Etude de la relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire chez le rongeur soumis à un régime obésogène

Mélanie Fouesnard

▶ **To cite this version:**

Mélanie Fouesnard. Etude de la relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire chez le rongeur soumis à un régime obésogène. Alimentation et Nutrition. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B014 . tel-03374491

HAL Id: tel-03374491
https://theses.hal.science/tel-03374491

Submitted on 12 Oct 2021

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

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

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Nutrition et Pathologies Métaboliques*

Par
Mélanie FOUESNARD

Etude de la relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire chez le rongeur soumis à un régime obésogène.

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 18/05/2021
Unité de recherche : Nutrition, Métabolismes et Cancers ; INRAE UMR1341 INSERM UMR1241

Rapporteurs avant soutenance :

Moïse Coeffier Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier, INSERM UMR1073, Université de Rouen
Carole Rovère Directrice de Recherche, IPMC UMR7275 CNRS Université Nice Sophia Antipolis

Composition du Jury :

Président :	Christophe Mougel	Directeur de Recherche, UMR 1349 IGEPP INRAE Agrocampus Ouest Rennes Université Rennes 1
Examinateurs :	Moïse Coeffier	Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier, INSERM UMR1073, Université de Rouen
	Pierre Peyret	Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne, UMR 454 MEDIS
	Carole Rovère	Directrice de Recherche, IPMC UMR7275 CNRS Université Nice Sophia Antipolis
Dir. de thèse :	Gaëlle Boudry	Directrice de Recherche, UMR1341 INRAE UMR 1241 INSERM Université Rennes 1
Co-dir. de thèse :	Véronique Douard	Chargée de Recherche, Institut MICALIS, INRAE, AgroParisTech

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mes deux directrices de thèse, Gaëlle Boudry et Véronique Douard, pour ces trois années (et quelques !) d'encadrement. Merci tout d'abord infiniment à toutes les deux de m'avoir fait confiance pour m'engager dans ce sujet même si ma formation ne collait pas exactement au sujet. Merci infiniment Gaëlle pour m'avoir aidée dès le départ à prendre mes marques dans ce nouvel environnement, lancée dans un projet qui avait déjà commencé : tu as fait un excellent travail de guide qui m'a permis de prendre de plus en plus confiance en moi avec le temps. Tes conseils ont été indispensables, aussi bien humainement que professionnellement, pour avancer le mieux possible. Merci pour ton ouverture d'esprit, ton soutien et ta présence. Merci infiniment Véronique pour ton énergie ultra-positive, tu as été un excellent moteur pour moi durant la dernière année de thèse (et les quelques mois supplémentaires !) passée à Micalis. Tu as été un pilier durant cette thèse et d'un soutien moral exceptionnel. Merci de m'avoir reboostée quand j'en avais besoin et d'avoir réussi à être aussi présente. Merci de m'avoir (re)donné confiance quand il le fallait et pour ces énormes boosts de motivation ! Vous avez toutes les deux été excellentes dans votre encadrement et je garderai un excellent souvenir du temps passé avec vous.

Un énorme merci à toute l'équipe EAT (anciennement NGB) de NuMeCan, pour son excellent accueil et sa bonne humeur. Merci à David Val-Laillet pour avoir accepté de m'accueillir en son sein. Un grand merci aux techniciens et assistants ingénieurs sans qui l'obtention de mes résultats n'aurait pas été possible. Parmi eux tout d'abord Régis Janvier pour sa bonne humeur, toute l'aide logistique autour de l'expérimentation animale, pour ta grande disponibilité et ta présence durant les expérimentations ainsi que les prélèvements finaux, pour lesquels tu étais indispensable. Merci à Patrice Dahirel pour son aide lors de la partie expérimentale et pour sa bonne humeur. Gwenaëlle Randuineau, merci pour ton aide technique, entre laboratoire et informatique, pour le traitement de nombreux échantillons et l'apprentissage des techniques qui y étaient liées. Travailler avec toi a été extrêmement agréable et j'espère vivement te recroiser. Merci à toi Véronique Rome pour toute l'aide que tu m'as apportée au laboratoire et ta disponibilité. Merci également à celles qui n'étaient pas directement impliqués dans ce projet mais qui m'ont volontiers aidée quand j'en avais besoin sur des sujets divers ou avec qui j'ai partagé des moments agréables : Laurence Le Normand, Armelle Cahu, Sylvie Guérin et Isabelle Nogret, j'ai énormément apprécié votre disponibilité, votre efficacité et votre bonne humeur. Merci à Nicole Gueguen pour sa patience et son aide pour l'aspect administratif de ce travail. Merci aux chercheurs et ingénieurs de recherche de l'équipe, Isabelle Luron, Sophie Blat, Nicolas Coquery, David Val-Laillet et Stéphanie Ferret-Bernard pour leurs conseils précieux, leurs suggestions et les discussions autour du traitement de mes

données. Merci à Yann Serrand pour son aide autour de mes soucis informatiques et pour sa bonne humeur. Merci aux doctorants de l'équipe et particulièrement à Sophie Menneson, Marion Lemaire, Yentl Gautier, Damien Bergeat et Laurence Lacaze. Sophie, Marion et Yentl, merci pour ces très bons moments passés ensemble, aussi bien au laboratoire qu'en dehors : j'en garderai d'excellents souvenirs et serai heureuse d'en construire d'autres. Merci à vous Damien et Laurence, pour les discussions intéressantes autour de l'analyse de données et pour votre présence amicale lors des journées scientifiques de l'école doctorale. Merci à Ilario Mennella pour son agréable compagnie durant son séjour ici. Merci aux stagiaires qui ont partagé de bons moments avec nous tous. Un merci tout particulier à Marius Bidon pour son aide énorme lors de son stage de Master 2 qui a permis d'alimenter considérablement un chapitre de cette thèse.
Un grand merci aux membres de l'unité PEGASE qui ont su m'aider lorsque j'en avais besoin ainsi que pour leur grande disponibilité. Merci particulièrement à Emilie Bernard pour son aide précieuse autour de la veille scientifique. Un énorme merci à Mathilde Le-Sciellour : merci à toi tout d'abord pour ton aide pour l'analyse statistique de mes résultats et merci ensuite tout personnellement pour ta présence, j'ai adoré passer du temps avec toi et j'espère te recroiser dès que possible.
Merci aux membres de l'institut NuMeCan qui m'ont aidée sur le site de Rennes, en particulier Sandrine David-Le-Gall pour les discussions autour de l'analyse de données de microbiote et son aide technique associée et Karima Begriche pour son aide technique lors de l'analyse d'expression de gènes. Un merci tout particulier à l'association des doctorants de NuMeCan, NPhDA, et aux doctorants qui ont croisé mon chemin au laboratoire et en dehors, particulièrement à Julien Allard, Yoann Daniel, Luis Cano, Kévin Bevant et Elise Vene.

Un énorme merci aux membres de l'équipe Amipem de l'institut Micalis pour leur accueil lors de ma dernière année de thèse. Merci tout d'abord à Philippe Gérard pour m'avoir acceptée dans son équipe ainsi que pour les discussions et divers conseils autour de ma thèse. Un immense merci à Fabienne Devime pour son aide technique indispensable pour le traitement de mes échantillons, pour sa gentillesse et sa compagnie. Merci à Magali Monnoye pour son aide analytique, sa gentillesse et sa grande disponibilité. Merci à Catherine Philippe pour sa participation à l'obtention de certains résultats et pour sa compagnie. Merci à Sylvie Rabot et Laurent Naudon pour les discussions enrichissantes autour de la thèse et tous les repas partagés. Xu Fei Zhang, thank you very much for your presence and technical help during sampling, I wish you the best for your post-doc and I hope to see you again soon. Un grand merci à Léa Roussin : merci pour ta compagnie et ta bonne humeur, j'espère que tout se passera pour le mieux pour la suite de ta thèse.
Merci aux membres extérieurs à l'équipe qui m'ont volontiers apporté leur aide lorsque j'en avais besoin. Merci à Isabelle Denis pour l'obtention et l'analyse d'échantillons ainsi que pour sa relecture et ses retours sur certaines parties du manuscrit. Merci à Nicolas Lapaque et Vincent Brochard pour leur aide en culture cellulaire.

Merci à Alexandre Benani pour sa collaboration dans ce projet et sa grande participation à l'obtention de nombreux résultats présentés ici. Merci à toi Alexandre pour tous tes conseils précieux, tes idées et tes encouragements. Merci également à Selma Ben-Fradj pour sa participation à ce projet. Selma, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Un immense merci à Samuel Chaffron pour m'avoir accueillie pendant un mois dans son équipe à Nantes et pour avoir guidé l'intégration de données présentée dans cette thèse. Merci pour ta bonne humeur et tes excellents conseils. Un énorme merci à Johanna Zoppi pour avoir concrétisé ce travail grâce à son application web : félicitations à toi, je te souhaite d'aller le plus loin possible dans ce travail dans lequel tu excelles. Merci pour ta bonne humeur, ton énergie et pour les bons souvenirs que je garde de ces quelques semaines passées avec toi.

Merci beaucoup aux membres de la plate-forme « Exploration du Métabolisme » de Clermont-Ferrand, Stéphanie Durand, Carole Migné et Mélanie Petera, pour leur aide indispensable à l'analyse des données de métabolomique caecales. Merci à vous trois pour votre patience, vos retours, et pour avoir tout mis en œuvre pour tenter d'identifier les métabolites d'intérêt.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, Serge Luquet et Muriel Thomas, pour leurs retours pertinents et leurs conseils indispensables à la bonne poursuite de cette thèse. Merci pour ces échanges enrichissants.

Un grand merci évidemment à tous mes proches qui m'ont soutenue, de près ou de loin, tout au long de cette thèse. Merci particulièrement à mes parents sans qui je n'aurais pas pu me lancer dans ce travail et pour leur soutien inconditionnel.

Table des matières

REMERCIEMENTS 1
TABLE DES MATIERES 4
LISTE DES ABREVIATIONS 7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 5

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 7

I. CONTEXTE GENERAL 8
II. LA REGULATION CENTRALE DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE 15
A. Les structures impliquées dans la régulation centrale du comportement alimentaire 15
1. La régulation de l'ingéré alimentaire par le tronc cérébral 15
a. Intégration des signaux périphériques par le tronc cérébral 15
i. Intégration de signaux circulants 15
ii. Intégration de signaux nerveux 19
b. La régulation de la prise alimentaire par le tronc cérébral 19
2. La régulation de l'ingéré alimentaire par l'hypothalamus 20
a. L'intégration de signaux périphériques par l'hypothalamus 20
i. Intégration de signaux circulants 20
ii. Intégration de signaux nerveux 22
b. La régulation de l'ingéré alimentaire par les neurones de premier ordre 22
c. La régulation de l'ingéré alimentaire par les neurones de second ordre 25
d. La régulation des dépenses énergétiques 25
3. La régulation hédonique du comportement alimentaire 26
B. Le rôle de l'inflammation dans la régulation centrale du comportement alimentaire 28
1. Le lien entre l'inflammation hypothalamique et l'obésité 28
2. Le lien entre inflammation hypothalamique causée par la consommation de WD et la régulation de la prise alimentaire 37
3. Les acteurs de l'inflammation hypothalamique sous WD 38
a. Acteurs cellulaires 38
b. Acteurs moléculaires 40
4. Les causes de l'inflammation hypothalamique sous WD 42
III. LE ROLE DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE 44
A. Le microbiote intestinal 44
1. Composition du microbiote intestinal chez l'individu sain 44
2. Relation entre microbiote intestinal et hôte : le concept d'holobionte 48
3. Microbiote et obésité 50
4. Microbiote et prise alimentaire 52
a. Lien entre microbiote et prise alimentaire 52
b. Lien entre microbiote et consommation de WD 53
B. Mécanismes d'action du microbiote sur la prise alimentaire 56
1. Régulation de la prise alimentaire via les cellules entéroendocrines 56
a. Organisation et classification des cellules entéroendocrines 58
b. Activation des EEC via les nutriments et les métabolites bactériens 60
c. Mode d'action des peptide gastro-intestinaux 65
2. La régulation de la prise alimentaire *via* l'action au niveau intestinal ou cérébrale de métabolites bactériens 65
3. La régulation de la prise alimentaire liée à l'inflammation induite par une hyperperméabilité intestinale 68

CHAPITRE 2 OBJECTIFS GENERAUX 71

OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE 72

CHAPITRE 3 RESULTATS 74

I. DETERMINATION DE LA REPONSE A COURT TERME DE L'AXE MICROBIOTE-INTESTIN-CERVEAU A UN REGIME WESTERN DIET ET SES CONSEQUENCES SUR LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE CHEZ LE RONGEUR 75

II. IMPACT DE PLUSIEURS CYCLES COURTS DE WD SUR L'AXE MICROBIOTE-INTESTIN-CERVEAU ET LA REGULATION DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE 117

III. ASPECT PREDICTIF DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE VIS-A-VIS DE DE LA PRISE ALIMENTAIRE LORS DE LA PHASE HYPERPHAGIQUE APRES L'INTRODUCTION D'UN WD 158

A. Introduction 158

B. Matériel et méthodes 159

1. Animaux 159
2. Analyse de la composition du microbiote 160
3. Analyse statistique 160

C. Résultats et discussion 162

1. Les souris présentaient des profils alimentaires variables dans les jours qui suivaient le changement d'aliment 162
2. Le microbiote fécal des souris changeait de composition dès 1 jour de WD et continuait à évoluer jusqu'à 8 jours de WD 162
3. Les petites et grandes consommatrices de WD à D1 possédaient un microbiote initial légèrement différent 163
4. Séparer les échantillons à D0 selon la composition du microbiote intestinal ne permettait pas de les séparer selon leur ingéré à D1 168

D. Références 174

IV. ETUDE DES VOIES DE COMMUNICATION ENTRE LE MICROBIOTE ET LE CERVEAU IMPLIQUEES DANS LA REGULATION A COURT TERME DE L'INGERE ALIMENTAIRE LORS DE L'EXPOSITION A UN REGIME GRAS ET SUCRE 177

A. La déplétion du microbiote intestinal induisait une diminution de la diversité α lors du changement de régime 177

1. Matériel et méthodes 177
2. Résultats 178

B. La déplétion du microbiote induit une augmentation du rassasiement lors de l'introduction de WD 181

1. Matériel et méthodes 181
2. Résultats 182

C. La déplétion du microbiote intestinal induit une surexpression des gènes des peptides satiétogènes exprimés par les EEC caecales 186

1. Matériel et méthodes 186
2. Résultats 187

D. L'absence de microbiote intestinal diminue la prolifération des cellules épithéliales caecales et induit des modifications de leur différenciation en EEC 190

1. Matériel et méthodes 190
2. Résultats 192

E. La déplétion du microbiote intestinal induit une modification du motif d'expression protéique de GLP1- et de CCK par les EEC caecales 196

1. Matériel et méthodes 196
2. Résultats 196

F. Les AGCC seuls ne sont pas à l'origine des modifications d'expression génique de gcg, cck, nts et pyy en absence de microbiote intestinal 199

1. Matériel et méthodes 199

2. Résultats 199

CHAPITRE 4 DISCUSSION 208

I. LE MICROBIOTE INTESTINAL A UN IMPACT SUR LA REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE SOUS WD 209

A. Reproductibilité des changements de microbiote suite à l'introduction d'un WD 209

1. La composition du microbiote initial était comparable entre les expériences et pourrait être prédictive de la réponse au changement de régime 209

B. L'introduction de WD induit une variation très précoce de la composition du microbiote intestinal vers un contexte pro-inflammatoire 211

C. Modifier le microbiote intestinal modifie la prise alimentaire à très court terme en réponse au WD 219

D. Identification des marqueurs bactériens qui pourraient expliquer les modifications de la prise alimentaire sous WD 222

II. LIEN POTENTIEL ENTRE LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE ET LA MISE EN PLACE DE L'INFLAMMATION CENTRALE SUITE AU WD 224

A. Les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires sont-ils des marqueurs d'inflammation hypothalamique ? 224

B. Le rôle potentiel du microbiote dans l'induction de l'inflammation hypothalamique précoce 225

C. L'introduction d'un WD induit une inflammation précoce d'autres structures cérébrales impliquées dans la régulation du comportement alimentaire 229

D. Implication des variations du microbiote intestinal dans les modifications des marqueurs inflammatoires liés au tronc cérébral et au striatum 230

III. VOIES DE COMMUNICATION ENTRE LE MICROBIOTE ET LE CERVEAU IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE LORS DE L'INTRODUCTION DE WD 232

A. Identification des voies impliquées lors de la transition au WD 232

B. Lien entre les modifications de la régulation des EEC et les modifications du microbiote intestinal. 236

IV. IMPORTANCE DE L'APPROCHE METHODOLOGIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE LIENS POTENTIELS ENTRE LE MICROBIOTE ET LE CERVEAU 239

A. Importance du choix du modèle animal 239

B. Importance de l'approche bioinformatique 243

1. La préparation des données de séquençage à l'analyse bioinformatique 244

2. Recherche de biomarqueurs bactériens : identification de bactéries individuelles *vs.* Identification de groupes de bactéries 245

CONCLUSION 248

BIBLIOGRAPHIE 250

RESUME DE LA THESE 292

Liste des abréviations

AP : Area Postrema
AGCC : Acides Gras à Chaîne Courte
AGCL : Acides Gras à Chaîne Longue
Agrp : Agouti-related peptide
AMPK : AMP-activated protein kinase
ARC : Arcuate nucleus of the hypothalamus
BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor
CCK : cholecystokinine
CCL : chemokine ligand
CNS: Central Nervous System
CRH : corticolibérine
CXCL12 : chemokine stromal cell-derived factor 12
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4 (récepteur de CXCL12)
CX3CL1 : C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1(fractalkine)
DAT : dopamine active transporter (SLC6A3)
DMN : noyau dorso-médian (de l'hypothalamus)
DRD1 : récepteur 1 à la dopamine
DRD2 : récepteur 2 à la dopamine
EAE : encéphalomyélite
EEC: enteroendocrine cell
FGF19 : fibroblast growth factor 19
FXR : farnesoid X receptor
GABA : acide γ-aminobutyrique
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GHSR : récepteur à la ghréline
GLP-1 : Glucagon-Like Peptide 1
GPR : récepteur couplé aux protéines G
GSH : glutathion (réduit)
GSSG : glutathion (oxydé)
Iba1 : Allograft inflammatory factor 1
Ikbkb: Inhibitor of Nuclear Factor κ B Kinase Subunit Beta
IL-1β : Interleukin-1 β
IL-6 : Interleukin 6
iNOS : oxyde nitrique synthase inductible
INSR : récepteur à l'insuline
IRMf : imagerie à résonnance magnétique fonctionnelle
ITS : internal transcribed spacer
LH : Lateral Hypothalamus
LPS : lipopolysaccharide
MCH : melanin-concentrating hormone
MC4R : Récepteur à la mélanocortine 4
Myd88 : réponse primaire de différenciation myéloïde 88
Nacc : Noyau Accumbens
NF-κB : nuclear factor-κB
NPY: Neuropeptide Y
NT : neurotensine
NTS : Noyau du Tractus Solitaire
ObR : récepteur à la leptine
OTU : unité taxonomique opérationnelle
PENK : preproenképhaline
POMC : pro-opiomélanocortine
PTP1B : protéine tyrosine phosphatase 1B
PVN : Noyau paraventriculaire (de l'hypothalamus)
PYY: Peptide tyrosine tyrosine (YY)
RE : réticulum endoplasmique
SOCS3 : Suppresseur de la signalisation de cytokines 3
TLR4 : Toll Like Receptor 4
TNF-α : Tumour Necrosis Factor α
TH : tyrosine hydroxylase
TRH : hormone thyréotrope
UPR : unfolded protein response
VMH : Ventro Medial Hypothalamus
VTA : Aire Ventro Tegmentale
WD: Western diet
WGCNA : Weighted Gene Correlation Network Analysis
Xbp1 : X-box binding protein 1

Liste des publications et communications

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau L., Migné C., Devime F., Durand S., Benani A., Chaffron S., Douard V., Boudry G. Dietary switch to Western diet induces hypothalamic adaptation associated with gut microbiota dysbiosis in rats. *Int J Obes* (2021). https://doi.org/10.1038/s41366-021-00796-4

Publié en ligne le 13 mars 2021 dans la revue International Journal of Obesity.

Fouesnard, M., Champeil-Potokar, G., Boutillon, F., Le Gleau, L., Ben Fradj, S., Philippe, C., Benani, A., Denis, I., Boudry, G., Douard, V.. Recurrent Western dieting induces a cicatricial caecal microbiota that participates to central food intake regulation disturbances.

En préparation.

Communications orales :

- Colloque mBIO 2018 (Romainville, les 19/06/2018 et 20/06/2018) :

Fouesnard, M., Le Gleau L., Douard V., Boudry G.. Influence du microbiote intestinal sur le maintien de l'homéostasie énergétique lors du passage à un régime obésogène chez le rongeur.

- GIS NAMS 2019 (Rennes, le 20/10/2019) :

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau L., Migné C., Devime F., Durand S., Benani A., Chaffron S., Douard V., Boudry G.. A multi-omic approach reveals how microbiota-hypothalamus axis adapts to a Western-diet short-term exposure in rats.

- 3rd Paris-Saclay Junior Conference on Computational Biology (Orsay, le 13/11/2019) :

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau L., Migné C., Devime F., Durand S., Benani A.,

Chaffron S., Douard V., Boudry G.. A multi-omic approach reveals how microbiota-hypothalamus axis adapts to a Western-diet short-term exposure in rats.

- Congrès international ESPEN (en visioconférence, du 19/09/2020 au 21/09/2020) :

Fouesnard M., Devime F., Ben-Fradj S., Benani A., Boudry G., Douard V.. Gut microbiota regulates caecal satiety hormones expression and satiation in response to Western diet.

En interne :

- Journée des doctorants de NuMeCan (Rennes) :

- Relation entre microbiote intestinal et comportement alimentaire chez le rongeur soumis à un régime obésogène – 30/03/2018.
- Impact of a hyper energetic (HE) diet on short term energy homeostasis regulation in the germ-free rat. – 21/03/2019.

- Journée des doctorants de Saint-Gilles (Saint-Gilles, le 21/05/2019)) :

- Relation entre microbiote intestinal et comportement alimentaire chez le rongeur soumis à un régime obésogène.

Communications affichées :

- Colloque mBIO 2018 (Romainville, les 19/06/2018 et 20/06/2018) :

Fouesnard, M., Le Gleau L., Douard V., Boudry G.. Influence du microbiote intestinal sur le maintien de l'homéostasie énergétique lors du passage à un régime obésogène chez le rongeur.

- GIS NAMS 2019 (Rennes, le 20/10/2019) :

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau L., Migné C., Devime F., Durand S., Benani A., Chaffron S., Douard V., Boudry G.. A multi-omic approach reveals how microbiota-hypothalamus axis adapts to a Western-diet short-term exposure in rats.

- Les Journées Francophones de Nutrition 2019 (Rennes, du 27/11/2019 au 29/11/2019) :

Fouesnard M., Bidon M., Janvier R., Devime F., Boudry G., Douard V.. Le microbiote intestinal est un acteur majeur dans la détermination du phénotype des cellules entéroendocrines caecales chez la souris.

- Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie Santé (Angers, les 10/12/2019 et 11/12/2019) :

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau L., Migné C., Devime F., Durand S., Benani A.,

Chaffron S., Douard V., Boudry G.. A multi-omic approach reveals how microbiota-hypothalamus axis adapts to a Western-diet short-term exposure in rats.

- Congrès international ESPEN (en visioconférence, du 19/09/2020 au 21/09/2020) :

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau L., Migné C., Devime F., Durand S., Benani A., Chaffron S., Douard V., Boudry G. Dietary switch to Western diet induces hypothalamic adaptation associated with gut microbiota dysbiosis in rats.

