussion

WD-induced gut microbiota alterations have been described as factors contributing to multiples metabolic and central disorders (Arora *et al.*, 2016). WD feeding in rats is also characterized by a loss of CCK sensitivity that participates to the impairment of food intake regulation observed in DIO (de Lartigue *et al.*, 2011; Duca *et al.*, 2013). We aimed to investigate if WD-induced alterations in gut homeostasis and microbiota could drive the loss of CCK sensitivity in VANs. We showed that switching from a chow diet to SD, irrespective of fat percentage, modified caecal content metabolome suggesting alterations in gut microbiota metabolism. Adding inulin to SD impacted caecal metabolome but with different outcomes depending on fat content and with still marked differences compared to the caecal metabolome of chow-fed rats. In all these animals with disturbed microbiota metabolism, CCK sensitivity was blunted compared to chow-fed rats, providing evidences of a link between diet-induced altered microbiota and loss of CCK sensitivity.



# Figure 4: NMR-based metabolomics analysis of the caecal content of rats fed LFC, LFI, HFC and HFI.

O-PLS-DA score plots showing the discrimination between 1H NMR spectra of caecal contents from rats fed (A) C vs LFC vs LFI, (B) C vs HFC vs HFI, (C) LFC vs LFI vs HFC vs HFI diets, Parameters of the O-PLS models are given in supplementary table 1. (D) O-PLS-DA correlation loading plots relative to the discrimination between 1H NMR spectra of caecal contents from rats fed LFC vs LFI. Metabolites are color coded according their correlation coefficient, red indicating a very strong positive correlation (R2=0.9). The direction of the metabolite indicates the group with which it is positively associated as labeled on the diagrams.

Many studies have described changes in gut microbial diversity and composition in response to diets (Ley et al., 2005; Daniel et al., 2014). By analyzing the caecal metabolome using <sup>1</sup>H-NMR we were able to evaluate the consequences of such changes on the metabolic function of the microbiota, thus on the molecules directly in contact with the host. We showed that the caecal metabolome of chow-fed rats was significantly different from that of the SD-fed rats, irrespectively of the fat percentage. SDfed rats exhibited lower caecal levels of several nucleic acids (adenine, uracil, hypoxanthine). Similar decrease in uracil and hypoxanthine levels have been reported in the feces of DSS-induced colitic mice compared to healthy ones (Hong et al., 2010). SD-fed rats also exhibited decreased propionate caecal level and increased caecal levels of AA with a concomitant decrease in the level of 4hydroxyphenylacetate, a microbial product of aromatic AA metabolism. Similar metabolomics profiles with increased levels of AA and decreased levels of SCFA have been reported in the feces of ulcerative colitis patients (Bjerrum et al., 2015). Metabolic profiling has emerged as a valuable tool to evaluate modulation of gut microbiota composition in response to physiological, pathological or genetic stimuli and to serve as a fingerprint of biochemical perturbations unique to the nature, site or mechanism of a particular biological process (Storr et al., 2013). The similarity between the fecal metabolome of our SD-fed rats and of animal models and humans with an inflamed gut strongly suggests an intestinal inflammatory context after SD consumption.

The increased proportion of several AA in caecal content of SD-fed rats compared to chow-fed ones suggest altered protein and AA bacterial metabolism. In the caecal lumen, AA originate from proteolysis of undigested dietary protein or of endogenous proteins (secretory enzymes, exfoliated intestinal epithelial cells and mucus protein) but can also originate from bacterial endogenous synthesis (Davila et al., 2013; Neis et al., 2015; Boudry et al., 2016). The released AA can be incorporated into bacterial cells or metabolized by intestinal bacteria which form a variety of products including SCFA, indoles, phenols or H<sub>2</sub>S (Davila et al., 2013; Neis et al., 2015; Boudry et al., 2016). Our data do not allow evaluating the relative contribution of increased AA release versus decreased AA utilization by bacteria which would cause the elevated proportion of AA observed in the caecal contents of SD-fed rats. Increased level of AA in the caecal content could result from decreased abundance of AA-fermenting bacteria such as Proteobacteria and Clostridium (Dai et al., 2011) and/or to increased abundance of bacteria that endogenously synthetized AA including Prevotella spp and E.Coli (Dai et al., 2011). However, our group showed previously in the same experimental conditions opposite results with increased Clostridium and Proteobacteria and decreased Prevotella abundances in the caecum of rats after 6 week consumption of HF SD (Hamilton et al., 2015), ruling out this hypothesis. Another possible explanation is that increased AA caecal content could result from a reduction of AA absorption in the small intestine. Cellulose is the only source of fibers in the HFC and LFC compared to chow diet that contains a wide variety of fibers (Warden et al., 2008). In pigs, intestinal absorption of AA is decreased with increasing cellulose supplementation doses (Zhenggun et

Metabolites	Chow	LFC	HFC	<b>P-Value</b>
4-Hydroxyacétate	$1.04 \pm 0.16^{a}$	$0.46 \pm 0.13^{b}$	$0.45 \pm 0.11^{b}$	0.008
Adenine	$0.32\pm0.03^a$	$0.23\pm0.03^{ab}$	$0.19 \pm 0.03^{b}$	0.008
Alanine	$1.80 \pm 0.20^{a}$	$2.89 \pm 0.15^{b}$	$2.68 \pm 0.03^{b}$	<0.0001
Hypoxanthine	$17.41 \pm 0.43^{a}$	$12.61 \pm 1.19^{b}$	$0.45 \pm 0.11^{b}$	0.008
Lactate	$2.60 \pm 0.25^{a}$	$3.77 \pm 0.39^{ab}$	$4.75 \pm 0.50^{b}$	0.003
Lysine	$0.53 \pm 0.05^{a}$	$0.78\pm0.05^{\rm b}$	$0.80\pm0.05^{\mathrm{b}}$	0.004
Phenylalanine	$12.02 \pm 1.42^{a}$	$16.71 \pm 1.30^{b}$	$17.36 \pm 0.76^{b}$	0.009
Propionate	$9.43 \pm 0.51^{a}$	$6.24 \pm 1.21^{ab}$	$5.90 \pm 0.99^{b}$	0.03
Uracil	$0.06 \pm 0.01^{a}$	$0.02 \pm 0.001^{b}$	$0.03 \pm 0.006^{b}$	0.004
Valine	$1.24 \pm 0.15^{a}$	$1.98 \pm 0.19^{b}$	$2.11 \pm 0.13^{b}$	0.002
UK1	$10.4 \pm 1.25^{a}$	$0.65 \pm 0.07^{ m b}$	$0.87 \pm 0.11^{b}$	0.0002
UK2	$0.30\pm0.03^{a}$	$0.03 \pm 0.003^{\mathrm{b}}$	$0.02 \pm 0.003^{b}$	< 0.0001

Table 3. Metabolites significantly changed in caecal content of rats fed synthetic diets relative to rats fed chow.

Data are mean  $\pm$  SEM. Letters denote significance (P<0.05)

Table 4. Metabolites significantly changed in caecal content of rats fed synthetic diets enriched in inuli
relative to rats fed synthetic diets enriched in cellulose.

						Two-ways anova		
	С	LFC	LFI	HFC	HFI	Fat	Fibers	Interaction
Alanine	$1.79\pm0.20$	$2,\!87\pm0,\!15$	$3,\!80\pm0,\!33$	$2{,}68 \pm 0{,}03$	$3,\!18\pm0,\!19$	0,065	0,003	0,348
Aspartate	$0.27\pm0.02$	$0,35 \pm 0,02^{a}$	$0,\!89\pm0.09^{b}$	$0{,}38\pm0{,}05^a$	$0,54 \pm 0,08^{a}$	0,018	0,001	0,007
Butyrate	$77.39 \pm 8.14$	$58.37 \pm 7.98$	$41.43 \pm 4.43$	$63.94 \pm 13.43$	$42.96\pm.53$	0.807	0.037	0.807
β-Glucose	$0.38\pm0.03$	$0.49\pm0.05^a$	$0.28\pm0.03^{b}$	$0.35\pm0.05^{ab}$	$0.40\pm0.07^{ab}$	0.88	0.15	0.017
Choline	$0.36\pm0.07$	$0.29\pm0.04$	$0.60\pm0.09$	$0.31\pm0.03$	$0.39\pm0.05$	0.127	0.003	0.059
Glutamate	$184.5\pm13.58$	$184.9\pm13.42$	$324.5\pm25.62$	$188.6\pm2.71$	$242.2\pm35.44$	0.121	0,001	0,106
Phenylalanine	$12.02\pm1.42$	$16.71 \pm 1.35$	$25.15\pm1.96$	$17.36\pm0.76$	$22.02\pm0{,}98$	0,367	<0,001	0,174
Tyrosine	$15.75\pm1.94$	$21.24\pm0.74$	$34.09\pm2.90$	$22.33\pm0.95$	$29.63\pm0.81$	0.245	<0,001	0.088
Valine	$1.24\pm0.16$	$1,\!98\pm0,\!19$	$2,94 \pm 0,31$	$2.11 \pm 0.13$	$2.67\pm0.22$	0,744	0,002	0,389

Data are mean  $\pm$  SEM. Two-ways anova was done within SD-fed rats. Letters denote significance (P<0.05)

*al.*, 2016). The authors suggested that cellulose increases small intestine motility thereby reducing the time for gastrointestinal absorption (Zhengqun *et al.*, 2016). Another possible explanation is the protein sources that differ between diets: while SD are composed only of caseins, chow diet contains several protein sources (soybean meal, fish meal, alfalfa meal, whey, porcine meat). The type of proteins in diet alters the gut microbiota composition and metabolism (An *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2016). Therefore, presence of caseins in the SD might alter gut microbiota AA metabolism resulting in increased AA proportion in caecal lumen. Taken together, these results suggest that the type of fibers and proteins are the main differences in composition between chow and SD that might drive the alterations of gut microbiota.

Despite a strong increase in fat content from 10 to 45% of energy, the percentage of fat did not modify caecal metabolome. Many gut bacteria are able to metabolize dietary lipids through different enzymatic processes (hydroxylation, hydrogenation, oxidation...) and we had speculated that the level of dietary fat would alter the gut microbiota composition and/or metabolome. Indeed, several studies showed modifications in gut microbiota composition with fat percentage although with inconsistent results in the fat-induced changes in bacteria abundances (de La Serre *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). In humans though, increasing fat content in the large intestine through the inhibition of fat absorption did not modify gut microbiota composition (Morales *et al.*, 2016). We and others (Chassaing *et al.*, 2015) described no major differences between caecal metabolomes or SCFA levels of LF and HF fed animals (Chassaing *et al.*, 2015; Matziouridou *et al.*, 2016), despite the increased fat proportion in caecal content following HF feeding (Hamilton *et al.*, 2015). Our results therefore strongly suggest that fat is not the main driver of microbiota changes observed in obesity studies.

Inulin supplementation impacted differently the caecal metabolome of HF and LF-fed animals. While in LF-fed animals, adding inulin significantly changed the caecal metabolic profile, it had less impact in HF-fed rats. Yet, the addition of inulin in HF-diet induced similar trends in caecal metabolite changes than those observed in LF-fed rats, including increased AA levels. Inulin supplementation has been associated with increased mucin secretion in the caecal lumen in rats fed with SD (Van den Abbeele *et al.*, 2011). Moreover, inulin increases the abundance of proteolytic bacteria including *Enterococcus* and bacteria belonging to the genus *Clostridium* (Cani *et al.*, 2009). Thereby, with increased proteolytic activities and elevated mucin secretion, inulin-fed rats could exhibit elevated AA levels in the caecal lumen. Furthermore, fermentation of AA by bacteria is decreased at low pH compared to neutral pH (Dai *et al.*, 2011). Relative to cellulose, adding inulin to a diet decreases caecal pH (Juskiewicz *et al.*, 2004; Zdunczyk *et al.*, 2004; Van den Abbeele *et al.*, 2011) and might therefore reduce AA bacterial fermentation. Besides modulating pH, inulin supplementation has also been associated to modulation of SCFA bacterial production despite conflicting results in the literature (Daubioul *et al.*, 2002; Van den Abbeele *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2013; Boets *et al.*, 2015; Chassaing *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2015; Weitkunat *et al.*, 2015). In our model, inulin did not



Figure 5: Intestinal homeostasis – Caecal tissue and content weights Caecum tissue relative weight (A-B) and Caecum content relative weight (C-D) of chow, LFC and HFC-fed rats (A-C) and LFC, LFI, HFC and HFI-fed rats (B-D). Values aremeans  $\pm$  SEM of n=8 rats per group. Letters denote significance (P<0.05) after Bonferroni's test. The sign § denotes significance (P<0.05) between groups fed the inulin and cellulose-supplemented diets irrespectively of the fat percentage.





Intestinal alkaline phosphatase activity in the caecum of chow, LFC and HFC (A) and LFC, LFI, HFC and HFI- fed rats (B). Values are means  $\pm$  SEM of n=8 rats per group. The sign § denotes significance (P<0.05) between groups fed the inulin and cellulose-supplemented diets irrespectively of the fat percentage. Letters denote significance (P<0.05) after Bonferroni's test.

impact SCFA caecal level compared to cellulose and even reduced butyrate levels in LFI rats. In mice, inulin supplementation increased acetate production but did not modify butyrate and propionate caecal levels (Chassaing *et al.*, 2015). In humans, two studies even showed a decreased SCFA concentrations during inulin supplementation (Teixeira *et al.*, 2013; Salazar *et al.*, 2015). Despite no evident effect of inulin on caecal SCFA level in our model, inulin supplementation restored caecal tissue and content weights as already observed (Juskiewicz *et al.*, 2004; Van den Abbeele *et al.*, 2011; Chassaing *et al.*, 2015). Moreover, IAP caecal activity was reduced in inulin-fed animals relatively to cellulose-fed ones, although still different from that of chow-fed rats. This improved gut homeostasis suggests that inulin might have enhanced gut microbiota SCFA production that was used by the colonocytes, resulted in colonocytes proliferation, caecal weight restoration and decreased IAP activity. This enhanced absorption of SCFA by colonocytes thus prevented their detection in the caecal metabolome of inulin-fed rats. Thus, our results suggest that adding inulin to a SD improved caecal homeostasis in both LF and HF-fed animals, yet the host-microbiota interactions in these inulin-supplemented animals were still different from that of chow fed rats.

DIO is characterized by a state of leptin resistance that leads to decreased sensitivity to the main anorexigenic gut hormone CCK in VANs (de Lartigue *et al.*, 2012). Our study is the first to demonstrate the effects of SD feeding on CCK sensitivity in VANs. We showed that, in parallel to drastic changes in caecal metabolome, consumption of SD for 8 weeks reduced the sensitivity to CCK, irrespective of fat content and fiber type in the diet. Loss of CCK sensitivity has been described as a consequence of leptin resistance in VANs, characterized by increased SOCS3 expression in response to leptin injection (de Lartigue *et al.*, 2011). We did not investigate the precise mechanisms involved in the reduced sensitivity to CCK in our model but we have preliminary data suggesting a disruption of leptin signaling in VANs during SD feeding. Indeed, protein expression of PTP1b, a protein that inhibits leptin signaling, increased in VANs in response to leptin injection in chow fed rats. Conversely, in SD-fed rats, PTP1b protein expression in VANs was similar in response to either saline or leptin injections (data not show). Yet further investigations are needed to better understand the link between altered microbiota and disruption of leptin signaling in VANs.

Unexpectedly, LFI-fed rats exhibited a particular phenotype characterized by an absence of response to CCK at both doses tested suggesting that CCK sensitivity was more disrupted in LFI rats than in the others groups. At the same time, the caecal metabolome of LFI was slightly different from that of other SD-fed animals with among others, more aspartate and glutamate. Aspartate and glutamate have been identified as ligands for N-methyl-D-aspartate receptors expressed in the synapse between VANs and the nervous central system (Chen *et al.*, 2005; de Lartigue, 2014). Thus, increased aspartate and glutamate levels which would activate continuously NDMA and blunt VANs CCK activation resulting in



### Figure 7: CCK sensitivity.

A-B) 20 minutes food intake (grams/100g of body weight) after intraperitoneal injection of either saline (400 µl) or CCK-8S at the lowest dose (0.8nM µg/kg body weight or the highest dose (2.6 nM/kg of body weight) of chow, LFC and HFC-fed rats (A) and LFC, LFI, HFC and HFI-fed rats (B) Values are means  $\pm$  SEM of n=8 rats per group. All rats within each group received both vehicle and CCK, results are expressed paired. Significance determined was by paired student's t-test between saline and CCK and denoted by \*.

reduced overall food intake and no response to CCK. Hence, we showed that adding inulin to LF diet exerts deleterious effects inducing an exaggerated alteration of CCK sensitivity.

Most of the obesity studies using DIO rodent models compared differences between the consumption of synthetic HF diet and either standard chow diet or synthetic LF diet. Our results showed that consumption of synthetic HFC for 8 weeks, but not LFC, increased weight gain and adiposity relative to C rats. Yet, the gut microbiota metabolome of HFC and LFC animals was very similar. This suggests that fat content of the diet and not gut microbiota alterations is the main driver of weight gain and adiposity in our model. Moreover, inulin supplementation altered gut microbiota metabolism without modifying adiposity or weight gain, endorsing this hypothesis. Along with our results, Rabot et al showed that mice transplanted with microbiota from lean or obese donors exhibited the same body composition but differences in glucose metabolism (Rabot et al., 2016). Furthermore, Wistar rats fed either chow or LFD exhibited the same weight gain but only the LFD rats presented metabolic disorders (Sampey et al., 2011). Taken together, these data suggest that gut microbiota might be more involved in WD-induced metabolic disorders than regulation of body mass composition. Our study provides evidence that gut microbiota metabolism alterations, and not fat content of the diet nor obesity, are also involved in the disturbances of satiety induced by WD consumption. Targeting the microbiota through inulin was not sufficient to restore normal gut-brain axis function in our model and further studies are needed to select efficient microbiota-targeted strategies.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Cécile Canlet from the French National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics (MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010) for her help with the NMR facility and Dr. Olivier Cloarec from Korrigan Sciences Limited for providing the matlab functions for analysis of NMR data.

### References

- An, C., T. Kuda, et al. (2014). "Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal." <u>Applied microbiology and biotechnology</u> **98**(6): 2779-2787.
- Anastasovska, J., T. Arora, et al. (2012). "Fermentable carbohydrate alters hypothalamic neuronal activity and protects against the obesogenic environment." <u>Obesity (Silver Spring)</u> **20**(5): 1016-1023.
- Arora, T. and F. Backhed (2016). "The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives." Journal of internal medicine.
- Bai, G., K. Ni, et al. (2016). "Dietary Casein and Soy Protein Isolate Modulate the Effects of Raffinose and Fructooligosaccharides on the Composition and Fermentation of Gut Microbiota in Rats." Journal of food science 81(8): H2093-2098.
- Benoit, B., P. Plaisancie, et al. (2013). "High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet." <u>Nutrition research</u> **33**(11): 952-960.
- Bjerrum, J. T., Y. Wang, et al. (2015). "Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals." <u>Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society</u> **11**: 122-133.
- Boets, E., L. Deroover, et al. (2015). "Quantification of in Vivo Colonic Short Chain Fatty Acid Production from Inulin." <u>Nutrients</u> **7**(11): 8916-8929.
- Boudry, G., I. Huëron-Luron, et al. (2016). Dietary Protein and Colonic Microbiota : Molecular Aspects. <u>The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins</u>. A. Press, Nikki Levy.
- Cani, P. D., S. Possemiers, et al. (2009). "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." <u>Gut</u> 58(8): 1091-1103.
- Chassaing, B., J. Miles-Brown, et al. (2015). "Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice." <u>Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol</u> **309**(7): G528-541.
- Chen, P. E., M. T. Geballe, et al. (2005). "Structural features of the glutamate binding site in recombinant NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors determined by site-directed mutagenesis and molecular modeling." <u>Molecular pharmacology</u> **67**(5): 1470-1484.
- Cloarec, O., M. E. Dumas, et al. (2005). "Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1H NMR spectroscopic metabonomic studies." <u>Analytical chemistry</u> 77(2): 517-526.
- Covasa, M. and R. C. Ritter (1998). "Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin." <u>Peptides</u> **19**(8): 1407-1415.
- Dai, Z. L., G. Wu, et al. (2011). "Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health." <u>Frontiers in bioscience</u> **16**: 1768-1786.
- Daniel, H., A. Moghaddas Gholami, et al. (2014). "High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice." <u>The ISME journal</u> **8**(2): 295-308.
- Daubioul, C., N. Rousseau, et al. (2002). "Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats." J Nutr **132**(5): 967-973.
- David, L. A., C. F. Maurice, et al. (2014). "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." <u>Nature</u> **505**(7484): 559-563.
- Davila, A. M., F. Blachier, et al. (2013). "Re-print of "Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host"." <u>Pharmacological research</u> **69**(1): 114-126.
- de La Serre, C. B., G. de Lartigue, et al. (2015). "Chronic exposure to low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons." <u>Physiology & behavior</u> **139**: 188-194.

- de La Serre, C. B., C. L. Ellis, et al. (2010). "Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation." <u>Am J Physiol</u> <u>Gastrointest Liver Physiol</u> **299**(2): G440-448.
- de Lartigue, G. (2014). "Putative roles of neuropeptides in vagal afferent signaling." <u>Physiology & behavior</u> **136**: 155-169.
- de Lartigue, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2011). "Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **301**(1): E187-195.
- de Lartigue, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2012). "Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats." <u>PLoS One</u> **7**(3): e32967.
- de Lartigue, G., C. B. de La Serre, et al. (2011). "Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin." <u>Physiology & behavior</u> **105**(1): 100-105.
- de Lartigue, G., R. Dimaline, et al. (2007). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **27**(11): 2876-2882.
- de Lartigue, G., C. C. Ronveaux, et al. (2014). "Vagal plasticity the key to obesity." <u>Molecular</u> <u>metabolism</u> **3**(9): 855-856.
- Dieterle, F., A. Ross, et al. (2006). "Metabolite projection analysis for fast identification of metabolites in metabonomics. Application in an amiodarone study." <u>Analytical chemistry</u> **78**(11): 3551-3561.
- Dockray, G. J. (2014). "Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain." <u>The</u> Journal of physiology **592**(14): 2927-2941.
- Duca, F. A., Y. Sakar, et al. (2013). "The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity." <u>The Journal of nutritional biochemistry</u> **24**(10): 1663-1677.
- Duca, F. A., L. Zhong, et al. (2013). "Reduced CCK signaling in obese-prone rats fed a high fat diet." <u>Hormones and behavior</u> **64**(5): 812-817.
- Everard, A. and P. D. Cani (2013). "Diabetes, obesity and gut microbiota." <u>Best practice & research.</u> <u>Clinical gastroenterology</u> **27**(1): 73-83.
- Everard, A., V. Lazarevic, et al. (2014). "Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity." <u>The ISME journal</u> **8**(10): 2116-2130.
- Guerville, M. and G. Boudry (2016). "Gastro-intestinal and hepatic mechanisms limiting the entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation." <u>Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol</u>: ajpgi 00098 02016.
- Hamilton, M. K., G. Boudry, et al. (2015). "Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent." <u>Am J Physiol Gastrointest Liver</u> <u>Physiol</u> **308**(10): G840-851.
- Hong, Y. S., Y. T. Ahn, et al. (2010). "1H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model." <u>Archives of pharmacal research</u> **33**(7): 1091-1101.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." <u>Nature</u> **444**(7121): 860-867.
- Johnson, A. R., J. J. Milner, et al. (2012). "The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity." <u>Immunol Rev</u> **249**(1): 218-238.
- Juskiewicz, J. and Z. Zdunczyk (2004). "Effects of cellulose, carboxymethylcellulose and inulin fed to rats as single supplements or in combinations on their caecal parameters." <u>Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology</u> **139**(4): 513-519.
- Kim, K. A., W. Gu, et al. (2012). "High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway." <u>PLoS One</u> **7**(10): e47713.
- Ley, R. E., F. Backhed, et al. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(31): 11070-11075.

Matziouridou, C., N. Marungruang, et al. (2016). "Lingonberries reduce atherosclerosis in Apoe(-/-) mice in association with altered gut microbiota composition and improved lipid profile." <u>Mol Nutr</u> <u>Food Res</u> **60**(5): 1150-1160.

- Morales, P., S. Fujio, et al. (2016). "Impact of Dietary Lipids on Colonic Function and Microbiota: An Experimental Approach Involving Orlistat-Induced Fat Malabsorption in Human Volunteers." <u>Clinical and translational gastroenterology</u> **7**: e161.
- Naznin, F., K. Toshinai, et al. (2015). "Diet-induced obesity causes peripheral and central ghrelin resistance by promoting inflammation." <u>The Journal of endocrinology</u> **226**(1): 81-92.
- Neis, E. P., C. H. Dejong, et al. (2015). "The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism." <u>Nutrients</u> **7**(4): 2930-2946.
- Rabot, S., M. Membrez, et al. (2016). "High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice." <u>Scientific reports</u> **6**: 32484.
- Raybould, H. E. (2007). "Mechanisms of CCK signaling from gut to brain." <u>Current opinion in</u> <u>pharmacology</u> **7**(6): 570-574.
- Salazar, N., E. M. Dewulf, et al. (2015). "Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women." <u>Clinical nutrition</u> **34**(3): 501-507.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." <u>Obesity (Silver Spring)</u> **19**(6): 1109-1117.
- Storr, M., H. J. Vogel, et al. (2013). "Metabolomics: is it useful for inflammatory bowel diseases?" <u>Current opinion in gastroenterology</u> **29**(4): 378-383.
- Teixeira, T. F., L. Grzeskowiak, et al. (2013). "Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors." <u>The British journal of nutrition</u> **109**(5): 914-919.
- Van den Abbeele, P., P. Gerard, et al. (2011). "Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats." <u>Environ Microbiol</u> **13**(10): 2667-2680.
- Veselkov, K. A., J. C. Lindon, et al. (2009). "Recursive segment-wise peak alignment of biological (1)h NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery." <u>Analytical chemistry</u> **81**(1): 56-66.
- Waise, T. M., K. Toshinai, et al. (2015). "One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice." <u>Biochemical and biophysical research communications</u> 464(4): 1157-1162.
- Warden, C. H. and J. S. Fisler (2008). "Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding." <u>Cell Metab</u> **7**(4): 277.
- Weitkunat, K., S. Schumann, et al. (2015). "Effects of dietary inulin on bacterial growth, short-chain fatty acid production and hepatic lipid metabolism in gnotobiotic mice." <u>The Journal of nutritional biochemistry</u> **26**(9): 929-937.
- Yan, H., R. Potu, et al. (2013). "Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig." <u>PLoS One</u> **8**(4): e59581.
- Zdunczyk, Z., J. Juskiewicz, et al. (2004). "Physiological effects of lactulose and inulin in the caecum of rats." <u>Archives of animal nutrition</u> **58**(1): 89-98.
- Zhengqun, L., L. Shuaibing, et al. (2016). "Effects of dietary cellulose levels on the estimation of endogenous amino acid losses and amino acid digestibility for growing pigs." <u>Animal Nutrition</u> **2**(2): 74-78.
# Article 3 :

## Une exposition chronique au LPS, chez le rat, induirait de façon dépendante de la dose de LPS, des modifications du rétrocontrôle de la signalisation de la leptine *via* PTP1b dans les VANs

Les résultats de mon deuxième article ont montré le rôle crucial du microbiote dans la perte de sensibilité aux signaux satiétogènes des VANs. Par ailleurs, l'équipe d'Helen Raybould a identifié les LPS comme des facteurs contribuant à la résistance à la leptine dans les VANs via notamment la surexpression de SOCS3 (une protéine inhibitrice de la signalisation de la leptine). Ainsi, l'objectif de notre étude a été de continuer à explorer les relations entre LPS et résistance à la leptine des VANs. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la variation d'expression d'une seconde protéine inhibitrice de la signalisation de la leptine, PTP1b lors d'une exposition chronique au LPS. L'exposition au LPS a été induite par trois modèles différents. In vivo, l'exposition au LPS a été obtenue soit par la consommation chronique d'un régime obesogène ou par des injections quotidiennes de LPS. Enfin, un modèle in vitro de culture primaire de nerf vague infusés avec du LPS a été développé. Grâce à ces trois modèles, nous avons montré que de fortes doses de LPS injectées (100µg/kg pendant 7 jours) augmenteraient l'expression protéique basale de PTP1b au niveau des VANs. En revanche, l'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime obésogène n'induit pas de modification de l'expression génique ou protéique basale de PTP1b mais pourrait modifier le rétrocontrôle de la signalisation de la leptine via PTP1b. L'ensemble de ces résultats suggère que PTP1b pourrait être une protéine impliquée dans la résistance à la leptine au niveau des VANs et serait ainsi une nouvelle piste thérapeutique pour limiter l'hyperphagie liée à l'obésité.

Deux modèles d'exposition chronique au LPS (*in vitro* et injections chronique de LPS) ainsi que leur analyse de laboratoire ont été réalisés au laboratoire d'Helen Raybould à UC Davis avec l'aide de Charlotte Ronveaux et Ricky Stephens. Le second modèle *in vivo* d'endotoxémie métabolique utilise les échantillons des animaux des articles 1 (Cal, WDal et WDpf<sup>high endotoxemia</sup>) et 2 (C, HFC). Il a donc été réalisé à l'INRA de St Gilles et à UC Davis.

Ces résultats sont présentés en français sous forme d'article mais nous semblent, à l'heure actuelle, trop préliminaires pour pouvoir être publiés.

### Introduction

Le nerf vague joue un rôle majeur dans le contrôle de la prise alimentaire, il reçoit les informations des organes périphériques et les relaye jusqu'au système nerveux central (SNC). Innervant les cryptes et les villosités du duodénum proximal, les neurones afférents du vague (VANs) sont très proches des hormones synthétisées par les cellules entero-endocrines en réponse à un repas (Dockray, 2014). En fonction de l'état nutritionnel, les hormones produites vont interagir avec leurs récepteurs exprimés sur les VANs, moduler l'activité neuronale du nerf vague et ainsi envoyer des signaux de faim ou de satiété au SNC (Dockray, 2014). Parmi ces hormones, la leptine et la cholécystokinine (CCK) sont essentielles à l'induction de la satiété (de Lartigue *et al.*, 2007).

Cependant, la régulation de la prise alimentaire par le nerf vague peut être altérée dans certaines situations pathologiques telles que l'obésité. En effet, les travaux de de Lartigue et collaborateurs ont montré qu'en complément de l'hypothalamus, les VANs présentent également une résistance à la leptine définie comme une baisse de la signalisation intracellulaire de la leptine (de Lartigue *et al.*, 2011). Au niveau des VANs, la résistance à la leptine se traduit par une diminution de l'activité neuronale associée à une perte de sensibilité aux hormones anorexigènes telles que la CCK (de Lartigue *et al.*, 2011; de Lartigue *et al.*, 2012). Même si la résistance à la leptine des VANs chez des animaux obèses semble maintenant bien établie, les mécanismes déclencheurs ne sont pas encore connus.

L'obésité est caractérisée comme un état d'inflammation chronique de bas grade pouvant avoir comme origine la présence dans le sang d'un composé des membranes bactériennes intestinales : le lipopolysaccharide (LPS) (Cani *et al.*, 2007). Localisés à proximité de la muqueuse intestinale, les VANs qui expriment TLR4 (Hosoi *et al.*, 2005) peuvent interagir avec le LPS. En effet, une infusion de LPS produit une décharge de calcium sur des cultures primaires de nerf vague (Riley *et al.*, 2013) et une administration intra-jéjunale ou plasmatique de LPS active les neurones du SNC où projettent les VANs (Gakis *et al.*, 2009). De plus, sur des cultures primaires de ganglion noueux, une infusion de LPS induit une dérégulation de la signalisation de la leptine caractérisée par une augmentation dose-dépendante de l'expression SOCS3, une des principales protéines inhibitrices de la signalisation intracellulaire de la leptine (de Lartigue *et al.*, 2011). De même, une infusion chronique de LPS pendant 6 semaines (12.5  $\mu$ g/kg de poids) à l'aide de mini-pompes implantées chez le rat induit une résistance à la leptine au niveau de VANs (de La Serre *et al.*, 2015). En conséquence, ces animaux présentaient une perte de sensibilité à la CCK conduisant à une hyperphagie et une obésité (de La serre *et al.*, 2015). Ainsi, l'élévation de l'endotoxémie, pourrait être un facteur déclencheur de la résistance à la leptine des VANs observée lors de l'obésité.

La signalisation de la leptine est majoritairement régulée par des tyrosines phosphatases via la dephosphorylation des résidus phosphotyrosine présents sur le récepteur Ob-Rb et d'autres molécules de signalisation (Cheng *et al.*, 2002; Tsou *et al.*, 2012). Plusieurs études ont décrit le rôle crucial de la tyrosine phosphatase-1B (PTP1b) dans le développement de la résistance à la leptine de nombreux tissus et l'obésité (Cheng *et al.*, 2002; Bence *et al.*, 2006; Banno *et al.*, 2010). Les animaux déficients pour PTP1b présentent une augmentation de la sensibilité à la leptine, un gain de poids inférieur sous régimes standard et obesogène ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique comparé à des animaux sauvages (Bence *et al.*, 2006; Banno *et al.*, 2010). De même, les animaux génétiquement obèses ou DIO présentent une surexpression de PTP1b dans de nombreux tissus tels que le foie, le muscle, le tissu adipeux et certaines aires de l'hypothalamus, par un mécanisme impliquant la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$ . Par ailleurs, il a été montré dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* que le LPS, puissant inducteur de la production de cytokines pro-inflammatoires, stimule l'expression de PTP1b au niveau central (Song *et al.*, 2016) (Borges Bde *et al.*, 2015). La résistance à la leptine induite par le LPS pourrait ainsi être médiée par une surexpression de PTP1b.

Le but de notre étude était d'évaluer l'impact du LPS sur l'expression de PTP1b au niveau des VANs, *via* trois modèles d'exposition chronique au LPS. Dans notre premier modèle, l'exposition au LPS a été induite par la consommation chronique d'un régime obesogène, modèle dans lequel nous avons récemment montré que les taux circulants de LPS-binding protein (LBP) étaient augmentés, suggérant une exposition chronique au LPS. Dans ce modèle, un sous-groupe d'animaux dont la consommation alimentaire était contrôlée et qui présentaient à la fois des taux circulants de LBP de LPS libre élevés (WDpf <sup>high LPS</sup>) a également était inclus (article 1). Nous avons également utilisé, les animaux Chow et HFC issus de l'article 2 comme modèle d'endotoxémie métabolique. Dans un deuxième modèle, des injections chroniques de LPS ont été réalisées. Enfin, nous avons utilisé des cultures primaires de ganglions noueux infusés avec du LPS comme troisième modèle.

### Matériels et méthodes

# 1<sup>er</sup> modèle : Exposition chronique au LPS *via* la consommation d'un régime obesogène

#### Animaux

#### Exp 1-Article 1 :

Les expériences ont été réalisées selon les recommandations de l'Union Européenne pour le bien-être animal (2003/35CEE). Des rats Wistar males (âgés de 8-9 semaines, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) ont été hébergés à  $22^{\circ}$ C  $\pm 2^{\circ}$ C selon un cycle de 12h jour/12h nuit. Ils avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à l'aliment d'animalerie standard (Special Diets Services, Rat and Mouse N°3 Breeding, Witham, UK, 11% lipides, 3.63 kCal/gm) pendant une semaine d'acclimatation avant le début de l'étude.

Après l'acclimatation, les rats ont été séparés en 3 groupes : un groupe contrôle nourris *ad libitum* avec le régime standard (n=12), un groupe WD*al* (n=12) nourris avec un régime WD (Research diets D12451, 45% lipides 4.73 kcal/g ). Le dernier groupe WD*pf* (n=12) a été nourri avec le même régime WD mais au même niveau énergétique que les contrôles durant la première semaine uniquement dans le but de supprimer l'hyperphagie initiale induite par la consommation d'un régime WD. Les animaux ont été euthanasiés après 1 et 6 semaines de régime.

#### Exp 2 – Article 2 :

Des rats Wistar males (âgés de 8-9 semaines, 280-370g Harlan San Diego, CA) ont été manipulés et hébergés en accord avec les protocoles développés par l'« institutional animal care and use committee » de l'université de Californie, Davis. Les animaux ont été hébergés à  $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  selon un cycle de 12h jour/12h nuit. Ils avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à l'aliment standard d'animalerie (Purina Lab Diet 5001 rodent diet; 13% lipides 28% protéines 58% Glucides; 3.36 kcal/g). Après une semaine d'acclimatation, les animaux ont été séparés en 5 groupes nourris avec 5 régimes différents. Cependant, dans ce modèle, nous n'utiliserons les données que des animaux nourris avec un régime standard d'animalerie C ou obésogène (HFC; Research diets D12451, 45% lipides 4.73 kcal/g) pendant 8 semaines.

Gènes	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
TLR4	GGTCGAATTGTATCGCCTTCT	CACAGCAGAAACCCAGATGA
MD2	ACTCCATAGAATTGCCGAAGC	TGGTGAATGATGGTGAAATTCAAAC
PTP1B	GGGTGGAGGTCTTCAAAGTG	GCCGCAGACCAAATCCTAA
SOCS3	CAGCGCCACTTCTTCACA	GGTTCCGTCGGTGGTAAAG
MCP-1	GTCTCAGCCAGATGCAGTTAAT	GCTGAAGTCCTTAGGGTTGATG
CCK-1R	AAGAGGATGCGGACGGT	GAGATGGCTACCAGGTTGAAG
Y2R	GTGCCATTTGGTGCCCTAT	AGTGAGTACTCCCGGAAGATG
CNR1	CTGGCCATCGCTGTACT	TTACGGTGGAATACATGGAAGT

Tableau 22 : Séquences des primers utilisées dans l'étude

#### Euthanasie et prise d'échantillons

#### Exp 1-Article 1 :

Après avoir été mis à jeun la nuit, les animaux ont été re-nourris pendant 2 heures avec leurs régimes respectifs, soit *ad libitum* (WD*al*) soit pair fed avec les C (WD*pf*). Ils ont été euthanasiés par une asphyxie au CO<sup>2</sup> suivie d'une ponction cardiaque.

Le plasma a été obtenu après centrifugation (4°C, 10 000 RPM, 15 minutes) et stocké à -80°C. L'adiposité a été calculée comme la somme des tissus adipeux mésentériques, epididymaux et retroperitonéaux divisée par le poids total de l'animal X 100. Les ganglions noueux ont été extraits, congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

#### Exp 2 -Article 2 :

Après une nuit à jeun, les animaux ont été injectées soit avec du sérum physiologique (400µl) ou de la leptine (80ug/kg de poids). Deux heures après l'injection, les rats ont été euthanasiés par une ponction cardiaque sous anesthésie à l'isoflurane. L'adiposité a été calculée comme la somme des tissus adipeux mésentériques, epididymaux et retroperitonéaux divisée par le poids total de l'animal X 100. Les ganglions noueux ont été extraits, congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

#### RT-qPCR sur les ganglions noueux

Les ARN de ganglion noueux ont été extraits *via* la méthode au Trizol (15596-018 ; Fischer Scientific) puis quantifiés grâce au Denovix. Par l'utilisation du kit High Capacity Complementary DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), 2  $\mu$ g d'ARN ont ensuite été convertis en ADNc selon les recommandations du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée grâce à l'appareil StepOnePlus real-time PCR utilisant le SyberGreen master mix comme système de détection. Les primers utilisés sont listés dans le tableau 22, ils ont été désignés grâce au logiciel « Integrated DNA Technologies Primer Quest ». Les primers amplifiant MCHR, GHSR, ObR, OXR1, IL-1B et TNF- $\alpha$  ont été testés mais leurs efficacités n'étaient pas satisfaisantes Les gènes Actine et GAPDH ont été utilisés comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en 2<sup>-ddct</sup> en prenant les animaux contrôles pour chaque semaine comme référence.

#### Western Blot

Les protéines de ganglion noueux et d'hypothalamus ont été extraites à l'aide d'un tampon Tris-base EDTA (1% triton, 1% d'inhibiteurs de protéases, 1% d'inhibiteurs de phosphatase et 3% PMSF). Puis 5 µg de protéines ont été déposés dans un Gel Bis Tris à 10% (Invitrogen NuPage). Les protéines ont ensuite migré pendant 50 minutes à 200V/160mA/25W (Invitrogen Power Case 500). Les protéines ont été transférées sur une membrane PDVF (Biorad #162-0174 7.0cm x 8.5cm) pendant 1 heure à 30V/160mA/18W. Les membranes ont été bloquées avec une solution de PBS contenant 10% de BSA à température ambiante. L'anticorps de lapin Anti-PTP1b (Abcam, ab189179) a été dilué à 1 :500 et

l'anticorps de lapin Anti-GAPDH (Cell Signalling, 14C10) a été utilisé comme contrôle de dépôt et dilué à 1 :1000. Les anticorps primaires ont été déposés sur la membrane et développés séparément. Ils ont été incubés 1h à température ambiante puis toute la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody#7074) ont été incubés pendant 1h à température ambiante. Enfin, les membranes ont été révélées grâce au substrat ECL (Thermo Scientific) et l'imageur ChemiDoc XRS (Biorad, Hercules,CA) puis analysées par le logiciel Image Lab Version 5.0.

#### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (v5, San Diego, CA USA). Les données sont exprimées en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques ont été déterminées par un test Anova à un facteur pour chaque semaine suivi de tests post-hoc.

### 2<sup>ème</sup> modèle : Injection chronique de LPS

#### Animaux

Des rats Wistar males (âgés de 8-9 semaines, 280-370g Harlan San Diego, CA) ont été manipulés et hébergés en accord avec les protocoles développés par l'« institutional animal care and use committee » de l'université de Californie, Davis. Les animaux ont été hébergés à  $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  selon un cycle de 12h jour/12h nuit. Ils avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à l'aliment standard d'animalerie (Purina Lab Diet 5001 rodent diet; 13% lipides 28% protéines 58% Glucides; 3.36 kcal/g). Après une semaine d'acclimatation durant laquelle les animaux ont été habitués à une injection intra-péritonéale quotidienne de sérum physiologique, ils ont été séparés en 3 groupes : C, LPS1 et LPS7. Tous les animaux ont reçus une injection quotidienne à 9h30 durant 7 jours de D1 à D7. Les animaux C ont reçu une injection de 400µl de sérum physiologique de D1 à D7, les animaux LPS1 ont reçu de D1 à D6 une injection de 400µl de sérum physiologique puis une injection de LPS (100 µg/kg) à D7, enfin les animaux LPS7 ont reçu de D1 à D7 une injection quotidienne de LPS (100 µg/kg/jour). La prise alimentaire et le poids ont été mesurés quotidiennement.

#### Euthanasie et prise d'échantillons

Deux heures après la dernière injection (D7), les rats ont été euthanasiés par ponction cardiaque après une anesthésie à l'isoflurane. Le plasma a été obtenu après centrifugation (4°C, 10 000 RPM, 15 minutes) et stockés à -80°C. L'adiposité a été calculée comme la somme des tissus adipeux mésentériques, epididymaux et retropéritonéaux divisée par le poids final de l'animal X 100. L'hypothalamus et les ganglions noueux de 3 rats par groupe ont été disséqués, congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C. Les ganglions noueux des 3 autres rats ont été disséqués et stockés à 4°C dans une solution de PBS contenant 5% de sucrose.

#### Coupe de ganglions noueux et immunohistochimie

Les ganglions noueux ont été coupés (9um) au cryostat et montés sur lames Superfrost/Plus Slides (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA). Les coupes ont été bloquées avec une solution de PBS contenant 20% de sérum d'âne, 0,2% de Triton 100X et 0,1% d'albumine sérique bovine. Les coupes ont été ensuite incubées avec un anticorps Anti-PTP1b (Abcam, ab189179) dilué à 1:500, avec une solution de DS-PBS (2% de sérum d'âne, 0,2% de triton 100X et 0,1% d'albumine sérique bovine dilués dans du PBS), pendant 1h à température ambiante puis toute la nuit à 4°C. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin IgG conjugé à un fluorochrome AlexaFluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY) dilué à 1:1000 dans du DS-PBS, pendant 1h à 37°C. Les images ont été collectées avec un microscope confocal (BX661 System, Olympus, Melville, NY) à l'objectif 60X.

#### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (v5, San Diego, CA USA). Les données sont exprimées en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques ont été déterminées par un test Anova à un facteur suivi de tests post-hoc.

### 3<sup>ème</sup> modèle : Infusion de LPS sur des cultures primaires de ganglion noueux

#### Animaux

Des rats Wistar males (âgés de 8-9 semaines, 280-370g Harlan San Diego, CA) ont été manipulés et hébergés en accord avec les protocoles développés par l'« institutional animal care and use committee » de l'université de Californie, Davis. Les animaux ont été hébergés à  $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  selon un cycle de 12h jour/12h nuit. Ils avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à l'aliment standard d'animalerie (Purina Lab Diet 5001 rodent diet; 13% graisses 28% protéine 58% Glucides; 3.36 kcal/gm). Ils ont été euthanasiés par ponction cardiaque sous anesthésie à l'isoflurane.

#### Culture primaire de nerf vague

Les ganglions noueux ont été disséqués stérilement puis digérés 120 minutes à 37°C dans 3 ml d'HBSS contenant 6 mg de collagénase. Les cellules sont ensuite dispersées et rincées deux fois dans une solution de DMEM supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal et 3% d'antibiotiques-Antimycotiques puis placées dans 4 puits séparés. Les cellules ont été gardées en culture pendant 72 heures dans la solution de milieu de culture. Le milieu de culture était renouvelé 24h après la mise en culture. Les cellules sont ensuite utilisées pour étudier l'expression de protéines par immunohistochimie.

#### Méthodologie utilisée

L'objectif de ce travail était d'étudier l'impact d'une exposition plus ou moins longue de LPS sur la signalisation de la leptine et plus particulièrement l'expression des deux principaux inhibiteurs PTP1B et SOCS3.

Dans un premier temps, nous avons voulu répéter les résultats de de Lartigue et collaborateurs qui montrent qu'une infusion d'une heure avec du LPS à 50 ng/ml induisait une augmentation de l'expression protéique de SOCS3 sur des cultures primaires de ganglion noueux (de Lartigue *et al.*, 2011). Comme décrit dans l'article de de Lartigue, nous avons tout d'abord incubés les cellules dans du milieu sans sérum pendant 1h afin d'éviter toutes interactions possibles avec des protéines contenues dans le SVF. Les cellules ont ensuite été exposées à 4 conditions différentes :

Puits 1 : Milieu sans SVF

Puits 2 : LPS à 5 µg/ml pendant 2 heures

Puits 3 : Leptine à 1 mg/ml pendant 1 heure

Puits 4 : LPS à 5 µg/ml pendant 2heures + Leptine à 1 mg/ml pendant 1 heure

Les lames sur lesquelles reposent les cellules ont ensuite été bloquées avec une solution de PBS contenant 20% de sérum d'âne, 0,2% de Triton 100X et 0,1% d'albumine sérique bovine. Les lames ont été incubées avec un anticorps Anti-SOCS3 (Santa Cruz, CA) dilué à 1:100, avec une solution de DS-PBS (2% de sérum d'âne, 0,2% de triton 100X et 0,1% d'albumine sérique bovine dilués dans du PBS), pendant 1h à température ambiante puis toute la nuit à 4°C. Les lames ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin IgG conjugé à un fluorochrome AlexaFluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY) dilué à 1:1000 dans du DS-PBS, pendant 1h à 37°C. Les images ont été collectées avec un microscope confocal (BX661 System, Olympus, Melville, NY) à l'objectif 60X.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'impact d'une exposition de LPS sur l'expression de PTP1b. Comme précédemment, nous avons tout d'abord incubés les cellules dans du milieu sans sérum pendant 1h puis les cellules ont été exposées à 4 conditions différentes :

Puits 1 : Milieu sans SVF

Puits 2 : LPS à 5  $\mu$ g/ml pendant 1 heure

Puits 3 : Leptine à 1 mg/ml pendant 1 heure

Puits 4 : TNF-α à 50 ng/ml pendant 24 heures (utilisé comme contrôle positif (Zabolotny et al., 2008))

Le protocole d'immunohistochimie est le même que celui décrit précédemment à l'exception de l'anticorps primaire utilisé. Les lames ont été incubées avec un anti-corps Anti-PTP1b (Abcam, ab189179).



Figure 17 : Caractérisation du modèle d'endotoxémie métabolique

<u>Animaux issus de l'article 1 :</u> Evolution du gain de poids (% du poids initial) (A). Effet d'un régime obesogène pendant 1 et 6 semaines sur l'adiposité (B), la prise alimentaire (C), l'endotoxémie (E) et la concentration sérique de LBP (F). Après une nuit à jeun, les animaux ont été nourris pendant 2 heures durant lesquelles leur prise alimentaire a été mesurée afin d'évaluer les signaux de satiété en réponse à un repas (D).

<u>Animaux issus de l'article 2 :</u> Evolution du gain de poids (% du poids initial) (G), Index d'adiposité après 8 semaines de régime (H),

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. \* P<0,05 # P<0,10 vs contrôle

### Résultats

### 1<sup>er</sup> modèle : Endotoxémie métabolique

#### Caractérisation de l'endotoxémie métabolique

#### Exp1-Art 1 :

Les animaux WDal et WDpf ont pris significativement plus de poids que les animaux C dès la première semaine jusqu'à atteindre, à 6 semaines de régime, un gain de poids de 40% et 37% par rapport au poids initial, respectivement, contre 29% pour les animaux C (Figure 17-A). De la même manière, les animaux nourris avec un régime obesogène pendant 6 semaines ont développé une adiposité plus importante que les animaux C (Figure 17-B). Au niveau de la prise alimentaire, les rats WDal ont présenté une hyperphagie durant la première semaine de régime puis ont réduit leur apport calorique pour être au même niveau énergétique que les animaux C (Figure 17-C). Comme voulu dans l'étude, les animaux WDpf présentaient le même apport calorique que les animaux C durant toute la durée de l'étude (Figure 17-C). A 1 et 6 semaines de régime, les animaux ont été mis à jeun toute la nuit puis re-nourris pendant 2 heures avant euthanasie afin d'évaluer les signaux de satiété en réponse à un repas. Après une semaine de régime, les trois groupes de rats ont présenté une prise alimentaire similaire durant les 2 heures durant lesquelles ils ont été re-nourris (Figure 17-D). En revanche, à 6 semaines de régime, les animaux WDpf tendaient à consommer plus de calories que les animaux C (p=0.0536) (Figure 17-D).