Liste des figures et tableaux

Figure 1.1. La triade de l'obésité.
Figure 1.2. Evolution de l'ingéré alimentaire lors de la première semaine de consommation de WD chez la souris.
Figure 1.3. Résumé des interactions entre le cerveau et les signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.
Figure 1.4. Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur.
Figure 1.5. Représentation simplifiée des signaux humoraux d'origine périphérique capables de réguler la prise alimentaire au sein de l'ARC.
Figure 1.6. Schéma des interactions entre les populations neuronales de l'ARC et du PVN.
Figure 1.7. Composition du microbiote intestinal humain.
Figure 1.8. Illustration du concept d'holobionte et de rupture symbiotique.
Figure 1.9. Implication du microbiote intestinal dans la régulation homéostatique de la prise alimentaire.
Figure 1.10. Répartition anatomique des différents types d'EEC le long du tractus gastro-intestinal et rôle majeur et stimuli de chaque région du tractus qui engendrent l'activation de la sécrétion des EEC.
Figure 1.11. Schéma représentant les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des EEC.
Figure 1.12. Mécanismes d'interaction entre le microbiote intestinal et l'épithélium intestinal vis-à-vis de la prise alimentaire.
Figure 1.13. Schéma représentant comment l'altération de la barrière intestinale pourrait être à l'origine d'une neuroinflammation lors de la consommation d'un WD.
Figure 3.1. Evolution de la composition bactérienne de souris soumises ou non à plusieurs cycles de WD jusqu'à atteindre un phénotype d'obésité, entrecoupés d'un retour à un phénotype normal.
Figure 3.2. Protocole expérimental de l'expérience visant à déterminer si la composition initiale du microbiote intestinal est prédictive de la prise alimentaire lors de l'introduction de WD.
Figure 3.3. Ingéré alimentaire quotidien moyen et individuel de souris soumises à un WD pendant 8 jours.
Figure 3.4. Evolution de la diversité bactérienne de souris soumises à un WD pendant 8 jours.
Figure 3.5. Différences de diversité et de composition entre les souris petites consommatrices de WD et les souris grandes consommatrices de WD, groupes déterminés lors de la phase hyperphagique.
Figure 3.6. La composition du microbiote fécal avant changement de régime n'est pas prédictive de l'ingéré alimentaire chez la souris lors du premier jour de consommation de WD.
Figure 3.7. Evolution de la diversité bactérienne sous traitement antibiotique, sous régime standard ou après 5 jours de WD.
Figure 3.8. Ingéré calorique quotidien de souris avec ou sans traitement antibiotique, avant et après introduction d'un WD.
Figure 3.9. Niveaux d'expression de gènes impliqués dans la production de peptides satiétogènes par les ECC dans les différentes portions de l'intestin chez des souris sous traitement antibiotique et chez des souris axéniques.

Figure 3.10. Immunomarquage anti-Ki67 et anti-mucines sur coupes de caecum de souris soumises à un traitement antibiotique.
Figure 3.11. Niveaux d'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des EEC chez des souris sous traitement antibiotique.
Figure 3.12. Résultats de doubles-marquages CCK/GLP-1 et PYY/GLP-1 sur coupe de caecum de souris soumises à un traitement antibiotique.
Figure 3.13. Concentrations et proportions en AGCC des contenus caecaux de souris soumises à un traitement antibiotique.
Figure 3.14. Concentrations et proportions en acides biliaires des contenus caecaux de souris soumises à un traitement antibiotique.
Figure 3.15. Schéma du protocole expérimental de culture cellulaire sur modèle STC-1 et résumé des conditions de culture utilisées pour tester les hypothèses de travail.
Figure 3.16. Niveaux d'expression de *gcg*, *cck*, *nts* et *pyy* dans les cellules STC-1 en fonction des différentes conditions de culture.
Figure 4.1. Comparaison de la diversité α entre les expérimentations animales menées au cours de cette thèse.
Figure 4.2. Comparaison du microbiote initial de chaque expérience.
Figure 4.3. Evolution de l'abondance relative de familles fortement abondantes à l'état initial dans toutes les expériences au moment du passage au WD.
Figure 4.4. Evolution de la diversité α au sein de chaque expérience au moment du passage au WD.
Figure 4.5. Evolution de la perméabilité caecale paracellulaire et transcellulaire chez le rat conventionnel et axénique en réponse au WD.
Figure 4.6. Evolution de la perméabilité caecale paracellulaire chez des souris soumises ou non à un traitement antibiotique en réponse au WD.
Figure 4.7. Perméabilité intestinale paracellulaire chez la souris soumise 1h de WD par rapport à 1h de régime standard dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon.
Figure 4.8. Impact du passage au WD sur les niveaux d'expression caecale de *cck*, *gcg*, *nts* et *pyy* chez la souris soumise ou non à un traitement antibiotique.
Figure 4.9. Niveaux d'expression des gènes *agrp*, *npy* et *pomc* chez le rat axénique et conventionnel avant et après transition au WD.

Tableaux :

Tableau 1.1. Résumé des études ayant montré un lien entre la consommation de WD et l'inflammation hypothalamique depuis De Souza *et al.* en 2005.
Tableau 3.1. Séquences des amorces utilisées pour évaluer les niveaux d'expression des gènes *gcg*, *cck*, *nts* et *pyy* dans différentes portions de l'intestin de souris traitées par antibiotiques et de souris axéniques.
Tableau 3.2. Références des amorces TaqMan utilisées pour évaluer les niveaux d'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des EEC.
Tableau 4.1. Caractéristiques des différentes expérimentations animales menées au cours de cette thèse.
Tableau 4.2. Evolution des marqueurs d'inflammation ou de stress oxydant mesurés au cours des expériences de cette thèse en réponse au WD.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

I. Contexte général

L'épidémie de surpoids et d'obésité est un des problèmes majeurs de santé publique actuels. D'après l'organisation mondiale de la santé, 39% des adultes de 18 ans et plus étaient en surpoids en 2016, avec 13% d'adultes obèses. Entre 1980 et 2015, le nombre de personnes obèses a doublé dans le monde et actuellement plus d'un tiers de la population est en surpoids ou obèse (Global Burden of Disease Collaborative Network [1]). La France n'est pas épargnée par cette épidémie, avec une augmentation constante du nombre de personnes obèses et en surpoids : l'enquête ObEpi, menée tous les trois ans entre 1997 et 2012, visant à recueillir les données déclaratives de poids et de taille des Français interrogés, a permis d'évaluer une augmentation de la prévalence l'obésité de 76% entre 1997 et 2012 pour la population globale, pour avoisiner les 15% chez l'adulte aujourd'hui, sans augmentation significative entre 2009 et 2012, suggérant un ralentissement de cette augmentation [2, 3]. L'augmentation de la prévalence de l'obésité dans les pays développés tend à ralentir depuis les années 2000, tandis que celle des pays en voie de développement augmente de plus en plus, ce qui peut s'expliquer en partie par une augmentation du niveau de vie qui a eu lieu au cours des années 2000 pour ces derniers tandis que cette augmentation était rencontrée plus tôt, à partir des années 1960, pour les pays occidentaux [2]. Cette épidémie d'obésité touche les adultes ainsi que les enfants dans les pays développés mais également dans les pays en voie de développement, avec des conséquences sur leur santé physique et mentale [4]. L'obésité galopante touche ainsi toutes les tranches d'âge et se généralise à travers le monde dans différents environnements.

Le surpoids se définit par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 25 tandis que l'obésité est définie par un IMC supérieur à 30. L'état inflammatoire, également appelé inflammation de bas grade, est une caractéristique de l'obésité et joue un rôle majeur dans le développement de pathologies qui lui sont associées [5]. Ce sont ces désordres métaboliques qui constituent le principal risque de morbidité ou de surmortalité lié à l'obésité. Parmi eux, on retrouve une élévation des risques de développement du diabète de type II [6], de maladies cardiovasculaires [7], d'être atteint de plusieurs types de cancers [8] ou encore de troubles musculo-squelettiques [9]. L'obésité est également liée à des troubles d'ordre psychologique et/ou psychiatrique tels que la dépression ou l'anxiété [10, 11], bien que la relation de causalité entre obésité et dépression soit discutée et actuellement largement étudiée chez l'Homme et chez plusieurs modèles animaux [12, 13]. Compte tenu de l'ampleur de l'épidémie et de ses conséquences sur la santé, il est primordial d'identifier des facteurs communs qui l'induisent pour mettre en place des méthodes de soin et de prévention. Les conséquences économiques de l'obésité sont fortes avec un coût des soins chiffré à 2190€ par an pour un individu français obèse contre 1320€ par an pour un individu non obèse d'après l'enquête sur la santé et la protection

sociale menée en 2012 : ce surcoût concerne cependant des individus plus âgés et pourrait donc ne pas être entièrement attribuable à l'obésité seule [14].

Le développement de l'obésité chez l'Homme est multifactoriel et de nombreux modèles intégrant les déterminants impliqués dans son développement et son installation ont été proposés pour rendre compte de la complexité de cette pathologie [15]. Elle résulte d'une interaction complexe entre la physiologie et les habitudes ainsi que les cultures alimentaires sur une longue période de temps. D'un point de vue évolutif, l'Homme est programmé pour stocker l'énergie apportée par l'alimentation, de façon à contrecarrer les effets d'éventuelles disettes. Les anciens hominidés, par rapport à l'Homme moderne, disposaient d'une nourriture peu abondante ou irrégulièrement disponible et avaient une activité physique plus élevée, caractéristique du mode de vie des chasseurs-cueilleurs. Ainsi, indépendamment des évolutions technologiques et culturelles, la physiologie humaine s'est adaptée pendant une longue période de temps afin de favoriser le stockage énergétique en parallèle d'une activité physique élevée et les individus qui ont hérité des traits génétiques favorisant ce stockage énergétique sont considérés comme davantage à risque de développer une obésité dans le contexte actuel [16]. Ces facteurs génétiques sont en permanence à l'étude et une méta-analyse menée sur une dizaine d'années jusqu'en 2005 a permis de regrouper ceux qui ont été identifiés dans la littérature dans « The Human Obesity Gene Map » [17]. Certaines caractéristiques de l'obésité, telles que la plus forte propension au stockage lipidique, sont transmissibles à la descendance [18, 19]. Bien que rares, des mutations concernant des gènes impliqués dans la régulation centrale du comportement alimentaire ont également été identifiées comme pouvant être à l'origine de l'obésité. Ainsi des mutations dans le gène codant pour *pomc*, un gène majeur impliqué dans la régulation de la satiété, génère l'obésité des individus porteurs du gène muté [20]. Des phénotypes d'obésité sont également retrouvés dans de cadre de mutations génétiques portant sur d'autres gènes impliqués dans la régulation de la satiété [21]. Des modifications épigénétiques dans ces mêmes gènes peuvent également participer à l'induction de l'obésité [21]. En dehors de l'aspect génétique, l'environnement des individus doit être pris en compte. Le marketing incessant pour des aliments et boissons gras et/ou sucrés prospère, tandis que les gouvernements mettent en place des mesures ciblant la responsabilité de chacun envers son poids et son alimentation (avec pour exemple en France la campagne « mangerbouger »). Aux Etats-Unis, ce paradoxe est explicable en partie par la puissance économique et politique de lobbys qui bloquent les tentatives de mises en place de mesures à visée plus globale, comme celles que l'on peut rencontrer dans la lutte contre le tabagisme, telles que des taxes qui s'appliqueraient aux produits obésogènes, tout en mettant en avant l'argument de la responsabilité personnelle vis-à-vis de la gestion du poids corporel des individus et de leurs habitudes alimentaires [22]. Ainsi, l'une des approches courantes pour engendrer la perte de poids est le suivi d'un régime hypocalorique, dont l'efficacité est controversée car la restriction peut engendrer une reprise de poids plus importante que le poids initial (effet yo-yo) et

dont les conséquences sur la santé mentale, comme la dépression, sont étudiées actuellement [23–25]. D'importants facteurs environnementaux sont à l'origine de comportements menant à l'obésité, en particulier chez l'enfant [26]. L'environnement économique joue également un rôle avec une prévalence plus forte du surpoids et de l'obésité chez les adultes les moins diplômés et chez les enfants de représentants légaux non diplômés, comme montré en France au cours de l'étude Esteban menée en 2014-2015 [27]. La cohorte Constances, menée en 2013, montrait également cette relation inversement proportionnelle entre niveau de revenus et prévalence de l'obésité en France [28].

Aujourd'hui, seule la chirurgie bariatrique, pratiquée entre autres dans les cas extrêmes d'obésité chez les personnes dont les moyens non invasifs pour induire une perte de poids n'ont pas donné de résultats, permet une perte de poids conséquente et sur le long-terme pour la plupart des individus [29, 30]. Le coût d'une telle chirurgie est élevé et des conséquences sur les individus à long terme sont observées telles que des carences nutritionnelles notamment pour certains micronutriments. Cependant, elle ne peut pas s'appliquer à tous les individus en surpoids et obèses et ne concerne pas les individus normo-pondérés qui sont en passe de devenir en surpoids, c'est pourquoi il est important de développer de nouvelles techniques de soin et de prévention de ce surpoids, notamment en identifiant les critères qui l'induisent. Les multiples causes de l'obésité peuvent être modélisées par la triade épidémiologique (Figure 1.1).

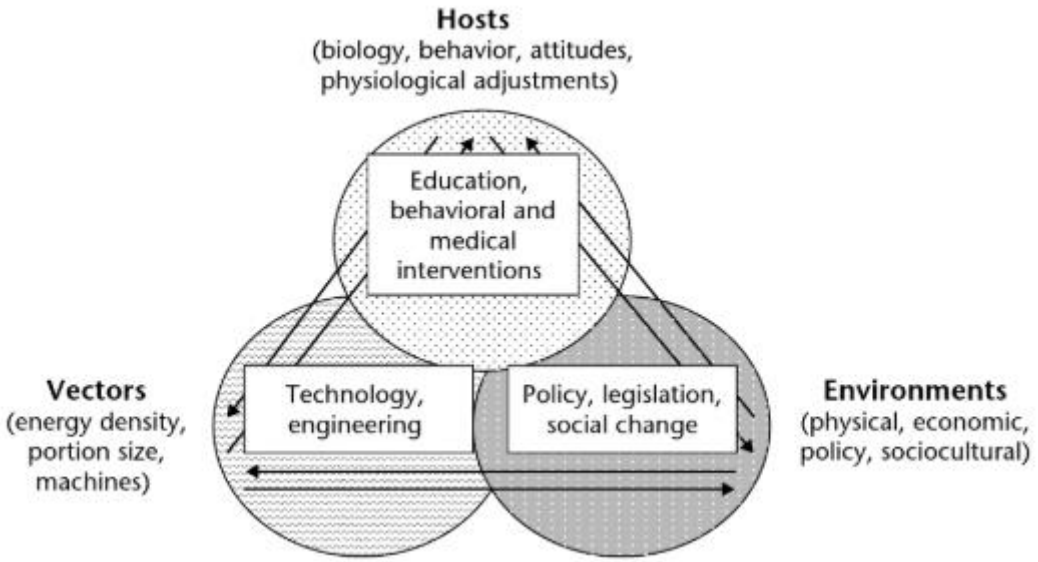


Figure 1.1. La triade de l'obésité. Ce schéma permet de résumer les trois grandes causes de l'obésité et leurs interactions : un hôte, son environnement (économique, politique, culturel) et les différents vecteurs d'obésité (la taille des portions, la densité énergétique de son alimentation…). L'hôte est sensible à son environnement qui peut influer sur l'induction de l'obésité (situation économique et politique). Enfin, les vecteurs issus de l'alimentation tels que la densité énergétique des aliments, la taille des portions et l'industrialisation de la production alimentaire, directement liés à l'avancement technologique, modifient les types d'aliments disponibles et leur disponibilité. D'après la référence [15].

Ainsi, les nombreux facteurs mis en avant dans le schéma de la triade épidémiologique favorisent *in fine* et de façon complexe l'augmentation de la consommation d'aliments palatables et de la sédentarisation. Les acteurs biologiques associés à ces deux derniers points sont des cibles de choix dans la recherche en santé publique et font l'objet de nombreuses études. Aujourd'hui, les causes les plus étudiées d'un point de vue biologique sont l'augmentation de la consommation d'aliments palatables qui sont souvent énergétiquement denses (gras et sucrés, aussi appelé régime occidental ou Western diet, WD) et la diminution de l'activité associée à la sédentarisation (la sédentarisation du travail, le développement des moyens de transport et l'urbanisation en sont les principales sources) [15]. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux dérégulations du comportement alimentaire engendrées par la consommation d'un aliment WD. Chez un individu sain, l'ingéré alimentaire et les dépenses énergétiques sont équilibrés afin de garantir l'homéostasie énergétique grâce à de nombreux processus physiologiques [31]. De nombreuses zones cérébrales sont notamment impliquées dans la régulation du comportement alimentaire. Parmi elles, l'hypothalamus est le principal régulateur de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques de l'individu (régulation homéostatique) tandis que le striatum en particulier est au cœur de la régulation hédonique du comportement alimentaire [32]. En association avec d'autres structures cérébrales, l'hypothalamus et le striatum communiquent par l'intermédiaire de projections neuronales pour réguler le comportement alimentaire [33]. Le fonctionnement des zones cérébrales impliquées dans la régulation homéostatique de l'ingéré alimentaire et de celles impliquées dans la régulation hédonique, est altéré par la consommation d'aliments palatables, ce qui participe à la mise en place de l'obésité et limite les possibilités de perte de poids chez l'Homme [34]. Plus particulièrement, la consommation d'aliments palatables augmente l'ingéré alimentaire à court terme chez l'Homme [35]. La visualisation et la consommation d'aliments palatables induit une activation de zones cérébrales impliquées dans la récompense alimentaire et l'induction de la faim chez l'Homme [36, 37]. Nous avons donc plus particulièrement étudié les adaptations du système nerveux central dans les premières heures/jours qui suivent la consommation d'un tel régime. Outre l'augmentation d'ingéré, plusieurs travaux suggèrent que l'activité cérébrale durant cette phase précoce de réponse à un aliment palatable (anticipation visuelle ou consommation) est un facteur de vulnérabilité en termes de prise de poids ultérieure [38, 39]. L'hypersensibilité à la récompense alimentaire serait ainsi susceptible d'exacerber le comportement de consommation, à l'origine de l'installation de la chronicité de ce comportement par le biais d'un mécanisme d'habituation voire de conditionnement, ce qui favoriserait et maintiendrait l'hyperphagie, et donc le risque de prise de poids [40].

Le modèle rongeur a été utilisé au cours de ce projet de thèse pour étudier les acteurs de la régulation de la prise alimentaire lors de l'introduction d'un WD. Un phénomène central d'anticipation d'un repas palatable est aussi observé chez le rongeur (souris et rat), avec l'augmentation de l'expression de *c-fos* (signe d'une activation neuronale) dans le noyau

accumbens, un noyau impliqué dans le système de récompense [41, 42]. Cependant, le rongeur présente une régulation extrêmement robuste de sa prise alimentaire sur plusieurs jours lors de l'introduction d'un tel régime. Cette réponse est caractérisée par une phase d'hyperphagie durant le premier jour d'introduction du régime suivie d'un retour à un ingéré alimentaire normal au cours des jours suivants (jusqu'à une semaine après introduction du régime) [43–45] (Figure 1.2). Durant ce retour à un ingéré alimentaire normal, une hyperglycémie transitoire, une intolérance au glucose et une inflammation systémique sont rencontrés chez le rat [46]. Malgré une forte régulation homéostatique qui permet un retour à un ingéré alimentaire normal, la phase hyperphagique est ainsi caractéristique de la supplantation de l'aspect hédonique de la régulation du comportement alimentaire, avec une activation des systèmes de récompense qui induisent une augmentation de l'ingéré alimentaire, par rapport à la régulation homéostatique. Ce modèle nous a donc semblé intéressant pour étudier les composantes hédoniques et homéostatiques de la régulation du comportement alimentaire. De plus , de façon intéressante, la réponse en terme d'ingéré lors de la première semaine de consommation de ce régime est prédictive de la propension des animaux à devenir obèses sur le long-terme [47, 48], expliquant 20% de la variabilité de poids corporel et d'adiposité après 4 semaines de WD [47].

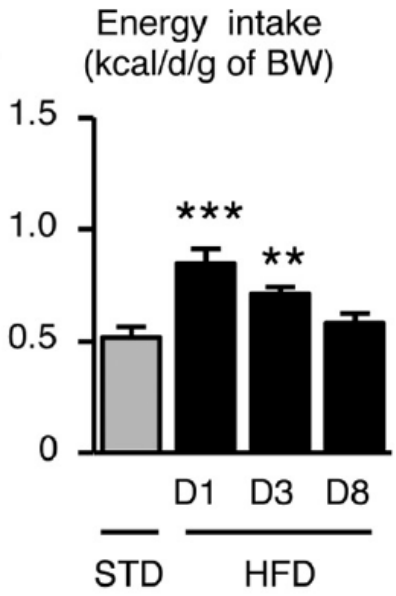


Figure 1.2. Evolution quotidienne de l'ingéré calorique (en kcal par jour par gramme de souris) de souris après introduction d'un aliment gras et sucré (HFD). L'ingéré a été évalué avant transition vers un WD (STD) ainsi qu'un jour (D1), trois jours (D3) et huit jours (D8) après changement de régime (HFD). Les différences significatives par rapport à l'apport calorique sous régime STD sont indiquées par des astérisques (*) avec ** : P<0,01 et *** : P<0,001. D'après [44].

II. La régulation centrale du comportement alimentaire

A. Les structures impliquées dans la régulation centrale du comportement alimentaire

Afin de maintenir l'équilibre entre les apports énergétiques et les dépenses associées, plusieurs structures cérébrales agissent de concert pour réguler la prise alimentaire. Cet équilibre est maintenu à la fois par les structures impliquées dans la régulation homéostatique et par celles impliquées dans la régulation hédonique de la prise alimentaire [49]. Cette régulation homéostatique est possible grâce à l'intégration de signaux périphériques issus du tractus gastro-intestinal, du tissu adipeux ou de glandes endocrines telles que le pancréas, soit par la transmission de messages nerveux, soit par la circulation sanguine (Figure 1.3). Le comportement alimentaire est également régi centralement par des structures impliquées dans la récompense en réponse aux aliments palatables, dont le principal régulateur est le striatum, impliqué dans les systèmes dopaminergique (qui régule le « wanting » ou l'envie de manger) et opioïde (qui régule le « liking » ou plaisir à manger).

1. La régulation de l'ingéré alimentaire par le tronc cérébral

a. Intégration des signaux périphériques par le tronc cérébral

i. Intégration de signaux circulants

Les signaux digestifs parviennent au cerveau au niveau du complexe dorso-vagal, situé dans le tronc cérébral, qui comprend notamment l'**area postrema (AP**), organe circumventriculaire dans lequel la barrière hémato-encéphalique est perméable, et le **noyau du tractus solitaire (NTS)**. Cette zone constitue un carrefour d'intégration des signaux en provenance du nerf vague, mais également de la circulation sanguine. Une barrière astrocytaire dense est présente entre l'AP et le NTS, cette barrière jouant un rôle de filtration des éléments provenant de la circulation sanguine [52]. Le rôle métabolique des astrocytes dans cette région du cerveau n'est encore que peu étudié. Leur rôle a été

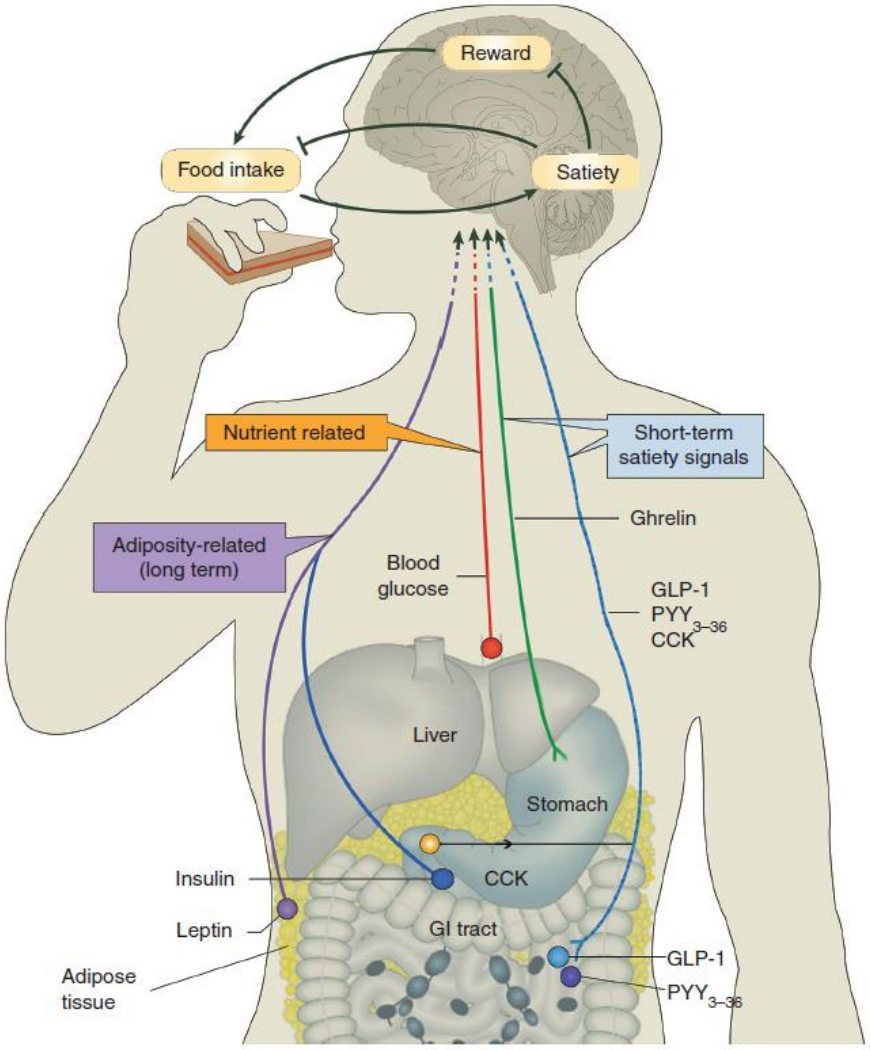


Figure 1.3. Le cerveau intègre des signaux périphériques pour réguler la prise alimentaire essentiellement grâce à la régulation homéostatique et en partie grâce à la régulation hédonique par l'intermédiaire de certains nutriments tels que les lipides. Ces signaux peuvent être liés à l'adiposité, pour une régulation à plus long terme, tels que l'insuline produite par le pancréas et la leptine produite par le tissu adipeux. D'autres signaux sont directement liés aux nutriments, le glucose étant un nutriment important dans cette régulation. Des signaux provenant du tractus gastro-intestinal auront une action à court terme, telles que les hormones glucagon-like peptide 1 (GLP-1), peptide tyrosine tyrosine (YY) (PYY), cholécystokinine (CCK) qui seront détaillés plus loin dans ce manuscrit. L'insuline peut également avoir une action à court terme avec une sécrétion précédant l'augmentation de la glycémie, lors de la phase céphalique [50]. D'après la référence [51].

davantage étudié dans l'hypothalamus. En effet, de façon relativement comparable, des astrocytes sont retrouvés entre le noyau arqué de l'hypothalamus (ARC), contenant les neurones AgRP/NPY et POMC, et l'éminence médiane, organe circumventriculaire en bordure du 3e ventricule. Dans l'ARC, un déploiement astrocytaire a été constaté en réponse à une consommation chronique de WD [53], ce déploiement ayant pour effet d'activer la réponse de neurones de l'ARC impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et pour conséquence une augmentation de la satiété par l'intermédiaire de la signalisation de la leptine [54]. Récemment, une étude a montré chez la souris nourrie pendant 12h avec un WD (lipides : 60% kcal) que le déploiement astrocytaire à proximité du NTS en réponse au régime induisait une augmentation de la satiété [55]. Ainsi, les astrocytes retrouvés entre l'AP et le NTS pourraient jouer un rôle physiologique dans la régulation du comportement alimentaire en intégrant des signaux circulants dont la nature exacte reste à préciser.

Le complexe dorso-vagal dispose de deux voies d'entrée des signaux périphériques régulateurs de la prise alimentaire : nerveuse et sanguine [59]. Parmi ces signaux, on retrouve des **nutriments** qui proviennent directement de la digestion et de l'absorption intestinale des aliments tels que le glucose, les acides aminés, les lipides et des **hormones** issues des cellules endocrines du tractus gastro-intestinal. L'AP et le NTS comprennent une grande diversité de populations neuronales et de neurotransmetteurs. Ces noyaux neuronaux reçoivent et envoient des projections vers de nombreuses régions cérébrales en lien avec la régulation énergétique (hypothalamus) et hédonique (aire tegmentale ventrale, striatum ventral) de la prise alimentaire. Les neurones POMC anorexigènes du NTS projettent vers l'hypothalamus, et permettent une communication entre ces deux structures [60]. Ils font du tronc cérébral une région relais entre le tractus digestif et l'hypothalamus. Ces voies de communication sont résumées dans la figure 4. Le complexe dorso-vagal intègre les informations digestives et induit la satiété suite au repas.

Parmi les nutriments, le **glucose** est un élément régulateur clé de l'homéostasie énergétique et la source principale d'énergie du système nerveux central [61]. Le glucose peut être détecté directement par les neurones du NTS, qui seront alors soit excités ("glucose-excited neurons") ou inhibés ("glucose-inhibited neurons") [62]. D'autres nutriments issus de l'alimentation peuvent jouer un rôle dans la régulation centrale de la prise alimentaire via le tronc cérébral. Les **acides aminés** ont un rôle anorexigène en activant certains neurones du complexe dorso-vagal soit directement, comme par exemple la **L-leucine** qui, après activation de la signalisation mTor, induit une diminution de l'ingéré alimentaire [63], ou l'arginine et le glutamate qui activent des neurones dans l'AP via l'activation du nerf vague [64]. Au sein du système nerveux central, les **lipides** jouent un rôle structural important en étant intégrés dans les membranes cellulaires des neurones. Cependant, aucun rôle de ces lipides issus de l'alimentation dans la régulation de la prise alimentaire *via* le tronc cérébral n'a été démontré à ce jour.

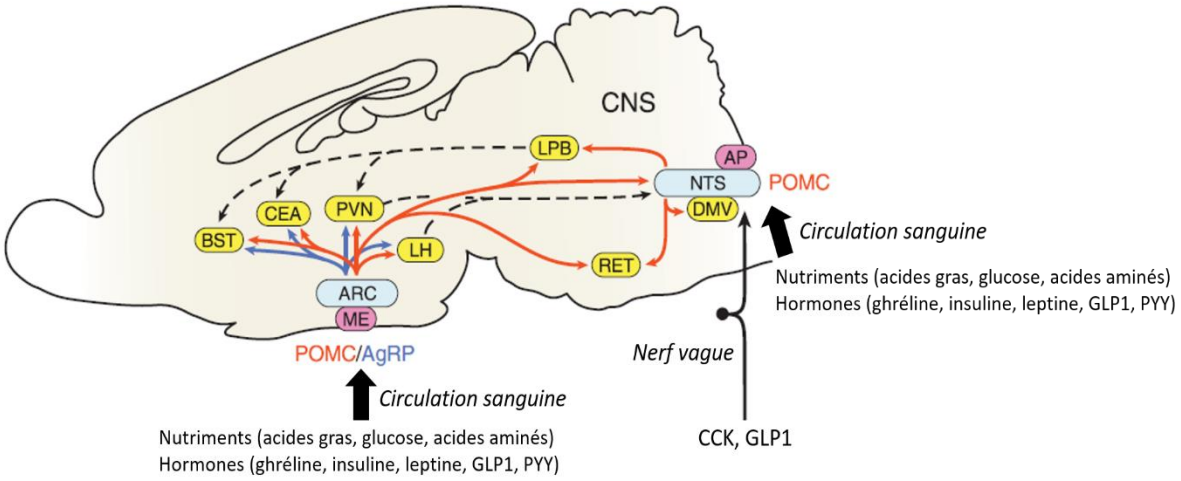


Figure 1.4. Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur. Les neurones de premier ordre exprimant POMC, provenant du noyau arqué de l'hypothalamus (ARC) ou du noyau du tractus solitaire du tronc cérébral (NTS), en bleu clair, sont proches des organes circumventriculaires (en rose), à savoir l'éminence médiane (ME) et l'area postrema (AP), respectivement. Cette situation anatomique permet à ces deux structures de recevoir des signaux périphériques humoraux qui vont induire une modification de l'activité de ces neurones de premier ordre. Les noyaux neuronaux indiqués en jaune contiennent des neurones exprimant le récepteur MC4R qui lie l'α-MSH produite à partir de POMC pour induire la satiété [56]. A l'inverse, les neurones AgRP, également situés dans l'ARC, ont un rôle orexigène [57]. Les projections POMC sont indiquées par les flèches rouges tandis que les projections d'AgRP sont indiquées par les flèches bleues. Les flèches en pointillés indiquent les projections secondaires de POMC qui lient l'hypothalamus et le NTS. BST : noyau du lit de la strie terminale ; CEA : noyau central de l'amygdale ; DMV : noyau moteur dorsal du nerf vague ; LH : hypothalamus latéral ; LPB : noyau parabrachial latéral ; ME : éminence médiane ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; RET : noyau réticulaire. Adapté de la référence [58].

Des **hormones** en provenance de la périphérie interagissent avec des récepteurs spécifiques situés à la surface des neurones présents dans l'AP et le NTS. Par exemple, la CCK, produite par les cellules de l'intestin, induit la production de pro-opiomélanocortine (POMC), un peptide satiétogène, par les neurones présents dans le NTS par l'intermédiaire du nerf vague [65]. La leptine, produite par le tissu adipeux, induit la production de POMC en se fixant sur son récepteur présent à la surface des neurones du NTS [66]. Le NTS contient également des neurones à préproglucagon (PPG), sensibles à la leptine qui peut les dépolariser [67], capables d'exprimer centralement GLP-1 en réponse à un repas, ce qui induit une diminution de la prise alimentaire *via* les neurones de l'ARC [68].

ii. Intégration de signaux nerveux

Les afférences du nerf vague projetant vers le NTS transmettent les informations provenant de la muqueuse intestinale, modulant ainsi la prise alimentaire [65]. Le GLP-1, produit au niveau intestinal, est capable de se fixer sur les récepteurs GLP-1R situés sur les afférences du nerf vague et de transmettre des informations satiétogènes vers le NTS [68]. De la même façon, la CCK produite au niveau de l'intestin induit une diminution de l'ingéré alimentaire par l'intermédiaire du nerf vague en stimulant la production d'ocytocine, une hormone anorexigène, par les neurones du NTS [69].

b. La régulation de la prise alimentaire par le tronc cérébral

Le NTS contient des neurones capables d'exprimer le peptide satiétogène POMC, qui est ensuite clivé en hormone mélanotrope (α-MSH) qui va interagir avec le système à mélanocortine de l'hypothalamus [60, 70] et du NTS [71] pour induire la satiété (Figure 4). L'activation à court terme des neurones POMC du NTS inhibe la prise alimentaire de façon immédiate, tandis que leur ablation n'engendre pas d'obésité sur le long terme, ce qui suggère que les neurones POMC du NTS ont plutôt un rôle dans la régulation à court terme de la satiété [72]. Le rôle du tronc cérébral dans la mise en place du surpoids et de l'obésité est encore peu étudié, principalement car le régulateur phare de l'ingéré alimentaire est l'hypothalamus. D'anciennes études ont montré que des lésions de l'AP et du NTS avaient un impact sur la régulation de la prise alimentaire, avec une hypophagie dans certains cas et une hyperphagie lorsque des aliments hautement palatables étaient proposés [73]. Il est donc intéressant d'étudier comment le tronc cérébral s'adapte et peut agir sur la régulation de la prise alimentaire.

2. La régulation de l'ingéré alimentaire par l'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure clé qui joue un rôle majeur dans la régulation du comportement alimentaire [58]. Il est constitué de plusieurs noyaux neuronaux qui communiquent entre eux et ont chacun un rôle particulier dans la régulation de l'homéostasie énergétique notamment *via* l'intégration de signaux périphériques.

a. L'intégration de signaux périphériques par l'hypothalamus

i. Intégration de signaux circulants

L'hypothalamus, et plus particulièrement l'ARC, est situé à proximité de l'éminence médiane, un des organes circumventriculaires qui, comme l'AP, comprend une barrière hémato-encéphalique semi-perméable. Cette proximité permet le passage facilité d'éléments issus de la circulation sanguine tels que les nutriments, les hormones et d'autres molécules issues par exemple du métabolisme du microbiote intestinal.

De la même façon que pour le tronc cérébral, le glucose et les acides aminés peuvent se fixer à des récepteurs présents au niveau des neurones de l'ARC, des tanycytes qui bordent l'éminence médiane ou des astrocytes présents autour des neurones pour moduler la prise alimentaire [74–76].

Les **acides gras** jouent un rôle dans la régulation du comportement alimentaire via leur détection par l'hypothalamus. Les acides gras à chaîne longue (AGCL) circulants provenant de l'absorption intestinale vers la circulation sanguine sont reconnus par l'hypothalamus comme un signal satiétogène. L'acide oléique, un AGCL, est capable de moduler l'activité de certains neurones de l'hypothalamus, diminuant l'ingéré alimentaire [77, 78]. Le mécanisme d'entrée des AGCL dans le système nerveux central est discuté, avec deux hypothèses possibles : la diffusion passive à travers la membrane plasmique ou le passage à l'aide d'un translocateur (FAT/CD36) [79]. Plus particulièrement, les AGCL vont se fixer sur ce translocateur présent à la surface des neurones POMC, ce qui induit la production d'α-MSH, un peptide satiétogène [80].

Les **hormones** telles que la leptine, l'insuline, le peptide YY (PYY) et le GLP-1 possèdent des récepteurs situés à la surface des neurones de l'ARC qui, lorsqu'ils sont activés, induisent une diminution de l'ingéré alimentaire (Figure 1.5). La ghréline, produite par l'estomac, est connue comme étant la première hormone provenant de la périphérie capa-

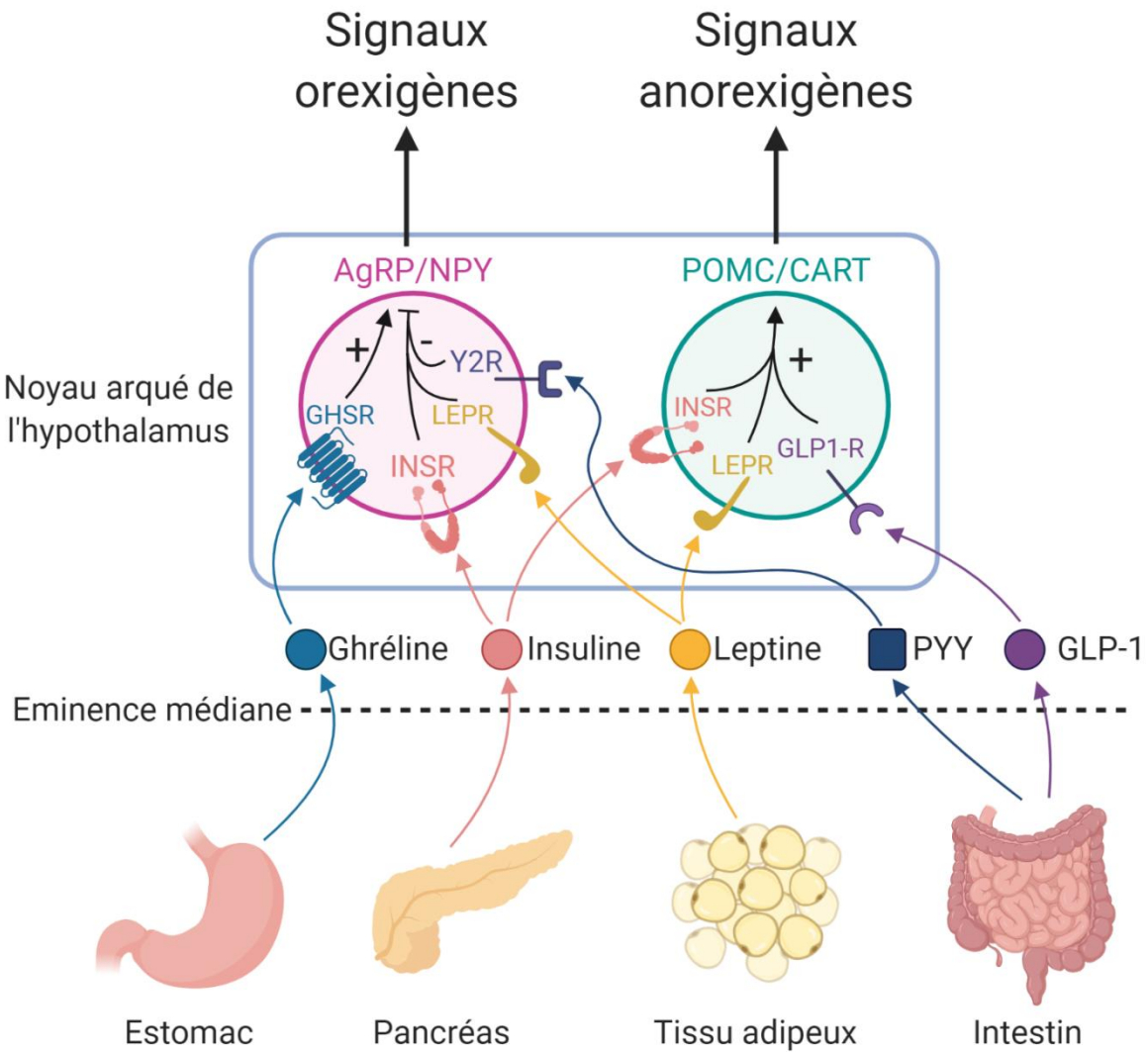


Figure 1.5. Représentation simplifiée des signaux humoraux d'origine périphérique capables de réguler la prise alimentaire *via* les neurones AgRP/NPY et POMC/CART situés au sein du noyau arqué de l'hypothalamus. Ces signaux circulants traversent la barrière hémato-encéphalique grâce à la semi-perméabilité de l'éminence médiane, où les capillaires sanguins sont fenestrés. La ghréline, produite par l'estomac, est la principale hormone orexigène. Elle se lie à son récepteur (GHSR) situé à la surface des neurones AgRP/NPY pour promouvoir la production de signaux orexigènes. L'insuline et la leptine, produites respectivement par le pancréas ainsi que la muqueuse gastrique [82] et le tissu adipeux, sont des signaux satiétogènes qui inhibent l'activité des neurones AgRP/NPY et activent celle des neurones POMC/CART en se fixant sur leurs récepteurs LEPR et INSR, respectivement. PYY et GLP-1, toutes deux produites par les cellules entéroendocrines de l'intestin, inhibent la prise alimentaire soit en inhibant l'activité des neurones AgRP/NPY (PYY) soit en activant celle des neurones POMC/CART (GLP-1) en se fixant sur leurs récepteurs Y2R (PYY) et GLP1-R (GLP-1).

ble d'induire la prise alimentaire en activant les neurones AgRP. L'asprosine est une autre hormone orexigène, découverte en 2016, fortement exprimée par le tissu adipeux pendant le jeûne et capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour activer les neurones AgRP et bloquer les neurones POMC par l'intermédiaire de la signalisation gabaergique [81].

ii. Intégration de signaux nerveux

En ce qui concerne la régulation de la prise alimentaire, l'hypothalamus reçoit notamment des afférences neuronales en provenance du tronc cérébral, premier intégrateur *via* le nerf vague des signaux rapides satiétogènes tels que la CCK, GLP-1 et PYY [83].

b. La régulation de l'ingéré alimentaire par les neurones de premier ordre

Les neurones de l'ARC sont capables d'intégrer des signaux à la fois périphériques (leptine, insuline, ghréline, hormones gastro-intestinales) et centraux (par l'intermédiaire de GABAR, récepteur à l'acide γ-aminobutyrique (GABA), principal inhibiteur de la neurotransmission du système nerveux central) pour moduler la prise alimentaire [80] (Figure 6). L'ARC comprend des neurones dits de premier ordre coexprimant NPY, AgRP et GABA qui augmentent la prise alimentaire en interagissant avec des récepteurs présents à la surface des neurones POMC de l'ARC et des neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN). La population de neurones AgRP/NPY produit des peptides orexigènes en réponse à des signaux de faim grâce à l'activation de récepteurs tels que le récepteur à la ghréline GHSR (activation de la transcription d'AgRP/NPY) ou de satiété *via* les récepteurs à la leptine (LEPR ou ObR) et à l'insuline (INSR) (inhibition de la transcription d'AgRP/NPY) par les ligands correspondants. Parmi ces peptides orexigènes, NPY réduit l'intervalle de temps entre les repas [84–87] et retarde la sensation de satiété, ce qui a pour conséquence d'augmenter la taille et la durée des repas [85, 88, 89]. AgRP est un peptide produit exclusivement dans l'ARC qui va stimuler la prise alimentaire par antagonisme au récepteur à la mélanocortine 4 (MC4R) situé dans le PVN [90]. AgRP et NPY vont également augmenter l'ingéré alimentaire en se fixant sur des récepteurs présents sur les neurones du PVN, du noyau ventromédian (VMN) et de l'hypothalamus latéral (LHA). Ces noyaux contiennent les neurones de second ordre qui permettent l'intégration des signaux en provenance des neurones du premier ordre (cf. paragraphe II.A.2.c).

L'ARC comprend également des neurones exprimant POMC/CART qui produisent des peptides anorexigènes en réponse à des signaux de satiété tels que la leptine et l'insuline, qui activent la transcription de POMC/CART [72, 91]. Les mélanocortines sont des peptides produits à partir du clivage de leur précurseur POMC, notamment l'α-MSH, qui va se fixer sur les récepteurs MC4R situés au niveau du PVN, du LHA et du VMN [92]. L'augmentation de l'activité des neurones POMC induit une augmentation de l'α-MSH dans le PVN, activant les neurones possédant MC4R pour induire la satiété. Le GABA est également un important neurotransmetteur impliqué dans la régulation de l'ingéré alimentaire, sécrété par les neurones NPY/AgRP. Le GABA sécrété dans les synapses provenant des neurones AgRP/NPY vers les neurones POMC va supprimer les effets anorexigènes de l'α-MSH sécrétée par les neurones POMC.