Après une semaine de régime, l'endotoxémie était similaire entre les différents groupes (Figure 17-E). A l'inverse, les animaux WDpf présentaient une augmentation significative de 543 % et 1648 % comparés aux animaux et WDal, respectivement (p=0.0169 et p=0.0140, respectivement) (Figure 17-E). La concentration sérique de LPB était augmenté à 1 et 6 semaines chez les rats WDpf relativement aux animaux C (p=0.0348, p=0.0616, respectivement).

#### Exp 2-Art 2 :

Les rats HFC présentaient un gain de poids et une adiposité significativement supérieurs aux animaux C. De plus, l'index d'adiposité des animaux HFC après 8 semaines de régime étaient proches de celles obtenus dans l'exp 1 (7% pour l'exp 2 *versus* 5% pour l'exp 1, Figure 17 G,H).



Figure 18 : Effet d'un régime obesogène pendant 1 et 6 semaines sur les expressions géniques de protéines de signalisation du LPS : TLR4 (A) et MD2 (B) ainsi qu'une cytokine pro-inflammatoire MCP-1 (C), de récepteurs aux hormones intestinales : CCK-1R (D), Y2-R (E) et CNR1 (F) et de protéines inhibitrices de la signalisation de la leptine : PTP1b (G) et SOCS3 (H).

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. Le signe dièse désigne une tendance entre le groupe considéré et le contrôle (p<0.10). Le traitement statistique des données a été effectué par test Anova à un facteur pour chaque semaine suivi de tests post-hoc Bonferonni.



<u>Figure 19</u> : Expression protéique de PTP1b dans le ganglion noueux – Article 2

Effet d'un régime obesogène pendant 8semaines sur l'expression protéique de PTP1b au niveau du ganglion noueux en réponse à une injection de sérum physiologique (400µl) ou de leptine (80µg/kg de poids) chez les animaux C (n=4 et n=2) et HFC (n=4 et n=4)

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. Le traitement statistique des données a été effectué soit par t-test entre les deux conditions. Expressions géniques de TLR4, MD2, CCK-1R, Y2R, CNR1, SOCS3 et PTP1b au niveau des ganglions noueux

#### Exp 1-Art 1 :

A 1 et 6 semaines, les expressions géniques de *tlr4*, *md2* et *mcp-1* au niveau du ganglion noueux des animaux WDpf et WDal étaient similaires à celle des animaux C (Figure 18 -A-B-C).

Afin d'évaluer l'évaluer l'impact d'un régime obesogène sur la physiologie du nerf vague, l'expression de récepteurs à certains peptides intestinaux a été mesurée par RT-qPCR au niveau du ganglion noueux. Aucune différence d'expression de récepteurs anorexigènes *CCK-1R* et *Y2R* n'a été observée entre les différents groupes à 1 et 6 semaines de régime (Figure 18-D-E). En revanche, après 1 semaine de régime l'expression génique de *CNR1* était augmentée chez les animaux WDpf par rapport aux animaux C et WDal (p=0.0282 et p=0.0374, respectivement) (Figure 18-F). A 6 semaines, l'expression de CNR1 tendait à diminuer chez les WDal comparé aux rats C (p=0.11) (Figure 18-F).

Nous avons ensuite mesuré les expressions géniques de SOCS3 et PTP1b au niveau du ganglion noueux. Aucune différence d'expression de *SOCS3* et de *PTP1b* n'a été observée entre les différents groupes à 1 ou 6 semaines (Figure 18-G-H).

#### Expression protéique de PTP1b au niveau des ganglions noueux

#### Exp 2-Art 2:

Bien que non significativement différent du à un faible nombre d'animaux (n=2), il semblerait que, chez les animaux contrôles, l'expression protéique de PTP1b soit augmentée en réponse à l'injection de leptine (Figure 19). A l'inverse, chez des animaux HFC l'injection de leptine n'induit pas d'augmentation de l'expression protéique de PTP1b. On peut également noter que l'expression basale de PTP1b n'était pas influencée par le régime



Figure 20 : Effet d'injections quotidiennes pendant 7 jours ou aigue sur le gain de poids (% du poids initial) (A), l'index adiposité (B) et l'ingéré moyen (g/jour) (C).

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. Le traitement statistique des données a été effectué soit par test Anova à deux facteurs (régime et temps) (A) soit à un facteur (B-C) suivi de tests post-hoc Bonferonni.



Figure 21 : Effet d'injections quotidiennes pendant 7 jours de LPS (100µg/kg/jour) ou aigüe (100µg/kg) sur l'expression protéique de PTP1b au niveau du ganglion noueux. A : Protéine PTP1b totale mesurée par Western Blot au niveau des ganglions noueux des rats S, LPS1 et LPS7. B : Quantification du Western Blot C :Immunoréactivité de PTP1b sur des coupes de ganglions noueux de rats S, LPS1 et LPS7

Les données (B) sont exprimées en moyenne ± écart type.

### 2<sup>ème</sup> modèle : Injections chroniques de LPS

#### Effet du LPS sur la prise de poids, l'adiposité et la prise alimentaire

Aucun traitement n'a influencé le gain de poids, l'adiposité ou la prise alimentaire (Figure 20-A-B-C).

#### Impact du LPS sur l'expression protéique de PTP1b

L'expression protéique de PTP1b mesurée par western blot semble être augmentée chez les animaux traités avec du LPS pendant 7 jours (LPS7) comparés aux animaux traités avec du sérum physiologique (Figure 21-A). Cependant, la significativité n'est pas atteinte au vue du nombre d'animaux très faible (n=3). De la même manière, via des observations en immunohistochimie, l'immuno-réactivité contre PTP1bsemble plus importante au niveau des ganglions noueux de rats LPS7 comparés aux LPS1 et C (Figure 21-B).



Milieu sans SVF

LPS (5µg/ml)

Leptine (10mg/ml)

TNF- $\alpha$  (50ng/ml)

Figure 22 : Impact du LPS sur l'expression de SOCS3 et PTP1b sur des cultures primaires de nerf vague. A :Immunoréactivité de SOCS3 sur des cultures primaires de ganglions noueux de rats standard dans des conditions sans SVF, infusés pendant 1 heure avec du LPS ( $5\mu$ g/ml), infusé pendant 2 heures avec de la leptine (10mg/ml) ou co-infusés leptine + LPS. B : Immunoréactivité de PTP-1B sur des cultures primaires de ganglions noueux de rats standard dans des conditions sans SVF, infusés avec du LPS ( $5\mu$ g/ml), de la leptine (10mg/ml) ou du TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) pendant 1 heure.

### 3<sup>ème</sup> modèle : Infusion de LPS sur des cultures primaires de ganglion noueux

#### Impact du LPS sur l'expression protéique de SOCS3 et PTP1B

L'expression protéique de SOCS3 était similaire quelques soit les conditions (Figure 22-A). Notamment, nous observions la présence de SOCS3 dans la condition 'milieu sans SVF', alors que celle-ci devrait être quasi-nulle en absence de stimulation. D'autres conditions de milieu contrôle ainsi que des concentrations différentes de LPS, de leptine ainsi que plusieurs dilutions d'anti-corps ont été testées, l'expression de SOCS3 restaient inchangées entre les différentes conditions.

Aucune immunoréactivité de PTP1b n'a été détectées quelques soit les conditions (Figure 22-B). Par faute de temps, la technique d'immunohistochimie n'a pas pu être optimisée.

### Discussion

Le but de notre étude était d'évaluer l'effet du LPS sur l'expression de PTP1b via deux modèles d'exposition chronique au LPS. Tout d'abord, nous avons développé un modèle d'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime obesogène. Nous avons montré que tous les rats ayant consommé un régime WD pendant 6 semaines présentaient une augmentation de la concentration de LBP et donc étaient endotoxémiques. En revanche, seuls les animaux WDpf présentaient à 6 semaines une quantité de LPS libre dans le sang supérieure à celle des animaux C et WDal d'une moyenne de 4.290 EU/ml soit environ 420 pg de LPS d'E.Coli/ml soit environ 25 700 pg de LPS/kg de poids vif. Ainsi, seuls les ganglions noueux de ces rats étaient exposés au LPS au moment du sacrifice. Les animaux issus de l'exp 2 présentaient une adiposité similaire à ceux de l'exp 1, on peut alors suggérer que ces animaux possédaient également une endotoxémie supérieure aux animaux C. Notre deuxième modèle d'exposition chronique au LPS impliquait probablement des taux circulant de LPS plus élevés puisqu'une injection moyenne de 100 µg de LPS d'E.Coli/kg était réalisée quotidiennement, soit une concentration près de 100 fois supérieure. Cependant, ce modèle n'atteint pas les concentrations de LPS injectées dans des modèles de sepsis puisque chez le rat Wistar, une injection entre 15 et 25 mg/kg est nécessaire pour induire un sepsis (Thomas et al., 2014). Deux autres modèles d'infusion de LPS ont été réalisées pour étudier l'impact du LPS sur la physiologie du nerf vague (de Lartigue et al., 2011; de La Serre et al., 2015). De la Serre et collaborateurs ont implantés des mini-pompes délivrant du LPS à 12.5 µg/kg/jour chez des rats Wistar (de La Serre et al., 2015). In vitro, des concentrations de 0.010 à 0.050 pg/ml ont été incubées sur des cultures primaires de nerf vague (de Lartigue et al., 2011). Notre premier modèle se définirait donc comme une endotoxémie légère tandis que notre deuxième modèle d'injection quotidienne représenterait plutôt une endotoxémie forte.

Aucune étude dans la littérature n'a évalué l'impact du LPS sur l'expression de récepteurs aux hormones intestinales au niveau du nerf vague. Cependant, plusieurs études ont mesuré l'expression de ces récepteurs chez des rats obèses ou DIO, donc potentiellement endotoxémiques. Paulino et collaborateurs ont montré qu'une semaine de régime obesogène (45% de lipides) n'était pas suffisante pour induire des modifications des expressions géniques de Ob-R, CCK-1R, CB-1R ou Y2R (Paulino *et al.*, 2009). En revanche, après 8 semaines de régime, deux études ont montré une augmentation des expressions géniques ou protéiques de MCHR et CB1R associée à une diminution d'Y2R chez des animaux DIO comparés à des animaux standards (Paulino *et al.*, 2009; de Lartigue *et al.*, 2012). A l'inverse, après 11 semaines de régime à 45% de lipides, l'expression de CB1R était similaire chez les rats obèses et résistants à l'obésité (Cluny *et al.*, 2013). Concernant CCK1R, deux études montrent une augmentation de son expression (Nefti *et al.*, 2009; Paulino *et al.*, 2009), alors que deux autres ne

décrivent aucune différence entre des animaux DIO et standards (Broberger *et al.*, 1997; Broberger *et al.*, 2001; Duca *et al.*, 2013). Cependant aucune de ces études n'a mesuré l'endotoxémie, nous ne pouvons donc pas être certain de l'exposition au LPS de ces animaux. Dans notre modèle, l'exposition chronique au LPS et/ou l'obésité n'ont pas eu d'impact sur l'expression de CCK1R, Y2R. En revanche, la consommation d'un régime obesogène sans hyperphagie initiale pendant une semaine augmente l'expression de CN1R, accentuant potentiellement les signaux orexigènes. Avant le sacrifice les animaux ont été nourris pendant 2 heures pour tenter d'évaluer leur capacité de régulation de la satiété. Durant la première semaine de régime, les animaux WDpf avaient accès à une quantité de nourriture calculée selon la consommation des animaux C, on peut donc penser que cette quantité n'était pas suffisante pour engendrer les signaux de satiété. A 6 semaines, l'expression de CNR1 au niveau du ganglion noueux tend à diminuer uniquement chez les rats WDal. En revanche, les rats WDpf tendent à augmenter leur PA sur 2 heures suggérant une baisse des signaux de satiété. Ainsi, la baisse d'expression de CNR1 chez les rats WDpf pourrait être un phénomène protecteur permettant de limiter l'hyperphagie.

Un des principaux mécanismes impliqués dans la régulation de la PA par le nerf vague est le système CCK-Leptine. Ces deux hormones agissent en synergie, la leptine potentialisant l'effet satiétogène de la CCK (de Lartigue *et al.*, 2011). Lors de l'obésité, les expressions géniques et protéiques de PTP1b, une protéine inhibitrice de la signalisation de la leptine, étaient élevées dans le tissu adipeux, l'hypothalamus et le foie (Zabolotny *et al.*, 2008; White *et al.*, 2009). Au niveau central, l'expression de PTP1b est fortement stimulée par l'inflammation engendrée par le LPS (Song *et al.*, 2016) (Borges Bde *et al.*, 2015). Nos deux modèles d'exposition chronique au LPS ont montré des résultats différents. L'endotoxémie faible induite par le régime obesogène ne modifiait pas l'expression génique basale de PTP1B. De même, chez les animaux HFC issus de l'article 2 potentiellement endotoxémiques, l'expression protéique de PTP1b basale au niveau du ganglion noueux n'était pas significativement différente des animaux standards. Cependant, en réponse à l'injection de leptine, l'expression protéique de PTP1b n'était pas augmentée chez les animaux HFC à la différence des animaux C. Ces résultats suggèrent que l'endotoxémie faible observée lors de la consommation d'un régime obésogène pourrait moduler l'expression protéique de PTP1b en réponse à la leptine.

A l'inverse, des injections quotidiennes de LPS pendant 7 jours semblent augmenter l'expression protéique basale de PTP1b dans le ganglion noueux. Par ailleurs, il a été montré par le même protocole expérimental, que le LPS augmente l'expression protéique de PTP1b dans l'hypothalamus (Borges Bde *et al.*, 2015). Malgré le faible nombre d'animaux, les résultats nous suggèrent qu'une exposition chronique au LPS à une dose suffisante pourrait induire une augmentation de l'expression protéique basale de PTP1b inhibant ainsi la signalisation de la leptine pouvant contribuer au développement de la résistance à la leptine.

Pour conclure, le LPS pourrait altérer la signalisation de la leptine en augmentant à la fois l'expression de SOCS3 (de Lartigue *et al.*, 2011) mais également celle d'un second inhibiteur PTP1b contribuant à la perte de sensibilité à la leptine. Cependant, dans notre modèle, l'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime obesogène ne semble pas suffisante pour augmenter l'expression protéique et génique basale de PTP1b mais pourrait modifier sa réponse à une injection de leptine.

### Références

- Banno, R., D. Zimmer, et al. (2010). "PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice." J Clin Invest **120**(3): 720-734.
- Bence, K. K., M. Delibegovic, et al. (2006). "Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action." <u>Nature medicine</u> **12**(8): 917-924.
- Borges Bde, C., R. C. Rorato, et al. (2015). "Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPSinduced leptin resistance in male rats." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **308**(1): E40-50.
- Broberger, C., K. Holmberg, et al. (2001). "Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia." <u>Brain research</u> **903**(1-2): 128-140.
- Broberger, C., M. Landry, et al. (1997). "Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus." <u>Neuroendocrinology</u> **66**(6): 393-408.
- Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." <u>Diabetes</u> **56**(7): 1761-1772.
- Cheng, A., N. Uetani, et al. (2002). "Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B." <u>Dev Cell</u> **2**(4): 497-503.
- Cluny, N. L., E. D. Baraboi, et al. (2013). "High fat diet and body weight have different effects on cannabinoid CB(1) receptor expression in rat nodose ganglia." <u>Autonomic neuroscience :</u> <u>basic & clinical</u> **179**(1-2): 122-130.
- de La Serre, C. B., G. de Lartigue, et al. (2015). "Chronic exposure to low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons." <u>Physiology & behavior</u> **139**: 188-194.
- de Lartigue, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2011). "Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **301**(1): E187-195.
- de Lartigue, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2012). "Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats." <u>PLoS One</u> **7**(3): e32967.
- de Lartigue, G., R. Dimaline, et al. (2007). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> 27(11): 2876-2882.
- Dockray, G. J. (2014). "Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain." <u>The</u> Journal of physiology **592**(14): 2927-2941.
- Duca, F. A., T. D. Swartz, et al. (2013). "Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors." Int J Obes (Lond) **37**(3): 375-381.
- Gakis, G., M. H. Mueller, et al. (2009). "Neuronal activation in the nucleus of the solitary tract following jejunal lipopolysaccharide in the rat." <u>Autonomic neuroscience : basic & clinical</u> **148**(1-2): 63-68.

- Hosoi, T., Y. Okuma, et al. (2005). "Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion." <u>Autonomic neuroscience : basic & clinical</u> **120**(1-2): 104-107.
- Nefti, W., C. Chaumontet, et al. (2009). "A high-fat diet attenuates the central response to withinmeal satiation signals and modifies the receptor expression of vagal afferents in mice." <u>American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology</u> 296(6): R1681-1686.
- Paulino, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2009). "Increased expression of receptors for orexigenic factors in nodose ganglion of diet-induced obese rats." <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> **296**(4): E898-903.
- Riley, T. P., J. M. Neal-McKinney, et al. (2013). "Capsaicin-sensitive vagal afferent neurons contribute to the detection of pathogenic bacterial colonization in the gut." <u>Journal of</u> <u>neuroimmunology</u> **257**(1-2): 36-45.
- Song, G. J., M. Jung, et al. (2016). "A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation." Journal of neuroinflammation **13**(1): 86.
- Thomas, R. C., M. F. Bath, et al. (2014). "Exploring LPS-induced sepsis in rats and mice as a model to study potential protective effects of the nociceptin/orphanin FQ system." <u>Peptides</u> **61**: 56-60.
- Tsou, R. C. and K. K. Bence (2012). "Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases." Frontiers in neuroscience **6**: 192.
- White, C. L., A. Whittington, et al. (2009). "HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms." <u>Am J Physiol</u> <u>Endocrinol Metab</u> **296**(2): E291-299.
- Zabolotny, J. M., Y. B. Kim, et al. (2008). "Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo." J Biol Chem **283**(21): 14230-14241.



Figure 23 : Différentes phases de l'obésité

Evolution du poids corporel de souris C57Bl/6J femelles nourries avec un régime chow ou obésogène pendant 12 mois (A). De Winzell et collaborateurs, 2004.

Evolution du poids corporel de rats Sprague-Dawley mâles nourris avec un régime standard ou obésogène pendant 15 semaines (B). Les rats susceptibles à l'obésité sont appelés "gainers" et les rats résistants correspondent aux "resisters". La flèche et l'ellipse correspondent à 6 semaines de régime, quand la variabilité entre les "gainers" et "resisters" est visible. De Lauterio et collaborateurs, 1994.

### **Discussion générale**

#### 1) Notre modèle animal, un modèle d'obésité pertinent?

#### Un modèle robuste

En France, comme dans l'ensemble de ses voisins européens, les régimes alimentaires traditionnels, principalement basés sur la consommation de céréales et de légumes ont connu, au cours du 20ème siècle, une transition vers des régimes beaucoup plus riches en lipides et pauvres en glucides. À la différence des pays industrialisés où cette transition nutritionnelle fut progressive, dans les pays en voie de développement, les habitudes alimentaires changent plus rapidement, en quelques décennies. Afin d'étudier les conséquences de ces changements alimentaires sur le développement de l'obésité et de ses troubles métaboliques et comportementaux, la recherche a souvent recours à l'utilisation de modèle animaux. Cependant, il est difficile de reproduire ces transitions très progressives chez l'animal. Dans nos études nous avons choisi d'utiliser un modèle *in vivo* d'obésité induite par la consommation d'un régime obésogène i.e. riche en lipides et en sucres ainsi que pauvre en fibres insolubles. Bien qu'assez loin de l'évolution progressive de l'alimentation humaine, ce modèle animal permet d'obtenir rapidement une obésité et ainsi d'étudier les facteurs liés à son développement.

Dans ces modèles animaux de DIO, la mise en place de l'obésité se caractérise par plusieurs phases : la première, dynamique, est marquée par un gain de poids corporel nettement supérieur à celui des animaux nourris avec un régime standard alors que lors de la deuxième phase, les gains de poids des animaux WD et C suivent des courbes similaires (Figure 24). Dans notre modèle in vivo, nous avons choisi d'étudier la phase de développement de l'obésité, c'est pourquoi nous avons soumis nos animaux à une courte période de régime, i.e. 6 semaines, afin de nous situer dans la phase dynamique de prise de poids. En effet, à la fin de cette première phase, estimée à environ 6 semaines dans l'étude de Lauterio et collaborateurs (Figure 24), il nous était possible d'évaluer la variabilité de réponse au régime obésogène entre les individus. De plus, la consommation d'un régime obésogène à plus long terme induit une inflammation locale et systémique (Hotamisligil, 2006) qui peut fortement impacter la physiologie digestive (Garrett et al., 2010). Dans notre modèle, 6 semaines de régime obésogène n'induit pas d'inflammation (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) dans l'iléon (Hamilton *et al.*, 2015) ni dans le foie (IL-1β). Dans le caecum, la consommation du régime WD pendant 6 semaines n'influence pas l'expression génique de TNF- $\alpha$  mais augmente légèrement de 57% l'expression génique d'IL-1 $\beta$  par rapport aux animaux chow (Article 1 et (Hamilton et al., 2015). On peut ainsi supposer que les effets observés sur la physiologie digestive seraient la conséquence du régime et non de l'inflammation. Pour s'assurer de la robustesse de ce modèle, nous pouvons comparer les modèles animaux issus de l'article 1 et de l'article 2, réalisées dans des localisations géographiques distinctes (Art1: France et


Figure 24 : Cinétique de gain de poids et de prise alimentaire similaire dans nos deux modèles d'obésité induite par la consommation chronique d'un régime obésogène.

Evolution du gain de poids (%poids initial) (A) et de la prise alimentaire (Kcal/jour) (B) pendant 6 semaines chez les rats nourris avec un régime contrôle « chow » et nourris avec un régime obésogène (45% de lipides). Les courbes/histogrammes en gris représentent les animaux issus de l'article 1 et celles en noires correspondent aux animaux de l'article 2.

art2 : USA) mais utilisant des régimes standards très similaires et des régimes obésogènes strictement identiques (WDal = HFC). Nous avons montré que ce modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime obesogène est robuste puisque les cinétiques de gain de poids et de prise alimentaire sont similaires (Figure 25). En revanche, les animaux issus de l'article 2 (Chow + WD) prennent plus de poids que ceux de l'article 1, même si la différence de gain de poids entre les animaux C et WD reste la même (delta de 12-13% après 6 semaines de régime). De plus, dans notre étude ainsi que dans de nombreuses autres, nous observons une phase d'hyperphagie durant les 3-4 premiers jours de régime WD, due probablement à une palatabilité plus élevée du régime obésogène comparée à celle du régime standard (Woods *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2015). Dans un deuxième temps, un remodelage hypothalamique permet le retour à une PA au même niveau énergétique que celui des animaux chow (Gouaze *et al.*, 2013).

La composition du microbiote intestinal est très dépendante de l'environnement (Hufeldt *et al.*, 2010; Ussar *et al.*, 2015). Nos études expérimentales ayant été réalisées dans deux animaleries différentes, nous pouvons supposer que les microbiotes des animaux avant expérimentation étaient différents. Sachant que la composition du microbiote intestinal avant expérimentation peut fortement influencer le développement de l'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime obesogène (Muller *et al.*, 2016). Nous n'avons pas évalué l'endotoxémie dans l'article 2 mais il n'est pas impossible que nos animaux présentent des statuts endotoxémiques différents. Pour conclure, notre modèle d'obésité induite par la consommation d'un régime obésogène est un modèle robuste en termes de cinétique de gain de poids et de PA. Cependant, les expérimentations ayant été réalisées dans deux animaleries différentes, les microbiotes de départ sont probablement différents pouvant alors impacter sur le développement de l'endotoxémie métabolique.

### Les effets attribués au régime obesogène sont-ils vraiment dus à l'augmentation du taux de lipides du régime, à la consommation d'un régime synthétique ou à l'obésité?

Pour étudier les effets du régime obésogène, il est essentiel de se référer à un groupe d'animaux dit « témoin » consommant un régime standard d'animalerie. Comme décrit dans le chapitre 5 de l'introduction bibliographique de cette thèse, le choix du régime de ce groupe témoin est crucial.

La majorité des études, notre article 1 compris, compare la physiologie et/ou le métabolisme d'animaux initialement nourris avec un régime standard (chow) puis soumis à un régime synthétique obésogène, avec ceux d'animaux toujours sous régime chow. Or, en plus de modifier les taux de lipides et de sucres, l'introduction d'un régime synthétique, à lui seul, induit des modifications métaboliques. En effet, comparé au régime chow, la consommation sur une même période de temps (3, 11 et 12 semaines) d'un régime synthétique à 10% de lipides augmente la masse grasse et donc le poids corporel par rapport aux animaux n'ayant pas changé d'aliment (Apolzan *et al.*, 2012; Benoit *et al.*, 2013; Chassaing *et al.*, 2015). Après 11 semaines, des rats nourris avec un régime synthétique à

	Effet du régime synthétique	Effet du % de lipides	Effet de l'obésité
	Chow vs Régimes synthétiques	LF vs HF	OB-P vs OB-R
Modulation du microbiote Possible augmentation des bactéries G -	OUI <sup>1</sup>	NON <sup>1</sup> OUI <sup>2</sup>	NON <sup>1</sup> OUI <sup>2</sup>
	Iléon : ?	Iléon : ?	Iléon : OUI <sup>2,3</sup>
IAP			
	Caecum : $OUI^1$	Caecum : NON <sup>1</sup>	Caecum : NON <sup>1</sup>
Perméabilité intestinale	?	$NON^2$	OUI <sup>2</sup>
Spécifique au LPS	?	?	?
AMPs	?	?	?