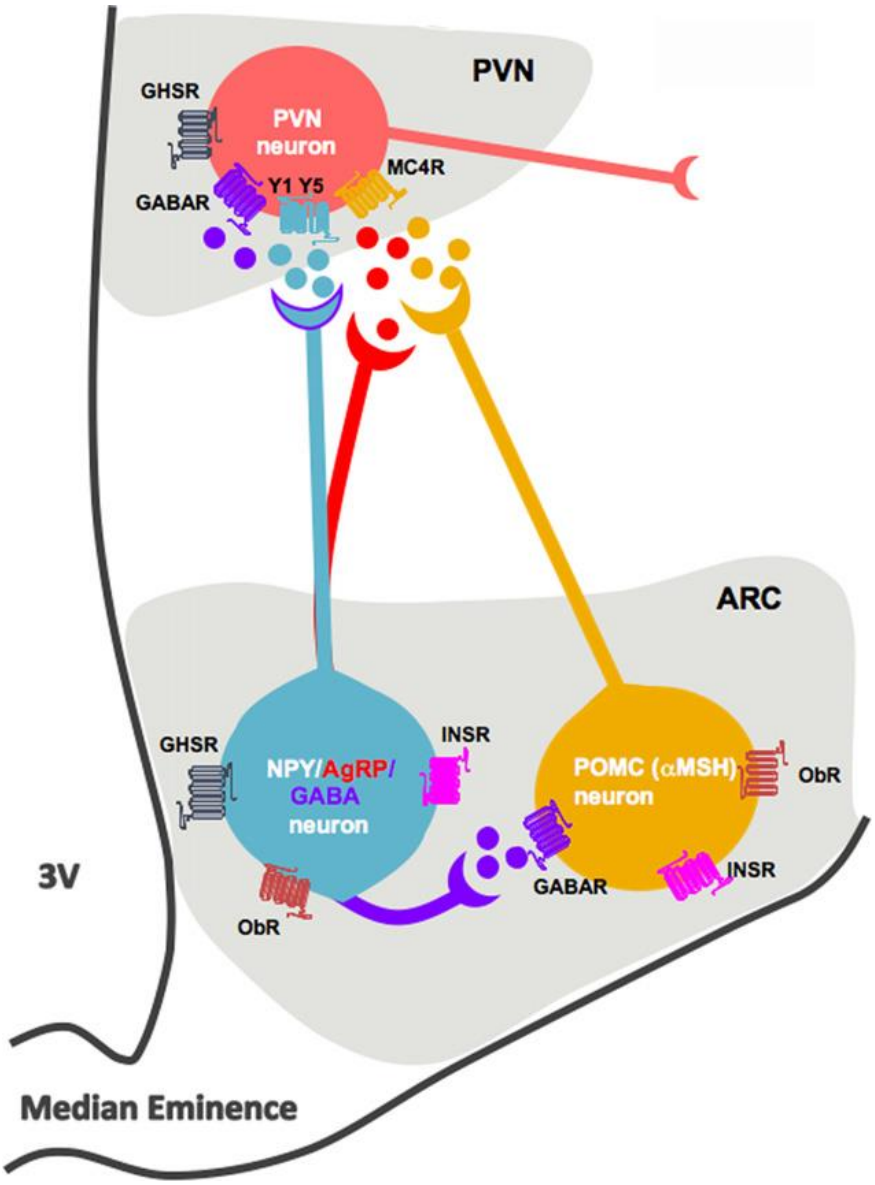


Figure 1.6. Schéma des interactions entre les différentes populations neuronales du noyau arqué (ARC) et les neurones de second ordre du noyau paraventriculaire (PVN). D'après la référence [80]. INSR : récepteur à l'insuline, GHSR : récepteur à la ghréline, ObR : récepteur à la leptine, GABAR : récepteur à l'acide γ-aminobutyrique.

c. La régulation de l'ingéré alimentaire par les neurones de second ordre

Trois régions hypothalamiques comprennent les neurones de second ordre : le PVN, le LHA et le VMN. Les neurones du PVN ont un rôle anorexigène [93], avec la production d'hormones satiétogènes telles que la corticolibérine (corticotropin-releasing hormone, CRH), l'hormone thyréotrope (thyrotropin-releasing hormone, TRH), la somatostatine, la vasopressine et l'ocytocine. Les neurones du PVN sont également capables d'induire une diminution de la masse graisseuse par augmentation de la β-oxydation des lipides par l'intermédiaire du système nerveux parasympathique [94]. Les efférences du PVN se projettent dans plusieurs zones, incluant le tronc cérébral, pour coordonner la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Les neurones du VMN induisent également une diminution de la prise alimentaire [95]. Ils reçoivent majoritairement des signaux neuronaux issus de l'ARC et en projettent vers celui-ci ainsi que vers d'autres noyaux tels que le LHA, le noyau dorso-médian (DMN) et également le tronc cérébral. Les neurones du VMN synthétisent le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), un peptide anorexigène [96]. Les neurones du LHA, contrairement au PVN et au VMN, induisent la prise alimentaire grâce à la production d'hormones orexigènes telles que l'hormone concentratrice de mélanine (melanin concentrating hormone, MCH) et l'orexine [97].

d. La régulation des dépenses énergétiques

La régulation de la balance énergétique implique une régulation des dépenses énergétiques, en plus de la régulation de la prise alimentaire. Plusieurs structures cérébrales sont impliquées dans la régulation des dépenses, incluant le tronc cérébral et l'hypothalamus. Les neurones sécréteurs de GABA, situés dans l'ARC et dans le tronc cérébral, sont les principaux coordinateurs de cette régulation [98, 99]. *In fine*, leur activation entraîne l'augmentation des dépenses énergétiques par thermogénèse (tissu adipeux brun) et l'activation de la locomotion [98]. Les neurones sécréteurs de GABA innervent le tissu adipeux brun ainsi que d'autres structures centrales telles que l'amygdale, également impliquée dans cette régulation. Chez l'individu sain, le métabolisme énergétique dépend principalement de la signalisation de la leptine, qui se fixe sur ses récepteurs présents sur les neurones POMC [100]. Lorsque les neurones POMC sont activés par la leptine, l'α-MSH sécrétée se fixe sur les neurones du PVN, ce qui a pour effet d'augmenter les dépenses énergétiques en activant la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun [100]. La production d'hormone TRH par le PVN induit également une augmentation de la dépense énergétique par l'activation de la fonction

musculaire et de la fonction cardio-vasculaire [101]. A l'opposé, NPY est capable de diminuer la dépense énergétique via une diminution de la thermogénèse du tissu adipeux brun en diminuant l'expression de la tyrosine hydroxylase du PVN [102].

3. La régulation hédonique du comportement alimentaire

Bien que la régulation homéostatique influe sur la prise alimentaire, dans le cadre de l'obésité croissante et de la sur-représentation d'aliments ultra-palatables dans le quotidien des individus, la régulation hédonique de la prise alimentaire supplanter la régulation homéostatique et participer à l'altération de la régulation de la prise alimentaire [103–106]. Il est donc primordial de comprendre comment le système de régulation hédonique est contrôlé et par quels facteurs. Le système de récompense implique plusieurs structures cérébrales et est composé de trois grands systèmes régulateurs : le système mésolimbique, qui comprend notamment le système dopaminergique ; le système endocannabinoïde et le système opioïdergique. L'hippocampe, l'amydgale, le cortex pré-frontal, l'aire tegmentaire ventrale (VTA) et le noyau accumbens (situé au niveau du striatum ventral) forment le système mésolimbique. L'hippocampe est connu principalement pour son rôle dans la mémorisation [107, 108] mais participe également à la régulation de la satiété [109]. Les neurones de la VTA sont activés en réponse à des aliments palatables et leurs projections sur le noyau accumbens contribuent à déclencher la motivation à manger, ou "wanting" [107]. Cette motivation à manger est essentiellement induite par la dopamine sécrétée par les neurones de la VTA, qui se lie aux récepteurs dopaminergiques (DRD1 et DRD2). Le transporteur de la dopamine (dopamine active transporter DAT ou SLC6A3) permet le re-uptake de la dopamine au niveau synaptique, terminant ainsi l'action de celle-ci. La tyrosine hydroxylase (Th) est l'enzyme à l'origine de la synthèse de dopamine et est indispensable chez la souris pour initier la prise alimentaire [110, 111]. Le système dopaminergique semble être impliqué dans la mise en place de l'obésité, avec notamment une corrélation négative entre le poids de rats obèses et les niveaux d'expression (génique et protéique) de DRD2 dans le striatum [112]. Les opioïdes sont quant à eux impliqués dans le plaisir à manger (ou « liking »), en participant entre autres à l'activation des neurones endocannabinoïdes du noyau accumbens chez le rat [113]. Cette activation du système endocannabinoïde peut induire l'augmentation de la prise d'aliments et de boissons palatables même chez les animaux ayant atteint la satiété et participent ainsi à la motivation à manger [114]. Les opioïdes sont également capables de déclencher l'envie de manger (ou « wanting ») dans certaines régions du noyau accumbens, bien que le principal régulateur de cette sensation soit la dopamine [115]. Les opioïdes régulent ainsi la prise alimentaire à court terme, de par leur implication dans le plaisir sensoriel lié à la consommation d'aliments palatables [116]. La preproenképhaline est un peptide clé du

système opioïdergique qui a une action euphorisante suite à sa liaison aux récepteurs μ des opiacés (OPRM1) [117], situés au sein du striatum [118, 119]. Ces structures centrales propres au système de récompense interagissent étroitement avec les structures qui régissent la régulation homéostatique de la prise alimentaire [33]. Ainsi, l'injection intracérébroventriculaire d'un inhibiteur d'un des récepteurs aux endocannabinoïdes chez le rat induit une diminution de l'effet orexigène d'agonistes du système à mélanocortine [120], soulignant une interaction entre la régulation homéostatique *via* le système à mélanocortine et la régulation hédonique *via* les endocannabinoïdes. L'obésité et la consommation de WD induisent une dérégulation homéostatique qui intervient dans la dérégulation de l'hédonisme lié à la prise alimentaire [121]. Cependant, les effets à long terme des modifications de la régulation hédonique sur la mise en place de l'obésité sont mal connus.

La régulation hédonique du comportement alimentaire est soumise à l'influence de signaux périphériques impliqués dans la régulation homéostatique de la prise alimentaire. La leptine est capable de se fixer sur les neurones dopaminergiques pour diminuer leur activité au niveau de la VTA et diminuer ainsi la prise alimentaire [122]. De façon similaire, le GLP-1 est capable de diminuer la motivation à manger en inhibant les neurones de la VTA et du noyau accumbens [123]. La ghréline se place comme un acteur à la fois homéostatique et hédonique dans la régulation de la prise alimentaire : elle possède des récepteurs situés au niveau de la VTA et induit la motivation à manger en s'y fixant, activant ainsi les neurones sécréteurs de dopamine, et est capable d'induire la sécrétion de dopamine dans le noyau accumbens [124]. Il a été montré que le nerf vague joue également un rôle hédonique en induisant la libération de dopamine lorsqu'il est activé [125].

Lors de la consommation d'aliments palatables tels qu'un WD, le système de récompense est activé et entraîne une augmentation de la prise alimentaire [126]. La reconnaissance des aliments palatables passe essentiellement par des récepteurs gustatifs [127] et des signaux visuels [128]. Ces informations orosensorielles sont transmises par les neurones du NTS [129] et induisent l'activation du système dopaminergique [130]. Le système de récompense peut toutefois être activé de manière indépendante à ces récepteurs lors de la consommation d'un WD. Par exemple malgré l'inhibition de la transduction du goût sucré chez la souris, le sucrose est capable d'activer les neurones du circuit de la récompense, en particulier les neurones du noyau accumbens, ce qui se traduit par une augmentation de sécrétion de dopamine chez ces souris [131]. L'infusion de lipides directement dans l'intestin, mimant la digestion, peut également activer le système de la récompense. La structure des lipides semble dans ce cas davantage influer sur l'activation du système dopaminergique que leur valeur calorique : lorsqu'infusés dans l'intestin à valeur calorique équivalente, les AGCL (par exemple l'oléate) activent le système dopaminergique chez la souris, mais pas le 2-monoacylglycérol [132]. Au niveau plasmatique, la concentration de triglycérides en particulier après consommation d'un

WD reste haute: mimer cette augmentation induite par l'obésité par l'intermédiaire d'une infusion dans la carotide de rats normo-pondéraux permet de diminuer la sécrétion de dopamine dans le striatum et la préférence pour un aliment WD, ce qui montre que les triglycérides sont capables de modifier la réponse hédonique [133]. Cependant, chez des animaux dont la triglycéridémie est augmentée de façon artificielle pendant 7 jours, l'infusion carotidienne de triglycérides n'inhibe plus la préférence pour l'aliment WD (ref 127). Récemment, il a été montré que les triglycérides circulants sont également capables de moduler l'activité du récepteur dopaminergique DRD2 *via* l'activation lipoprotéine lipase dans le noyau accumbens du striatum [134].

B. Le rôle de l'inflammation dans la régulation centrale du comportement alimentaire

1. Le lien entre l'inflammation hypothalamique et l'obésité

L'obésité, que ce soit chez l'Homme ou dans un modèle animal, est caractérisée par une inflammation générale de bas grade dont la cause principale est la production de cytokines par le tissu adipeux [135]. L'hypothalamus est également touché par cette inflammation chez l'obèse. Le premier lien entre inflammation hypothalamique et obésité a été établi en 2005 chez le rongeur par de Souza *et al.*, qui ont montré chez le rat que la consommation de WD (lipides 45%kcal) pendant 16 semaines induisait une inflammation hypothalamique caractérisée par une augmentation significative de l'expression et de la production des cytokines TNF-α, IL-1β et IL-6 ainsi qu'une surexpression des protéines impliquées dans l'activation des voies de transduction du signal JNK et NF-κB. Cette inflammation hypothalamique était associée à une altération de la signalisation de l'insuline *via* l'activation de ces deux voies de transduction [136]. Depuis l'étude de de Souza *et al.*, de nombreuses études ont montré une inflammation hypothalamique après consommation de WD chez le rongeur (Tableau 1.1). Ces études montrent que le pourcentage de lipides (en grande majorité soit 45%, soit 60%) n'influence pas le niveau de réponse inflammatoire centrale. De façon générale, les résultats de ces études montrent que l'inflammation est généralement caractérisée par des élévations relativement faibles (x1,5 ou x2) des niveaux d'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Deux types cellulaires majeurs, présents dans l'ensemble du cerveau, jouent un rôle majeur dans l'inflammation centrale (voir paragraphe II.B.3.a): la microglie, constituée par les macrophages du cerveau, et les astrocytes, qui composent environ 35% des cellules du système nerveux central et qui jouent un rôle dans l'inflammation *via* des modifications morphologiques (remodelage astrocytaire) et la

production de cytokines pro-inflammatoires [137]. En plus de l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de l'activation des voies de transduction (NF-κB notamment), l'activation de la microglie et le recrutement des astrocytes de l'ARC ont été observés chez les modèles rongeurs dans de nombreuses études en lien avec la consommation de WD et/ou l'obésité [138–142]. Cette augmentation de l'inflammation hypothalamique peut aussi être évaluée *in vivo* par imagerie à résonnance magnétique (IRM) par la visualisation d'une augmentation du temps de relaxation T2 chez la souris obèse [143] ainsi que chez l'Homme [144]. Les données sur l'inflammation hypothalamique chez l'Homme sont moins nombreuses, mais une augmentation du signal IRM hypothalamique (augmentation du temps de relaxation T2) a été observée chez des patients obèses, en corrélation avec leur IMC [145]. Le signal IRM pouvant refléter l'activation de la microglie [138, 145] et le recrutement astrocytaire [138]. Une augmentation du nombre de cellules Iba1+ et GFAP+ par immunomarquage dans l'hypothalamus d'un homme obèse par rapport à un homme normo-pondéré a été mesurée post-mortem au cours de cette même étude, confirmant que les caractéristiques inflammatoires observées chez le rongeur sont aussi observables chez l'Homme. L'activation de la microglie est aussi corrélée positivement à l'insulino-résistance dans ces études chez l'Homme [145]. Chez des patients anciennement obèses ayant subi une chirurgie bariatrique, l'effet anti-inflammatoire de la forte perte de poids est aussi visible par IRM fonctionnelle avec une augmentation de l'activité fonctionnelle de l'hypothalamus. Une augmentation de l'activité anti-inflammatoire dans le liquide cérébro-spinal était également observée, avec une élévation des niveaux protéiques d'IL-10 et d'IL-6, deux cytokines connues pour jouer un rôle anti-inflammatoire dans l'hypothalamus (par exemple après un exercice physique) [146, 147], l'IL-6 pouvant en effet jouer un rôle pro ou anti-inflammatoire selon le contexte [148]. Ainsi, l'augmentation de l'inflammation hypothalamique suite à la consommation de WD ou lors de l'obésité ainsi que sa diminution lors d'une forte perte de poids sont vérifiées à la fois dans les modèles animaux et chez l'Homme via d'autres techniques expérimentales, ce qui confirme la pertinence de l'utilisation de modèles animaux (rongeurs notamment) pour l'étude du lien entre la consommation de WD et l'inflammation hypothalamique.

Publication	Espèce	Composition de l'aliment WD	Régime contrôle	Durée d'alimentation	Marqueur(s) d'inflammation	Zone(s) de l'hypothalamus
Cansell et al., 2020 [72]	Souris C57BL/6J	Lipides : 40,9%kcal, glucides : 43%kcal, protéines : 16,1%kcal)	Naturel (lipides : 13,5%kcal, glucides : 61,3%kcal, protéines : 25,2%kcal)	1 heure	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x5), de *ccl2* (x2) et de *ccl5* (x2) Augmentation de l'expression génique de *gfap* (x2)	Hypothalamus entier
Cansell et al., 2020 [72]	Souris C57BL/6J	Lipides : 40,9%kcal, glucides : 43%kcal, protéines : 16,1%kcal)	Naturel (lipides : 13,5%kcal, glucides : 61,3%kcal, protéines : 25,2%kcal)	3 heures	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x2), d'*il-6* (x2), de *tnf-α* (x2), de *ccl2* (x2) et de *ccl5* (x2) Augmentation de l'expression génique d'*iba1* (x2)	Hypothalamus entier
Cansell et al., 2020 [72]	Souris C57BL/6J	Lipides : 40,9%kcal, glucides : 43%kcal, protéines : 16,1%kcal)	Naturel (lipides : 13,5%kcal, glucides : 61,3%kcal, protéines : 25,2%kcal)	6 heures	Augmentation de l'expression génique d'*iba1* (x1,8)	Hypothalamus entier
Waise et al., 2015 [67]	Souris C57BL/6J	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 12,3%kcal, glucides : 59,2%kcal, protéines : 28,5%kcal)	1 jour	Augmentation du nombre (x1,4) et de la taille (x2,5) des cellules Iba1+.	Hypothalamus entier
Buckman et al., 2015 [69]	Souris C57BL/6J	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 13%kcal)	1 jour	Augmentation de l'expression génique d'*emr1* (x1,7), d'*iba1* (x1,7), d'*il-6* (x1,7) et de *tnf-α* (x2,2) Augmentation de l'expression protéique de S100-B (x1,3) et de GFAP (x2), signe d'une activation astrocytaire, en association avec des variations morphologiques subtiles des astrocytes, visible par immunomarquage	Hypothalamus médiobasal
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	1 jour	Augmentation de l'expression d'*emr1* (x2,1) et de *gfap* (x1,5) Augmentation de l'expression d'*ikbkb* (x1,5) Augmentation de l'expression d'*il-6* (x1,5), de *tnf-α* (x1,5)	Hypothalamus entier
Morari et al., 2014 [71]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Inconnue	1 jour	Augmentation de l'expression génique de la fractalkine (x 1,2) et du récepteur de la fractalkine (x1,5) Augmentation de l'expression génique de *tnf-α* (x2), de *cd11b* (x1,5), de *cd36* (x5,5), de *mrc1* (x4) et de *cd163* (x2)	Hypothalamus entier
Morari et al., 2014 [71]	Souris balb/c (résistance à l'obésité)	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Inconnue	1 jour	Augmentation de l'expression génique de *tnf-α* (x 1,5)	Hypothalamus entier
Terrien et al., 2019 [70]	Souris C57BL/6J	Lipides : 45%kcal (lard, huile de soja), glucides : 35%kcal, protéines : 20%kcal	Synthétique (lipides :10%kcal, glucides : 70%kcal, protéines : 20%kcal)	3 jours	Augmentation de la taille de la microglie (x1,5 dans l'ARC et x1,4 dans le PVN)	ARC et PVN
					Augmentation de l'expression génique du récepteur à l'histamine 1 (*hrh1*, x2) et de la nicotinamide phosphoribosyltransférase (*nampt*, x1,9), deux gènes liés à l'inflammation	PVN
Kim et al., 2019 [54]	Souris C57BL/6	Lipides : 45%kcal (lard, huile de soja), glucides : 35%kcal, protéines : 20%kcal	Naturel (lipides : 18%kcal (huile de soja), glucides : 58%kcal, protéines : 24%kcal)	3 jours	Augmentation de l'immunomarquage positif à Iba1 dans la microglie et du nombre de cellules microgliales	ARC
					Augmentation de l'expression génique d'*ucp2* (x1,5), d'*il-1β* (x2), d'*il-6* (x2) et de *tnf-α* (x2)	Hypothalamus entier

McLean et al., 2019 [79]	Souris C57BL/6J	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Semi-synthétique (lipides : 10%kcal)	3 jours	Augmentation de la quantité de protéines impliquées dans le stress cellulaire (telles que les Hsp), signe d'un stress oxydant	Hypothalamus entier
Morari et al., 2014 [71]	Souris balb/c (résistance à l'obésité)	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Inconnue	3 jours	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x2), *mcp1* (x3,8), *ccr2* (x3), *cdb11b* (x1,7), *cd36* (x3,8), *cd163* (x3,8)	Hypothalamus entier
Morari et al., 2014 [71]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Inconnue	3 jours	Augmentation de l'expression génique de *tnf-α* (x2,5), de *cd11b* (x1,7), de *cd36* (x4), d'*il-1β* (x2,5), du récepteur de la fractalkine (x1,5)	Hypothalamus entier
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	3 jours	Augmentation de l'expression d'*emr1* (x2,5) et de *gfap* (x1,5) Augmentation de l'expression d'*ikbkb* (x1,5) Augmentation de l'expression d'*il-6* (x1,4), de *socs3* (x1,7)	Hypothalamus entier
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	3 jours	Augmentation du nombre de cellules microgliales (x1,2)	ARC
Oh-I et al., 2010 [65]	Rat Wistar	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International))	1 semaine	Augmentation de l'expression génique de l'arginase (x15), un marqueur de l'activation des macrophages (ici microglie)	Hypothalamus entier
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	1 semaine	Augmentation du nombre de cellules microgliales (x1,1)	ARC
Thaler et al., 2012 [50]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	1 semaine	Astrocytose visible par imagerie	ARC
Kim et al., 2019 [54]	Souris C57BL/6	Lipides : 45%kcal (lard, huile de soja), glucides : 35%kcal, protéines : 20%kcal	Naturel (lipides : 18%kcal (huile de soja), glucides : 58%kcal, protéines : 24%kcal)	1 semaine	Augmentation de l'immunomarquage positif à Iba1 dans la microglie et du nombre de cellules microgliales	ARC
Kim et al., 2019 [54]	Souris C57BL/6	Lipides : 45%kcal (lard, huile de soja), glucides : 35%kcal, protéines : 20%kcal	Naturel (lipides : 18%kcal (huile de soja), glucides : 58%kcal, protéines : 24%kcal)	1 semaine	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x2), d'*il-6* (x2,1), de *tnf-α* (x2,5) et de *cx3cr1* (x5,5)	Hypothalamus entier
Tsaousidou et al., 2014 [66]	Souris C57BL/6N	Lipides : 34%kcal (essentiellement des acides gras insaturés), glucides : 47%kcal, protéines : 19%kcal	Naturel (lipides : 18%kcal, glucides : 58%kcal, protéines : 24%kcal)	10 jours	Activation de la voie de signalisation JNK	Neurones AgRP de l'ARC
Balland et Cowley, 2017 [68]	Souris C57BL/6	Lipides : 43%kcal, glucides : 36%kcal, protéines : 21%kcal	Naturel (lipides : 4,6%kcal)	10 jours	Augmentation du nombre de cellules GFAP+ (astrocytes) étoilées (x7), signe d'une astrogliose	ARC
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	2 semaines	Augmentation du nombre de cellules microgliales (x1,4)	ARC
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	2 semaines	Augmentation de l'expression d'*emr1* (x1,6) et de *gfap* (x1,5) Augmentation de l'expression d'*ikbkb* (x1,6)	Hypothalamus entier

Morari et al., 2014 [71]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Inconnue	2 semaines	Augmentation de l'expression génique de la fractalkine (x 1,2) et du récepteur de la fractalkine (x1,5)	Hypothalamus entier
Kim et al., 2020 [149]	Rat Fisher	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 13,2%kcal, glucides : 62,1%kcal, protéines : 24,7%kcal)	3 semaines	Augmentation du nombre de cellules Iba1+ (x1,4 dans le ganglion noueux et x2,1 dans le NTS par rapport aux rats contrôle)	Ganglion noueux et NTS
André et al., 2017 [77]	Souris	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 14%kcal, glucides : 61%kcal, protéines : 25%kcal)	3 semaines	Activation de la voie IKKβ/NF-κB au sein des astrocytes. Augmentation de l'expression génique de *socs3* (x1,5) Augmentation du ratio protéique pSTAT3/STAT3 (x1,4)	Hypothalamus médio-basal
André et al., 2017 [77]	Souris	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 14%kcal, glucides : 61%kcal, protéines : 25%kcal)	3 semaines	Augmentation du nombre (x1,8) de cellules Iba1+ Augmentation du nombre de cellules TNF-α+ (x3) Activation de la prolifération microgliale	ARC
Valdearcos et al., 2014 [51]	Souris C57BL/6	Lipides : 42%kcal, glucides : 42,7%kcal, protéines : 15,2%kcal	Naturel (lipides : 13,2%kcal, glucides : 62,1%kcal, protéines : 24,7%kcal)	4 semaines	Augmentation de l'immunomarquage TNF-α+ et du nombre de cellules Iba1+ (x1,7)	ARC
Valdearcos et al., 2014 [51]	Souris C57BL/6	Lipides : 42%kcal, glucides : 42,7%kcal, protéines : 15,2%kcal	Naturel (lipides : 13,2%kcal, glucides : 62,1%kcal, protéines : 24,7%kcal)	4 semaines	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x3), *ikbkb* (x2), *tnf-α* (x2) et *il-6* (x2)	Hypothalamus entier
Valdearcos et al., 2014 [51]	Souris C57BL/6	Lipides : 42%kcal, glucides : 42,7%kcal, protéines : 15,2%kcal	Naturel (lipides : 13,2%kcal, glucides : 62,1%kcal, protéines : 24,7%kcal)	4 semaines	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x3), *ikbkb* (x3), *tnf-α* (x2) et *il-6* (x2,5)	Fraction microgliale de l'hypothalamus
Valdearcos et al., 2017 [55]	Souris C57BL/6	Lipides : 42,0%kcal (lipides du lait), glucides : 42,7%kcal protéines : 15,2%kcal	Synthétique (lipides : 12%kcal (huile de maïs), glucides : 67%kcal, protéines : 21%kcal)	4 semaines	Accumulation de la microglie et recrutement de cellules myéloïdes	Hypothalamus médiobasal (ARC et éminence médiane)
Thaler et al., 2012 [50]	Rat Long-Evans	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	4 semaines	Augmentation de l'expression d'*emr1* (x2,0) et de *gfap* (x1,3) Augmentation de l'expression d'*ikbkb* (x1,5) Augmentation de l'expression d'*il-6* (x1,6), de *tnf-α* (x1,6) et de *socs3* (x2,1)	Hypothalamus entier
Douglass et al., 2017 [53]	Souris C57BL6/J	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 13%kcal)	6 semaines	Augmentation du nombre de cellules GFAP+ (x4)	ARC
Gao et al., 2014 [73]	Souris	Inconnue	Inconnue	6 semaines	Augmentation du nombre de cellules positives à Iba1 (immunomarquage)	ARC
Posey et al., 2009 [60]	Rat Wistar	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Contrôle synthétique avec lipides : 10%kcal (lard, huile de soja)	7 semaines	Augmentation de la quantité de protéine IKKβ phosphorylée (x1,5)	Hypothalamus entier
Milanski et al., 2009 [61]	Rat Wistar	Lipides : 36,0%g (origine animale)	Naturel (lipides : 4%g)	8 semaines	Augmentation de l'expression protéique de TLR4 dans les macrophages (immunofluorescence)	ARC
Milanski et al., 2009 [61]	Rat Wistar	Lipides : 36,0%g (origine animale)	Naturel (lipides : 4%g)	8 semaines	Activation des voies de transductions du signal TLR4 et TLR2 (association protéique TLR4/Myd88 et TLR2/Myd88) Augmentation de l'expression génique de *tnf-α* (x4,4), *il-1β* (x8), d'*il-6* (x2,7) et d'*il-10* (x2)	Hypothalamus entier
Kim et al., 2018 [76]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Synthétique (lipides : 10%kcal)	8 semaines	Augmentation de l'expression génique de *tnf-α* (x3), *mcp-1* (x3,8), *il-6* (x1,8), *gfap* (x1,5), *iba1* (x2) et *cb11b* (x2,5)	Hypothalamus entier