### Tableau 23 : Part d'implication de l'introduction du régime synthétique, du pourcentage de lipides dans le régime ou de l'obésité sur les principaux mécanismes intestinaux pouvant être impliqués dans la régulation de l'endotoxémie métabolique.

- ? : Aucune donnée disponible dans la littérature
- <sup>1</sup> : Résultats obtenus dans l'article 1
- <sup>2</sup>: Résultats obtenus dans l'étude de De la Serre et collaborateurs, 2010
- <sup>3</sup> : Résultats obtenus dans l'étude de Sefcikova et collaborateurs, 2008

10% de lipides montrent également une perturbation du métabolisme des lipides et du glucose ainsi qu'une inflammation du TA (Benoit *et al.*, 2013). Enfin, les résultats obtenus dans l'article 2 montrent que la consommation d'un régime synthétique, indépendamment du taux de lipides, est suffisante pour induire une perturbation de la régulation de la PA par le nerf vague. Ces résultats à propos de l'impact de l'introduction d'un régime synthétique sur la physiologie n'étaient pas disponibles lors du design expérimental de l'article 1, nous avions alors choisi d'avoir un seul groupe contrôle chow. Cependant, ces résultats récents questionnent sur l'interprétation des données issues de notre modèle d'étude d'obésité utilisé dans l'article 1. En effet, la question est de savoir quelle est la part du taux élevé de lipides, de l'introduction d'un régime synthétique ou de l'obésité dans les modifications de la prise en charge intestinale et hépatique du LPS observés dans l'article 1 (Tableau 23).

Nous avons montré dans l'article 1 que l'élévation du taux de bactéries gram-négatif dans le contenu caecal pouvait être un facteur contribuant à l'endotoxémie. Notre étude (article 2) et celle de Chassaing et al. montrent que la consommation d'un régime synthétique modifie profondément le métabolome intestinal (Chassaing et al., 2015; Guerville et al., 2016) avec peu de différences dans les profils métabolomiques du caecum en fonction du taux de lipides du régime et de leur statut d'obésité. Ceci suggère que l'introduction d'un régime synthétique, quel que soit le taux de lipides ou le statut d'obésité des animaux, modifie le microbiote et pourrait ainsi être à l'origine de l'augmentation des bactéries Gram-négatif observée dans l'article 1. Cependant, même si la technique de métabolomique permet d'identifier des différences de profils de métabolisme de l'écosystème bactérien, elle ne renseigne pas sur la nature des bactéries et notamment leur statut Gram positif / négatif. En effet, des modifications de la composition du microbiote caecal dépendantes à la fois de l'obésité mais également du régime obésogène, selon le genre bactérien ont été observées grâce à l'utilisation de rats Sprague-Dawley susceptibles et résistants à l'obésité (OB-P et OB-R, respectivement) consommant le même régime obésogène (de La Serre et al., 2010). Ainsi, l'augmentation de l'abondance des Bacteroidales (Bacteroidetes, Gram négatif) et des Clostridiales (Firmicutes, Gram positif) seraient plutôt une conséquence du régime riche en lipides alors que l'augmentation de l'abondance d'Enterobacteriales (Proteobacteria, Gram négatif) serait plutôt due à l'obésité (de La Serre et al., 2010). L'obésité elle-même pourrait donc être un facteur contribuant à l'augmentation de l'abondance des bactéries Gram négatif. Pour aider à l'interprétation de nos résultats, il serait nécessaire d'effectuer un séquençage de l'ADN16S du microbiote intestinal d'animaux nourris avec un régime chow, LF, OB-P et OB-R afin d'identifier les modifications de la composition du microbiote, et par conséquent à l'augmentation du niveau de bactérie Gram négatif, propres à l'introduction d'un régime synthétique, à l'augmentation du taux de lipides ou à l'obésité.



Figure 25: Perméabilité intestinale de rats nourris avec un régime Chow, SD-LF et SD-HF pendant 1 semaine.

Données préliminaires obtenues par le laboratoire d'Helen Raybould. Perméabilité mesurée *ex vivo* en Chambres d'Ussing. Flux de FD4 (A.C.F), d'HRP (B.D.F) et de F-LPS (E) dans l'iléon (A.B), le caecum (C.D.E) et le colon (F.G)

Nous avons également montré dans l'article 1 que l'activité de l'IAP dans le caecum était augmentée chez les animaux WD relativement aux animaux chow. Dans l'article 2, la consommation d'un régime synthétique LF ou HF induisait une même augmentation de l'activité caecale d'IAP comparée à la celle d'un régime chow. Par conséquent, la stimulation de l'activité de l'IAP caecale serait le résultat de l'introduction d'un régime synthétique plutôt que de l'obésité ou du taux de lipides du régime. Cependant il semblerait que les facteurs régulant l'activité de l'IAP soient différents selon le site intestinal. Deux études ont montré que l'activité iléale de l'IAP était modifiée (augmentée ou diminuée selon l'étude) uniquement chez les animaux OB-P relativement aux OB-R et C (Sefcikova *et al.*, 2008; de La Serre *et al.*, 2010). Ainsi, dans l'intestin grêle, l'IAP serait stimulée par l'obésité et non par le régime obésogène consommé.

Enfin, nous avons suggéré dans l'article 1 que l'augmentation de la perméabilité iléale au LPS pouvait être un facteur participant à l'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime synthétique obésogène. Aucune étude dans la littérature n'a comparé la perméabilité intestinale avec des marqueurs non spécifiques (sucres, FD-4, HRP par exemple) ou spécifique au LPS entre des animaux nourris avec un régime chow ou synthétique HF/LF. Cependant, des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire d'Helen Raybould montrent que la perméabilité paracellulaire (flux de FD4) tend à être augmentée dans l'iléon de rats nourris pendant 1 semaine avec un régime synthétique LF comparés à des rats C et HF (Figure 26). Cependant, les modifications de perméabilité induite par l'alimentation sont très dynamiques dans le temps, ces effets à 1 semaine ne sont donc pas transposables à plus long terme. De plus, dans l'étude réalisée par de la Serre et collaborateurs utilisant la technique de mesure de perméabilité in vivo avec le FD4, les rats OB-P présentaient une augmentation de la perméabilité paracellulaire supérieure aux animaux OB-R, suggérant un impact de l'obésité et non du régime hyperlipidique sur la perméabilité intestinale (de La Serre et al., 2010). Cependant, le lien entre perméabilité mesurée avec le FD4 in vivo et passage transépithélial du LPS n'étant pas du tout établi comme indiqué dans notre revue bibliographique (Guerville et Boudry, 2015), il est difficile de conclure sur l'implication du taux de lipides vs l'introduction d'un régime synthétique ou l'obésité dans l'augmentation de perméabilité iléale au LPS observée dans l'article 1. Pour répondre à cette question, il serait nécessaire de mesurer la perméabilité iléale au LPS, en chambre d'Ussing, chez des animaux chow, LF, OB-P et OB-R.

Enfin, aucune étude dans la littérature n'a comparé les effets d'un régime obésogène ou de l'obésité sur les mécanismes hépatiques de prise en charge du LPS ni sur les AMPs.

Pour conclure, il est difficile d'interpréter l'ensemble des données obtenues dans l'article 1 à la lueur de l'impact des régimes synthétiques sur la physiologie intestinale observés dans l'article 2. La consommation d'un régime synthétique seul, même à faible taux de lipides, semble avoir un fort impact sur la physiologie intestinale. Néanmoins, la forte proportion de lipides du régime synthétique

HF induit probablement une augmentation de la sécrétion de chylomicrons facilitant ainsi le passage intestinal de LPS (Laugerette *et al.*, 2012). De plus, les lipides en excès stockés dans le TA seront capables d'induire une inflammation qui se propagera par la suite de façon locale et systémique (Hotamisligil, 2006). Ainsi, même si l'altération de la physiologie intestinale ne serait pas la conséquence du régime obésogène mais de la consommation d'un régime synthétique, la forte teneur en lipides du régime induit aussi probablement des modifications du métabolisme et du statut inflammatoire des animaux qui pourraient faciliter également le passage trans-épithélial de LPS, perpétuant et accentuant l'inflammation. Afin de confirmer cette hypothèse et s'assurer de la part respective du taux de lipides, des régimes synthétiques ou de l'obésité dans les effets observés dans l'article 1, il serait cependant nécessaire de conduire une étude évaluant l'intégralité des mécanismes intestinaux et hépatiques de prise en charge du LPS chez des animaux nourris avec des régimes chow , LF et HF avec des animaux OB-P et OB-R.

### 2) Quels sont les facteurs à cibler pour limiter l'endotoxémie métabolique ?

Nos travaux ont montré que l'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime obésogène serait le résultat de plusieurs facteurs : une élévation du niveau de bactéries Gram-négatif dans le caecum ainsi qu'une perte de la fonction de barrière intestinale au niveau de l'iléon caractérisée par une baisse de l'expression des AMPs et une augmentation du passage transepithelial de LPS.

Il est connu que la consommation d'un régime obésogène altère la composition du microbiote intestinal. Cependant, peu d'études ont relié ce changement de microbiote avec une possible augmentation de la quantité de LPS dans les contenus qui pourrait contribuer largement à l'endotoxémie métabolique. Nos résultats montrent une élévation du niveau de Verrucomicrobia, des bactéries Gram-négatif porteuses de LPS, dans les contenus caecaux de rats consommant un régime WD. Comme décrit dans ma revue de littérature, dans la lumière intestinale, les LPS sont libérés à la fois lors de la mort des bactéries mais également lors de leur croissance par division (Guerville et al., 2016). Ces résultats suggèrent ainsi une concentration de LPS libre potentiellement plus importante dans les contenus intestinaux suite à la consommation d'un régime obésogène. Il faut cependant noter qu'évaluer le taux de LPS dans les contenus par la mesure du niveau de bactéries Gram-négatifs présente quelques limites puisque toutes les bactéries Gram-négatifs ne possèdent pas de LPS ou alors contiennent des LPS avec des lipides A différents présentant des toxicités variables (Caroff et al., 2003). Notons cependant que l'écosystème intestinal étant assez homogène comparé à d'autres environnements, les lipides A des LPS des bactéries intestinales, et donc leur niveau de toxicité, sont peu variables (Guerville et al., 2016). Une deuxième méthode serait d'utiliser comme Everard et collaborateurs, une approche de métagénomique permettant de mesurer le potentiel de biosynthèse des LPS dans les contenus luminaux (Everard et al., 2014). Ils ont séquencés l'intégralité du génome



Figure 26 : Proportion de séquences impliquées dans la biosynthèse de LPS dans le microbiote caecal de rats nourris avec un régime C (bleu) ou WD pendant 1 (orange), 3 (vert) et 6 semaines (violet).

Valeurs obtenues à partir de données issus du séquençage du microbiote caecal grâce au logiciel Picrust.



Figure 27: La composition du microbiote intestinal est différente selon site intestinal.

Moyenne relative de l'abondance des phylum dans l'iléon et le caecum de rats nourris pendant 6 semaines avec un régime standard ou obésogène.

De Hamilton et al, 2014

bactérien du microbiote caecal puis grâce à une analyse fonctionnelle, ont rassemblé les gènes par grandes fonctions métaboliques dont la biosynthèse de LPS. Par l'utilisation de cette technique, ils montrent des résultats inverses, à savoir une diminution de l'abondance de gènes impliqués dans la biosynthèse de LPS. Cette méthode présente également des limites puisqu'elle ne rend pas compte de l'expression des gènes qui peut être diminuée ou augmentée. Une autre possibilité serait d'utiliser des outils de prédictions métaboliques à partir de données de séquençage de l'ADN 16S comme l'outil Picrust (Langille et al., 2013). Une étude de notre équipe conduite sur le même modèle animal (Hamilton et al., 2015), a utilisé cet outil sur des données de microbiote caecal. A l'inverse de résultats obtenus par Everard et collaborateurs, le microbiote caecal des rats nourris avec un régime obésogène pendant 6 semaines présentaient une augmentation de la proportion de séquences impliquées dans la biosynthèse de LPS comparé au microbiote de souris standards, corroborant ainsi notre hypothèse d'une élévation de la concentration potentielle de LPS dans le caecum (Figure 27). Enfin, il est également possible d'évaluer les niveaux de LPS dans l'intestin en dosant précisément la quantité totale de LPS dans les contenus ou les fèces par dosage LAL. Deux études utilisant cette technique montrent une élévation de la concentration de LPS dans les fecès d'animaux nourris avec un régime WD (Kim et al., 2012; Lau et al., 2016), Cependant, chaque prélèvement induit immédiatement une lyse des bactéries entrainant une libération de LPS ce qui biaise les résultats obtenus après dosage. Toutefois, si on fait l'hypothèse que la prise d'échantillon est similaire entre les groupes témoins et WD et que le niveau de lyse bactérienne est identique entre les deux groupes, une analyse relative des concentrations de LPS dans les contenus intestinaux serait intéressante. En conclusion, aucune technique n'est réellement satisfaisante pour évaluer la quantité de LPS dans les contenus luminaux. L'étude du génome ou du transcriptome bactérien par métagénomique ou métatranscriptomique couplée à un dosage LAL dans les contenus intestinaux pourrait probablement permettre une évaluation plus précise. Enfin, notre étude comme celle d'Everard et collaborateurs n'a étudié que le microbiote caecal. Cependant, le microbiote caecal est très différent de celui de l'iléon (Hamilton et al., 2015) (Figure 28). Ainsi, on peut suggérer que lors de la consommation d'un régime obésogène, le microbiote iléal présenterait également une élévation du niveau de bactéries Gram-négatif qui, couplée à l'augmentation du passage trans-epithélial de LPS au niveau de l'iléon observée dans l'article 1, pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'endotoxémie métabolique.

Probablement en réponse à l'élévation de la concentration en LPS dans le contenu intestinal, la muqueuse intestinale s'adapte, pour réduire la toxicité des LPS, en augmentant l'activité de l'IAP, à la fois au niveau iléal et caecal (article 1 et 2). A l'inverse de ce mécanisme protecteur de la muqueuse, les expressions iléales d'AMPs sont diminuées dans notre modèle d'obésité suggérant un effet plutôt délétère (article 1). Le phénomène de tolérance au LPS pourrait être impliqué dans l'inhibition de l'expression des AMPs. En effet, il a été montré que la stimulation de l'expression des AMPs et notamment de Reg3- $\gamma$  était très dépendante de TRIF, une molécule de signalisation de TLR4

(Stockinger et al., 2014). D'autre part, lors d'une exposition prolongée au LPS, les tissus y compris l'intestin présentent un stade de tolérance au LPS caractérisé par une diminution de TLR4 et de Myd88 (Abreu et al., 2005). On peut alors suggérer que TRIF est également inhibé lors de la tolérance au LPS conduisant à une réduction de la production d'AMPs dans l'intestin. Il est également important de noter que l'altération de l'expression des AMPs est dépendante du site intestinal puisqu'elle est diminuée uniquement dans l'intestin distal (Tomas et al., 2016); (de Wit et al., 2008). La composition du microbiote, également dépendante du site intestinal (Hamilton et al., 2015), pourrait aussi affecter l'expression de Reg3- $\gamma$  (Natividad *et al.*, 2013). En effet, des souris monocolonisées avec le probiotique Bifidobacterium breve (Actinobactérie, Gram positif) présentent une augmentation plus importante de l'expression iléale et colique de Reg3-y que celles colonisées avec Escherichia coli JM83 (Protéobactérie, Gram négatif) (Natividad et al., 2013). Enfin, il est à noter que la diminution de l'expression des AMPs au niveau iléal pourrait être interprétée différemment. En effet, une fois liés aux bactéries Gram-négatifs, les AMPs vont perméabiliser les membranes cellulaires conduisant à la mort bactérienne et donc à la libération du LPS. On peut alors imaginer que la réduction des AMPs serait finalement un phénomène protecteur pour la muqueuse afin de limiter la quantité de LPS libre pouvant traverser l'épithélium intestinal.

Le résultat majeur de l'article 1 est la mise en évidence d'une perturbation de la dynamique de sécrétion de mucus dans l'iléon suite à 6 semaines de consommation d'un régime obésogène. En effet, les animaux WD présentaient une diminution du nombre de cellules remplies de mucus associées à une augmentation de la présence de mucus dans la lumière iléale, suggérant une augmentation de la sécrétion de mucus dans l'iléon. Une étude récemment publiée par Tomas et collaborateurs montre également, dans l'iléon, une perturbation de la dynamique de sécrétion de mucus suite à la consommation d'un régime obesogène pendant 30 jours chez la souris. Cependant cette perturbation est caractérisée, à l'inverse de notre étude, par une rétention du mucus dans les cellules (Tomas et al., 2016). En effet, dans cette étude, la consommation d'un régime obésogène diminue l'expression de la Merpin-B, une peptidase nécessaire à la libération de muc2 dans la lumière induisant alors une accumulation de muc2 dans les cellules à mucus. Malgré l'opposition de nos résultats avec ceux de Thomas, on peut suggérer que, tout comme l'altération de la perméabilité intestinale lors de la consommation d'un régime obésogène (Hamilton et al., 2015), les modifications de la régulation de la sécrétion de mucus induites par le régime obésogène soient dynamiques selon la durée de l'intervention nutritionnelle. Ainsi, à court terme, après 4 semaines de régime, le mucus serait retenu dans les cellules jusqu'à atteindre une limite qui induirait le signal pour sécréter le mucus dans la lumière, comme observé dans notre étude après 6 semaines de régime obésogène. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'établir une étude longitudinale couplant plusieurs techniques de mesure de la sécrétion de mucus comme la coloration au PAS/Bleu d'Alcian ou l'immuno-histochimie avec l'utilisation d'anticorps anti-muc2 et anti-Merpin\_B.



# Figure 28 : Transport de LPS à travers les cellules intestinales de l'intestin grêle. Images obtenues grâce à la technique d'imagerie *in vivo*. Howe et collaborateurs, 2014

Des souris standards ont été anesthésiées puis injectées avec du LPS-Alexa 488 (vert). Trente minutes à 1 heure après l'injection, la surface des cellules intestinales a été observée avec un microscope intravital confocal. Par ces images, les auteurs concluent que les LPS sont localisés uniquement dans les cellules à mucus (flèches roses). Un des principaux régulateurs de la sécrétion de mucus est l'acétylcholine (Specian *et al.*, 1980), un neurotransmetteur synthétisé par les neurones du système nerveux entérique, une partie du système nerveux autonome qui contrôle les fonctions digestives. Chez des souris DIO, la concentration tissulaire d'acétylcholine est augmentée dans le colon (Reichardt *et al.*, 2013) ainsi que dans le système nerveux entérique duodénal (Balemba *et al.*, 2011). On peut alors suggérer que la concentration iléale d'acétylcholine serait augmentée chez les animaux WD expliquant la sécrétion importante de mucus. La sécrétion de mucus est également stimulée par la liaison de la leptine avec son récepteur Ob-Rb exprimé sur les cellules intestinales (Plaisancie *et al.*, 2006; El Homsi *et al.*, 2007). L'augmentation de la sécrétion de leptine gastrique chez des animaux DIO (Le Beyec *et al.*, 2014) pourrait alors contribuer à la stimulation de la sécrétion de mucus. De même, Reg3- $\gamma$ , qui est fortement diminué dans notre modèle d'obésité, est nécessaire à une bonne organisation spatiale du mucus dans la lumière (Loonen *et al.*, 2014). L'ensemble de ces données suggère de fortes modifications de la dynamique de sécrétion du mucus dans ces modèles DIO qu'il faudrait approfondir afin d'en comprendre les mécanismes.

Comme décrit dans ma revue de littérature, les mécanismes précis par lesquelles les LPS traversent l'intestin ne sont pas connus, bien que plusieurs voies de passage aient été suggérées (Guerville et al., 2016). Les résultats obtenus dans l'article 1 montrent que dans le groupe WDpf, la perméabilité caecale au LPS est augmentée alors que ni la perméabilité paracellulaire ni la transcellulaire n'étaient modifiées suggérant que le LPS n'emprunterait pas ces voies de passages. Parmi les autres voies possibles, il semblerait que les cellules à mucus, en parallèle de leur action principale sécrétrice, puissent également être des voies d'entrée du LPS ainsi que des bactéries porteuses de LPS (Howe et al., 2014; Knoop et al., 2016). En effet, Howe et collaborateurs ont montré sur des images d'immunohistochimie, que les LPS étaient capables de traverser l'intestin via des cellules à mucus (Figure 29). Cependant, ces résultats restent préliminaires, comme le montre la figure 29, et restent à être confirmés. L'équipe de Knoop a, par la suite, décrit plus précisément ce mécanisme qui serait dépendant du site intestinal (Knoop et al., 2015). En effet, la formation de ces goblet-cell associated passage (GAP) dans l'intestin grêle serait stimulée par l'acétylcholine alors qu'à l'inverse, dans le colon, via une interaction entre Myd88 et les LPS, les GAP ne seraient pas sensibles à l'acétylcholine. Ainsi, les GAP coliques sont absents dans un côlon sain. Dans notre modèle, suite à un problème technique, nous n'avons malheureusement pas pu effectuer de coloration histologique des cellules à mucus dans le caecum. Cependant, au niveau iléal, l'augmentation de la perméabilité spécifique au LPS observée en chambres d'Ussing coïncide avec les observations histologiques de sécrétion de mucus. Nous avons donc émis l'hypothèse que les LPS pourraient emprunter cette voie de passage transépithélial. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de conduire de nouvelles études en testant par exemple la perméabilité au LPS de tissus intestinaux en chambre d'Ussing sur des tissus stimulés ou non avec des molécules stimulatrices de la sécrétion de mucus. Cependant, la technique la Figure 29: Prise alimentaire (Kcal/j) des rats nourris *ad libitum* avec un régime standard (C ou chow), western diet (WD ou HFC) ou western diet supplémenté avec de l'inuline (HFI) et de rats nourris avec western diet en pair-feeding (WDpf) pendant 1 semaine.

Les animaux qui ont consommé un régime obésogène (WDal + HFC) présentent une hyperphagie. En revanche, la supplémenation en inuline ainsi que le pair-feeding permettent d'empêcher l'hyperphagie initiale.



plus appropriée serait d'utiliser de l'imagerie *in vivo* ciblant les cellules à mucus infusées avec du FITC-LPS et stimulées ou non avec de l'acétylcholine.

Nos travaux permettent d'émettre de nouvelles hypothèses qui pourraient amener à de nouvelles pistes thérapeutiques pour limiter l'endotoxémie métabolique et les conséquences de l'obésité. Si l'hypothèse d'un passage du LPS à travers les cellules à mucus iléale est vérifiée, inhiber la formation de GAP pourrait alors permettre de freiner l'entrée de LPS. Dans l'intestin grêle, les GAP se forment en réponse à une stimulation avec de l'acétylcholine. Cibler ce neurotransmetteur ou moduler le phénotype du système nerveux central pour ré-équilibrer les proportions des différents neurones avec des approches nutritionnelles, comme déjà montré avec des acides gras à chaines courtes (Soret et al. 2010) ou à longue-chaine (de Quelen et al, 2011), pourrait permettre de modifier la formation de ces GAP. La formation des GAP semble également dépendante de la composition du microbiote. Ainsi, en modulant le microbiote intestinal iléal par une supplémentation en pré ou probiotique, on pourrait moduler la régulation de la sécrétion et de l'organisation du mucus et des GAP. Cependant, le microbiote iléal est très différent de celui du gros intestin (Figure 28). Afin de cibler spécifiquement l'iléon, il sera ainsi nécessaire de trouver des probiotiques se développant dans les conditions physico-chimiques particulières de l'iléon, tels que des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes (Lactobacilles par exemple) ou Actinobacteria (Bifidobactéries par exemple).

### 3) L'hyperphagie initiale à la consommation d'un régime obésogène, un

### mécanisme naturel et essentiel au maintien de l'homéostasie du gros intestin?

Chez le rongeur, l'introduction d'un régime obésogène induit une phase d'hyperphagie pendant les 3-4 premiers jours de régime suivie d'une phase de stabilisation où l'animal retrouve un apport énergétique similaire à celui des animaux chow. Afin de vérifier que les effets observés sur l'intestin et le foie à l'issue de l'intervention nutritionnelle étaient réellement la conséquence de la consommation d'un régime obésogène pendant 6 semaines et non celle de l'hyperphagie initiale, nous avons ajouté, dans le design expérimental de l'article 1, un groupe de rats nourris avec un régime obésogène dont l'hyperphagie de la première semaine a été contrôlée. Dans l'article 2, même si ce n'était pas le but recherché, nous avons observé que la supplémentation en inuline chez des animaux nourris avec le régime HF empêchait également l'hyperphagie initiale (Figure 30).



Figure 30 : La prise alimentaire de la première semaine est prédictive du gain de poids à 6 semaines.

Corrélation entre la prise alimentaire (Kcal/jour) et le gain de poids. Animaux issus de l'article 1 (A) et de l'article 2 (B).

## L'hyperphagie est-elle responsable du gain de poids et de l'adiposité induite par un régime obésogène ?

Chez l'homme, il a été montré que l'activation du système de la récompense, stimulée par des aliments palatables, était corrélée au gain de poids à 6 mois (Yokum *et al.*, 2011). Ainsi il était possible de prédire le gain de poids en fonction de l'hyperphagie initiée par un régime palatable (Yokum *et al.*, 2011). En modifiant cette première phase d'hyperphagie, nos deux modèles (WDpf et HFI) permettent ainsi d'évaluer l'impact de l'hyperphagie sur le gain de poids et l'adiposité à plus long terme. Nous observons, dans les deux modèles, qu'avec ou sans hyperphagie initiale, les animaux ne présentent pas réellement de différence significative de gain de poids et d'adiposité à 6 et 8 semaines. Néanmoins, il est important de noter que la quantité d'énergie consommée durant cette phase d'hyperphagie reste prédictive du gain de poids à long terme (Figure 31) avec cependant un coefficient de détermination relativement faible ( $r^2=0.22$  et  $r^2=0.35$ ). Ces résultats suggèrent que l'hyperphagie induit des modifications physiologiques impliquées dans la régulation de la dépense énergétique et/ou de la PA à long terme. Il est donc essentiel d'étudier plus précisément cette phase d'hyperphagie et son impact à long terme.

#### Le changement de rythme alimentaire impacte-t-il le développement de l'obésité ?

Chez les animaux WDpf, notre protocole de pair-feeding consistait à proposer aux rats la quantité d'aliment WD calculée pour correspondre au même niveau énergétique que celui de la ration des rats chow. Cette ration était ensuite fournie aux animaux 2 fois par jour. Cependant, cette perturbation du rythme alimentaire chez les rats WDpf, peut également être un facteur influençant la physiologie et le métabolisme des animaux (Hatori et al., 2012). C'est pourquoi un groupe de rat contrôle pair-fed a été rajouté, ces animaux recevaient l'aliment chow également deux fois par jour la première semaine puis étaient nourris ad libitum jusqu'à 6 semaines. Nous avons montré que la procédure de pair-feeding pouvait influencer la physiologie à 6 semaines. En effet, les animaux pair-fed (pf) présentaient une altération de l'expression de certains AMPs et de molécules de signalisation de TLR4. De plus, les animaux Cpf présentaient une adiposité ainsi qu'une PA plus importante que les animaux Cal. Ces modifications phénotypiques peuvent être liées à des effets confondants dus à la procédure de pairfeeding. En effet, une fois avoir reçu leurs rations alimentaires, les animaux pf consomment l'intégralité de leur nourriture puis rentrent dans une phase de jeune de plusieurs heures (Ellacott et al., 2010). De plus, du fait de la rythmicité de la distribution des rations, les animaux sont capables de moduler leur sécrétion d'hormones en fonction des heures de distribution (Ellacott et al., 2010). Ainsi, ces effets confondants liés à la procédure de pair-feeding ont pu impacter la physiologie et la régulation du comportement alimentaire. Cependant, l'ajout du quatrième groupe de rats pair-fed nourris avec un régime contrôle dans le design expérimental nous a permis de nous affranchir de ces nombreux facteurs confondants liés au protocole de pair-feeding. L'impact de l'hyperphagie sur la

	3 jours		1 Semaine	
	hyperphagie	Sans hyperphagie	hyperphagie	Sans hyperphagie
Stéatose	+	=	+	=
Triglycérides plasmatiques	=	_	=	_
Intolérance au glucose	+	+	+	=
Glucose plasmatique à jeun	+	-	+	-
alpha-1- antichymotrypsin plasmatique	+	=	=	=
ApoA-VI plasmatique	+	=	=	—

### Tableau 24 : Récapitulatif des résultats obtenus dans l'article de Williams et collaborateurs.

Des souris ont été nourries soit *ad libitum* avec un régime contrôle, obésogène ou pair-fed avec un régime obésogène pendant 3 jours et 1 semaine. Les colonnes 'hyperphagie' correspondant aux résultats obtenus chez animaux nourris avec un régime obesogène *ad libitum* alors que les colonnes 'sans hyperphagie' représentent ceux des animaux nourris avec un régime obésogène pair-fed. Les auteurs ont mesuré, entre autres, la stéatose, plasmatiques, l'intolérance au glucose ainsi que des données plasmatiques de glucose à jeun, l'alpha-1-antichymotrypsine, l'apolipoprotéine A-VI et les triglycérides.

+, - ou = : Supérieur, inférieur ou égal comparé aux animaux chow

physiologie intestinale a été identifié lorsqu'une interaction significative entre l'effet du régime et du rythme alimentaire était observée.

# Quels mécanismes pourraient expliquer pourquoi l'hyperphagie initiale est nécessaire à la régulation de la BEI et de l'endotoxémie?

La période d'hyperphagie initiale à la consommation d'un régime obésogène est marquée par un nombre important de modifications métaboliques. Cette période est caractérisée par une perturbation des métabolismes du glucose et des lipides, une stéatose ainsi qu'une inflammation (Lee et al., 2011; Wiedemann et al., 2013; Williams et al., 2014). Williams et collaborateurs ont également utilisé la procédure de pair-feeding pour identifier l'effet de l'hyperphagie initiale dans l'initiation de ces troubles métaboliques, soit immédiatement (à la fin des 3 jours d'hyperphagie) ou à court-terme (à 1 semaine, i.e. 4 jours après le retour à un ingéré normal) (Williams et al., 2014). Les principaux résultats comparant les animaux WDpf et WDal sont présentés dans le tableau 23. Certaines altérations du métabolisme sont spécifiques de la consommation ad libitum du régime WD pendant 3 jours, telles que la stéatose, l'augmentation de l'Apolipoprotéine-4 (impliquée dans la synthèse de chylomicrons) ou l'α-1 anti-chymotrypsin (une protéine de l'inflammation) qui ne sont pas retrouvées quand les animaux sont en pair-feeding pendant ces 3 jours. D'autres études se sont également intéressées aux changements métaboliques lors de cette phase de 3-4 jours d'hyperphagie sans contrôler l'impact de la surconsommation de lipides. Ainsi, l'introduction d'un régime obésogène entraine un pic de leptine après 3 jours de régime (Williams et al., 2014). Nous avons également mesuré la perméabilité au LPS dans l'iléon et le caecum ainsi que l'endotoxémie chez des animaux nourris avec un régime WD pendant 1, 2 ou 4 jours afin de caractériser plus précisément les conséquences intestinales de cette phase d'hyperphagie. Aucune perte de fonction de barrière intestinale ni d'augmentation de l'endotoxémie n'ont été observées (données préliminaires, Figure 30). Ces résultats nous suggèrent que l'hyperphagie initiale induit des perturbations du métabolisme des lipides et du glucose mais impacte peu la perméabilité intestinale au LPS.

Dans un deuxième temps, Williams et collaborateurs ont observé l'impact des 3 jours d'hyperphagie à court terme en étudiant les animaux *ad libitum* ou en pair-feeding après une semaine de régime. Certains paramètres tels que l'intolérance au glucose restaient différents entre les animaux WD avec ou sans hyperphagie alors que d'autre devenaient similaires comme la quantité plasmatique d'ApoA-IV (Tableau 23). Dans notre étude, l'absence d'hyperphagie induit, après une semaine de régime, une inflammation dans le caecum et l'iléon des rats WDpf relativement au WDal mais n'influence pas l'augmentation de la perméabilité caecale et iléale au LPS induite par la consommation du régime obésogène pendant 1 semaine (Données non publiées dans l'article 1, Figure 31).



Figure 31 : Effet de la consommation d'un régime obésogène pendant 1,2 ou 4 jours sur la prise alimentaire, l'endotoxémie et la perméabilité au LPS.

Des rats Wistar ont été nourris soit avec un régime standard (Chow) ou avec un régime obésogène pendant 1 (HFD1),2 (HFD2) ou 4 jours (HFD4). La prise alimentaire (Kcal/jour) a été mesurée quotidiennement (A). La concentration plasmatique de LBP a été mesurée via un kit ELISA (B). Pour des raisons techniques, nous n'avons pas les valeurs de LBP des animaux HFD4. La perméabilité iléale (C) et caecale (D) au FITC-LPS a été mesurée en Chambre d'Ussing.



Figure 32 : Perméabilité au LPS après une semaine de régime obésogène.

Perméabilité iléale (A) et caecale (B) au LPS chez des rats nourris *ad libitum* avec un régime standard (Cal), western diet (WDal) ou pair-fed avec le régime standard (Cpf) ou western diet (WDpf) pendant 1 semaine.

Enfin, à plus long terme, l'absence d'hyperphagie initiale induirait une altération du métabolisme des lipides dans le foie (de Meijer et al., 2010). Cependant, le modèle d'étude utilisé dans cet article présente un biais important puisque les animaux WDpf avaient un apport énergétique inférieur tout au long de l'intervention comparé aux animaux WDal. Ainsi, les différences observées entre les deux groupes pourraient être uniquement le résultat d'une surconsommation de lipides et non un effet propre à l'hyperphagie initiale. Dans notre modèle, à long terme, les rats WDpf sans hyperphagie présentaient une augmentation de 100% de la perméabilité caecale au LPS, comparé aux animaux WDal avec hyperphagie. Plusieurs hypothèses de mécanismes expliquant ce résultat peuvent être émises. Tout d'abord, les rats WDpf pourraient présenter une diminution de la réabsorption d'AB associée à une augmentation de la synthèse d'AB comme suggéré par la diminution de l'expression génique d'ASBT au niveau iléal et l'augmentation de l'expression génique de Cyp7A1 au niveau hépatique. Ces modifications pourraient aboutir à une élévation de la quantité d'AB dans les contenus caecaux. Murakami et collaborateurs ont montré que la quantité d'AB dans le caecum est fortement corrélée à une augmentation de la perméabilité caecale (Murakami et al., 2016). Ainsi, le passage accru de LPS observé chez les animaux WDpf pourrait être la conséquence d'une trop grande quantité d'AB dans le contenu caecal. Cependant l'absence de modifications des perméabilités paracellulaire et transcellulaire au niveau du caecum suggère que cet effet des AB serait spécifique à la perméabilité au LPS. En l'absence de données définitives sur les mécanismes de passage transépithélial de LPS aux différents niveaux de l'intestin, cette hypothèse reste à confirmer. En plus de la détermination des voies de passage transépithélial du LPS, pour valider cette hypothèse d'un rôle des AB, il serait intéressant, dans un premier temps, de mesurer les concentrations d'AB dans les contenus intestinaux. Puis la deuxième étape serait de caractériser plus précisément le métabolisme des AB lors de l'hyperphagie.

En addition de son rôle principal dans l'absorption des lipides, la bile permet également d'excréter le LPS du foie dans le duodénum pour qu'il soit évacué. Le passage iléal et caecal de LPS étant augmenté chez les animaux WDpf à 6 semaines, l'afflux de LPS au niveau hépatique est probablement également augmenté. Ainsi, on peut ainsi faire l'hypothèse que la synthèse d'AB serait élevée et la réabsorption diminuée, permettant d'accroître l'excrétion de LPS par la bile. Pour vérifier ces hypothèses, il serait dans un premier temps nécessaire d'étudier l'impact du LPS sur le métabolisme des AB *via* des modèles *in vivo* et *in vitro*. Dans un deuxième temps, après cannulation du canal cholédoque, la concentration de LPS pourrait être mesurée dans la bile afin d'évaluer la part de la détoxification du LPS par le système biliaire chez ces animaux WDpf.

Enfin, comme décrit dans le chapitre 5 de l'introduction bibliographique, il est commun d'observer une variabilité de réponse au régime obésogène chez le rongeur. Dans notre étude, nous avons observé une grande variabilité dans les valeurs de LPS plasmatique au sein du groupe WDpf. Deux sousgroupes WDpf <sup>high endotoxémie</sup> et WDpf <sup>low endotoxémie</sup> ont pu être identifiés. Ces animaux présentaient le même phénotype à l'exception de l'abondance caecale des Protéobactéries qui était élevée chez les animaux LPS<sup>high endotoxémie</sup> ainsi qu'une plus forte capacité de passage du LPS au niveau caecal. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une composition du microbiote délétère notamment élevée en Protéobactéries pourrait, en plus de la perte de fonction de barrière intestinale, participer à l'endotoxémie.

Pour conclure, en ajoutant un groupe contrôle nous affranchissant des facteurs confondants de l'hyperphagie initiale, nous avons découvert que celle-ci pouvait être impliquée dans le développement de l'endotoxémie métabolique liée à la consommation d'un régime obésogène *via* un effet sur le passage transépithélial du LPS au niveau caecal. De plus, ce modèle de rat sans hyperphagie pourrait se révéler un modèle d'étude précieux pour avancer dans la compréhension de mécanismes de prise en charge du LPS et de l'endotoxémie métabolique.

#### 4) La physiologie des VANs peut-elle être modifiée par l'homéostasie intestinale?

#### Quel est l'impact d'un changement de microbiote sur la physiologie des VANs ?

La régulation de la PA est le reflet d'une interaction entre le SNC et l'intestin. Plusieurs études ont montré que des modifications de l'homéostasie intestinale par notamment des perturbations du microbiote intestinal modifiait cette communication, entrainait des désordres centraux comme la dépression (Bravo et al., 2011) mais aussi des dérèglements de la PA via une action au niveau central (Norris et al., 2013; Alcock et al., 2014; Frost et al., 2014; Breton et al., 2016). Nous avons montré, dans l'article 2, que l'introduction d'un régime synthétique modifie la composition du microbiote intestinal et induit, de façon concomitante, une perte de sensibilité à la CCK. Ce parallèle a également était montré dans les études conduites par l'équipe d'Helen Raybould. Leurs travaux sur les rats Sprague-Dawley ont montré que les animaux OB-P présentaient une modification du microbiote ainsi qu'une perte de sensibilité à la CCK (de La Serre et al., 2010; de Lartigue et al., 2012). Cependant, ces résultats doivent être confirmés puisqu'ils ont été observés lors de deux expérimentations animales différentes. Plusieurs mécanismes expliquant cette relation entre microbiote et physiologie des VANs peuvent être suggérés. Tout d'abord, les bactéries du microbiote sont impliquées dans la digestion des protéines, or beaucoup d'AA sont les précurseurs de neurotransmetteurs. Ainsi, une modification de leur métabolisme pourrait impacter le SNC en modulant la synthèse endogène de neurotransmetteurs. Parmi les AA, l'aspartate, sous sa forme méthylée, active les récepteurs NMDA présents au niveau des synapses entre le nerf vague et le NTS et qui sont impliqués dans la transmission du signal satiétogène de la CCK (Campos et al., 2013). Dans notre article 2, nous avons montré que les animaux ayant une

perte de sensibilité à la CCK, présentaient également une augmentation de la quantité d'aspartate dans les contenus caecaux appuyant ainsi notre hypothèse. De plus, le microbiote semble également être impliqué dans le développement des EEC et la production d'hormones intestinales puisque les souris GF présentent une diminution de la production de CCK de façon basale (Figure 34) (Duca et al., 2012). Enfin, la dernière hypothèse est que le microbiote intestinal pourrait être à l'origine de la présence dans le sang de composés bactériens, tels que les LPS (Cf section suivante) qui pourraient modifier la régulation de la PA. Des études montrent que des bactéries particulières telles que des lactobacilles peuvent activer les fibres afférentes du nerf vague (Horii et al., 2013; Perez-Burgos et al., 2013). L'originalité de nos résultats est de mettre en évidence que la composition du microbiote peut avoir un impact sur la régulation de la PA via le nerf vague. Cependant, nos travaux montrent un parallèle entre ces deux phénomènes mais en aucun cas de lien de cause à effet entre modulation du microbiote et modification physiologique des VANs. Pour cela, il serait intéressant, dans un premier temps, d'évaluer la sensibilité à la CCK de souris GF afin de s'assurer de l'implication du microbiote dans la régulation de la PA. Dans un deuxième temps, la composition du microbiote de souris conventionnelles pourrait être modulée par ajout de probiotiques ou d'antibiotiques afin d'observer les effets sur la régulation de la PA par le nerf vague. Enfin, par transplantation du microbiote d'animaux insensibles à la CCK à des souris GF, on serait capable d'évaluer le lien de cause à effet entre le microbiote intestinal et la sensibilité à la CCK.

#### Quel est le rôle des LPS dans les modifications de la physiologie des VANs ?

En plus d'altérer la physiologie de nombreux tissus tels que le foie, le muscle et le TA, les LPS probablement *via* l'induction de l'inflammation impactent également le fonctionnement des organes et tissus impliqués dans la régulation du comportement alimentaire. Au niveau hypothalamique, il a été proposé que l'inflammation induite par la liaison du LPS avec TLR4 soit capable d'induire une résistance à la leptine (de Git *et al.*, 2015). Ainsi, l'élévation de l'endotoxémie pourrait également être un facteur déclencheur de la résistance à la leptine des VANs observée lors de l'obésité.

*PTP1b, une nouvelle protéine impliquée dans le développement de la résistance à la leptine induit par les LPS dans les VANs ?* 

En addition de SOCS3, une deuxième protéine inhibitrice de la signalisation de la leptine, PTP1b, a été identifiée comme facteur contribuant à la résistance à la leptine (Zabolotny *et al.*, 2002). Plusieurs études ont montré son implication dans le développement de l'obésité et des troubles du comportement alimentaire *via* des modèles génétique de délétion pour cette protéine (Cheng *et al.*, 2002; White *et al.*, 2009). De plus, TNF- $\alpha$  est capable d'induire le recrutement de NF- $\kappa$ B sur le promoteur du gène de PTP1b dans le TA (Zabolotny *et al.*, 2008). Des inhibiteurs de PTP1b réduisent également l'induction de la signalisation d'IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B suggérant une interaction forte entre inflammation et signalisation de la leptine *via* cette protéine.



## Figure 33 : Niveau protéique de CKK dans l'intestin de souris conventionnelles (NORM) et GF après une nuit de jeune.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SEM. \*\*\*P<0.001, comparé aux souris NORM. *De Duca et al,* 2012 Cependant, à la différence de SOCS3 où l'expression est mesurée suite à l'injection aigüe de leptine, les études sur PTP1b comparent son expression basale (Cheng *et al.*, 2002; White *et al.*, 2009). Ainsi, l'effet d'une injection aigüe de leptine sur l'expression de PTP1b n'est pas connu, que ce soit dans l'hypothalamus ou le ganglion noueux. Plusieurs résultats nous permettent néanmoins d'émettre une hypothèse. Tout d'abord, une étude de White et collaborateurs montre qu'une infusion chronique de leptine induit une augmentation de l'expression de PTP1b dans l'hypothalamus (White *et al.*, 2009). Des résultats préliminaires obtenus durant mon séjour aux Etats-Unis tendent à montrer qu'une injection aigüe de leptine augmente l'expression de PTP1b dans l'hypothalamus et le ganglion noueux de rats standards (Figure 35).

Comme montré pour SOCS3 dans l'hypothalamus, le LPS semble capable de stimuler l'expression hypothalamique de PTP1b (Borges Bde et al., 2015). En effet, des injections quotidiennes de LPS pendant 7 jours augmentent l'expression protéique basale de PTP1b dans l'hypothalamus associée à une résistance à la leptine dans cet organe (Borges Bde et al., 2015). De même, les résultats préliminaires obtenus dans l'article 3 nous suggèrent un effet similaire du LPS dans le ganglion noueux. Toutefois, la répétition de ces expérimentations est nécessaire pour confirmer ces résultats. Par ailleurs, les résultats également présentés dans l'article 3 et obtenus sur les animaux décrits dans l'article 2 montrent que l'expression protéique, de PTP1b au niveau des VANs ne serait pas différente au niveau basal entre les groupes recevant les régimes synthétiques et ayant une sensibilité à la CCK diminuée mais n'augmenterait pas en réponse à la leptine chez ces rats à la différence des rats contrôles (Figure 36). L'ensemble de ces données très préliminaires suggère un lien entre sensibilité à la CCK et expression de PTP1b. Afin d'approfondir ce lien et d'établir un parallèle entre l'augmentation de PTP1b dans les VANs et la perte de sensibilité à la CCK, il serait possible de mesurer la sensibilité à la CCK chez des animaux injectés avec du LPS pendant 7 jours. Injecter ces animaux avec de la leptine nous permettrait également de confirmer, d'une part, les effets de la leptine sur l'expression de PTP1b dans les VANS, mais également d'observer une possible altération de cette réponse à la leptine suite à une exposition chronique au LPS. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de PTP1b nous permettrait de déterminer l'importance de cette protéine inhibitrice dans l'induction de la résistance à la leptine par le LPS dans les VANs et donc de la sensibilité à la CCK. La résistance à la leptine dans les VANS étant suffisante à l'induction de l'hyperphagie et de l'obésité chez la souris (de Lartigue et al., 2014), traiter les perturbations de la régulation de la PA, et plus particulièrement de la satiété, chez les obèses avec des inhibiteurs de PTP1b pourrait alors être un nouvel axe de traitement.



Figure 34 : Expression protéique de PTP1b dans l'hypothalamus (A) et le ganglion noueux (B) de rats chow injectés en intra-péritonéal avec du sérum physiologique ( 400µl) ou de la leptine (80ug/kg de poids).

Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SEM. Données issues de l'article 3 (non publiées).



Figure 35: Expression protéique de PTP1b dans l'hypothalamus (A) et le ganglion noueux (B) de rats chow, HFC, LFC, HFI, LFI (résumé en régime synthétique) injectés en intrapéritonéae avec du sérum physiologique ou de la leptine (80ug/kg de poids).

Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SEM. Données issues de l'article 3 (non publiées).

#### Lien avec l'endotoxémie métabolique ?

Les deux études qui ont suggéré l'implication du LPS dans le développement de la résistance à la leptine au niveau des VANs, ont utilisé soit un modèle *in vitro* (culture de ganglions noueux), soit un modèle de rats implantés avec des mini-pompes délivrant du LPS (de Lartigue et al., 2011; de La Serre et al., 2015). Un parallèle entre endotoxémie et perte de sensibilité à la CCK a également était montré chez les rats Sprague-Dawley OB-R et OB-P (de La Serre et al., 2010; de Lartigue et al., 2012). Cependant, une fois de plus, ces résultats proviennent de deux études séparées et il nous semblerait nécessaire de les confirmer dans la même expérimentation. Aucune étude in vivo n'a montré sur le même modèle à la fois une endotoxémie métabolique et une résistance à la leptine au niveau des VANs. Les résultats obtenus dans l'article 3, obtenus sur les animaux décrits dans l'article 1 (C, WDal et WDpf high endotoxemia) ne montrent aucun effet de l'endotoxémie métabolique sur les expressions géniques basales de PTP1b et SOCS3 au niveau du ganglion noueux. Dans l'article 2, les rats HFC ont été nourris pendant 8 semaines avec un régime obésogène, suggérant que ces animaux présentaient une endotoxémie métabolique, même si celle-ci n'a pas été mesurée. Nos données préliminaires (n=2 pour le groupe HFC) montrent que l'expression protéique de PTP1b dans les ganglions noueux au niveau basal était similaire entre les animaux HFC et Chow. En revanche, en réponse à une injection de leptine, les rats chow présentaient une augmentation de l'expression protéique de PTP1b à la différence des animaux HFC dont l'expression était similaire avec ou sans injection de leptine. De plus, ces résultats ont été également montrés au niveau hypothalamique (Données non publiées). Ces résultats préliminaires nous suggèrent que l'endotoxémie métabolique pourrait moduler l'expression de PTP1b en réponse à une injection de leptine et donc être impliquée dans la résistance à la leptine au niveau des VANs.

Pour conclure, le LPS à forte dose pourrait induire une augmentation basale de l'expression protéique de PTP1b au niveau du ganglion noueux. En revanche, le LPS à faible dose perturberait le rétrocontrôle de PTP1b en réponse à la leptine et probablement provoquerait de façon chronique une résistance à la leptine.



Figure 36 : Schéma général de thèse

### Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre comment l'endotoxémie métabolique pouvait résulter d'une altération de l'homéostasie intestinale. Nous avons également tenté de comprendre comment des perturbations de l'homéostasie intestinale et la présence de LPS dans le système circulatoire, pouvaient modifier la voie de signalisation de l'hormone satiétogène majeure, la CCK, en interaction avec la leptine. Le but à long-terme de ce travail était d'avancer dans les connaissances sur la dérégulation de la satiété chez les obèses, une diminution de ces signaux de satiété envoyés au SNC conduisant à une augmentation de la PA perpétuant ainsi l'obésité.

Les résultats de l'article 1 montrent que, chez le rat, l'endotoxémie métabolique induite par la consommation d'un régime synthétique obésogène pourrait résulter d'une augmentation du niveau de bactéries Gram-négative, porteuses de LPS, dans les contenus caecaux. D'autre part, la consommation d'un régime synthétique obésogène pendant 6 semaines augmenterait le passage de LPS à travers l'iléon. Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer cette altération de la barrière intestinale : une élévation de la sécrétion de mucus pouvant conduire à la formation de GAP qui laisserait passer les LPS ou une perturbation du métabolisme des acides biliaires qui augmenterait la quantité d'AB dans la lumière intestinale et altèrerait la BEI. Ainsi, ces résultats ouvrent sur de nouvelles pistes thérapeutiques afin de limiter l'endotoxémie métabolique et donc l'obésité (Figure 36).