Dalvi et al., 2017 [78]	Souris C57BL/6J	Lipides : 60%kcal, glucides : 26%kcal, protéines : 15%kcal	Inconnue	8 semaines	Diminution de la densité des cellules TNF-α+ (x2) Augmentation de la densité des cellules GFAP+ (x3) Augmentation du nombre de cellules GFAP+ (x2) Augmentation de la densité des cellules Hsp70+ (x2)	ARC
					Augmentation de l'expression génique d'*ikbα* (x1,2)	Hypothalamus entier
Morari et al., 2014 [71]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Inconnue	8 semaines	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x1,5) et de la fractalkine (x 1,2)	Hypothalamus entier
Milanski et al., 2012 [63]	Rat Wistar	Composition inconnue, mais le détail de la composition en acides gras déterminée par HPLC est disponible en tableau supplémentaire de l'article	Composition inconnue, mais le détail de la composition en acides gras déterminée par HPLC est disponible en tableau supplémentaire de l'article	8 semaines	Accumulation de la microglie (plateau à 4 semaines), augmentation de la production de TNF-α (colocalisation avec la microglie) Augmentation de l'expression génique de *tnf-α* (x2), *il-6* (x2), *il-1β (x2,5)* et *ikbkb* (x2)	Hypothalamus entier
Gao et al., 2014 [73]	Souris	Inconnue	Inconnue	10 semaines	Augmentation du nombre de cellules positives à Iba1 (immunomarquage)	ARC
Gao et al., 2014 [73]	Souris	Inconnue	Inconnue	10 semaines	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x1,2)	Hypothalamus entier
Dorfman et al., 2017 [74]	Souris C57BL6/J	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel	12 semaines	Augmentation de l'expression génique d'*il-1β* (x2,5) et de *ikbkb* (x1,8)	Hypothalamus entier
Horvath et al., 2010 [75]	Rat Sprague-Dawley	Lipides : 34%kcal, glucides : 48%kcal, protéines : 17%kcal	Naturel (lipides : 13%kcal, glucides : 63%kcal, protéines : 24%kcal)	12 semaines	Induction de l'immunomarquage GFAP+	ARC
Zhang et al., 2008 [62]	Souris C57BL/6	Research Diets	Naturel (Teklad)	12 semaines	Surexpression de protéines de la voie NF-κB	ARC
De Souza *et al.*, 2005 [49]	Rat Wistar	Lipides 45%kcal (lard, huile de soja), glucides 35%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 10 kcal%, glucides : 70 kcal%, protéines : 20 kcal%)	13 semaines	Augmentation de l'expression protéique de TNF-α (x1,5), IL-1β (x5) et IL-6 (x8). Activation de la voie JNK avec surexpression protéique de JNK phosphorylée (x1,7)	Hypothalamus entier
Valdearcos et al., 2014 [51]	Souris C57BL/6	Lipides : 42%kcal, glucides : 42,7%kcal, protéines : 15,2%kcal	Naturel (lipides : 13,2%kcal, glucides : 62,1%kcal, protéines : 24,7%kcal)	16 semaines	Augmentation du nombre de cellules Iba1+ (x1,8)	ARC
Milanski et al., 2009 [61]	Rat Wistar	Lipides : 36,0%g (origine animale)	Naturel (lipides : 4%g)	16 semaines	Augmentation de l'expression protéique de TNF-α (x14), IL-1β (x13) et d'IL-6 (x11)	Hypothalamus entier
Milanski et al., 2009 [61]	Rat Wistar	Lipides : 36,0%g (origine animale)	Naturel (lipides : 4%g)	16 semaines	Augmentation de l'expression de l'antigène F4/80, signe de l'augmentation du nombre de macrophages (ici microglie ; immunofluorescence)	ARC
De Souza *et al.*, 2005 [49]	Rat Wistar	Lipides 45%kcal (lard, huile de soja), glucides 35%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (lipides : 10 kcal%, glucides : 70 kcal%, protéines : 20 kcal%)	16 semaines	Immunomarquage positif pour TNF-α	ARC et hypothalamus latéral
Meng et Cai, 2011 [64]	Souris C57BL/6	Inconnue (Research Diets)	Inconnue	16 à 20 semaines	Diminution de l'immunomarquage Atg7+, signe d'une diminution de l'autophagie	ARC
					Diminution de l'expression protéique d'Atg7 (x2,5), d'Atg5 (x1,7) et de LC3-II/1 (x1,4) ainsi que de l'expression génique d'*atg12* (x1,4), tous étant des marqueurs de l'autophagie	Hypothalamus entier

Balland et Cowley, 2017 [68]	Souris C57BL/6	Lipides : 43%kcal, glucides : 36%kcal, protéines : 21%kcal	Naturel (lipides : 4,6%kcal)	20 semaines	Augmentation du nombre de cellules GFAP+ (astrocytes) étoilées (x5), signe d'une astrogliose	ARC
Horvath et al., 2010 [75]	Souris C57BL/6	Lipides : 45%kcal, glucides : 35%kcal, protéines : 20%kcal	Naturel (lipides : 12,1%kcal, glucides : 59,8%kcal, protéines : 28%kcal)	20 semaines	Augmentation de l'expression génique de *gfap* (x1,4), signe d'une astrocytose Induction de l'immunomarquage GFAP+	ARC
Thaler et al., 2012 [50]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	8 mois	Augmentation de l'autophagie (x8) et diminution du nombre de neurones POMC (x1,3)	ARC
Thaler et al., 2012 [50]	Souris C57BL/6	Lipides : 60%kcal (lard, huile de soja), glucides 20%kcal, protéines 20%kcal	Naturel (3.34 kcal/g; PMI Nutrition International)	8 mois	Astrocytose visible par imagerie	ARC

Tableau 1.1. Résumé des études ayant montré un lien entre la consommation de WD et l'inflammation hypothalamique depuis De Souza et al. en 2005 [136]. Les études sont classées dans l'ordre croissant de temps de consommation de WD puis selon le %kcal de lipides dans le WD, avec indication de l'espèce animale utilisée, des compositions énergétiques des régimes WD et contrôles utilisés lorsque celles-ci étaient disponibles, de la durée de consommation du WD avec les marqueurs d'inflammation correspondants ainsi que la région hypothalamique concernée.

L'inhibition de cette inflammation hypothalamique permet de prévenir le développement de l'obésité. De façon intéressante, la déplétion neuronale de IKKβ (un des médiateurs moléculaires de l'inflammation hypothalamique, voir section II.B.3.b) rend résistantes à l'obésité des souris (C57BL/6) soumises à un régime WD pendant 1 mois [150]. De même, chez le rat Long-Evans, l'administration centrale d'un inhibiteur d'IKKβ induit une diminution de l'ingéré alimentaire après 5 à 7 semaines de WD (lipides 60%kcal) mais pas chez les rats maintenus sous régime standard [151]. L'inhibition de TLR4 et de TNF-α (deux médiateurs moléculaires de l'inflammation hypothalamique, voir sectionII.B.3.b) par injection intracérébroventriculaire d'anticorps chez le rat rendu obèse par la consommation d'un régime WD pendant 8 semaines permet de diminuer l'inflammation hypothalamique (diminution de l'expression de *tnf-α*, *il-1β* et *il-6* et diminution de l'activation de la voie NF-κB via la diminution de la quantité de IKBα phosphorylée), de restaurer la sensibilité à la leptine de l'hypothalamus, de rétablir la signalisation de l'insuline dans le foie ainsi que l'homéostasie du glucose [152]. L'inhibition de l'activation de la microglie (voir acteurs cellulaires, paragraphe II.B.3.a) prévient l'augmentation de l'ingéré alimentaire, de l'adiposité et du gain de poids chez la souris sous WD (lipides 60%kcal) [153]. L'utilisation de modèles murins KO pour une ou plusieurs voies d'induction de l'inflammation confirme également le lien entre inflammation hypothalamique et obésité. Chez la souris, des KO spécifiques de la voie IKKβ-NF-κB dans les neurones AgRP et POMC permettent de protéger contre le développement de l'obésité induite par la consommation de WD [150, 154, 155].

A l'opposé, l'induction de l'inflammation hypothalamique permet d'induire l'obésité. Par exemple, l'activation de la voie IKKβ/NF-κB *in vivo* entraine une hyperphagie associée à une prise de poids significative sous consommation d'un régime standard [156]. L'administration centrale de la cytokine IL-4 chez le rat stimule l'activation de la voie IKKβ/NF-κB dans l'hypothalamus, ce qui induit une hyperphagie et une prise de poids significative [157]. L'activation de JNK dans les neurones AgRP chez la souris induit un gain de poids et une augmentation de la résistance à la leptine (systémique et neuronale) [158]. Dans cette même étude, l'activation de la signalisation IKK2 dans les neurones AgRP chez la souris induit une insulinorésistance et affecte l'homéostasie du glucose dans ces neurones. L'induction du syndrome métabolique dépend donc de l'activation de plusieurs voies liées à l'inflammation au sein de l'hypothalamus.

Dans les études mentionnées précédemment, l'inflammation hypothalamique était étudiée en réponse à une ingestion chronique (plusieurs semaines ou mois) de régime WD. Il est important de noter que l'induction de l'inflammation hypothalamique est biphasique et débute rapidement après le changement de régime. Chez le rat, une première phase d'inflammation est observée 1 à 3 jours après introduction d'un régime

WD. Cette réponse inflammatoire semble même se mettre en place en quelques heures après l'ingestion de WD (lipides : 41%kcal) et serait donc activée à l'échelle du repas [159]. Elle se traduit par une surexpression d'*il-6*, *tnf-α*, *ikbkb* ainsi que des marqueurs d'activation de la glie tels que *emr1* (microglie) et *gfap* (astrocytes). Cette première phase est suivie par une résolution de l'inflammation avant un rebond 4 semaines plus tard (surexpression d'*il-6*, *tnf-α*, *ikbke* et *socs3*) [138]. Cette augmentation de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires est accompagnée d'une activation de la microglie dans l'ARC (visualisable par une augmentation du nombre de cellules microgliales) dès la première semaine de consommation de WD [138]. Un motif d'expression génique similaire a été observé chez la souris dans les mêmes conditions [138]. D'autres études ont montré que l'inflammation hypothalamique se produit avant l'apparition de l'obésité [141, 160–163] et précèderait l'inflammation dans les tissus périphériques (tissu adipeux et foie) [138]. De ce fait, l'hypothalamus semble être le premier organe touché par une inflammation induite par la consommation de WD.

De plus, la première phase d'inflammation hypothalamique qui fait suite à l'introduction d'un WD semble prédictive du phénotype d'obésité qui se met en place à long terme en réponse à une consommation chronique de WD. Cet aspect prédictif a notamment été observé dans une étude utilisant deux souches de souris, l'une résistante à l'obésité (WSB/EiJ) et l'autre prône à l'obésité (C57BL/6J) [164]. La microglie hypothalamique de l'ARC et du PVN des souris prônes à l'obésité (C57BL/6J) était plus activée (marquage Iba1+) sous régime contrôle et après 3 jours de WD (lipides : 45%kcal) contrairement à la souche résistante à l'obésité. La fractalkine, une chemokine produite lors de l'activation de la microglie, est également exprimée plus rapidement (dès 1 jour) et plus fortement dans les neurones de l'hypothalamus de souris prônes à l'obésité que de souris résistantes à l'obésité suite à l'introduction d'un WD (lipides : 60%kcal) [165]. Inhiber la fractalkine avant passage au WD réduit l'obésité après consommation à long terme de WD ainsi que le développement de l'intolérance au glucose chez ces souris [165]. Cependant, dans une autre étude, il a été montré que l'inhibition de la voie de signalisation NF-κB dans les astrocytes prévient leur activation en réponse à 24h de régime WD et entraîne une augmentation de 15 % de l'apport calorique dans les 24 premières heures suivant l'introduction du régime, suggérant que l'activation initiale des astrocytes en réponse au WD joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'augmentation de la prise alimentaire et par extension de la mise en place de l'obésité [162]. Bien que l'effet à long terme de cette inhibition astrocytaire de la voie NF-κB n'ait pas été étudié, ces travaux soulignent la complexité et l'importance de la cinétique de la réponse inflammatoire hypothalamique lors de l'introduction d'un régime WD dans la mise en place de l'obésité. L'exposition récurrente au WD, comme rencontré dans nos modes de vie actuels, pourrait favoriser cette inflammation hypothalamique à court terme et la mise en place de l'obésité à long terme : il est donc important de s'intéresser à l'impact et aux mécanismes sous-tendant l'impact de ces expositions répétées pour lutter contre l'épidémie d'obésité.

2. Le lien entre inflammation hypothalamique causée par la consommation de WD et la régulation de la prise alimentaire

L'inflammation centrale perturbe la régulation du comportement alimentaire de façon différente selon le niveau d'inflammation. Ainsi, l'administration chez le rongeur de fortes doses d'IL-6 (chez le rat), ou encore de TNF-α et IL-1β (chez la souris) induit une diminution de la prise alimentaire [166, 167] tandis que bloquer l'action de ces cytokines dans ce contexte d'inflammation aigüe permet de diminuer l'anorexie [168].

Contrairement à l'anorexie, qui est liée à une inflammation de haut grade, l'obésité est liée à une inflammation de bas grade et une hyperphagie. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette hyperphagie. La consommation de WD engendre une augmentation de la résistance à la leptine liée à l'activation du suppresseur de la signalisation des cytokines 3 (SOCS3) et de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) par les cytokines, ce qui induit une diminution de la satiété [169, 170]. Ainsi, des souris qui ont une délétion spécifique de *socs3* dans les neurones hypothalamiques exprimant POMC montrent un gain de poids plus faible sous WD (lipides : 58%kcal) dès l'introduction du régime par rapport aux souris contrôles recevant le même régime [171]. La consommation de WD à long terme (8 semaines) chez le rat engendre également une apoptose des neurones POMC de l'ARC liée à l'augmentation de cytokines telles que TNF-α et IL-1β [172], ce qui participe à augmenter la prise alimentaire en diminuant le signal satiétogène [173]. A plus court terme, les mécanismes sont probablement différents. Après 5 jours de consommation de régime gras et sucré, la chemokine stromal cell-derived factor 12 (CXCL12) est produite et serait capable d'augmenter l'ingéré alimentaire en induisant une augmentation de l'expression de gènes orexigènes (enképhaline) des neurones du second ordre au sein du PVN par l'intermédiaire de son récepteur CXCR4 [174]. Après quelques semaines de consommation de WD, d'autres chimiokines sont produites dont CCL5 qui induit une augmentation de l'expression du peptide orexigène MCH suivie d'une augmentation de l'ingéré alimentaire, à l'inverse de ce qui est observé dans le cadre d'une inflammation de haut grade [175, 176]. La production de certaines chemokines peut donc réguler positivement la prise alimentaire dans le cadre d'une inflammation de bas grade et ce dès la première semaine de consommation de WD. L'induction de l'inflammation à la suite de la consommation de WD semble induire une diminution des signaux satiétogènes par différentes voies mais son action à très court terme est plus difficile à mesurer compte tenu de l'augmentation de la prise alimentaire liée à l'hédonisme qui semble prendre le dessus sur cet aspect inflammatoire.

3. Les acteurs de l'inflammation hypothalamique sous WD

a. Acteurs cellulaires

Trois grands types cellulaires au sein du système nerveux central sont impliqués dans son inflammation : la **microglie, les macrophages périvasculaires** et les **astrocytes**. La microglie est constituée des macrophages du cerveau, capables de phagocyter des microorganismes, débris cellulaires ou métabolites toxiques [177]. Son activation, caractérisée par l'augmentation de l'expression d'Iba1 [142] et une modification de leur morphologie vers des formes moins ramifiées, est induite à très court terme (1 à 3 jours) suite à la consommation d'un WD (lipides : 60%kcal) [138]. La microglie peut être également activée après une ingestion orale (sous forme de solution enrichie) de certains acides gras tels que le palmitate en comparaison à l'oléate [139, 178]. Cette activation de la microglie par les acides gras saturés est notamment visible au niveau de l'ARC, probablement en raison de sa position anatomique proche de l'éminence médiane, dont les capillaires deviennent plus perméables après consommation de WD (lipides : 58%kcal) pendant 10 semaines [179] [138, 142, 180]. L'activation à court terme de la microglie lors de la consommation de WD a lieu en particulier par l'intermédiaire d'une augmentation de l'expression la fractalkine (CX3CL1) dont l'inhibition de la signalisation permet de limiter le développement de l'obésité.

Les macrophages périvasculaires sont situés à proximité des vaisseaux sanguins par lesquels les pathogènes ou d'autres molécules toxiques pour le système nerveux central sont susceptibles d'entrer. Ils constituent donc une première barrière de protection [181]. Ces macrophages sont activés et s'accumulent après 2 semaines de consommation de WD (lipides : 58%kcal) chez la souris, c'est-à-dire après la première phase d'activation microgliale au niveau de l'hypothalamus [180]. Cette activation concerne des macrophages déjà présents dans le système nerveux central et n'implique pas de migration de macrophages recrutés en périphérie [179]. Ces macrophages périvasculaires activés expriment de hauts niveaux d'oxyde nitrique synthase inductible, potentiellement associé à une augmentation des niveaux d'oxyde nitrique qui participe au stress oxydant [180]. L'inhibition de cette enzyme au sein des macrophages de l'ARC permet de diminuer plusieurs aspects de l'inflammation hypothalamique induite par la consommation de WD tels que la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de la microglie et des astrocytes ou encore l'hyperperméabilité vasculaire [180]. La production d'oxyde nitrique, et donc le stress oxydant, pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'inflammation hypothalamique lors de la consommation de WD.

Les astrocytes sont d'autres acteurs cellulaires qui participent à l'inflammation hypothalamique. L'activation des astrocytes (astrogliose) est mesurable en quantifiant les cellules GFAP+ (glial fibrillary acidic protein) et les modifications morphologiques incluant une rétractation dendritique et une diminution des contacts avec les neurones adjacents. La consommation de WD ainsi que l'activation de la voie de signalisation NF-κB entraine une activation astrocytaire et celle-ci est plus forte au niveau des neurones POMC après 3 mois de consommation de WD (lipides : 34%kcal) chez le rat prône à l'obésité que chez le rat résistant à l'obésité [53]. Les astrocytes activés expriment et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que CCL2, qui participent à l'induction de l'inflammation hypothalamique en se fixant sur les récepteurs CCR2 présents en surface des neurones [182].

Les cellules de la microglie et les astrocytes seraient capables de communiquer entre eux par l'intermédiaire de la production de chimiokines et de leurs récepteurs mutuels. La production de chimiokines par les astrocytes en réponse aux acides gras pourrait activer les récepteurs présents à la surface des macrophages, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter le niveau d'inflammation locale [183]. L'inflammation provenant de la microglie se propage aux autres acteurs notamment par des hémicanaux (connexines), qui permettent le passage de fortes quantités de glutamate, produites en réponse à l'activation de la microglie, qui vont induire des dommages neuronaux [184]. Le blocage de ce passage chez la souris permet de prévenir le développement de l'obésité, démontrant l'importance de cette propagation dans ce processus [185]. La microglie est capable d'activer les astrocytes en produisant certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1α, TNF-α) et la protéine du complément C1q et participe ainsi à la mise en place de l'inflammation hypothalamique [186]. Des astrocytes en culture activés avec du palmitate sont capables d'induire la production de la cytokine CCL2 et l'expression d'Iba1 par la microglie lorsqu'ils sont mis en contact avec elle pendant 4h, permettant sa migration et participant ainsi à son activation [182].La coculture d'astrocytes primaires murins activés par des facteurs adipocytaires issus d'individus obèses, avec des cellules microgliales murines activées par du LPS, induit une augmentation significative du relargage de cytokines proinflammatoires (MCP-1 et IL-6) par rapport à des astrocytes et de la microglie non activés [187]. Cette synergie serait due à l'interaction entre le récepteur 4-1BB (ou CD137), présent à la surface des astrocytes, qui est capable d'interagir avec son ligand 4-1BBL (ou CD137L) situé à la surface des cellules microgliales et induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires [187]. Cette interaction est retrouvée *in vivo*, avec une diminution de l'inflammation hypothalamique en réponse à une consommation de WD (lipides : 60%kcal) pendant 8 semaines chez des souris C57BL/6 4-1BB$^{-/-}$ [187]. Cibler à la fois les astrocytes et la microglie, ainsi que comprendre la mise en place de leur activation lors de la consommation de WD, peut constituer une cible de prévention de l'obésité.

b. Acteurs moléculaires

Les **cytokines et chimiokines** sont des acteurs majeurs de l'inflammation hypothalamique dans le contexte de l'exposition aux régimes de type WD. Parmi les cytokines impliquées, la fractalkine est sécrétée 1 à 3 jours après introduction du régime WD, avec pour effet le recrutement (ou l'activation) de la microglie [165]. Chez le rongeur, la consommation de WD induit une augmentation de l'activité de SOCS3 et de PTP1B dans l'hypothalamus [188]. Dans l'hypothalamus PTP1B et SOCS3 sont impliquées dans la cascade de signalisation de la leptine : l'absence de PTP1B chez la souris induit une résistance à l'obésité induite par la consommation de WD [189] et une déficience de PTP1B permet d'atténuer l'inflammation hypothalamique [190]. Une injection intracérébroventriculaire de TNF-α chez le rat induit une augmentation de l'expression d'*il-1β* et d'*il-6* (de 15 min à 3h post-injection) et de *socs3* (2h et 3h post-injection) dans l'hypothalamus [191].

La consommation de WD à long terme induit chez la souris l'expression de **l'oxyde nitrique synthase** inductible (iNOS) dans les macrophages périvasculaires, qui est d'une part à l'origine de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1β, IL-6 et TNF-α et d'autre part responsable d'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, rendant l'hypothalamus plus susceptible au passage de molécules périphériques tels que les acides gras [180]. Le stress oxydant, induit par la production d'espèces réactives de l'oxygène par les mitochondries, est activé en réponse à une consommation de WD, avec notamment une augmentation de l'activité de la superoxide dismutase à cuivre/zinc, une enzyme pro-oxydante, dès la première semaine de consommation du régime chez le rat [192]. Cette augmentation se poursuit pendant 6 semaines, puis diminue fortement entre 12 et 18 semaines parallèlement à la diminution du ratio glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG), ce qui suggère un rétablissement de l'équilibre redox après 18 semaines de consommation de WD dans l'hypothalamus des rats [192]. Cette augmentation du stress oxydant induite par la consommation de WD semble avoir lieu plus rapidement chez la souris. En effet, dès 3 jours de consommation de WD (lipides : 60%kcal) la production de protéines pro-oxydantes (liées au métabolisme de la mitochondrie) augmente mais pas la production de protéines liées à l'inflammation, suggérant que le stress oxydant précède la mise en place de l'inflammation hypothalamique en réponse à l'introduction d'un WD [193].