Les résultats de l'article 2 montrent que la consommation d'un régime synthétique, indépendamment de la teneur en lipides du régime, altérerait le métabolome caecal. Ces résultats questionnent bien évidemment sur la part d'implication du taux élevé de lipides, de l'introduction d'un régime synthétique ou de l'obésité dans les modifications de la prise en charge intestinale du LPS observés dans l'article 1. Cependant, cet article montre clairement que modifier le microbiote intestinal par l'alimentation altère profondément la sensibilité à la CCK des animaux. Cette diminution de sensibilité ne serait pas due au taux de lipides de l'aliment ni au statut d'obésité des animaux (Figure 36).

Une fois dans le sang, les LPS peuvent avoir des conséquences néfastes sur le fonctionnement de nombreux organes y compris le nerf vague. Il est connu dans la littérature que, chez le rat, les LPS peuvent stimuler l'expression de SOCS3, un inhibiteur de la signalisation de la leptine dans le nerf vague. Nous avons montré dans l'article 3, que les LPS à forte dose pouvaient induire une augmentation de l'expression protéique basale de PTP1b, un deuxième inhibiteur de la signalisation de la leptine et parallèle à la diminution de la sensibilité à la CCK semblent également apparaître chez des animaux dont l'homéostasie intestinale est perturbée. Même si l'ensemble de ces résultats sont à confirmer,

nous avons ainsi soulevé une deuxième piste thérapeutique : la résistance à la leptine induite par les LPS, au niveau du nerf vague pourrait être limitée en ciblant spécifiquement PTP1b..

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes liant perturbation de l'homéostasie intestinale et régulation de la PA et suggère de nouvelles pistes de recherche pouvant à terme aboutir à des nouvelles thérapies pour limiter les défauts de régulation de la PA observée dans l'obésité.

### Perspectives

Les perspectives de ce travail s'articulent autour de trois grandes questions.

1) Quel est l'implication du taux de lipides, de l'obésité ou de la consommation d'un régime synthétique sur les mécanismes de prise en charge des LPS altérés lors de l'obésité ?

Comme décrits dans ma discussion générale, les récents résultats publiés sur l'impact de la consommation d'un régime synthétique (avec faible ou fort taux de lipides) sur le métabolisme questionnent sur l'interprétation des données obtenues dans l'article 1. Ainsi, il serait nécessaire d'évaluer l'implication du taux de lipides, de la consommation d'un régime synthétique et de l'obésité sur les différents paramètres identifiés comme facteurs clés dans le développement de l'endotoxémie métabolique. Pour répondre à ces questions, une nouvelle expérimentation animale est essentielle. Des rats sprague-dawley pourraient être nourris avec 3 régimes différents : régime standard d'animalerie, régime synthétique à faible taux de lipides et régime synthétique obésogène à fort taux de lipides. Afin de déterminer l'implication de l'obésité, des rats sprague dawley OB-P et OB-R consommant le même régime synthétique obésogène pourraient être utilisés. Grâce à ce nouveau design expérimental, nous serions alors capables d'éliminer les facteurs confondants liés à l'utilisation de régime synthétique mais également d'identifier l'impact de l'obésité dans l'induction de l'endotoxémie métabolique. In fine, ce travail s'insère dans une problématique de santé humaine, il sera alors crucial de confirmer ces résultats chez l'homme. En fonction des résultats obtenus, des biopsies d'iléon pourraient être réalisées chez des hommes obèses ou consommant un régime obésogène. La perméabilité au LPS, la sécrétion de mucus et l'expression d'AMPs pourraient alors être mesurées sur ces échantillons.

### 2) Comment empêcher l'endotoxémie métabolique pour limiter les troubles du comportement alimentaire ?

Les résultats obtenus dans l'article 2 montrent qu'une modification du microbiote est associée à une perturbation de la régulation de la satiété par le système leptine-CCK au niveau des VANs. En parallèle, l'équipe d'Helen Raybould montre que les LPS sont des inducteurs potentiels de la résistance à la leptine des VANs. Limiter l'endotoxémie métabolique pourrait donc réduire l'altération du système leptine-CCK. Les résultats de l'article 1 montrent que l'iléon semble être un site intestinal particulièrement important dans l'induction de l'endotoxémie métabolique. Afin de limiter le passage trans-épithélial de LPS de la lumière intestinale au compartiment sanguin, une étape importante serait de déterminer plus spécifiquement les voies de passage des LPS à travers l'iléon. D'après les travaux d'Howe, les LPS seraient capables de travers l'intestin *via* les cellules à mucus, une fois le mucus sécrété. Pour confirmer ces travaux, des tissus intestinaux pourraient être montés en chambres d'Ussing et stimulés avec de l'acétylcholine afin de provoquer la sécrétion de mucus. Ainsi, il nous serait possible de comparer le passage iléal de LPS selon la sécrétion de mucus. De la même manière,
*in vitro*, le passage de LPS à travers des cellules intestinales épithéliales stimulés ou non avec de l'acétylcholine pourra être mesuré grâce à l'utilisation de co-culture de lignée cellulaire unissant des cellules à mucus (HT29-MTX) et des cellules d'intestin grêle (Caco2). En comprenant la voie spécifique de passage du LPS à travers l'iléon, des outils pourraient être développés pour limiter sa translocation.

De façon plus générale, nous avons montré dans l'article 1 que l'homéostasie intestinale était un facteur clé dans l'induction de l'endotoxémie métabolique. En modulant ce facteur, il serait alors possible de limiter l'endotoxémie métabolique et les dérégulations de la satiété qui lui sont associées. En utilisant l'inuline comme modulateur de l'homéostasie intestinale nous avons montré que, dans nos conditions expérimentales, ce probiotique n'était pas réellement efficace sur le restauration du métabolome caecal et probablement pas sur l'endotoxémie métabolique. En effet, l'inuline agit principalement au niveau du gros intestin alors que les données de l'article 1 suggèrent que l'intestin grêle est le site intestinal à cibler. Chez le rat, on sait que l'iléon est riche en actinobactéries par rapport au gros intestin, ainsi l'utilisation de bidifidobactéries comme probiotique pourrait être un choix judicieux. Par ailleurs, ces bactéries ont un effet bénéfique sur la barrière intestinale chez le rat. Il serait ainsi intéressant d'identifier une espèce de bifidobactéries et de conduire une nouvelle étude comparant des animaux Chow, LF, HF, HF+bidifidobacterium pour mesurer l'endotoxémie ainsi que la réponse à la CCK.

## 3) La protéine PTP1b a-t-elle un rôle prédominant dans la résistance à la leptine induite par les LPS ?

Les résultats présentés dans l'article 3 sont préliminaires, il serait tout d'abord nécessaire de répéter les expérimentations afin de confirmer les données obtenues. Des observations supplémentaires pourraient toutefois être réalisées. Après 7 jours d'injection quotidienne de LPS, les animaux pourraient être injectés soit avec du sérum physiologique soit avec de la leptine afin d'étudier le rétrocontrôle de la leptine *via* PTP1b dans ce modèle de sur-expression de PTP1b. Dans le but d'évaluer si une élévation de l'expression de PTP1b peut induire une résistance à la leptine et donc une perte de sensibilité à la CCK, des animaux ayant reçus une injection quotidienne de LPS pendant 7 jours pourraient être soumis à un test de sensibilité à la CCK. Pour appuyer ces données, des inhibiteurs de PTP1b pourraient également être injectés lors des tests de sensibilités à la CCK. L'ensemble de ces données nous permettrait d'évaluer le rôle de PTP1b dans la résistance à la leptine induite par les LPS .

## Références

- Abreu, M. T., M. Fukata, et al. (2005). "TLR signaling in the gut in health and disease." J Immunol **174**(8): 4453-4460.
- Anderson, A. S., K. R. Haynie, et al. (2015). "Early skeletal muscle adaptations to short-term high-fat diet in humans before changes in insulin sensitivity." Obesity (Silver Spring) **23**(4): 720-724.
- Adam, T. C. and M. S. Westerterp-Plantenga (2005). "Glucagon-like peptide-1 release and satiety after a nutrient challenge in normal-weight and obese subjects." The British journal of nutrition 93(6): 845-851.
- Aguirre, V., T. Uchida, et al. (2000). "The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)." J Biol Chem 275(12): 9047-9054.
- Alcock, J., C. C. Maley, et al. (2014). "Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms." Bioessays 36(10): 940-949.
- Aja, S., S. Sahandy, et al. (2001). "Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 281(6): R1862-1867.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol 4(7): 499-511.
- Al Maskari, M. Y. and A. A. Alnaqdy (2006). "Correlation between Serum Leptin Levels, Body Mass Index and Obesity in Omanis." Sultan Qaboos University medical journal 6(2): 27-31.
- Allott, E. H. and S. D. Hursting (2015). "Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies." Endocrine-related cancer 22(6): R365-386.
- Amar, J., R. Burcelin, et al. (2008). "Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men." The American journal of clinical nutrition 87(5): 1219-1223.
- Andres, S. F., M. A. Santoro, et al. (2015). "Deletion of intestinal epithelial insulin receptor attenuates high-fat diet-induced elevations in cholesterol and stem, enteroendocrine, and Paneth cell mRNAs." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 308(2): G100-111.
- Apolzan, J. W. and R. B. Harris (2012). "Differential effects of chow and purified diet on the consumption of sucrose solution and lard and the development of obesity." Physiology & behavior 105(2): 325-331.
- Aranias, T., A. Grosfeld, et al. (2015). "Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation." Journal of Nutritional Science 4.
- Ariyasu, H., K. Takaya, et al. (2002). "Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin." Endocrinology 143(9): 3341-3350.
- Armougom, F., M. Henry, et al. (2009). "Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients." PLoS One 4(9): e7125.
- Arumugam, M., J. Raes, et al. (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." Nature 473(7346): 174-180.
- Asakawa, A., A. Inui, et al. (2003). "Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance." Gastroenterology 124(5): 1325-1336.
- Backhed, F., H. Ding, et al. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proc Natl Acad Sci U S A 101(44): 15718-15723.
- Backhed, F., J. K. Manchester, et al. (2007). "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." Proc Natl Acad Sci U S A 104(3): 979-984.
- Bado, A., S. Levasseur, et al. (1998). "The stomach is a source of leptin." Nature 394(6695): 790-793.
- Balemba, O. B., C. M. Stenkamp-Strahm, et al. (2011). High-Fat Diet-Induced Neuropathy of the Enteric Nervous System and the Effect of Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist, DMAB-Anabaseine Dihydrochloride.
- Ballinger, A., L. McLoughlin, et al. (1995). "Cholecystokinin is a satiety hormone in humans at physiological post-prandial plasma concentrations." Clinical science 89(4): 375-381.

- Banks, W. A., M. Tschop, et al. (2002). "Extent and direction of ghrelin transport across the bloodbrain barrier is determined by its unique primary structure." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 302(2): 822-827.
- Banno, R., D. Zimmer, et al. (2010). "PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice." J Clin Invest 120(3): 720-734.
- Basu, S., M. Haghiac, et al. (2011). "Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation." Obesity (Silver Spring) 19(3): 476-482.
- Batterham, R. L., M. A. Cohen, et al. (2003). "Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36." New England Journal of Medicine 349(10): 941-948.
- Batterham, R. L., H. Heffron, et al. (2006). "Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation." Cell Metab 4(3): 223-233.
- Batterham, R. L., C. W. Le Roux, et al. (2003). "Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88(8): 3989-3992.
- Beck, B. (2000). "Neuropeptides and obesity." Nutrition 16(10): 916-923.
- Beck, B., N. Musse, et al. (2002). "Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats." Biochemical and biophysical research communications 292(4): 1031-1035.
- Belzer, C. and W. M. de Vos (2012). "Microbes inside--from diversity to function: the case of Akkermansia." The ISME journal 6(8): 1449-1458.
- Bence, K. K., M. Delibegovic, et al. (2006). "Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action." Nature medicine 12(8): 917-924.
- Benoit, B., F. Laugerette, et al. (2015). "Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice." Nutrition research 35(4): 346-356.
- Benoit, B., P. Plaisancie, et al. (2014). "Pasture v. standard dairy cream in high-fat diet-fed mice: improved metabolic outcomes and stronger intestinal barrier." The British journal of nutrition 112(4): 520-535.
- Benoit, B., P. Plaisancie, et al. (2013). "High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet." Nutrition research 33(11): 952-960.
- Berteus Forslund, H., A. K. Lindroos, et al. (2002). "Meal patterns and obesity in Swedish women-a simple instrument describing usual meal types, frequency and temporal distribution." European journal of clinical nutrition 56(8): 740-747.
- Berthoud, H. R. (2008). "Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction." Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society 20 Suppl 1: 64-72.
- Berthoud, H. R. and W. L. Neuhuber (2000). "Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system." Autonomic neuroscience : basic & clinical 85(1-3): 1-17.
- Bertone, V., E. Tarantola, et al. (2011). "Altered alkaline phosphatase activity in obese Zucker rats liver respect to lean Zucker and Wistar rats discussed in terms of all putative roles ascribed to the enzyme." Eur J Histochem 55(1): e5.
- Bevins, C. L. and N. H. Salzman (2011). "Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis." Nat Rev Microbiol 9(5): 356-368.
- Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, et al. (1998). "Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance." Mol Cell 1(4): 619-625.
- Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, et al. (1998). "Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels." Endocrinology 139(8): 3485-3491.
- Boey, D., S. Lin, et al. (2006). "Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity." Diabetologia 49(6): 1360-1370.
- Bohorquez, D. V. and R. A. Liddle (2011). "Axon-like basal processes in enteroendocrine cells: characteristics and potential targets." Clinical and translational science 4(5): 387-391.
- Borges Bde, C., R. C. Rorato, et al. (2015). "Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPSinduced leptin resistance in male rats." Am J Physiol Endocrinol Metab 308(1): E40-50.
- Boutagy, N. E., R. P. McMillan, et al. (2015). "Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant?" Biochimie.

- Boyd, K. A., D. G. O'Donovan, et al. (2003). "High-fat diet effects on gut motility, hormone, and appetite responses to duodenal lipid in healthy men." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284(2): G188-196.
- Bravo, J. A., P. Forsythe, et al. (2011). "Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve." Proc Natl Acad Sci U S A 108(38): 16050-16055.
- Bray, G. A. (2010). "Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose." Current opinion in lipidology 21(1): 51-57.
- Breton, J., N. Tennoune, et al. (2016). "Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth." Cell Metab 23(2): 324-334.
- Briggs, D. I., P. J. Enriori, et al. (2010). "Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons." Endocrinology 151(10): 4745-4755.
- Briggs, D. I., S. H. Lockie, et al. (2013). "Calorie-restricted weight loss reverses high-fat diet-induced ghrelin resistance, which contributes to rebound weight gain in a ghrelin-dependent manner." Endocrinology 154(2): 709-717.
- Brignardello, J., P. Morales, et al. (2010). "Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function." Alimentary pharmacology & therapeutics 32(11-12): 1307-1314.
- Broberger, C., K. Holmberg, et al. (2001). "Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia." Brain research 903(1-2): 128-140.
- Broberger, C., M. Landry, et al. (1997). "Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus." Neuroendocrinology 66(6): 393-408.
- Brown, T. A., M. C. Washington, et al. (2011). "The feeding responses evoked by cholecystokinin are mediated by vagus and splanchnic nerves." Peptides 32(8): 1581-1586.
- Brun, P., I. Castagliuolo, et al. (2007). "Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292(2): G518-525.
- Burdyga, G., G. de Lartigue, et al. (2008). "Cholecystokinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28(45): 11583-11592.
- Burdyga, G., A. Varro, et al. (2006). "Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290(6): G1289-1297.
- Burdyga, G., S. Lal, et al. (2003). "Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans." Gastroenterology 124(1): 129-139.
- Burdyga, G., D. Spiller, et al. (2002). "Expression of the leptin receptor in rat and human nodose ganglion neurones." Neuroscience 109(2): 339-347.
- Burger, K. S. and E. Stice (2011). "Variability in reward responsivity and obesity: evidence from brain imaging studies." Current drug abuse reviews 4(3): 182-189.
- Burguera, B., M. E. Couce, et al. (2000). "Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats." Diabetes 49(7): 1219-1223.
- Cahill, F., Y. Ji, et al. (2014). "The Association of Serum Total Peptide YY (PYY) with Obesity and Body Fat Measures in the CODING Study." PLoS One 9(4): e95235.
- Camina, J. P., M. C. Carreira, et al. (2003). "Regulation of ghrelin secretion and action." Endocrine 22(1): 5-12.
- Cammisotto, P. and M. Bendayan (2012). "A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone." Anatomy & cell biology 45(1): 1-16.
- Campos, C. A., H. Shiina, et al. (2013). "Vagal afferent NMDA receptors modulate CCK-induced reduction of food intake through synapsin I phosphorylation in adult male rats." Endocrinology 154(8): 2613-2625.
- Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." Diabetes 56(7): 1761-1772.

- Cani, P. D., R. Bibiloni, et al. (2008). "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemiainduced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." Diabetes 57(6): 1470-1481.
- Cani, P. D., S. Possemiers, et al. (2009). "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." Gut 58(8): 1091-1103.
- Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, et al. (1996). "Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance." Lancet 348(9021): 159-161.
- Caroff, M. and D. Karibian (2003). "Structure of bacterial lipopolysaccharides." Carbohydrate research 338(23): 2431-2447.
- Carvalho, B. M., D. Guadagnini, et al. (2012). "Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice." Diabetologia 55(10): 2823-2834.
- Castanon, N., J. Lasselin, et al. (2014). "Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes." Frontiers in endocrinology 5: 74.
- Chandarana, K., C. Gelegen, et al. (2011). "Diet and gastrointestinal bypass-induced weight loss: the roles of ghrelin and peptide YY." Diabetes 60(3): 810-818.
- Chang, C. J., C. S. Lin, et al. (2015). "Ganoderma lucidum reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota." Nat Commun 6: 7489.
- Chassaing, B., J. Miles-Brown, et al. (2015). "Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 309(7): G528-541.
- Chen, P., Q. Zhang, et al. (2014). "Antidiabetic effect of Lactobacillus casei CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin." Nutrition 30(9): 1061-1068.
- Cheng, A., N. Uetani, et al. (2002). "Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B." Dev Cell 2(4): 497-503.
- Chiang, J. Y. (2002). "Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors." Endocrine reviews 23(4): 443-463.
- Chung, S., K. Lapoint, et al. (2006). "Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes." Endocrinology 147(11): 5340-5351.
- Clement, K., C. Vaisse, et al. (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." Nature 392(6674): 398-401.
- Clemente-Postigo, M., M. I. Queipo-Ortuno, et al. (2012). "Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients." Journal of lipid research 53(5): 973-978.
- Clemente-Postigo, M., M. Roca-Rodriguez Mdel, et al. (2015). "Lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding protein levels and their relationship to early metabolic improvement after bariatric surgery." Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery 11(4): 933-939.
- Cluny, N. L., E. D. Baraboi, et al. (2013). "High fat diet and body weight have different effects on cannabinoid CB(1) receptor expression in rat nodose ganglia." Autonomic neuroscience : basic & clinical 179(1-2): 122-130.
- Clerc, P., M. G. Coll Constans, et al. (2007). "Involvement of cholecystokinin 2 receptor in food intake regulation: hyperphagia and increased fat deposition in cholecystokinin 2 receptor-deficient mice." Endocrinology 148(3): 1039-1049.
- Cohen, J. C., J. D. Horton, et al. (2011). "Human fatty liver disease: old questions and new insights." Science 332(6037): 1519-1523.
- Coleman, D. L. and E. M. Eicher (1990). "Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse." The Journal of heredity 81(6): 424-427.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normalweight and obese humans." N Engl J Med 334(5): 292-295.
- Covasa, M., J. Grahn, et al. (2000). "High fat maintenance diet attenuates hindbrain neuronal response to CCK." Regulatory peptides 86(1-3): 83-88.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, et al. (2003). "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis." Neuron 37(4): 649-661.

- Creely, S. J., P. G. McTernan, et al. (2007). "Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab 292(3): E740-747.
- Cuzzolaro, M. (2016). Eating disorders and obesity. Clinical Management of Overweight and Obesity. P. Sbraccia, Nisoli, Enzo, Vettor, Roberto.
- Dakin, C. L., C. J. Small, et al. (2002). "Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 283(6): E1173-1177.
- Daly, D. M., S. J. Park, et al. (2011). "Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse." The Journal of physiology 589(Pt 11): 2857-2870.
- Daniel, H., A. Moghaddas Gholami, et al. (2014). "High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice." The ISME journal 8(2): 295-308.
- Date, Y., M. Kojima, et al. (2000). "Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans." Endocrinology 141(11): 4255-4261.
- Date, Y., N. Murakami, et al. (2002). "The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats." Gastroenterology 123(4): 1120-1128.
- Davis, J. E., N. K. Gabler, et al. (2008). "Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat." Obesity (Silver Spring) 16(6): 1248-1255.
- Davis, J. E., N. K. Gabler, et al. (2009). "The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes." Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 41(7): 523-530.
- de Courten, B., J. M. Moreno-Navarrete, et al. (2016). "Contrasting association of circulating sCD14 with insulin sensitivity in non-obese and morbidly obese subjects." Mol Nutr Food Res 60(1): 103-109.
- de Git, K. C. and R. A. Adan (2015). "Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity 16(3): 207-224.
- de La Serre, C. B., G. de Lartigue, et al. (2015). "Chronic exposure to low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons." Physiology & behavior 139: 188-194.
- de La Serre, C. B., C. L. Ellis, et al. (2010). "Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 299(2): G440-448.
- de Lartigue, G. (2014). "Putative roles of neuropeptides in vagal afferent signaling." Physiology & behavior 136: 155-169.
- de Lartigue, G. (2016). "Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity." The Journal of physiology.
- de Lartigue, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2011). "Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons." Am J Physiol Endocrinol Metab 301(1): E187-195.
- de Lartigue, G., C. Barbier de la Serre, et al. (2012). "Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats." PLoS One 7(3): e32967.
- de Lartigue, G., R. Dimaline, et al. (2007). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27(11): 2876-2882.
- De Lartigue, G., R. Dimaline, et al. (2010). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript mediates the actions of cholecystokinin on rat vagal afferent neurons." Gastroenterology 138(4): 1479-1490.

- de Lartigue, G., G. Lur, et al. (2010). "EGR1 Is a target for cooperative interactions between cholecystokinin and leptin, and inhibition by ghrelin, in vagal afferent neurons." Endocrinology 151(8): 3589-3599.
- de Lartigue, G., C. C. Ronveaux, et al. (2014). "Deletion of leptin signaling in vagal afferent neurons results in hyperphagia and obesity." Molecular metabolism 3(6): 595-607.de Meijer, V. E., H. D. Le, et al. (2010). "Dietary fat intake promotes the development of hepatic
- de Meijer, V. E., H. D. Le, et al. (2010). "Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model." Metabolism: clinical and experimental 59(8): 1092-1105.
- De Silva, A. and S. R. Bloom (2012). "Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity." Gut and liver 6(1): 10-20.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2005). "Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus." Endocrinology 146(10): 4192-4199.
- De Taeye, B., L. H. Smith, et al. (2005). "Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease." Current opinion in pharmacology 5(2): 149-154.
- de Wit, N. J., H. Bosch-Vermeulen, et al. (2008). "The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice." BMC medical genomics 1: 14.
- Degen, L., D. Matzinger, et al. (2001). "The effect of cholecystokinin in controlling appetite and food intake in humans." Peptides 22(8): 1265-1269.
- Dehghan, P., B. Pourghassem Gargari, et al. (2014). "Oligofructose-enriched inulin improves some inflammatory markers and metabolic endotoxemia in women with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial." Nutrition 30(4): 418-423.
- Delhanty, P. J., S. J. Neggers, et al. (2014). "Should we consider des-acyl ghrelin as a separate hormone and if so, what does it do?" Frontiers of hormone research 42: 163-174.
- Deopurkar, R., H. Ghanim, et al. (2010). "Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3." Diabetes Care 33(5): 991-997.
- Dockray, G. J. (2006). Gastrointestinal hormones: Cholecystokinin, somatostatin and ghrelin. Physiology of the Gastrointestinal Tract. L. Johnson, editor, Elsevier. 1.
- Dockray, G. J. (2014). "Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain." The Journal of physiology 592(14): 2927-2941.
- Dockray, G. J. and G. Burdyga (2011). "Plasticity in vagal afferent neurones during feeding and fasting: mechanisms and significance." Acta physiologica 201(3): 313-321.
- Donovan, M. J., G. Paulino, et al. (2007). "CCK(1) receptor is essential for normal meal patterning in mice fed high fat diet." Physiology & behavior 92(5): 969-974.
- Dowman, J. K., J. W. Tomlinson, et al. (2010). "Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease." QJM : monthly journal of the Association of Physicians 103(2): 71-83.
- Drewe, J., C. Beglinger, et al. (2001). "Effect of ischemia on intestinal permeability of lipopolysaccharides." European journal of clinical investigation 31(2): 138-144.
- Druce, M. R., A. M. Wren, et al. (2005). "Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects." Int J Obes (Lond) 29(9): 1130-1136.
- Duboc, H., Y. Tache, et al. (2014). "The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application." Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver 46(4): 302-312.
- Duca, F. A., T. D. Swartz, et al. (2013). "Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors." Int J Obes (Lond) 37(3): 375-381.
- Duca, F. A., L. Zhong, et al. (2013). "Reduced CCK signaling in obese-prone rats fed a high fat diet." Hormones and behavior 64(5): 812-817.
- Duncan, S. H., G. E. Lobley, et al. (2008). "Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss." Int J Obes (Lond) 32(11): 1720-1724.
- Duparc, T., H. Plovier, et al. (2016). "Hepatocyte MyD88 affects bile acids, gut microbiota and metabolome contributing to regulate glucose and lipid metabolism." Gut.