Dans l'hypothalamus, le développement de l'insulino-résistance, suite à l'inflammation induite par l'obésité, passe en partie par l'activation de la voie inflammatoire du Toll Like Receptor 4 (**TLR4**), induite par la consommation de lipides [194–196]. L'activation de TLR4 entraine une cascade signalétique impliquant le facteur de différentiation myéloïde

88 (**Myd88**) ou encore **IKKβ**, et aboutissant à la translocation nucléaire de **NF-κB** et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [197]. Compte tenu de la forte expression constitutive de IKKβ dans l'hypothalamus, cette voie de signalisation joue un rôle prépondérant dans l'activation de l'inflammation hypothalamique induite par la consommation de WD ainsi que dans la mise en place de la résistance à la leptine et la dérégulation de l'homéostasie du glucose [150]. La suppression d'IKKβ dans les neurones AgRP empêche le développement de l'obésité avec une protection contre l'intolérance au glucose. La délétion hypothalamique de Myd88 chez la souris sous WD les protège du développement de la résistance à la leptine [194]. Dans l'hypothalamus, la production de TNF-α, observable suite à l'activation de la voie TLR4/NF-κB [198], induit une augmentation de l'expression de SOCS3 [199], qui participe ensuite à la mise en place de la résistance à l'insuline et à la leptine lors de la consommation à long terme de WD en se fixant sur leurs récepteurs [200]. SOCS3 est également induite par l'activation de la voie NF-κB [150] notamment via la production d'IL-1 [201].

Un autre mécanisme lié à l'inflammation hypothalamique, le **stress du réticulum endoplasmique** (RE), est lié directement à la mise en place de l'obésité [154]. En effet, la suppression dans les neurones POMC de la X-box binding protein 1 (Xbp1), un facteur de transcription qui a un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant et qui est exprimé suite au stress du RE [202], induit une augmentation de la résistance à la leptine et de l'adiposité [203]. L'expression constitutive de Xbp1 dans les neurones POMC de l'ARC réprime l'expression de SOCS3 et de PTP1B, ce qui prévient le développement de l'obésité en réponse au WD [204]. L'activation de la voie NF-κB par le WD induit également un stress du RE [150]. L'inhibition de la signalisation du récepteur à la leptine par le stress du RE se fait par l'intermédiaire de la réponse UPR (unfolded protein response) dans l'hypothalamus de souris obèses après consommation de WD pendant au moins 25 semaines (lipides : 60%kcal) [203]. Il apparait ainsi que la mise en place de l'insulino-résistance et de la résistance à la leptine hypothalamique liée à l'inflammation passe par une interaction entre plusieurs acteurs impliqués dans la mise en place de l'inflammation. L'**autophagie** est un phénomène physiologique qui permet une régulation métabolique dans divers tissus, dont le cerveau. Sa modulation (augmentation ou diminution) peut avoir des conséquences négatives sur cette régulation. Par exemple, l'induction de l'autophagie *in vitro* dans une lignée de cellules hypothalamiques induit l'expression de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), responsable d'une augmentation de l'expression de *npy* et d'une diminution de l'expression de *pomc* [205]. L'autophagie est également impliquée dans l'induction de l'inflammation hypothalamique. En effet, chez la souris, la diminution de l'autophagie hypothalamique par un ARN interférent dirigé contre Atg7, une protéine induisant l'autophagie, induit une augmentation de l'inflammation médiée par l'activation de la voie IKKβ/NF-κB [155]. Cette étude montre aussi que la diminution de l'autophagie hypothalamique chez la souris permet de diminuer la prise alimentaire et

d'augmenter les dépenses énergétiques, ce qui souligne son importance à la fois dans la mise en place de l'inflammation hypothalamique et dans la régulation de la prise alimentaire [155].

4. Les causes de l'inflammation hypothalamique sous WD

Les acides gras alimentaires provoquent une inflammation hypothalamique par l'activation de la voie TLR4, suivie par une augmentation du stress du RE qui génère la production de cytokines pro-inflammatoires [195]. L'entrée des acides gras dans l'hypothalamus est facilitée par l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [206]. Ce stress du RE a également été constaté *in vitro* en réponse au palmitate sur des lignées cellulaires neuronales hypothalamiques exprimant AgRP et NPY [163]. Chez la souris, une infusion intraveineuse de lipides (émulsion de triglycérides) induit également une inflammation hypothalamique, caractérisée par la production de TNF-α et une astrocytose [163]. *In vivo*, le palmitate alimentaire, mais pas l'acide oléique est capable d'induire une activation de la microglie mettant en avant l'importance de la nature des lipides dans l'induction de l'inflammation hypothalamique [207].

En plus des lipides, les sucres simples sont également des activateurs de l'inflammation hypothalamique. Chez le rat, le fructose (en solution à 10% donnée pendant 8 semaines) induit une activation des astrocytes de l'ARC (mesurable par une augmentation du marquage GFAP+ et de l'expression du gène *gfap*), un plus grand nombre de cellules IκBα+ dans la même région, une surexpression hypothalamique des gènes codant pour IL-1β, TNF-α, IL-6, IKKβ, IκBα et NF-κB ainsi qu'une augmentation des niveaux protéiques d'IL-1β, Myd88 et TLR4 [208]. Dans la même étude, la mise en contact d'une solution de fructose à 5mM pendant 24h avec des astrocytes en culture issus de rats nouveau-nés induit une surexpression des gènes codant pour TLR4 et Myd88, une augmentation de la quantité de protéines IκBα et NF-κB phosphorylée [208]. Le glucose est également capable d'induire l'inflammation hypothalamique. L'infusion intracérébroventriculaire de glucose chez la souris induit une augmentation de l'activation de la voie NF-κB dans l'hypothalamus, mais pas dans les tissus périphériques [150]. Chez la souris, la microglie de l'ARC est activée (augmentation du nombre de cellules Iba1+) après consommation de régimes enrichis en sucrose ou en amidon [209].
Des stimuli autres qu'alimentaires sont capables d'induire chez la souris une inflammation hypothalamique semblable à celle retrouvée chez les individus obèses, tels que les particules fines issues de la pollution atmosphérique [210]. Chez l'Homme, le microbiote est également suspecté d'avoir un rôle dans cette induction avec une augmentation de l'inflammation hypothalamique positivement corrélée à une réduction

de l'abondance de *Parasuterella sp.* dans l'intestin chez des individus obèses [211]. De façon intéressante, une élévation systémique du niveau d'endotoxines d'origine bactérienne, telles que le LPS, est mesurée après 1, 3 et 6h post-introduction de WD (lipides : 41%kcal) chez la souris, ce qui pourrait éventuellement favoriser l'initialisation de l'inflammation centrale [159]. Un traitement chronique par le LPS ou encore une dysbiose intestinale causée par la consommation de WD induisent une augmentation de la prise alimentaire liée à l'activation de la microglie du ganglion noueux (nerf vague) [149, 212, 213].

Ainsi, la consommation de WD induit, et ce même à très court terme, une inflammation hypothalamique. Cette inflammation hypothalamique précède l'inflammation systémique caractéristique de l'obésité et est liée à la mise en place de cette dernière. Différents signaux interagissant entre eux sont responsables de son induction et montrent la complexité des mécanisme impliqués dans son apparition. L'inflammation hypothalamique issue de la consommation de WD peut aussi dépendre de signaux provenant de l'intestin puisque la consommation de WD (lipides : 60%kcal) pendant 24h induit une inflammation hypothalamique et des ganglions noueux, carrefours d'intégration des signaux provenant du nerf vague [160]. Le rôle du microbiote dans l'induction de cette inflammation hypothalamique dans le cadre de la consommation de WD est possible et doit être davantage étudié pour mieux comprendre les liens entre intestin et cerveau et permettre de trouver de nouveaux moyens de prévention et de traitement de l'obésité. De plus, en dehors de l'inflammation hypothalamique, l'inflammation concernant d'autres structures impliquées dans la régulation de la prise alimentaire sont d'un grand intérêt. En effet, le striatum, et plus particulièrement le noyau accumbens, pourrait, par l'intermédiaire d'une neuroinflammation, promouvoir la prise de poids chez l'Homme [214]. Le tronc cérébral peut également présenter une inflammation notamment caractérisée par l'activation des astrocytes, et qui aurait pour effet de diminuer la prise alimentaire chez la souris [55]. Etudier la mise en place de l'inflammation dans ces autres structures, moins étudiée que l'hypothalamus jusqu'à présenti, présente ainsi un grand intérêt afin de mieux comprendre la régulation de la prise alimentaire, en particulier lors de la consommation d'un WD.
De façon intéressante, hors du cadre de l'inflammation de bas grade, les acides biliaires secondaires, des métabolites issus de l'activité métabolique du microbiote, peuvent participer à l'amélioration de maladies neuroinflammatoires *via* une diminution de l'inflammation systémique, avec une suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle d'encéphalomyélite (EAE) associée à une altération de la régulation des cellules T [215]. De façon similaire, l'activation du Farnesoid X Receptor (FXR), un récepteur des acides biliaires secondaires [216], améliore l'EAE en induisant la génération de macrophages anti-inflammatoires, chez la souris et chez l'Homme [217]. Ainsi, l'activité métabolique du microbiote intestinal, via notamment la production d'acides biliaires secondaires, peut moduler l'inflammation systémique et impacter la neuroinflammation. On pourrait donc supposer un éventuel lien entre la composition

luminale en acides biliaires secondaires et l'inflammation hypothalamique qui caractérise la consommation de WD. Un microbiote dysbiotique de type pro-inflammatoire, induit par une consommation de WD puis transféré à des rats dont le microbiote a été déplété, engendre dans le NTS une rétraction des fibres neuronales C ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules Iba1+, suggérant une activation de la microglie [149]. Cette étude suggère qu'un microbiote dysbiotique consécutif de la consommation de WD est capable d'induire une inflammation centrale. L'interleukine 17, produite par l'épithélium intestinal en réponse à une modification de la composition du microbiote liée à l'alimentation, est également capable de diminuer la prise alimentaire centralement en se fixant à ses récepteurs situés sur les neurones POMC et AgRP de l'ARC et en augmentant l'expression de *pomc* [218]. La dysbiose du microbiote induite par l'introduction d'un régime riche en fructose induit une neuroinflammation hippocampale chez la souris [219]. Bien que plusieurs facteurs issus du microbiote soient capables d'induire une neuroinflammation, on peut supposer que tous n'ont pas été découverts compte tenu du nombre important de métabolites bactériens qui n'ont pas encore été caractérisés et des nouveaux rôles de métabolites connus qui restent à découvrir, tels que les acides biliaires.

III. Le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de la prise alimentaire

A. Le microbiote intestinal

1. Composition du microbiote intestinal chez l'individu sain

Le microbiote intestinal est constitué de l'ensemble des microorganismes présents dans l'intestin : les bactéries, les virus (phages), les archées et certains eucaryotes unicellulaires (protistes) et champignons [220] (Figure 1.7). La composition et le nombre de microorganismes varient tout au long du tube digestif : leur quantité et leur diversité augmentent graduellement depuis le tractus gastro-intestinal proximal (estomac, avec une estimation à 10^1 à 10^3 cellules/gramme de contenu luminal humain) jusqu'au tractus gastro intestinal distal (colon, avec une estimation à 10^{12} cellules/gramme de contenu luminal humain) à mesure que le pH augmente d'un pH acide vers un pH neutre et que la vitesse du transit diminue ainsi que la disponibilité en oxygène et en nutriments [220]. Bien que le nombre de microorganismes par gramme de contenu luminal soit régulièrement révisé et montre des variabilités entre les études, il est communément admis que la quantité et la diversité des microorganismes de l'intestin proximal sont significativement inférieures à celles de l'intestin distal [221]. Une étude menée sur le

microbiote intestinal d'une cohorte de 124 individus européens a démontré, par métagénomique, que la proportion de gènes bactériens atteint 99% du microbiote intestinal, tandis que les champignons et les archées représentent une minorité du microbiome [222]. Bien que les bactéries constituent la majorité du microbiome, les virus, archées et eucaryotes unicellulaires sont suspectés de jouer un rôle dans la physiologie de l'hôte ainsi que dans la mise en place de certaines pathologies intestinales, notamment en agissant sur l'activité bactérienne.

Les virus, qui composent le virome intestinal, représentent près de 6% des microorganismes de l'intestin et chez l'Homme ils sont essentiellement constitués de phages (virus de bactéries) [223]. Les phages sont capables de modifier le génome des bactéries par transfert de gènes. Ils peuvent ainsi modifier diverses fonctions métaboliques des bactéries, être impliqués dans leur adaptation à leur environnement ou encore dans la résistance des bactéries aux antibiotiques, bien que la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques par les phages soit un événement rare. La caractérisation des phages intestinaux est beaucoup moins avancée que celle des bactéries, et ce en raison de difficultés techniques notamment dues à l'absence au sein des génomes viraux de gènes pouvant servir de marqueurs universels tels que le gène 16SrRNA utilisé dans l'affiliation taxonomique des bactéries. Cependant, dans les études où elle a été réalisée notamment grâce aux outils récents de métagénomique virale, la composition de ces phages varie de façon significative avec l'âge pendant la petite enfance chez l'Homme [224] ou encore en réponse à un changement de régime [223]. Il a été démontré qu'une transplantation fécale de phages issus de souris normo-pondérales vers des souris obèses était capable de modifier la composition des bactéries présentes dans l'intestin, de diminuer significativement le poids des souris et de rétablir leur tolérance au glucose [225].

Le microbiote est également composé d'archées, l'espèce la plus abondante chez l'Homme étant *Methanobrevibacter smithii*, une archée productrice de méthane à partir de produits de fermentation bactérienne qui représente jusqu'à 10% de la quantité des anaérobes dans le colon chez l'Homme [226]. En totalité, le génome des archées représente moins de 1% du microbiome chez l'Homme [227]. Certaines archées sont capables d'interagir avec les bactéries pour promouvoir leur activité métabolique, telle que *Methanobrevibacter smithii*, capable de favoriser la fermentation des glycanes par *Bacteroides thetaiotaomicron*, une bactérie impliquée dans la digestion des polysaccharides [228].

Les champignons, et particulièrement les levures, font également partie du microbiote intestinal et représentent ~0.1% des microorganismes du tube digestif humain. Leur identification reste cependant difficile compte tenu des bases de données beaucoup moins alimentées par les séquences spécifiques des champignons (Espaceur interne transcrit ou internal transcribed spacer (ITS)) par rapport aux séquences bactériennes. De plus, les approches d'étude du mycobiome intestinal sont encore très récentes et en constante évolution [229]. Cette proportion est donc probablement sous-estimée en termes de

nombre et d'importance des champignons dans la physiologie intestinale de l'hôte. Une étude récente montre une association entre la consommation d'un WD (lipides : 60% kcal) et la composition du mycobiome chez la souris ainsi qu'entre la composition fongique et l'activité prédite de certains taxa bactériens [230]. L'obésité affecte aussi la composition du mycobiome humain [231]. Comme les bactéries, les champignons sont retrouvés essentiellement au niveau de l'intestin distal [232].

Comme indiqué précédemment le microbiote intestinal est donc essentiellement composé de bactéries. Cependant, sa composition varie largement entre les individus chez l'Homme et entre les animaux d'une même espèce [233, 234]. Chez un même individu, sa composition varie également en fonction de l'âge, avec une mise en place au cours des premières années de la vie. Bien que la composition du microbiote intestinal soit plus stable à l'âge adulte, elle reste sensible à de nombreux éléments extérieurs pouvant modifier de façon temporaire ou non sa composition. Parmi ces éléments extérieurs, les traitements antibiotiques et les changements de régime sont reconnus comme étant les principaux perturbateurs de la composition du microbiote intestinal. Une approche utilisée chez l'Homme pour décrire le microbiote intestinal dans son ensemble est la notion d'entérotypes, un terme popularisé depuis leur caractérisation dans une étude publiée en 2011 [235]. Chez l'Homme sain, 3 types d'entérotypes ont été dénombrés et nommés selon le genre principal qui les compose : *Prevotella*, *Bacteroides* et parfois *Ruminococcus* [235, 236]. Il apparaît cependant que leur composition au sein d'un même individu ne soit pas figée, avec des variations compositionnelles temporaires à court terme en réponse à l'environnement, malgré une stabilité de leur composition sur le long-terme [237]. La notion d'entérotypes, qui suppose une composition précise et stable au cours du temps, est ainsi discutée compte tenu du caractère instable et évolutif de la composition du microbiote au cours du temps notamment en raison de l'influence d'éléments extérieurs comme indiqué précédemment [238]. De manière générale, les entérotypes tels que définis par Arumugam en 2011 ne sont pas associés à un statut métabolique particulier [239]. Malgré des différences compositionnelles, les microbiotes intestinaux entre individus semblent partager un set de fonctions métaboliques communes [240]. Il peut donc être plus intéressant de raisonner en mesurant l'activité métabolique des bactéries en plus de leur identification taxonomique.

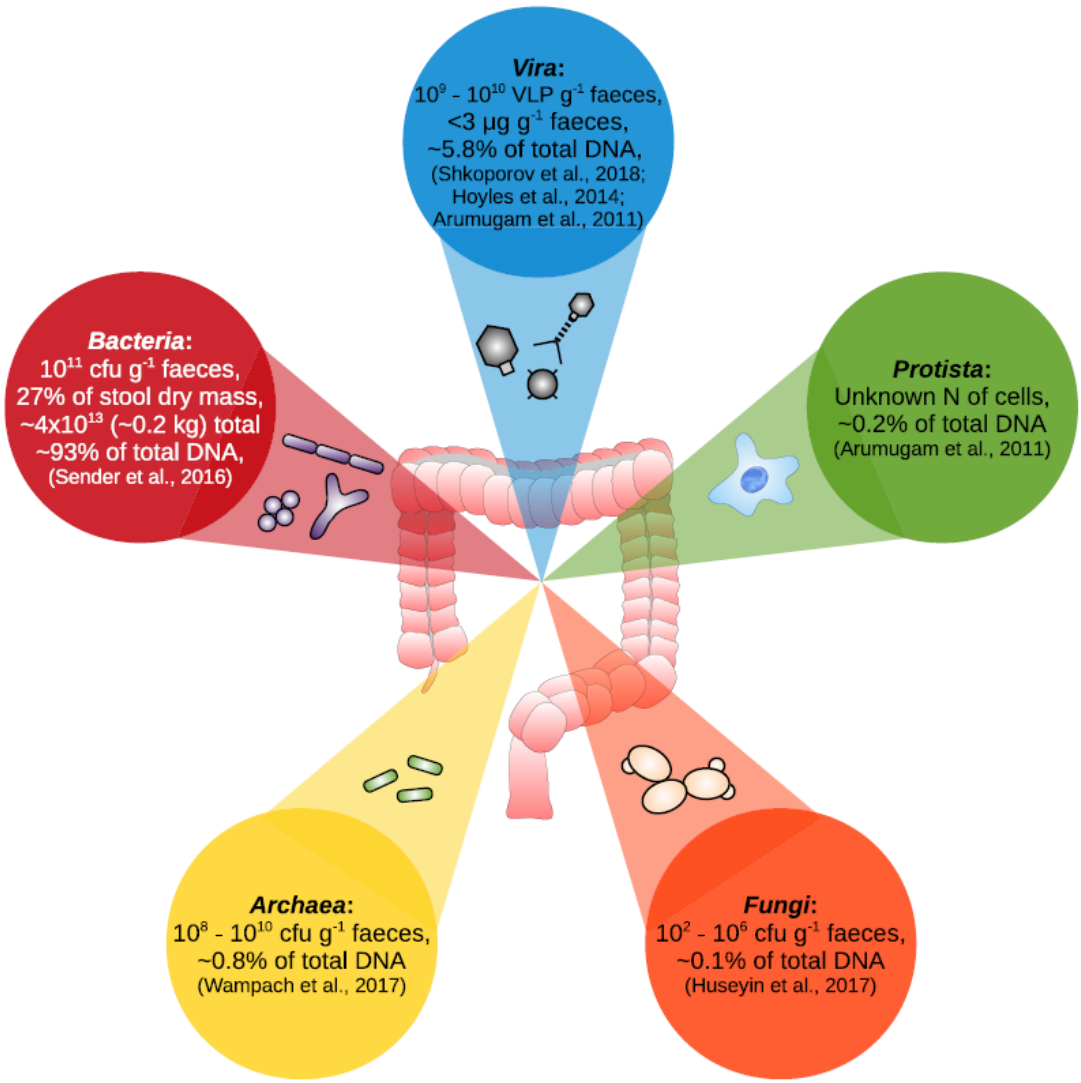


Figure 1.7. La composition du microbiote intestinal humain. La revue de Shkoporov et al., 2019 [227] compile les résultats d'études ayant quantifié les proportions de virus, protistes, champignons, archées et bactéries au sein du microbiote intestinal humain.

2. Relation entre microbiote intestinal et hôte : le concept d'holobionte

Chaque individu peut être considéré comme un superorganisme au sein duquel les cellules de l'hôte cohabitent avec un nombre au moins équivalent de microorganismes [221], principalement des bactéries, qui fonctionnent en symbiose avec lui, formant un holobionte [221, 241]. Le concept d'holobionte implique une relation physiologique étroite et collaborative entre l'activité métabolique du microbiote et celle de l'hôte qui permet de maintenir l'homéostasie. Le microbiote intestinal peut être considéré comme un « organe » métabolique à part entière, capable d'exercer des fonctions dont les cellules de l'hôte ne sont pas pourvues, comme la digestion de polysaccharides issus des plantes [242]. Le microbiote intestinal joue un rôle dans l'homéostasie immunitaire en limitant la colonisation par des pathogènes et en favorisant l'intégrité de la barrière intestinale [243]. Inversement, l'hôte fournit les conditions de croissance pour ces microorganismes (anaérobie, pH adapté, apport de nutriments) et peut modifier cette composition par l'intermédiaire de son système immunitaire [244, 245]. Les bactéries symbiontes de l'intestin forment une communauté stable qui permet d'éviter la croissance de bactéries symbiotiques mais potentiellement pathogènes lorsqu'elles sont suffisamment nombreuses (les pathobiontes) ainsi que l'installation et la croissance de bactéries pathogènes provenant de l'extérieur. Lorsque l'équilibre hôte-microbiote est rompu, un état intermédiaire de transition critique avant la mise en place d'un état pathologique est constaté, rendant l'hôte plus susceptible de développer une pathologie (Figure 1.8).

A titre d'exemple, chez la souris, plusieurs ruptures de cette homéostasie en réponse à la consommation répétée de WD entrecoupée de retours à la consommation d'un régime standard conduisent à une altération permanente du microbiote intestinal que l'on peut qualifier de cicatriciel (*i.e.*, qui reste marqué de l'empreinte du passage au WD) [246]. De plus, le gain de poids après chaque réintroduction de WD était significativement plus rapide, avec un aspect causal du microbiote intestinal cicatriciel. Comprendre les modifications des interactions microbiote-hôte pendant ces transitions alimentaires permettrait de mieux comprendre la mise en place de l'obésité et proposer des solutions pour retourner à l'état symbiotique.