- Edwards, C. M., C. R. Abbott, et al. (2000). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat." Brain research 866(1-2): 128-134.
- El Homsi, M., R. Ducroc, et al. (2007). "Leptin modulates the expression of secreted and membraneassociated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293(1): G365-373.
- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, et al. (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." J Clin Invest 105(12): 1827-1832.
- Elchebly, M., P. Payette, et al. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." Science 283(5407): 1544-1548.
- Ellacott, K. L., G. J. Morton, et al. (2010). "Assessment of feeding behavior in laboratory mice." Cell Metab 12(1): 10-17.
- Enos, R. T., K. T. Velazquez, et al. (2016). "High-fat diets rich in saturated fat protect against azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 310(11): G906-919.
- Erridge, C., T. Attina, et al. (2007). "A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation." The American journal of clinical nutrition 86(5): 1286-1292.
- Everard, A., C. Belzer, et al. (2013). "Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity." Proc Natl Acad Sci U S A 110(22): 9066-9071.
- Everard, A., L. Geurts, et al. (2014). "Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status." Nat Commun 5: 5648.
- Everard, A., V. Lazarevic, et al. (2014). "Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity." The ISME journal 8(10): 2116-2130.
- Fam, B. C., M. J. Morris, et al. (2007). "Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity." Diabetes, obesity & metabolism 9(6): 840-852.
- Farley, C., J. A. Cook, et al. (2003). "Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats." Obesity research 11(7): 845-851.
- Farooqi, I. S., S. A. Jebb, et al. (1999). "Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency." N Engl J Med 341(12): 879-884.
- Fasano, A. (2011). "Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer." Physiol Rev 91(1): 151-175.
- Federico, A., M. Dallio, et al. (2016). "Gastrointestinal Hormones, Intestinal Microbiota and Metabolic Homeostasis in Obese Patients: Effect of Bariatric Surgery." In vivo 30(3): 321-330.
- Feinle, C., I. M. Chapman, et al. (2002). "Plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) responses to duodenal fat and glucose infusions in lean and obese men." Peptides 23(8): 1491-1495.
- Fernandez-Real, J. M., E. Garcia-Fuentes, et al. (2010). "Fat overload induces changes in circulating lactoferrin that are associated with postprandial lipemia and oxidative stress in severely obese subjects." Obesity (Silver Spring) 18(3): 482-488.
- Fernandez-Real, J. M., S. Perez del Pulgar, et al. (2011). "CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance." Diabetes 60(8): 2179-2186.
- Ferrer, M., A. Ruiz, et al. (2013). "Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure." Environ Microbiol 15(1): 211-226.
- Filippi, B. M., M. A. Abraham, et al. (2013). "Insulin and glucagon signaling in the central nervous system." Reviews in endocrine & metabolic disorders 14(4): 365-375.
- Frantz, A. L., E. W. Rogier, et al. (2012). "Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides." Mucosal immunology 5(5): 501-512.
- Frost, G., M. L. Sleeth, et al. (2014). "The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism." Nat Commun 5: 3611.
- Gaige, S., E. Abou, et al. (2004). "Effects of interactions between interleukin-1 beta and leptin on cat intestinal vagal mechanoreceptors." The Journal of physiology 555(Pt 1): 297-310.

- Gainsford, T., T. A. Willson, et al. (1996). "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14564-14568.
- Gakis, G., M. H. Mueller, et al. (2009). "Neuronal activation in the nucleus of the solitary tract following jejunal lipopolysaccharide in the rat." Autonomic neuroscience : basic & clinical 148(1-2): 63-68.
- Gallant, A. R., J. Lundgren, et al. (2012). "The night-eating syndrome and obesity." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity 13(6): 528-536.
- Gamble, J., S. Kenny, et al. (2013). "Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 suppresses inhibition of gastric emptying by cholecystokinin (CCK) in mice." Regulatory peptides 185: 9-13.
- Garrett, W. S., J. I. Gordon, et al. (2010). "Homeostasis and inflammation in the intestine." Cell 140(6): 859-870.
- Geerling, J. J., Y. Wang, et al. (2013). "Acute central neuropeptide Y administration increases food intake but does not affect hepatic very low-density lipoprotein (VLDL) production in mice." PloS one 8(2): e55217.
- Gerard, P. (2016). "Gut microbiota and obesity." Cell Mol Life Sci 73(1): 147-162.
- Geurts, L., G. G. Muccioli, et al. (2013). "Chronic endocannabinoid system stimulation induces muscle macrophage and lipid accumulation in type 2 diabetic mice independently of metabolic endotoxaemia." PLoS One 8(2): e55963.
- Ghanim, H., S. Abuaysheh, et al. (2009). "Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance." Diabetes Care 32(12): 2281-2287.
- Ghigliotti, G., C. Barisione, et al. (2014). "Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions." Inflammation 37(4): 1337-1353.
- Ghoshal, S., J. Witta, et al. (2009). "Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides." Journal of lipid research 50(1): 90-97.
- Gibbs, J., R. C. Young, et al. (1973). "Cholecystokinin decreases food intake in rats." Journal of Comparative and Physiological Psychology 84(3): 488-495.
- Glaser, B., G. Zoghlin, et al. (1988). "Pancreatic polypeptide response to secretin in obesity: effects of glucose intolerance." Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 20(5): 288-292.
- Gnanapavan, S., B. Kola, et al. (2002). "The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 87(6): 2988.
- Gouaze, A., X. Brenachot, et al. (2013). "Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity." PLoS One 8(8): e72029.
- Gonzalez-Carter, D., A. E. Goode, et al. (2016). "Inhibition of Leptin-ObR Interaction Does not Prevent Leptin Translocation Across a Human Blood-Brain Barrier Model." Journal of neuroendocrinology 28(6).
- Gonzalez-Quintela, A., M. Alonso, et al. (2013). "Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity." PLoS One 8(1): e54600.
- Graham, M., J. R. Shutter, et al. (1997). "Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice." Nature genetics 17(3): 273-274.
- Gruber, L., S. Kisling, et al. (2013). "High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's diseaselike ileitis independently of obesity." PLoS One 8(8): e71661.
- Gu, Y., S. Yu, et al. (2014). "Dietary cocoa reduces metabolic endotoxemia and adipose tissue inflammation in high-fat fed mice." The Journal of nutritional biochemistry 25(4): 439-445.
- Guan, X. (2014). "The CNS glucagon-like peptide-2 receptor in the control of energy balance and glucose homeostasis." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 307(6): R585-596.
- Gubern, C., A. Lopez-Bermejo, et al. (2006). "Natural antibiotics and insulin sensitivity: the role of bactericidal/permeability-increasing protein." Diabetes 55(1): 216-224.

- Gueugnon, C., F. Mougin, et al. (2012). "Ghrelin and PYY levels in adolescents with severe obesity: effects of weight loss induced by long-term exercise training and modified food habits." European journal of applied physiology 112(5): 1797-1805
- Guerville, M. and G. Boudry (2016). "Gastro-intestinal and hepatic mechanisms limiting the entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol: ajpgi 00098 02016.
- Gueugnon, C., F. Mougin, et al. (2012). "Ghrelin and PYY levels in adolescents with severe obesity: effects of weight loss induced by long-term exercise training and modified food habits." European journal of applied physiology 112(5): 1797-1805.
- Guillemot-Legris, O., V. Mutemberezi, et al. (2016). "Obesity is associated with changes in oxysterol metabolism and levels in mice liver, hypothalamus, adipose tissue and plasma." Scientific reports 6: 19694.
- Guilmeau, S., M. Buyse, et al. (2004). "Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function." Current opinion in pharmacology 4(6): 561-566.
- Gummesson, A., L. M. Carlsson, et al. (2011). "Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women." Obesity (Silver Spring) 19(11): 2280-2282.
- Guo, J., Z. Liu, et al. (2015). "Lipopolysaccharide challenge significantly influences lipid metabolism and proteome of white adipose tissue in growing pigs." Lipids in health and disease 14: 68.
- Hamilton, M. K., G. Boudry, et al. (2015). "Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 308(10): G840-851.
- Hartmann, P., C. T. Seebauer, et al. (2016). "Deficiency of intestinal mucin-2 protects mice from dietinduced fatty liver disease and obesity." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 310(5): G310-322.
- Hatori, M., C. Vollmers, et al. (2012). "Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet." Cell Metab 15(6): 848-860.
- Hernandez, E., R. Bargiela, et al. (2013). "Functional consequences of microbial shifts in the human gastrointestinal tract linked to antibiotic treatment and obesity." Gut microbes 4(4): 306-315.
- Heuman, D. M. (1989). "Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions." Journal of lipid research 30(5): 719-730.
- Higa, T. S., A. V. Spinola, et al. (2014). "Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice." International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology 6(1): 47-54.
- Hildebrandt, M. A., C. Hoffmann, et al. (2009). "High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity." Gastroenterology 137(5): 1716-1724 e1711-1712.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature 420(6913): 333-336.
- Ho, A. and A. Chin (1988). "Circadian feeding and drinking patterns of genetically obese mice fed solid chow diet." Physiology & behavior 43(5): 651-656.
- Hodin, C. M., F. J. Verdam, et al. (2011). "Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals." The Journal of pathology 225(2): 276-284.
- Horii, Y., Y. Nakakita, et al. (2013). "Effects of intraduodenal injection of Lactobacillus brevis SBC8803 on autonomic neurotransmission and appetite in rodents." Neuroscience letters 539: 32-37.
- Hosoi, T., Y. Okuma, et al. (2005). "Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion." Autonomic neuroscience : basic & clinical 120(1-2): 104-107.
- Hosoi, T., S. Yokoyama, et al. (2010). "Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice." PLoS One 5(9).
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature 444(7121): 860-867.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." J Clin Invest 95(5): 2409-2415.

- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science 259(5091): 87-91.
- Howe, S. E., D. J. Lickteig, et al. (2014). "The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine." PLoS One 9(1): e86656.
- Hufeldt, M. R., D. S. Nielsen, et al. (2010). "Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors." Comparative medicine 60(5): 336-347.
- Human Microbiome Project Consortium, (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 486: 207-214.
- Hummasti, S. and G. S. Hotamisligil (2010). "Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes." Circulation research 107(5): 579-591.
- Hutchison, A. T. and L. K. Heilbronn (2016). "Metabolic impacts of altering meal frequency and timing Does when we eat matter?" Biochimie 124: 187-197.
- Irizarry, K. A., M. Miller, et al. (2016). "Prader Willi Syndrome: Genetics, Metabolomics, Hormonal Function, and New Approaches to Therapy." Advances in pediatrics 63(1): 47-77.
- Islam, K. B., S. Fukiya, et al. (2011). "Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats." Gastroenterology 141(5): 1773-1781.
- Ivezaj, V., M. A. White, et al. (2016). "Examining binge-eating disorder and food addiction in adults with overweight and obesity." Obesity (Silver Spring).
- Iwasaki, Y., M. Kakei, et al. (2013). "Pancreatic polypeptide and peptide YY3-36 induce Ca2+ signaling in nodose ganglion neurons." Neuropeptides 47(1): 19-23.
- Jiang, T., X. Gao, et al. (2016). "Apple-Derived Pectin Modulates Gut Microbiota, Improves Gut Barrier Function, and Attenuates Metabolic Endotoxemia in Rats with Diet-Induced Obesity." Nutrients 8(3).
- Johnson, A. M., A. Costanzo, et al. (2015). "High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability." PLoS One 10(4): e0122195.
- Johnson, A. R., J. J. Milner, et al. (2012). "The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity." Immunol Rev 249(1): 218-238.
- Jumpertz, R., D. S. Le, et al. (2011). "Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans." The American journal of clinical nutrition 94(1): 58-65.
- Jung, U. J. and M. S. Choi (2014). "Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease." International journal of molecular sciences 15(4): 6184-6223.
- Kaga, T., A. Inui, et al. (2001). "Modest overexpression of neuropeptide Y in the brain leads to obesity after high-sucrose feeding." Diabetes 50(5): 1206-1210.
- Kakei, M., T. Yada, et al. (2002). "Glucagon-like peptide-1 evokes action potentials and increases cytosolic Ca2+ in rat nodose ganglion neurons." Autonomic neuroscience : basic & clinical 102(1-2): 39-44.
- Kaliannan, K., S. R. Hamarneh, et al. (2013). "Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 110(17): 7003-7008.
- Kaliannan, K., B. Wang, et al. (2015). "A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia." Scientific reports 5: 11276.
- Kallio, K. A., K. A. Hatonen, et al. (2015). "Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders." Acta Diabetol 52(2): 395-404.
- Kamegai, J., H. Tamura, et al. (2004). "Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach." Regulatory peptides 119(1-2): 77-81.
- Karin, M. and M. Delhase (2000). "The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling." Seminars in immunology 12(1): 85-98.
- Kavanagh, K., A. T. Wylie, et al. (2013). "Dietary fructose induces endotoxemia and hepatic injury in calorically controlled primates." The American journal of clinical nutrition 98(2): 349-357.
- Kawano, M., M. Miyoshi, et al. (2016). "Lactobacillus gasseri SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet." Journal of nutritional science 5: e23.

- Kenny, S., J. Gamble, et al. (2013). "Gastric expression of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 is associated with hyperphagia and obesity in mice." Endocrinology 154(2): 718-726.
- Kentish, S., H. Li, et al. (2012). "Diet-induced adaptation of vagal afferent function." The Journal of physiology 590(1): 209-221.
- Kentish, S. J. and A. J. Page (2015). "The role of gastrointestinal vagal afferent fibres in obesity." The Journal of physiology 593(4): 775-786.
- Kentish, S. J., G. A. Wittert, et al. (2013). "A chronic high fat diet alters the homologous and heterologous control of appetite regulating peptide receptor expression." Peptides 46: 150-158.
- Kern, P. A., M. Saghizadeh, et al. (1995). "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase." J Clin Invest 95(5): 2111-2119.
- Khan, A. R., F. R. Awan, et al. (2015). "Elevated serum level of human alkaline phosphatase in obesity." JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association 65(11): 1182-1185.
- Khodabandehloo, H., S. Gorgani-Firuzjaee, et al. (2016). "Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and beta-cell dysfunction." Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine 167(1): 228-256.
- Kim, B. J., O. D. Carlson, et al. (2005). "Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 90(12): 6665-6671.
- Kim, K. A., W. Gu, et al. (2012). "High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway." PLoS One 7(10): e47713.
- Kim, K. A., I. A. Lee, et al. (2014). "beta-Sitosterol attenuates high-fat diet-induced intestinal inflammation in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 in the NF-kappaB pathway." Molecular nutrition & food research 58(5): 963-972.
- Kim, M. K., K. H. Baek, et al. (2013). "Serum alkaline phosphatase, body composition, and risk of metabolic syndrome in middle-aged Korean." Endocrine journal 60(3): 321-328.
- Kirchner, H., J. A. Gutierrez, et al. (2009). "GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance." Nature medicine 15(7): 741-745.
- Kleinridders, A., D. Schenten, et al. (2009). "MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity." Cell Metab 10(4): 249-259.
- Kless, C., V. M. Muller, et al. (2015). "Diet-induced obesity causes metabolic impairment independent of alterations in gut barrier integrity." Mol Nutr Food Res 59(5): 968-978.
- Knoop, K. A., K. G. McDonald, et al. (2015). "Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon." Mucosal immunology 8(1): 198-210.
- Knoop, K. A., K. G. McDonald, et al. (2016). "Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria." Gut 65(7): 1100-1109.
- Kobayashi, K., T. M. Forte, et al. (2000). "The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding." Metabolism: clinical and experimental 49(1): 22-31.
- Koda, S., Y. Date, et al. (2005). "The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats." Endocrinology 146(5): 2369-2375.
- Kojima, M., H. Hosoda, et al. (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." Nature 402(6762): 656-660.
- Kojima, S., N. Ueno, et al. (2007). "A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation." Peptides 28(2): 459-463.
- Kong, L. C., B. A. Holmes, et al. (2014). "Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbiota in overweight and obese subjects." PLoS One 9(10): e109434.
- Kopp, A., C. Buechler, et al. (2009). "Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes." Obesity (Silver Spring) 17(4): 648-656.
- Krude, H., H. Biebermann, et al. (1998). "Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans." Nature genetics 19(2): 155-157.
- Lalles, J. P., R. Orozco-Solis, et al. (2012). "Perinatal undernutrition alters intestinal alkaline phosphatase and its main transcription factors KLF4 and Cdx1 in adult offspring fed a high-fat diet." The Journal of nutritional biochemistry 23(11): 1490-1497.

- Lam, Y. Y., C. W. Ha, et al. (2012). "Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice." PLoS One 7(3): e34233.
- Langille, M. G., J. Zaneveld, et al. (2013). "Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences." Nature biotechnology 31(9): 814-821.
- Laskey, R. A., M. L. McCarroll, et al. (2016). "Obesity-related endometrial cancer: an update on survivorship approaches to reducing cardiovascular death." BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology 123(2): 293-298.
- Lassmann, V., P. Vague, et al. (1980). "Low plasma levels of pancreatic polypeptide in obesity." Diabetes 29(6): 428-430.
- Lau, E., C. Marques, et al. (2016). "The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity." Nutrition & metabolism 13: 31.
- Laugerette, F., M. Alligier, et al. (2014). "Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14." Molecular nutrition & food research 58(7): 1513-1518.
- Laugerette, F., J. P. Furet, et al. (2012). "Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab 302(3): E374-386.
- Laugerette, F., C. Vors, et al. (2011). "Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation." The Journal of nutritional biochemistry 22(1): 53-59.
- Le Beyec, J., A. L. Pelletier, et al. (2014). "Overexpression of gastric leptin precedes adipocyte leptin during high-fat diet and is linked to 5HT-containing enterochromaffin cells." Int J Obes (Lond) 38(10): 1357-1364.
- Le Chatelier, E., T. Nielsen, et al. (2013). "Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers." Nature 500(7464): 541-546.
- Le Drean, G., V. Haure-Mirande, et al. (2014). "Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway." FASEB J 28(3): 1059-1070.
- Lecomte, V., N. O. Kaakoush, et al. (2015). "Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters." PLoS One 10(5): e0126931.
- le Roux, C. W., R. L. Batterham, et al. (2006). "Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety." Endocrinology 147(1): 3-8.
- Lee, G. H., R. Proenca, et al. (1996). "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice." Nature 379(6566): 632-635.
- Lee, Y. S., P. Li, et al. (2011). "Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance." Diabetes 60(10): 2474-2483.
- Leibowitz, K. L., G. Q. Chang, et al. (2007). "Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight." Int J Obes (Lond) 31(8): 1210-1221.
- Levin, B. E., A. A. Dunn-Meynell, et al. (1997). "Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats." The American journal of physiology 273(2 Pt 2): R725-730.
- Ley, R. E., F. Backhed, et al. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." Proc Natl Acad Sci U S A 102(31): 11070-11075.
- Li, T. and J. Y. Chiang (2009). "Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs." PPAR research 2009: 501739.
- Li, J., W. Ma, et al. (2011). "Slower gastric emptying in high-fat diet induced obese rats is associated with attenuated plasma ghrelin and elevated plasma leptin and cholecystokinin concentrations." Regulatory peptides 171(1-3): 53-57.
- Lin, S., T. C. Thomas, et al. (2000). "Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity 24(5): 639-646.
- Lindstrom, P. (2007). "The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]." TheScientificWorldJournal 7: 666-685.

- Lira, F. S., J. C. Rosa, et al. (2012). "Long-term interdisciplinary therapy reduces endotoxin level and insulin resistance in obese adolescents." Nutrition journal 11: 74.
- Lira, F. S., J. C. Rosa, et al. (2010). "Endotoxin levels correlate positively with a sedentary lifestyle and negatively with highly trained subjects." Lipids in health and disease 9: 82.
- Little, T. J., K. L. Feltrin, et al. (2008). "A high-fat diet raises fasting plasma CCK but does not affect upper gut motility, PYY, and ghrelin, or energy intake during CCK-8 infusion in lean men." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 294(1): R45-51.
- Liu, X., L. Lu, et al. (2014). "Lipopolysaccharide binding protein, obesity status and incidence of metabolic syndrome: a prospective study among middle-aged and older Chinese." Diabetologia 57(9): 1834-1841.
- Liu, Z. J., J. Bian, et al. (2007). "Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver." Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 39(7): 489-494.
- Lonnqvist, F., P. Arner, et al. (1995). "Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects." Nature medicine 1(9): 950-953.
- Loonen, L. M., E. H. Stolte, et al. (2014). "REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum." Mucosal immunology 7(4): 939-947.
- Lopresti, A. L. and P. D. Drummond (2013). "Obesity and psychiatric disorders: commonalities in dysregulated biological pathways and their implications for treatment." Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 45: 92-99.
- Lowette, K., L. Roosen, et al. (2015). "Effects of high-fructose diets on central appetite signaling and cognitive function." Frontiers in nutrition 2: 5.
- Luche, E., B. Cousin, et al. (2013). "Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism." Molecular metabolism 2(3): 281-291.
- Luck, H., S. Tsai, et al. (2015). "Regulation of obesity-related insulin resistance with gut antiinflammatory agents." Cell Metab 21(4): 527-542.
- Lugari, R., A. Dei Cas, et al. (2004). "Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) secretion and plasma dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) activity in morbidly obese patients undergoing biliopancreatic diversion." Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 36(2): 111-115.
- Lynes, M., S. Narisawa, et al. (2011). "Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 301(6): R1738-1747.
- Malaisse-Lagae, F., J. L. Carpentier, et al. (1977). "Pancreatic polypeptide: a possible role in the regulation of food intake in the mouse. Hypothesis." Experientia 33(7): 915-917.
- Major, P., M. Matlok, et al. (2015). "Changes in levels of selected incretins and appetite-controlling hormones following surgical treatment for morbid obesity." Wideochirurgia i inne techniki maloinwazyjne = Videosurgery and other miniinvasive techniques / kwartalnik pod patronatem Sekcji Wideochirurgii TChP oraz Sekcji Chirurgii Bariatrycznej TChP 10(3): 458-465.
- Malo, M. S., S. Biswas, et al. (2006). "The pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression." DNA and cell biology 25(12): 684-695.
- Manco, M., J. M. Fernandez-Real, et al. (2007). "Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92(2): 483-490.
- Mandal, R. S., S. Saha, et al. (2015). "Metagenomic surveys of gut microbiota." Genomics, proteomics & bioinformatics 13(3): 148-158.
- Mandviwala, T., U. Khalid, et al. (2016). "Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker?" Current atherosclerosis reports 18(5): 21.
- Manning, S. and R. L. Batterham (2014). "The role of gut hormone peptide YY in energy and glucose homeostasis: twelve years on." Annual review of physiology 76: 585-608.

- Mantzoros, C. S. and J. S. Flier (2000). "Editorial: leptin as a therapeutic agent--trials and tribulations." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 85(11): 4000-4002.
- Mao, J. W., H. Y. Tang, et al. (2015). "Intestinal mucosal barrier dysfunction participates in the progress of nonalcoholic fatty liver disease." International journal of clinical and experimental pathology 8(4): 3648-3658.
- Marco, J., M. A. Zulueta, et al. (1980). "Reduced pancreatic polypeptide secretion in obese subjects." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 50(4): 744-747.
- Marques, C., M. Meireles, et al. (2016). "High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat." Adipocyte 5(1): 11-21.
- Marti, A., A. Marcos, et al. (2001). "Obesity and immune function relationships." Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity 2(2): 131-140.
- Martire, S. I., N. Holmes, et al. (2013). "Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity." PLoS One 8(4): e60407.
- Mastrodonato, M., D. Mentino, et al. (2014). "High-fat diet alters the oligosaccharide chains of colon mucins in mice." Histochemistry and cell biology 142(4): 449-459.
- McManus, B., R. Korpela, et al. (2015). "Compared to casein, bovine lactoferrin reduces plasma leptin and corticosterone and affects hypothalamic gene expression without altering weight gain or fat mass in high fat diet fed C57/BL6J mice." Nutrition & metabolism 12: 53.
- McRoberts, J. A., R. Aranda, et al. (1990). "Insulin regulates the paracellular permeability of cultured intestinal epithelial cell monolayers." J Clin Invest 85(4): 1127-1134.
- Melanson, K. J., T. J. Angelopoulos, et al. (2008). "High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation." The American journal of clinical nutrition 88(6): 1738S-1744S.
- Melhorn, S. J., E. G. Krause, et al. (2010). "Acute exposure to a high-fat diet alters meal patterns and body composition." Physiology & behavior 99(1): 33-39.
- Milanski, M., G. Degasperi, et al. (2009). "Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29(2): 359-370.
- Moesgaard, S. G., B. Ahren, et al. (2004). "Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach." Regulatory peptides 120(1-3): 261-267.
- Monte, S. V., J. A. Caruana, et al. (2012). "Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus." Surgery 151(4): 587-593.
- Monteleone, P., R. Bencivenga, et al. (2003). "Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88(11): 5510-5514.
- Montgomery, M. K., N. L. Hallahan, et al. (2013). "Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding." Diabetologia 56(5): 1129-1139.
- Monti, V., J. J. Carlson, et al. (2006). "Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults." Journal of the American Dietetic Association 106(6): 822-828; quiz 829-830.
- Moran, T. H., A. R. Baldessarini, et al. (1997). "Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin." The American journal of physiology 272(4 Pt 2): R1245-1251.
- Moran, T. H. and S. Bi (2006). "Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 361(1471): 1211-1218.
- Moreira, A. P., T. F. Teixeira, et al. (2016). "Effect of a high-fat meal containing conventional or higholeic peanuts on post-prandial lipopolysaccharide concentrations in overweight/obese men." Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association 29(1): 95-104.
- Moreno-Navarrete, J. M., F. Ortega, et al. (2012). "Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance." Int J Obes (Lond) 36(11): 1442-1449.

- Moreno-Navarrete, J. M., F. J. Ortega, et al. (2008). "Association of circulating lactoferrin concentration and 2 nonsynonymous LTF gene polymorphisms with dyslipidemia in men depends on glucose-tolerance status." Clinical chemistry 54(2): 301-309.
- Moreno-Navarrete, J. M., F. J. Ortega, et al. (2009). "Decreased circulating lactoferrin in insulin resistance and altered glucose tolerance as a possible marker of neutrophil dysfunction in type 2 diabetes." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 94(10): 4036-4044.
- Moreno-Navarrete, J. M., M. Sabater, et al. (2012). "Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance." PLoS One 7(5): e37160.
- Muller, T. D., R. Nogueiras, et al. (2015). "Ghrelin." Molecular metabolism 4(6): 437-460.
- Muller, V. M., T. Zietek, et al. (2016). "Gut barrier impairment by high-fat diet in mice depends on housing conditions." Mol Nutr Food Res 60(4): 897-908.
- Munzberg, H., J. S. Flier, et al. (2004). "Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice." Endocrinology 145(11): 4880-4889.
- Munzberg, H. and C. D. Morrison (2015). "Structure, production and signaling of leptin." Metabolism: clinical and experimental 64(1): 13-23.
- Murakami, Y., S. Tanabe, et al. (2016). "High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice." Journal of food science 81(1): H216-222.
- Murphy, E. F., P. D. Cotter, et al. (2010). "Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models." Gut 59(12): 1635-1642.
- Naito, E., Y. Yoshida, et al. (2011). "Beneficial effect of oral administration of Lactobacillus casei strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice." Journal of applied microbiology 110(3): 650-657.
- Narisawa, S., L. Huang, et al. (2003). "Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice." Molecular and cellular biology 23(21): 7525-7530.
- Naslund, E., B. Barkeling, et al. (1999). "Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity 23(3): 304-311.
- Natividad, J. M., C. L. Hayes, et al. (2013). "Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and Bifidobacterium breve NCC2950." Applied and environmental microbiology 79(24): 7745-7754.
- Naznin, F., K. Toshinai, et al. (2015). "Diet-induced obesity causes peripheral and central ghrelin resistance by promoting inflammation." The Journal of endocrinology 226(1): 81-92.
- Nefti, W., C. Chaumontet, et al. (2009). "A high-fat diet attenuates the central response to within-meal satiation signals and modifies the receptor expression of vagal afferents in mice." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 296(6): R1681-1686.
- Nohr, M. K., A. Dudele, et al. (2016). "LPS-Enhanced Glucose-Stimulated Insulin Secretion Is Normalized by Resveratrol." PLoS One 11(1): e0146840.
- Norris, G. H., C. Jiang, et al. (2016). "Milk sphingomyelin improves lipid metabolism and alters gut microbiota in high fat diet-fed mice." The Journal of nutritional biochemistry 30: 93-101.
- Norris, V., F. Molina, et al. (2013). "Hypothesis: bacteria control host appetites." J Bacteriol 195(3): 411-416.
- Nourissat, G., G. Ciais, et al. (2015). "Arthroscopy and obesity." Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR 101(8 Suppl): S351-352.
- Oliveira, A. G., B. M. Carvalho, et al. (2011). "Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats." Diabetes 60(3): 784-796.
- Ollmann, M. M., B. D. Wilson, et al. (1997). "Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein." Science 278(5335): 135-138.
- Ortiz, S., P. Zapater, et al. (2014). "Bacterial DNA translocation holds increased insulin resistance and systemic inflammatory levels in morbid obese patients." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 99(7): 2575-2583.

- Owyang, C. and A. Heldsinger (2011). "Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite." Journal of neurogastroenterology and motility 17(4): 338-348.
- Park, H. K. and R. S. Ahima (2014). "Leptin signaling." F1000prime reports 6: 73.
- Paulino, G., N. Darcel, et al. (2008). "Adaptation of lipid-induced satiation is not dependent on caloric density in rats." Physiology & behavior 93(4-5): 930-936.
- Pedroso, J. A., D. C. Buonfiglio, et al. (2014). "Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity." Molecular metabolism 3(6): 608-618.
- Pendyala, S., J. M. Walker, et al. (2012). "A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut." Gastroenterology 142(5): 1100-1101 e1102.
- Peng, X., Y. Nie, et al. (2015). "Juglone prevents metabolic endotoxemia-induced hepatitis and neuroinflammation via suppressing TLR4/NF-kappaB signaling pathway in high-fat diet rats." Biochemical and biophysical research communications 462(3): 245-250.
- Peng, L., Z. R. Li, et al. (2009). "Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers." J Nutr 139(9): 1619-1625.
- Perez-Burgos, A., B. Wang, et al. (2013). "Psychoactive bacteria Lactobacillus rhamnosus (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304(2): G211-220.
- Pfluger, P. T., D. Herranz, et al. (2008). "Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage." Proc Natl Acad Sci U S A 105(28): 9793-9798.
- Pfluger, P. T., J. Kampe, et al. (2007). "Effect of human body weight changes on circulating levels of peptide YY and peptide YY3-36." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92(2): 583-588.
- Phillips, R. J. and T. L. Powley (1998). "Gastric volume detection after selective vagotomies in rats." The American journal of physiology 274(6 Pt 2): R1626-1638.
- Pieramico, O., P. Malfertheiner, et al. (1990). "Interdigestive cycling and post-prandial release of pancreatic polypeptide in severe obesity." Int J Obes (Lond) 14(12): 1005-1011.
- Pierre, N., L. Deldicque, et al. (2013). "Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet." PLoS One 8(5): e65061.
- Pilvi, T. K., S. Harala, et al. (2009). "Effects of high-calcium diets with different whey proteins on weight loss and weight regain in high-fat-fed C57BL/6J mice." The British journal of nutrition 102(3): 337-341.
- Pischon, T., U. Nothlings, et al. (2008). "Obesity and cancer." The Proceedings of the Nutrition Society 67(2): 128-145.
- Plaisancie, P., R. Ducroc, et al. (2006). "Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290(4): G805-812.
- Plaza-Diaz, J., C. Gomez-Llorente, et al. (2014). "Effects of Lactobacillus paracasei CNCM I-4034, Bifidobacterium breve CNCM I-4035 and Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats." PLoS One 9(5): e98401.
- Qi, X., J. T. Reed, et al. (2008). "Ghrelin secretion is not reduced by increased fat mass during dietinduced obesity." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 295(2): R429-435.
- Raimondi, F., P. Santoro, et al. (2008). "Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294(4): G906-913.
- Rajala, M. W., C. M. Patterson, et al. (2014). "Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice." Endocrinology 155(3): 748-757.
- Raybould, H. E. (2007). "Mechanisms of CCK signaling from gut to brain." Current opinion in pharmacology 7(6): 570-574.
- Reichardt, F., C. Baudry, et al. (2013). "Properties of myenteric neurones and mucosal functions in the distal colon of diet-induced obese mice." The Journal of physiology 591(20): 5125-5139.
- Reidelberger, R. D., J. Hernandez, et al. (2004). "Abdominal vagal mediation of the satiety effects of CCK in rats." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 286(6): R1005-1012.

- Reinehr, T., P. J. Enriori, et al. (2006). "Pancreatic polypeptide in obese children before and after weight loss." Int J Obes (Lond) 30(10): 1476-1481.
- Reunanen, J., V. Kainulainen, et al. (2015). "Akkermansia muciniphila Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer." Applied and environmental microbiology 81(11): 3655-3662.
- Ridaura, V. K., J. J. Faith, et al. (2013). "Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice." Science 341(6150): 1241214.
- Riley, T. P., J. M. Neal-McKinney, et al. (2013). "Capsaicin-sensitive vagal afferent neurons contribute to the detection of pathogenic bacterial colonization in the gut." Journal of neuroimmunology 257(1-2): 36-45.
- Ronveaux, C. C., G. de Lartigue, et al. (2014). "Ability of GLP-1 to decrease food intake is dependent on nutritional status." Physiology & behavior 135: 222-229.
- Rossi, M., M. S. Kim, et al. (1998). "A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo." Endocrinology 139(10): 4428-4431.
- Saha, S., T. F. Batten, et al. (1995). "Glutamate-immunoreactivity in identified vagal afferent terminals of the cat: a study combining horseradish peroxidase tracing and postembedding electron microscopic immunogold staining." Experimental physiology 80(2): 193-202.
- Sainz, N., J. Barrenetxe, et al. (2015). "Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin." Metabolism: clinical and experimental 64(1): 35-46.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." Obesity (Silver Spring) 19(6): 1109-1117.
- Sayin, S. I., A. Wahlstrom, et al. (2013). "Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist." Cell Metab 17(2): 225-235.
- Schwartz, M. W., E. Peskind, et al. (1996). "Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans." Nature medicine 2(5): 589-593.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature 404(6778): 661-671.
- Schwiertz, A., D. Taras, et al. (2010). "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." Obesity (Silver Spring) 18(1): 190-195.
- Sebastian, J. C. (2013). "Respiratory physiology and pulmonary complications in obesity." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism 27(2): 157-161.
- Sefcikova, Z., T. Hajek, et al. (2008). "Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats." Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca 57(3): 467-474.
- Sellmann, C., J. Priebs, et al. (2015). "Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time." The Journal of nutritional biochemistry 26(11): 1183-1192.
- Serino, M., E. Luche, et al. (2012). "Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota." Gut 61(4): 543-553.
- Sharifnia, T., J. Antoun, et al. (2015). "Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 309(4): G270-278.
- Shen, J., M. S. Obin, et al. (2013). "The gut microbiota, obesity and insulin resistance." Molecular aspects of medicine 34(1): 39-58.
- Singh, M. (2014). "Mood, food, and obesity." Frontiers in psychology 5: 925.
- Sleeth, M. L., E. L. Thompson, et al. (2010). "Free fatty acid receptor 2 and nutrient sensing: a proposed role for fibre, fermentable carbohydrates and short-chain fatty acids in appetite regulation." Nutrition research reviews 23(1): 135-145.
- Smith, G. P., C. Jerome, et al. (1985). "Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats." The American journal of physiology 249(5 Pt 2): R638-641.
- Soares, A., E. J. Beraldi, et al. (2015). "Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice." BMC gastroenterology 15: 3.

- Sobhani, I., M. Buyse, et al. (2002). "Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach." Gastroenterology 122(2): 259-263.
- Song, G. J., M. Jung, et al. (2016). "A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation." Journal of neuroinflammation 13(1): 86.
- Specian, R. D. and M. R. Neutra (1980). "Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine." J Cell Biol 85(3): 626-640.
- Stadlbauer, U., S. C. Woods, et al. (2015). "PYY3-36: Beyond food intake." Frontiers in neuroendocrinology 38: 1-11.
- Stanley, S., K. Wynne, et al. (2004). "Gastrointestinal satiety signals III. Glucagon-like peptide 1, oxyntomodulin, peptide YY, and pancreatic polypeptide." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286(5): G693-697.
- Stenman, L. K., R. Holma, et al. (2013). "A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304(3): G227-234.
- Stenman, L. K., R. Holma, et al. (2013). "Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity." The British journal of nutrition 110(6): 1157-1164.
- Stenman, L. K., R. Holma, et al. (2012). "High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids." World journal of gastroenterology : WJG 18(9): 923-929.
- Stockinger, S., C. U. Duerr, et al. (2014). "TRIF signaling drives homeostatic intestinal epithelial antimicrobial peptide expression." J Immunol 193(8): 4223-4234.
- Strohmayer, A. J. and D. Greenberg (1994). "Devazepide alters meal patterns in lean, but not obese, male Zucker rats." Physiology & behavior 56(5): 1037-1039.
- Succurro, E., C. Segura-Garcia, et al. (2015). "Obese Patients With a Binge Eating Disorder Have an Unfavorable Metabolic and Inflammatory Profile." Medicine 94(52): e2098.
- Suganami, T., T. Mieda, et al. (2007). "Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation." Biochemical and biophysical research communications 354(1): 45-49.
- Sun, L., Z. Yu, et al. (2010). "A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese." Diabetes Care 33(9): 1925-1932.
- Suzuki, T. and H. Hara (2010). "Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats." Nutrition & metabolism 7: 19.
- Suzuki, T., S. Yoshida, et al. (2008). "Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability." The British journal of nutrition 100(2): 297-305.
- Svenson, K. L., R. Von Smith, et al. (2007). "Multiple trait measurements in 43 inbred mouse strains capture the phenotypic diversity characteristic of human populations." Journal of applied physiology 102(6): 2369-2378.
- Swartz, T. D., Y. Sakar, et al. (2013). "Preserved adiposity in the Fischer 344 rat devoid of gut microbiota." FASEB J 27(4): 1701-1710.
- Swartz, T. D., D. M. Savastano, et al. (2010). "Reduced sensitivity to cholecystokinin in male rats fed a high-fat diet is reversible." J Nutr 140(9): 1698-1703.
- Taira, R., S. Yamaguchi, et al. (2015). "Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes." Journal of clinical biochemistry and nutrition 56(2): 149-154.
- Takeuchi, T., H. Shimizu, et al. (2004). "Bovine lactoferrin reduces plasma triacylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents." The British journal of nutrition 91(4): 533-538.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell 83(7): 1263-1271.
- Teixeira, T. F., M. C. Collado, et al. (2012). "Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability." Nutrition research 32(9): 637-647.
- Teixeira, T. F., N. C. Souza, et al. (2012). "Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors." Clinical nutrition 31(5): 735-740.

- Thigpen, J. E., K. D. Setchell, et al. (2004). "Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies." ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources 45(4): 401-416.
- Thomas, R. C., M. F. Bath, et al. (2014). "Exploring LPS-induced sepsis in rats and mice as a model to study potential protective effects of the nociceptin/orphanin FQ system." Peptides 61: 56-60.
- Tomas, J., C. Mulet, et al. (2016). "High-fat diet modifies the PPAR-gamma pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Toshinai, K., M. S. Mondal, et al. (2001). "Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration." Biochemical and biophysical research communications 281(5): 1220-1225.
- Tschop, M., D. L. Smiley, et al. (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." Nature 407(6806): 908-913.
- Tschop, M., C. Weyer, et al. (2001). "Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity." Diabetes 50(4): 707-709.
- Tsou, R. C. and K. K. Bence (2012). "Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases." Frontiers in neuroscience 6: 192.
- Tsukumo, D. M., M. A. Carvalho-Filho, et al. (2007). "Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance." Diabetes 56(8): 1986-1998.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." Nature 444(7122): 1027-1031.
- Turnbaugh, P. J., V. K. Ridaura, et al. (2009). "The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice." Science translational medicine 1(6): 6ra14.
- Ukkola, O. H., V. P. Puurunen, et al. (2011). "High serum fasting peptide YY (3-36) is associated with obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes." Regulatory peptides 170(1-3): 38-42.
- Ussar, S., N. W. Griffin, et al. (2015). "Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome." Cell Metab 22(3): 516-530.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." Nature 389(6651): 610-614.
- Vaishnava, S., M. Yamamoto, et al. (2011). "The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine." Science 334(6053): 255-258.
- van Dielen, F. M., C. van't Veer, et al. (2001). "Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity 25(12): 1759-1766.
- van Greevenbroek, M. M., C. G. Schalkwijk, et al. (2013). "Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences." The Netherlands journal of medicine 71(4): 174-187.
- Varma, M. C., C. M. Kusminski, et al. (2015). "Metabolic endotoxaemia in childhood obesity." BMC obesity 3: 3.
- Ventre, J., T. Doebber, et al. (1997). "Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice." Diabetes 46(9): 1526-1531.
- Verdam, F. J., S. Fuentes, et al. (2013). "Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity." Obesity (Silver Spring) 21(12): E607-615.
- Verdich, C., S. Toubro, et al. (2001). "The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety--effect of obesity and weight reduction." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity 25(8): 1206-1214.
- Verrijken, A., S. Francque, et al. (2010). "Visceral adipose tissue and inflammation correlate with elevated liver tests in a cohort of overweight and obese patients." Int J Obes (Lond) 34(5): 899-907.

- Vilsboll, T., T. Krarup, et al. (2003). "Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88(6): 2706-2713.
- Vors, C., G. Pineau, et al. (2015). "Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 100(9): 3427-3435.
- Waise, T. M., K. Toshinai, et al. (2015). "One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice." Biochemical and biophysical research communications 464(4): 1157-1162.
- Wald, H., Z. Ong, et al. (2016). Behavioral and Physiological Prédictors of Diet-Induced Weight Gain, Department of Psychology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States.
- Walters, W. A., Z. Xu, et al. (2014). "Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD." FEBS letters 588(22): 4223-4233.
- Wang, J., H. Tang, et al. (2015). "Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice." The ISME journal 9(1): 1-15.
- Wang, J. H., S. Bose, et al. (2014). "Flos Lonicera ameliorates obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota." PLoS One 9(1): e86117.
- Warden, C. H. and J. S. Fisler (2008). "Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding." Cell Metab 7(4): 277.
- Warwick, Z. S., C. M. McGuire, et al. (2000). "Behavioral components of high-fat diet hyperphagia: meal size and postprandial satiety." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 278(1): R196-200.
- Watson, C. J., C. J. Hoare, et al. (2005). "Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores." Journal of cell science 118(Pt 22): 5221-5230.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." J Clin Invest 115(5): 1111-1119.
- Wellman, P. J., L. L. Bellinger, et al. (2005). "Meal patterns and body weight after nicotine in male rats as a function of chow or high-fat diet." Pharmacology, biochemistry, and behavior 82(4): 627-634.
- White, C. L., A. Whittington, et al. (2009). "HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms." Am J Physiol Endocrinol Metab 296(2): E291-299.
- Wiedemann, M. S., S. Wueest, et al. (2013). "Adipose tissue inflammation contributes to short-term high-fat diet-induced hepatic insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab 305(3): E388-395.
- Wierup, N., W. G. Richards, et al. (2005). "CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight." Regulatory peptides 129(1-3): 203-211.
- Williams, L. M., F. M. Campbell, et al. (2014). "The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases." PLoS One 9(8): e106159.
- Wilsey, J. and P. J. Scarpace (2004). "Caloric restriction reverses the deficits in leptin receptor protein and leptin signaling capacity associated with diet-induced obesity: role of leptin in the regulation of hypothalamic long-form leptin receptor expression." The Journal of endocrinology 181(2): 297-306.
- Wilsey, J., S. Zolotukhin, et al. (2003). "Central leptin gene therapy fails to overcome leptin resistance associated with diet-induced obesity." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 285(5): R1011-1020.
- Winzell, M. S. and B. Ahren (2004). "The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes." Diabetes 53 Suppl 3: S215-219.

- Wisen, O., H. Bjorvell, et al. (1992). "Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal." Regulatory peptides 39(1): 43-54.
- Woods, S. C., T. A. Lutz, et al. (2006). "Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 361(1471): 1219-1235.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, et al. (2003). "A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats." J Nutr 133(4): 1081-1087.
- Wren, A. M., L. J. Seal, et al. (2001). "Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans." The Journal of clinical endocrinology and metabolism 86(12): 5992.
- Wren, A. M., C. J. Small, et al. (2001). "Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats." Diabetes 50(11): 2540-2547.
- Xia, S. F., X. M. Duan, et al. (2015). "Role of thyroid hormone homeostasis in obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high-fat diet." Metabolism: clinical and experimental 64(5): 566-579.
- Xiang, X., W. An, et al. (2013). "Lipopolysaccharide inhibits the expression of resistin in adipocytes." Journal of molecular endocrinology 51(3): 287-299.
- Xu, A. W., C. B. Kaelin, et al. (2005). "Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance." PLoS biology 3(12): e415.
- Yamawaki, Y., H. Kimura, et al. (2010). "MyD88 plays a key role in LPS-induced Stat3 activation in the hypothalamus." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 298(2): R403-410.
- Yang, H. (2002). "Central and peripheral regulation of gastric acid secretion by peptide YY." Peptides 23(2): 349-358.
- Yang, N., C. Wang, et al. (2005). "Interaction of dietary composition and PYY gene expression in diet-induced obesity in rats." Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong ke ji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban 25(3): 243-246.
- Yang, J., M. S. Brown, et al. (2008). "Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone." Cell 132(3): 387-396.
- Yang, K., N. D. Pfeifer, et al. (2015). "Species differences in hepatobiliary disposition of taurocholic acid in human and rat sandwich-cultured hepatocytes: implications for drug-induced liver injury." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 353(2): 415-423.
- Yang, Y., J. L. Millan, et al. (2015). "Intestinal alkaline phosphatase deficiency leads to lipopolysaccharide desensitization and faster weight gain." Infect Immun 83(1): 247-258.
- Yaswen, L., N. Diehl, et al. (1999). "Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin." Nature medicine 5(9): 1066-1070.
- Yokota, A., S. Fukiya, et al. (2012). "Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet?" Gut microbes 3(5): 455-459.
- Yokum, S., J. Ng, et al. (2011). "Attentional bias to food images associated with elevated weight and future weight gain: an fMRI study." Obesity (Silver Spring) 19(9): 1775-1783.
- Yoshimoto, S., T. M. Loo, et al. (2013). "Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome." Nature 499(7456): 97-101.
- Zabolotny, J. M., Y. B. Kim, et al. (2008). "Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo." J Biol Chem 283(21): 14230-14241.
- Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, et al. (2002). "PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo." Dev Cell 2(4): 489-495.
- Zagorodnyuk, V. P., B. N. Chen, et al. (2001). "Intraganglionic laminar endings are mechanotransduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach." The Journal of physiology 534(Pt 1): 255-268.
- Zhang, J. V., P. G. Ren, et al. (2005). "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake." Science 310(5750): 996-999.
- Zhang, X., F. Dong, et al. (2005). "High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex." Experimental neurology 191(2): 318-325.

- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature 372(6505): 425-432.
- Zheng, F., Y. J. Kim, et al. (2013). "Overexpression of neuropeptide Y in the dorsomedial hypothalamus causes hyperphagia and obesity in rats." Obesity (Silver Spring) 21(6): 1086-1092.
- Zheng, H., L. M. Patterson, et al. (2002). "CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake." Brain research 957(2): 298-310.
- Zheng, H., L. M. Patterson, et al. (2005). "Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance." Neuroscience 135(2): 611-625.
- Zhou, X., D. Han, et al. (2014). "A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet." PLoS One 9(12): e115148.
- Zu, L., J. He, et al. (2009). "Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway." J Biol Chem 284(9): 5915-5926.
- Zucker, L. M. and H. N. Antoniades (1972). "Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty"." Endocrinology 90(5): 1320-1330.

étude de l'origine de l'endotoxémie métabolique et de son rôle sur la physiologie du nerf vague dans un modèle d'obésité induite par un régime occidental chez le rat.

le système sanguin. Mon second objectif était d'étudier l'impact Pour cela, un modèle de rats soumis à un régime obésogène a été utilisée. Mes travaux ont montré que la consommation d'un régime obésogène induisait une perte de la fonction de barrière intestinale au niveau de l'iléon caractérisée par une baisse des défenses mucosales et une augmentation de la perméabilité au LPS. L'obésité est également caractérisée par une altération du signaux de satiété. Nous avons montré la sénsibilité aux signaux de satiété. Nous avons montré que ni l'obésité ni le pourcentage de lipides du régime n'étaient responsables de cette perte de sensibilité aux signaux de satiété mais que l'altération du microbiote en serait le contributeur principal. Ainsi, l'endotoxémie métabolique serait le résultat d'une augmentation du passage transepithelial de LPS, qui, une fois dans le sand pourraient atteindre, entre autres le porfunde

Mots-clefs : endotoxémie métabolique, obésité, rats, nerf vague,

## RÉSUMÉ ABSTRACT

Gut-brain axis and the regulation of satiety during obesity : Study of metabolic endotoxemia origin and its role on vagus nerve physiology in a rat model of diet-induced obesity.

plasma of gut-derived bacteria components, lipopolysaccharides intestine and enter into the circulatory system. My second aim was to investigate the effect of gut microbiota composition and LPS on the satiety regulation by the vagus nerve, the main communication pathway between the gut and the brain. To answer these questions, we have mainly used a DIO rat model. We showed that consumption permeability. Obesity is also characterized by an alteration in feeding behavior including a decreased sensitivity to intestinal satiety signals. triggers loss of sensitivity to satiety signals but that gut microbiota f LPS, which once spread in the blood could reach, among oth things, the vagus nerve where they could disrupt intestinal signals

Keywords: Metabolic endotoxemia, Obesity, Rats, Vagal afferent

AGRO CAMPUS

AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage 65 rue de Saint-Brieuc - CS84215 - F-35042 Rennes Cedex Tél. : 02 23 48 50 00 www.agrocampus-ouest.fr