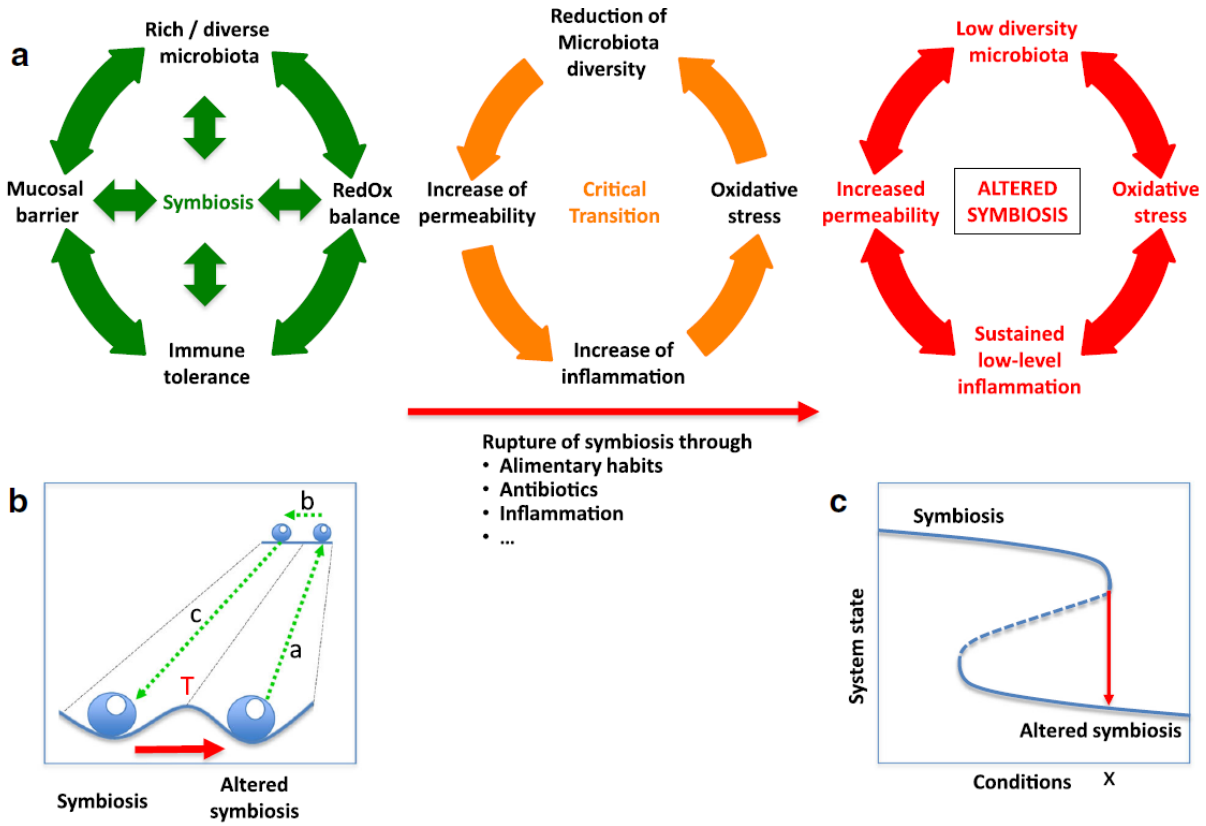


Figure 1.8. Illustration du concept d'holobionte et de rupture symbiotique menant d'un état physiologique sain à un état pathologique en conséquence de la rupture de symbiose entre le microbiote et l'hôte. La transition critique (orange) menant de l'état de symbiose (vert) entre le microbiote intestinal et l'hôte (fonction de barrière intacte, maintien de la balance redox et absence d'un état inflammatoire) vers une symbiose altérée (rouge) (augmentation de la perméabilité intestinale, stress oxydant et mise en place d'une inflammation de bas grade) est représentée. D'après [241].

3. Microbiote et obésité

Le lien de cause à effet entre microbiote et obésité a été démontré en 2006 par le groupe de Jeffrey Gordon lors d'un transfert de microbiote caecal de souris obèses vers des souris minces qui a permis de récapituler le phénotype d'obésité [247]. Il a plus récemment été clairement montré que le microbiote d'individus obèses est différent de celui d'individus normo-pondéraux et que cette dysbiose est également retrouvée dans de nombreux modèles animaux d'obésité génétique ou d'obésité induite par des régimes hypercaloriques [248]. Le groupe de Gordon a également montré que les souris axéniques dépourvues de microbiote étaient résistantes à l'obésité induite par le régime WD [214], ce modèle animal ayant ainsi permis d'élucider certains des mécanismes d'induction de l'obésité liés au microbiote intestinal [228, 247, 249–252]. Ces travaux ont ouvert la voie aux recherches sur le rôle du microbiote dans la physiopathologie de l'obésité.

La consommation chronique de WD modifie la composition du microbiote intestinal. De nombreux travaux ont étudié les adaptations à long terme de sa composition dans ce cadre, chez l'Homme et dans des modèles murin [233, 247, 252–254]. Parmi les marqueurs microbiens issus des très nombreuses études haut débit réalisées au cours des 15 derniers années, la richesse bactérienne apparait fortement corrélée au statut d'obésité [233, 255–260]. En effet, une diminution de la diversité bactérienne du microbiote intestinal est constatée dans l'obésité et une augmentation de cette dernière est corrélée positivement à l'amélioration du métabolisme du glucose et une diminution de l'inflammation de bas grade [255]. De façon surprenante, il semble difficile d'avoir un ou des marqueurs bactériens clairs et indiscutables représentatifs du statut métabolique des individus (comme le diabète, la stéatose hépatique ou l'IMC entre autres). En effet, l'enrichissement en Firmicutes et l'appauvrissement en Bacteroidetes initialement décrits chez l'Homme obèse et dans le modèle murin [233, 247, 252–254, 254] est remis en question, notamment après analyse du microbiote d'individus obèses dans de larges cohortes humaines [250, 257, 261–265]. A l'échelle du genre, des biomarqueurs potentiels de l'obésité peuvent être définis en différenciant par exemple des patients atteints d'obésité avec pathologies métaboliques associées ou sans pathologies associées [266]. L'identification de biomarqueurs de l'obésité reste également difficile à cause des différences méthodologiques telles que les variations d'affiliation taxonomique selon la base de données utilisée, la méthode d'alignement de séquences utilisée ou encore les différentes méthodes de normalisation de l'abondance des OTUs qui limitent aujourd'hui les comparaisons entre études et donc la possibilité d'affirmer avec certitude qu'une espèce bactérienne en particulier est un biomarqueur fiable de l'obésité [267–269]. Certaines espèces bactériennes ont cependant été associées à une diminution de l'adiposité, telles qu'*Akkermansia muciniphila* (phylum des Verrucomicrobia, une bactérie

qui dégrade le mucus de la paroi intestinale) ou bien à une augmentation de l'adiposité telles que les bactéries du genre *Lactococcus* (phylum des Firmicutes) ou les *Allobaculum* (phylum des Bacteroidetes) [270]. De même, le genre *Blautia* (Firmicutes), producteur de butyrate et d'acétate, a été identifié comme capable de réduire l'obésité en régulant l'activité des récepteurs couplés aux protéines G (GPR) 41 et 43 [271]. Au contraire, l'introduction d'*Enterobacter cloacae B29*, une bactérie pro-inflammatoire positivement corrélée avec l'IMC chez certains individus, entraine le développement d'une insulino-résistance chez les souris, ce qui suggère que le développement de bactéries productrices d'endotoxines en réponse au WD participe à la mise en place de l'obésité [272]. Cependant ces changements sont loin d'être retrouvés unanimement et varient beaucoup entre individus et d'une étude à l'autre. Récemment l'étude des variations du microbiote sur une échelle de 24h chez des individus sains, obèses ou avec un diabète de type 2 a mis en évidence un cluster de bactéries dont la rythmicité journalière était altérée. Ce cluster était statistiquement associé voire prédictif du diabète de type 2 [239]. Ce travail renforce l'idée que dans la cadre de l'obésité et des pathologies métaboliques, il faut davantage considérer un ensemble de bactéries comme conduisant à un état pathologique chez l'hôte, plutôt qu'une seule bactérie isolée.

En plus des effets à long terme d'une alimentation de type WD, il a été montré qu'en l'espace de 8 heures le passage d'un régime standard (chow) vers un WD induit des changements significatifs de composition du microbiote fécal chez la souris [273]. Dans différentes souches de souris de fond génétique distinct, l'introduction d'un WD (lipides : 45%kcal) modifiait de façon similaire la composition du microbiote intestinal en moins de 4 jours, ce qui suggère que malgré un fond génétique ainsi qu'une composition du microbiote intestinal différente entre les souches, une réponse homogène à l'introduction d'un WD est attendue [274]. Chez l'Homme, le passage d'un régime à bases de plantes (riche en fibres) à un régime à base de viande modifie également la composition du microbiote fécal en l'espace de 24h [275]. Dans une étude menée chez 10 individus pour lesquels a été introduit pendant 10 jours soit un régime riche en fibres et pauvres en lipides, soit un régime pauvre en fibres et riche en lipides, les variations de composition du microbiote fécal observées après 24h étaient les plus fortes dans les deux groupes [236]. Après 10 jours, la composition du microbiote n'avait pas été modifiée suffisamment pour être considérée comme un basculement d'entérotype, ce qui suggère qu'il est nécessaire de prolonger davantage la consommation d'un nouveau régime pour modifier de manière significative la composition du microbiote intestinal, rejoignant le concept d'un état de transition critique du système microbiote-hôte avant la présence de l'état pathologique décrit précédemment. Cependant, les conséquences physiologiques sur l'hôte de ces changements rapides de la composition du microbiote intestinal en réponse à un changement de régime demeurent peu étudiées.

Des études récentes chez le rongeur ont montré que 20 % de la communauté microbienne intestinale présente une rythmicité diurne dans des conditions non pathologiques, à la fois en terme d'abondance et de fonction [276–278]. Ces variations suivent le rythme des repas [279], mais également l'horloge interne [277]. De façon intéressante, chez le rongeur, l'administration par infusion colique de protéines produites par *Escherichia coli* à différentes phases de croissance (exponentielle et stationnaire) ont un impact sur la prise alimentaire ainsi que sur la quantité de peptides anorexigènes produits par l'épithélium intestinal et présents dans la circulation sanguine, ce qui suggère un potentiel lien entre le microbiote, la régulation de l'appétit et l'activité intestinale à très court terme [280].

Bien que la modification de la composition à court voire très court terme du microbiote intestinal en réponse à l'introduction d'un WD ait été étudiée, l'impact de ces variations sur l'hôte est aujourd'hui inconnu. De plus, l'introduction répétée d'un WD semble générer un microbiote intestinal cicatriciel dont le rôle est à préciser, en particulier concernant la mise en place de l'obésité. Outre la diminution de richesse, de potentiels biomarqueurs bactériens de l'obésité ont été identifiés mais sont inconsistants à travers les études, ce qui peut supposer que les variations observées concernent plus d'une bactérie et concerneraient plutôt des groupes de bactéries qui évoluent de concert en réponse à l'introduction de WD et partagent des activités métaboliques communes et/ou complémentaires.

4. Microbiote et prise alimentaire

a. Lien entre microbiote et prise alimentaire

De nombreux travaux suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle dans la prise alimentaire. Dans les modèles rongeurs axéniques, l'effet de l'absence de microbiote intestinal sur la prise alimentaire n'est pas clair avec une augmentation de l'ingéré sous régime standard [252] ou une diminution de l'ingéré sous WD [251]. Cet effet de l'absence de microbiote sur la prise alimentaire pourrait être dépendant de l'âge chez la souris, avec une augmentation de la prise alimentaire sous régime standard chez des souris axéniques de 4 semaines tandis que les souris axéniques de 8 mois avaient un ingéré alimentaire inférieur par rapport à des souris contrôles conventionnelles [281]. Une autre approche pour évaluer le lien entre microbiote et prise alimentaire est le transfert de microbiote. Le by-pass gastrique en Roux-en-Y est un traitement efficace de l'obésité et induit de fortes modifications de la composition du microbiote intestinal chez l'Homme et chez le

rongeur [282–284]. Le transfert de microbiote de souris ayant perdues beaucoup de poids consécutivement à un by-pass gastrique Roux-en-Y à des souris axéniques a permis de transférer le phénotype de perte de poids associé à une diminution significative de la prise alimentaire [285]. La transplantation d'échantillons fécaux issus d'humains ayant subi ou non un by-pass gastrique, avec ou sans perte de poids significative après chirurgie, à des souris traitées par antibiotiques a montré que le microbiote intestinal après chirurgie avait une influence sur le gain de poids chez les animaux transplantés, sans avoir d'influence sur l'ingéré alimentaire hebdomadaire [286]. D'autres méthodes sont utilisées pour faire varier la composition du microbiote, en l'enrichissant en bactéries par l'administration de probiotiques. L'utilisation de probiotiques tels qu'*Hafnia alvei*, une bactérie identifiée comme produisant une protéine satiétogène mimétique de l'α-MSH de l'hôte, est capable de réduire le gain de poids en diminuant la prise alimentaire chez la souris C57BL/6 sous WD [287]. A ce jour, *Hafnia alvei* est le seul probiotique commercialisé dont le mécanisme central expliquant la diminution de prise alimentaire est élucidé. D'autres probiotiques sont utilisés pour diminuer la prise alimentaire. Parmi eux, *Lactobacillus helveticus* et *Bifidobacterium longum* sont capables de diminuer l'appétit chez l'Homme [288]. L'administration de *Lactobacillus rhamnosus* chez le poisson-zèbre permet de diminuer la prise alimentaire, avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour la leptine et *mc4r*, deux gène impliqués dans la satiété, avec une diminution de l'expression de *npy* [289]. Chez la souris obèse, la combinaison de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium bifidumi* permet de diminuer la prise alimentaire dans le cadre d'une consommation à long terme (5 semaines) de WD [290]. L'autre façon de modifier le microbiote est via l'utilisation de prébiotiques qui permettent de modifier la composition et/ou l'activité des bactéries déjà présentes dans l'intestin. Plusieurs prébiotiques tels que l'inuline [291], l'oligofructose [292], le polydextrose seul [293, 294] ou en combinaison avec le xylitol [295] ont montré un impact satiétogène chez l'Homme sain. Dans les études citées, la mesure de la prise alimentaire restait globale (à l'échelle quotidienne voire hebdomadaire) et était notamment utilisée comme un paramètre expliquant les variations de poids des animaux et non comme un paramètre à expliquer. Des données précises concernant la prise alimentaire, notamment des mesures à l'échelle du repas en cages métaboliques, restent à obtenir pour évaluer plus précisément le lien entre les variations de composition du microbiote et la prise alimentaire.

b. Lien entre microbiote et consommation de WD

Comme vu dans le paragraphe précédent, les modifications du microbiote peuvent influencer l'ingéré alimentaire. L'action du microbiote sur la prise alimentaire en réponse à un changement de régime est d'un intérêt particulier, notamment lors de la transition

d'un régime équilibré vers un WD pour comprendre les mécanismes précoces qui mènent vers le surpoids et l'obésité. En effet, lors de l'introduction d'un WD, une inflammation hypothalamique se met en place de façon très précoce qui va conditionner en partie la mise en place de l'obésité et la régulation de la prise alimentaire (cf. paragraphes II.B.1 et II.B.2). Les mécanismes conditionnant la mise en place de cette inflammation hypothalamique pourraient dépendre des modifications du microbiote induites par l'introduction du WD.

Un moyen de déterminer l'impact du microbiote sur la prise alimentaire lors de la consommation d'un régime WD est d'utiliser un modèle murin sans microbiote (axénique). Chez le rongeur axénique, toutes les études ne sont pas concordantes sur l'effet de l'introduction d'un WD sur la prise alimentaire, avec une augmentation de cette prise par rapport aux contrôles conventionnelles [251] ou une absence d'effet du changement de régime dans les 24h [296] ou dans les trois jours qui suivent son introduction [297]. L'utilisation de modèles axéniques présente des limites qui peuvent compliquer l'interprétation des résultats. Les animaux sans germe présentent des différences d'expression de gènes impliqués dans la régulation du comportement alimentaire par rapport à des animaux avec un microbiote conventionnel, avec par exemple une surexpression de *bdnf* (un gène suppresseur de l'obésité [298]) mais aussi de *agrp* et *npy* dans l'hypothalamus et dans le tronc cérébral de souris axéniques qui est réprimée en présence d'un microbiote intestinal s [299]. A l'inverse, les niveaux d'expression de *pomc* sont moins élevés dans l'hypothalamus de souris axéniques par rapport à des souris conventionnalisées [299]. Les animaux axéniques peuvent également présenter des modifications des circuits impliqués dans l'activité motrice et la régulation de l'anxiété [300], ce qui peut modifier le comportement alimentaire. Enfin, l'utilisation de ce modèle présente des limites techniques. En effet, il n'y a jusqu'à présent à notre connaissance pas de matériel adapté au suivi constant et automatique de la consommation alimentaire dans le contexte de l'axénie [281].

Un autre moyen de dépléter le microbiote intestinal en s'affranchissant des limites de l'utilisation d'un modèle axénique est d'utiliser une combinaison d'antibiotiques à large spectre. Une étude menée chez la souris soumise à la consommation de WD pendant 8 semaines avec un traitement antibiotique par voie orale en parallèle a montré qu'elles avaient un ingéré alimentaire plus faible que les souris sous WD sans traitement antibiotique [301]. Une autre étude sur le même modèle a mesuré une augmentation de l'ingéré alimentaire (g/jour) après traitement antibiotique sous régime standard par rapport aux souris sous WD (supplémentation de 10% de lard à l'alimentation standard) après 8 semaines de consommation de leurs régimes respectifs [302]. Cependant, la façon de mesurer l'ingéré alimentaire dans cette étude (en g/jour et non en kcal/jour) limite les conclusions que l'on peut tirer sur l'impact d'un traitement antibiotique sur l'ingéré alimentaire en lien avec la consommation de WD. Chez des souris traitées avec des antibiotiques à large spectre dans l'eau de boisson et recevant un WD (lipides : 60%kcal) pendant 4 semaines, l'apport calorique hebdomadaire est significativement diminué par

rapport aux souris non traitées et sous WD, cette diminution n'étant pas rencontrée sous régime standard [303]. De la même façon que lors de l'utilisation de modèles axéniques, toutes les études ne fournissent pas de résultats homogènes sur la prise alimentaire après traitement antibiotique, certaines d'ailleurs n'ont mesuré aucune différence d'ingéré alimentaire suite au traitement [304, 305]. L'effet de l'absence de microbiote (en conditions d'axénie) ou de sa déplétion sur la prise alimentaire sous WD n'est donc pas encore clarifié.

Comme vu dans le paragraphe II.A.4.a., l'introduction de certains probiotiques dans l'alimentation permet de diminuer la prise alimentaire [287–289]. Cependant, sous régime WD, toutes les études ne montrent pas de modification de l'ingéré alimentaire. Par exemple chez la souris après 8 semaines de consommation de WD suivies de 4 semaines de consommation de WD et de probiotiques (un mélange de *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* et *Streptococcus thermophilus*), aucune différence d'ingéré alimentaire n'a été mesurée [306]. Dans une autre étude, une souche *d'Escherichia coli* modifiée pour exprimer la synthase de N-acylphosphatidyléthanolamines d'*Arabidopsis thaliana*, qui permet la production de lipides aux propriétés anti-obésité, est administrée comme probiotique pendant 2 semaines à des souris sous WD depuis 10 jours, avec ou sans traitement préalable par un cocktail d'antibiotiques [307]. Dans les deux cas (avec ou sans traitement par antibiotiques), l'ingéré alimentaire cumulé des souris sous WD recevant les probiotiques était moins élevé par rapport aux souris sous WD sans probiotiques, en parallèle d'une réduction de l'adiposité. Chez le rat soumis à un WD associé à un probiotique (*Lactobacillus paracasei*), l'ingéré alimentaire est similaire aux rats contrôles sous WD seul mais la mise en place de la stéatose hépatique non alcoolique est retardée [308]. L'impact des probiotiques sur la prise alimentaire sous WD ne semble donc pas dépendre d'une déplétion préalable du microbiote pour une meilleure implantation, ni d'une consommation préalable ou non de WD, ce qui indiquerait une action curative potentielle selon le probiotique utilisé. De plus, les études qui ont mesuré l'ingéré alimentaire lors des traitements (antibiotique ou probiotique) ne disposaient pas toujours de moyens précis de mesure de l'ingéré (tels que des cages métaboliques) : bien qu'un ingéré journalier ou sur quelques heures ne soit pas différent avec ou sans traitement par probiotiques ou antibiotiques, il est possible que les patterns d'ingéré (durée et taille des repas, intervalles entre les repas) diffèrent. A notre connaissance, à ce jour, aucune étude n'a été menée en cages métaboliques sous traitement antibiotique pour évaluer la réponse fine des animaux à un changement de régime après déplétion du microbiote intestinal. Les effets sur l'ingéré alimentaire sont également mesurés après une longue période de consommation de WD : les données sur l'impact d'une modification du microbiote intestinal à très court terme après ou pendant le passage d'un régime standard à un WD manquent, malgré l'importance dans la régulation de l'homéostasie énergétique des événements centraux durant cette fenêtre de temps chez l'individu non obèse.

La transplantation d'un microbiote de souris génétiquement obèses vers des souris axéniques permet de récapituler le phénotype d'obésité sans modifier la prise alimentaire, suggérant qu'il existe un type de microbiote intestinal capable d'augmenter l'extraction d'énergie provenant de l'aliment sans induire d'augmentation de la prise alimentaire [247]. Des rats dont le microbiote a été déplété par traitement antibiotique puis recolonisés par un microbiote dysbiotique issus de rats soumis à 8 jours de WD présentent un ingéré alimentaire significativement plus élevé sous WD par rapport aux rats colonisés par un microbiote non dysbiotique après 5 semaines de colonisation [149]. Ceci démontre le lien de cause à effet entre les modifications du microbiote induites à court terme par le régime et la régulation de la prise alimentaire à long terme. D'autres études ont mis en avant l'utilisation du transfert de matière fécal comme un moyen de diminuer le phénotype d'obésité et les désordres métaboliques associés. Chez l'Homme, le transfert de microbiote à partir de donneurs minces vers des receveurs obèses permet de rétablir la sensibilité à l'insuline après 6 semaines, ce qui pourrait diminuer la prise alimentaire [309]. Toutes les études ne s'accordent donc pas sur l'impact du microbiote sur la prise alimentaire, probablement car les modifications du microbiote dépendent du mélange d'antibiotiques utilisé, de la méthode d'administration, du type d'animal ou encore de l'environnement des animaux. Etudier la corrélation entre les modifications du microbiote (de composition mais aussi d'activité) et les variations centrales en lien avec la régulation de la prise alimentaire permettrait de déterminer quel(s) facteur(s) induisent ces variations de prise alimentaire.

B. Mécanismes d'action du microbiote sur la prise alimentaire

La prise alimentaire est régulée en partie par l'axe intestin-cerveau. Au sein de l'axe intestin-cerveau, le microbiote joue un rôle prépondérant par différents mécanismes. En effet, le microbiote peut influer sur la prise alimentaire par **voie humorale, nerveuse**, par l'intermédiaire de **métabolites bactériens** capables de traverser la barrière hémato-encéphalique ou par **voie inflammatoire** (Figure 1.9).

1. Régulation de la prise alimentaire via les cellules entéroendocrines

La présence de cellules entéroendocrines (EEC) tout au long de l'intestin fait de celui-ci le premier organe endocrine de l'organisme. Les EEC produisent près de 30 peptides différents, bien qu'elles représentent seulement 1% des cellules de l'épithélium intestinal [310]. Elle sont capables de sécréter des peptides orexigènes et anorexigènes en réponse

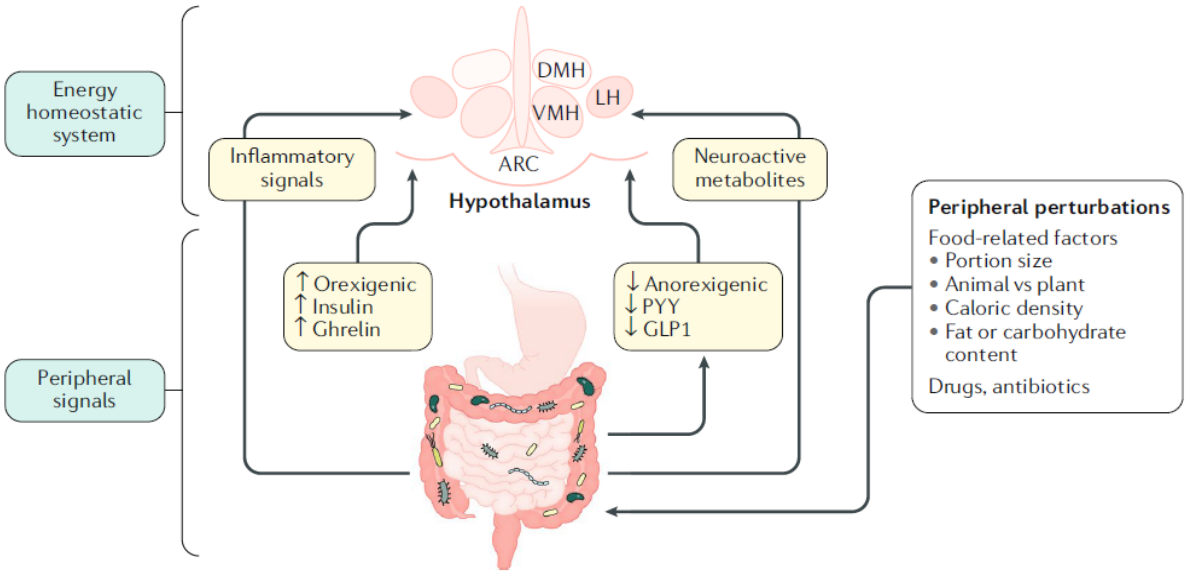


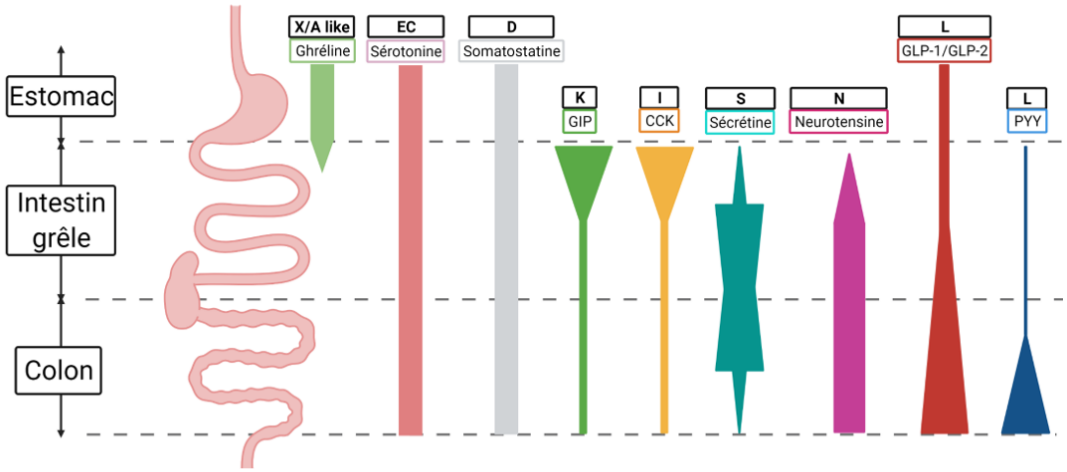
Figure 1.9. Implication du microbiote intestinal dans la régulation homéostatique de la prise alimentaire. Le microbiote peut envoyer des signaux à l'hypothalamus par l'intermédiaire de signaux inflammatoires, de métabolites bactériens neuroactifs et en modulant l'activité sécrétoire des cellules entéroendocrines. PYY : peptide YY ; GLP1 : glucagon-like peptide 1 ; DMH : dorsomedial hypothalamus ; LH: lateral hypothalamus; VMH : ventromedial hypothalamus ; ARC : arcuate nucleus. D'après [312].

aux nutriments présents dans le tractus gastro-intestinal ou en réponse aux stimuli liés aux repas tels que des composés du métabolisme bactérien ou de l'hôte [311].

a. Organisation et classification des cellules entéroendocrines

Les hormones intestinales présentent des schémas d'expression caractéristiques le long du tube digestif. Bien qu'il existe certaines différences entre les espèces, le peptide insulinotrope dépendant du glucose (GIP) se trouve généralement dans le duodénum, la CCK dans le duodénum et le jéjunum, et le GLP1 dans le jéjunum, l'iléon et le côlon. Le PYY, en revanche, est principalement exprimé dans l'iléon distal et le côlon (Figure 10A). Différents types d'EEC ont été identifiés et elles ont été très longtemps caractérisées par le peptide majoritaire qu'elles produisent (Figure 1.10). Récemment, il a été démontré que les EEC étaient capables d'une forte plasticité transcriptionnelle [313]. Ces nouvelles données suggèrent que non pas une quinzaine [314] mais seulement 4 types cellulaires d'EEC seraient présents le long du tube digestif [315, 316] : 1- un type de cellules exprimant spécifiquement et uniquement la somatostatine, 2- les cellules entérochromaffines qui expriment la substance P et la sérotonine (5HT), 3- un type de cellules co-exprimant la ghréline et la motiline et 4- une lignée majeure de cellules capable d'exprimer la CCK, la sécrétine, le GIP, le GLP-1/-2, le PYY et la neurotensine. Pour des raisons de compréhension vis-à-vis de la littérature plus ancienne, la dénomination plus ancienne est conservée dans ce manuscrit.

A



B

Gut region	Intestinal processes	Luminal stimuli of EECs
Stomach	Acid secretion Mechanical disruption	Acid Digested protein
Duodenum Jejunum Proximal ileum	Release of bile acids, pancreatic and intestinal enzymes, bicarbonate Digestion Absorption (⇨)	Monosaccharides Free fatty acids Monoacylglycerols Amino acids Di/tripeptides Bile acids
Terminal ileum	Bile acid reabsorption	Bile acids Unabsorbed nutrients
Colon Rectum	Bacterial metabolism	Short-chain fatty acids Indole Secondary bile acids

Figure 1.10. A. Répartition anatomique des différents types d'EEC identifiés le long du tractus gastro-intestinal. L'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin, avec une distinction entre l'intestin proximal et distal pour ces deux derniers, comportent des EEC qui expriment des peptides soit à concentration continue (rectangle) soit en gradient de concentration (triangle). Une couleur correspond à un type d'hormone ou de peptide sécrété, dont le nom est indiqué au-dessus de chaque motif. Le type cellulaire qui exprime les hormones est indiqué en noir et en gras au-dessus. A partir des données du tableau 2 de [311]. **B.** Schéma montrant le rôle majeur de chaque région du tractus gastro-intestinal (« intestinal processes ») ainsi que les stimuli qui engendrent l'activation de la sécrétion des EEC. D'après la référence [317].

b. Activation des EEC via les nutriments et les métabolites bactériens

Comme vu précédemment, les hormones produites par les ECC sont capables de moduler la prise alimentaire en ayant majoritairement un rôle satiétogène central, à l'exception de la ghréline (Figure 1.9). Les nutriments postprandiaux ainsi que d'autres facteurs luminaux liés à la digestion stimulent l'expression et/ou la sécrétion des hormones peptidiques des EEC via des mécanismes faisant intervenir des transporteurs ou des récepteurs des nutriments couplés ou non à des canaux ioniques, des récepteurs couplés aux protéines G ou encore certains récepteurs de l'immunité. Comme cela est décrit ci-dessous, les stimuli nutritionnels et les voies de détection des nutriments semblent être communs à différents types de cellules et ceci bien que les EECs, ou en tout cas les peptides qu'elles expriment, soient réparties selon un gradient particulier le long du tractus digestifs (Figure 1.10). Cependant, les cellules situées à différents endroits le long du tractus digestif sont exposées à différents stimuli luminaux, en fonction des cinétiques de digestion et d'absorption des nutriments et produits de la digestion ou de leur transformation par les bactéries de l'intestin (Figure 1.10B). Même si de nombreux peptides sont produits par les EECs, dans le cadre de ce projet de thèse, trois peptides en particulier ont été étudiés : la CCK, GLP-1 et la neurotensine.

La CCK est un peptide dont l'action anorexigène passe par un effet sur le rassasiement avec une diminution de la taille des repas. L'injection périphérique de CCK permet de diminuer la taille des repas chez l'Homme, le primate non humain et le rongeur [318]. La suppression des récepteurs CCK1R chez la souris induit l'ingestion de repas plus conséquents et de plus grande durée [319]. Malgré tout, sur le long terme, l'absence de CCK ne semble pas modifier l'ingéré alimentaire journalier, l'adiposité ou le poids corporel chez la souris [320, 321]. La CCK est sécrétée essentiellement dans les parties proximales de l'intestin (duodénum en particulier) [322]. Les lipides et les protéines activent sa sécrétion dans l'intestin [323, 324]. Des récepteurs à la CCK sont présents dans l'hypothalamus où la suppression de CCK1R induit une surexpression de NPY dans le DMH chez le rat [325]. La communication entre les EEC produisant la CCK et les centres régulateurs centraux de la prise alimentaire passe par la circulation et par l'activation du nerf vague. La CCK étant majoritairement exprimée au niveau de l'intestin proximal, peu de données existent quant à l'impact du microbiote intestinal sur sa régulation. Chez le modèle porcin, l'infusion iléale d'acides gras à chaîne courte (AGCC) (acétate, butyrate, propionate) induit une augmentation de la concentration plasmatique de CCK [326] tandis que chez la souris le propionate active l'expression de CCK dans l'iléon et le caecum [327]. La sécrétion de CCK est également activée chez la souris par le LPS via l'activation des TLR4, 5 et 9 [328] et pourrait ainsi participer à la diminution de la prise alimentaire dans un contexte d'infection gastro-intestinale [329]. L'impact du microbiote intestinal sur la CCK dans les parties distales de l'intestin, où le microbiote est le plus dense et actif métaboliquement, est encore inconnu malgré la capacité de co-expression de plusieurs peptides dont la CCK par les EEC de l'intestin distal [330].

Le GLP-1 est un peptide exprimé tout au long du tractus gastro-intestinal avec une plus forte expression au niveau de l'intestin distal. La sécrétion de GLP-1 est stimulée de façon directe par le glucose, les AGCL ou encore les AGCC et de façon indirecte par un autre peptide produit par les EEC, le GIP [331]. De plus, des métabolites bactériens tels que le butyrate [332], le propionate [333, 334], l'indole [335], le S-equol [336], le LPS [337] ou encore certains prébiotiques, par l'intermédiaire de la production d'AGCC [338], induisent la sécrétion ou l'expression de GLP-1. Le GLP-1 est une incrétine qui augmente la sécrétion d'insuline [339]. Il diminue également la prise alimentaire, en se fixant sur ses récepteurs GLP-1Rs présents à la surface du nerf vague : chez l'Homme, une vagotomie associée à une pyloroplastie annulent l'effet d'une injection de GLP-1 par voie intraveineuse [340]. Chez des rats génétiquement modifiés pour diminuer l'expression du récepteur GLP-1 au niveau du nerf vague (diminution d'environ 50% de l'expression (ARN et protéines) des récepteurs GLP1-Rs dans le ganglion noueux), la taille des repas augmente (+20%) ainsi que la prise alimentaire pendant 1h après un jeûne de 16h (+20%) tandis que le nombre de repas diminue (-40%) durant la période nocturne [341]. Le GLP-1 diminue également la prise alimentaire de façon indirecte en stimulant la sécrétion d'insuline [342], connue pour avoir un rôle satiétogène par l'intermédiaire des neurones NPY de l'ARC [343].

Malgré l'activation de la sécrétion de GPL-1 par de nombreux métabolites ou composés d'origines bactériennes, les souris axéniques présentent une forte activation de la sécrétion de GLP-1 et de son expression dans les régions distales (iléon et colon) [344, 345]. Les AGCC issus de l'activité fermentaire du microbiote seraient capables, en plus de leur rôle activateur décrit précédemment, de réprimer l'expression de *gcg* (le gène codant pour GLP-1) dans l'intestin distal chez la souris axénique recolonisée : la disparition des AGCC en absence de microbiote pourrait expliquer cette surexpression de *gcg* dans les parties distales de l'intestin, mais d'autres stimuli pourraient rentrer en jeu. En effet, les mécanismes en œuvre dans cette régulation demeurent assez mal connus [345]. La régulation de l'expression de *gcg* passe également par le métabolisme des acides biliaires. En effet, les acides biliaires primaires tels que l'acide déoxycholique (deoxycholic acid, DCA) sont capables de se fixer au farnesoid X receptor (FXR), un récepteur nucléaire, et inhiber l'expression et la production de GLP-1 dans les cellules L [346]. Dans cette même étude, l'absence de FXR *in vivo* chez la souris était associée à une augmentation de l'expression de GLP-1 et permettait une amélioration du métabolisme du glucose. Les acides biliaires secondaires sont également capables de se fixer au récepteur TGR5, ce qui active une cascade de signalisation aboutissant à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 par les EEC [347, 348]. Les acides biliaires primaires tel que l'acide cholique et secondaires tel que l'acide taurodeoxycholique activent également la sécrétion de GLP-1 *in vivo* et *in vitro* [347, 349]. TGR5 et FXR constituent des cibles de choix pour l'amélioration du métabolisme du glucose dans le cadre du traitement de l'obésité [350, 351] mais pourraient également être utilisés pour réguler la prise alimentaire au vu des propriétés satiétogènes du GLP-1.

La neurotensine est un peptide anorexigène également sécrété par les EEC. Elle peut être co-sécrétée avec la CCK, le GIP, le GLP-1, le PYY et la sécrétine par une même lignée d'EEC [315] et en particulier avec GLP-1 et PYY, bien que ces peptides ne semblent pas être stockés dans les mêmes vésicules sécrétoires au sein des cellules L [313, 352]. Les acides gras sont capables d'induire la sécrétion de la neurotensine essentiellement dans l'intestin proximal, mais pas les glucides ni les protéines [353]. La neurotensine est connue pour jouer un rôle dans l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin proximal, tels que les acides gras, ainsi que dans la motricité intestinale [354]. Bien que la densité de cellules exprimant la neurotensine soit proche de celle des cellules exprimant GLP-1 ou PYY, la neurotensine intestinale a été peu étudiée, notamment concernant son rôle dans la régulation de la prise alimentaire [315]. Le rôle de la neurotensine dans cette régulation a en effet été davantage étudié lorsqu'elle est exprimée au niveau du système nerveux central, où elle agit comme un inhibiteur du système dopaminergique [355]. Une étude a montré que la neurotensine exprimée par l'intestin joue un rôle anorexigène chez le rat et la souris [356]. Cet effet anorexigène est préservé après vagotomie, bien que plus court en durée que chez des animaux sham, ce qui suggère que le signal de la neurotensine ne dépend pas principalement de la signalisation par le nerf vague [356]. Des souris

déficientes en pro-neurotensine plasmatique d'origine intestinale (la forme précurseur de la neurotensine retrouvée dans la circulation) sont protégées de l'obésité, de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance, avec une diminution de l'absorption des acides gras lors de l'exposition à un régime WD (lipides : 60%kcal) pendant 6 mois [357]. De plus, les niveaux de pro-neurotensine sont positivement et significativement corrélés à l'inflammation du tissu adipeux viscéral issu de biopsies de patients obèses [353]. De façon intéressante, le nombre de cellules exprimant la neurotensine mais également GLP-1 et la CCK dans l'intestin chez le rat est significativement augmenté après bypass gastrique, en association avec une diminution de l'ingéré alimentaire et une perte de poids significative : la modulation de l'expression et de la sécrétion de la neurotensine, GLP-1 et CCK dans l'intestin pourrait donc constituer une nouvelle piste de soin de l'obésité et de la régulation de la prise alimentaire [358].

La prolifération et la différentiation des ECC constituent un autre levier de régulation de la synthèse des peptides gastro-intestinaux, en plus des signaux luminaux. Cette différenciation dépend de nombreux facteurs de transcription exprimés différentiellement au cours du temps (Figure 11). Les facteurs de transcription précoces (lignée sécrétoire *vs.* absorptive, différenciation précoce des EEC) sont bien connus. En revanche, les facteurs de transcription intermédiaires et tardifs sont encore en cours d'identification. Une étude récente a montré à l'échelle de la cellule que différents facteurs de transcription tardifs étaient exprimés séquentiellement et que leur ordre ainsi que le moment au cours duquel ils étaient exprimés influaient sur l'identité finale de la cellule [359]. L'identité des EECs dans un tissu à un instant précis reste donc difficile à déterminer moléculairement en mesurant les niveaux d'expression de gènes, étant donné que toutes les cellules de l'épithélium ne sont pas au même stade de différenciation.

Chez la souris, le WD stimule la différenciation des EEC en cellules L [360]. La différenciation des cellules souches intestinales en EEC est sous l'influence de l'activation de la voie de signalisation Notch, qui est modifiée par l'introduction d'un régime riche en lipides chez la drosophile, avec une augmentation de la quantité d'EEC dans les parties distales de l'intestin [361]. Malgré ces augmentations, la prise alimentaire reste plus forte chez les rongeurs sous WD, ce qui suggère que des mécanismes compensatoires, encore non identifiés, sont mis en place et limitent l'action anorexigène des EEC, ou que l'action de ces hormones est bloquée. Ces mécanismes compensatoires pourraient être mis en place au niveau du système nerveux central, notamment avec des modifications des équilibres de neuropeptides de l'ARC impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, ce qui n'a pas été montré jusqu'à présent. Le rôle du microbiote dans la prolifération et la différenciation des EEC est encore peu étudié. Les signaux en provenance du WD, en lien avec l'activité du microbiote, capables de moduler la prolifération et la différenciation des EEC restent donc en grande majorité à déterminer.

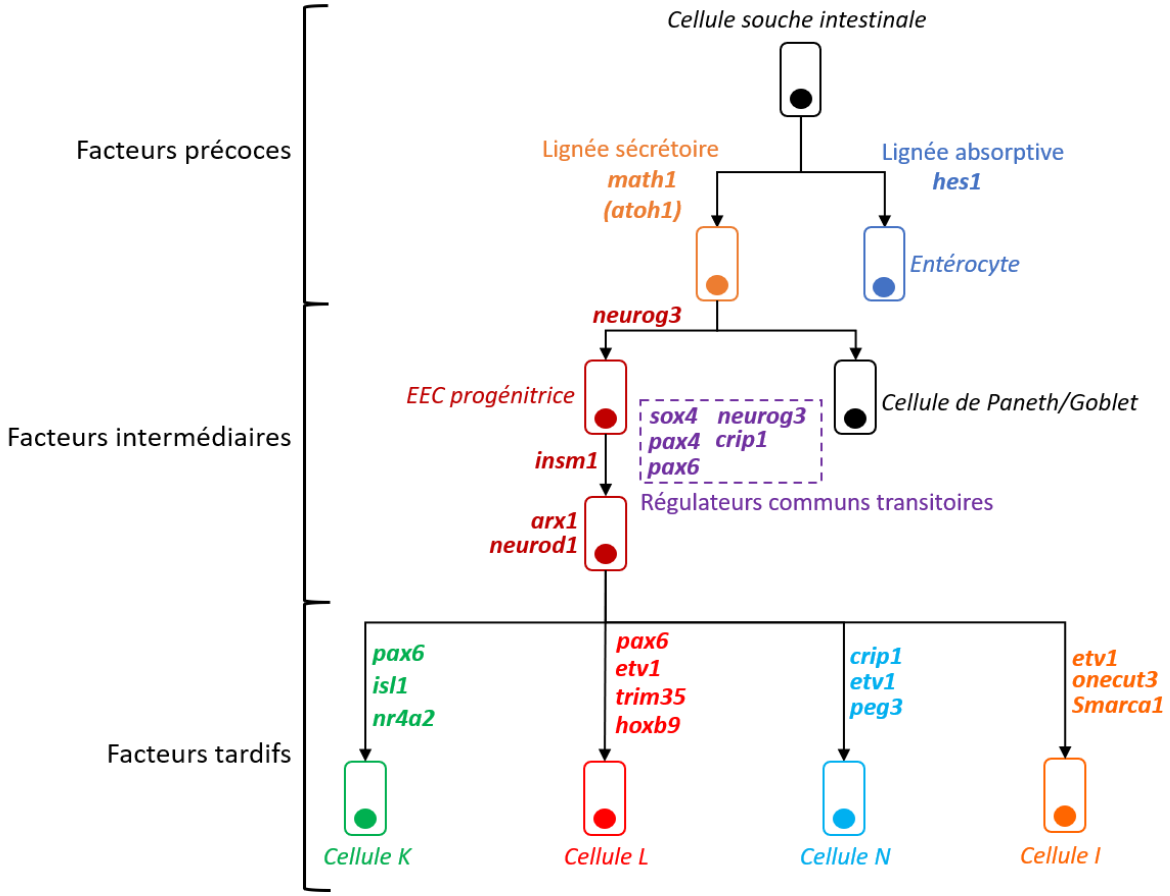


Figure 1.11. Schéma représentant les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des EEC. Adapté de [359, 362]. Les facteurs de transcription précoces (*hes1* et *math1*) sont bien connus et identifiés. En revanche, les facteurs de transcription intermédiaires et tardifs, qui agissent à différents temps et parfois en combinaison avec d'autres facteurs de transcription, sont moins bien identifiés. Le schéma résume ainsi les résultats d'une étude récente qui a identifié plusieurs facteurs de transcription pour lesquels le timing d'expression, en plus de la présence/absence, permet d'obtenir différents types d'EEC [359]. Les trois grands types d'EEC mentionnés précédemment dans l'introduction sont représentés (cellules K (qui expriment GIP), L (qui expriment GLP-1, GLP-2 et PYY), N (qui expriment la neurotensine) et I (qui expriment la CCK)). Les facteurs de régulation transitoires communs aux EEC et aux cellules de Goblet et de Paneth sont encadrés en violet. Les facteurs de transcription sont indiqués en gras, minuscule et italique. Chaque type cellulaire est indiqué en italique. Les facteurs de différentiation intermédiaires et tardifs sont exprimés selon un timing qui n'est pas précisé ici, car cela n'a pas été étudié durant ce projet.

c. Mode d'action des peptide gastro-intestinaux

Certains peptides gastro-intestinaux régulent de la prise alimentaire via une action au niveau du système nerveux central. Plusieurs voies peuvent être impliquées dans ces régulations : endocrine (par la circulation sanguine), neurocrine (par l'intermédiaire de l'activation du nerf vague expriment les récepteurs spécifiques des peptides sécrétés), paracrine (qui permet de renforcer la sécrétion de peptides par les EEC grâce à une stimulation par les EEC voisines) et par l'intermédiaire de neuropodes qui sont des extensions cytoplasmiques pseudo-axonales des EEC qui se forment au niveau de leur face baso-latérale où une interaction pseudo-synaptique a lieu entre cette extension et les neurones du nerf vague [363].

2. La régulation de la prise alimentaire *via* l'action au niveau intestinal ou cérébrale de métabolites bactériens

Le microbiote intestinal produit des molécules capables d'influer directement sur la prise alimentaire. Parmi elles, certains AGCC ont un rôle direct dans la régulation centrale de la prise alimentaire. Injecté centralement, l'acétate a un effet anorexigène en réduisant l'activité catalytique de l'AMPK hypothalamique [364]. Le microbiote intestinal métabolise également les acides biliaires en acides biliaires secondaires. Les acides biliaires en se liant à FXR dans l'intestin, peuvent agir sur la prise alimentaire par l'intermédiaire de l'activation de la production entérocytaire du fibroblast growth factor 19 (FGF19) chez la souris [365]. FGF19 est ensuite capable de réduire l'activité des neurones AgRP/NPY de l'hypothalamus entrainant une diminution de la prise alimentaire [366, 367]. Certains métabolites dérivés du métabolisme du tryptophane par les bactéries, qui comprennent la sérotonine, l'indole et la kynurénine, sont susceptibles d'influer sur la prise alimentaire. Cependant, bien que la sérotonine synthétisée au niveau de l'hypothalamus soit capable de réguler la prise alimentaire en agissant sur le système dopaminergique, il n'y a actuellement pas de preuve que la sérotonine synthétisée par l'épithélium intestinal en réponse au microbiote ou produite par le microbiote, ce qui constitue 95% de la sérotonine totale produite, puisse traverser la barrière hémato-encéphalique et agir au niveau du système nerveux central [368]. D'autres métabolites ou composés bactériens sont susceptibles d'agir directement sur la régulation de la prise alimentaire en tant que mimétique d'hormones de l'hôte. A ce jour, ceci a été montré uniquement pour la protéine chaperone d'*E.coli* ClpB, mimétique de l'α-MSH, qui est capable de réduire l'ingéré alimentaire lorsqu'elle est injectée centralement chez la souris [369]. Le LPS, constituant de la membrane des bactéries Gram négative, est également capable de moduler centralement la prise alimentaire. En effet, l'injection centrale de forte

doses de LPS a pour effet d'induire une anorexie [370, 371], par l'intermédiaire de l'activation du stress oxydant dans l'ARC [370]. Les neurones du nerf vague, qui relie l'intestin au NTS, sont sensibles au LPS : ils possèdent les récepteurs TLR4 qui lient le LPS présent à la surface des bactéries Gram négative, dont l'abondance est augmentée est réponse à la consommation de WD. Une vagotomie sub-diaphragmatique permet de diminuer l'augmentation d'IL-1β dans l'hypothalamus induite par le LPS (injection intrapéritonéale) chez la souris, suggérant un lien entre le nerf vague et l'inflammation hypothalamique [372]. L'infusion chronique de faibles doses de LPS (via des mini-pompes osmotiques) inhibe la signalisation de la leptine au niveau du nerf vague (via une fixation sur les TLR4 et l'activation de SOCS3), diminuant ainsi l'effet synergique de la leptine sur l'effet satiétogène de la CCK au niveau vagal [213]. Certaines cellules entéroendocrines expriment également des TLRs [373] dont l'activation induit la sécrétion de certains peptides [328]. Il existe aujourd'hui de nombreuses inconnues dans le milieu complexe qui constitue l'ensemble des métabolites bactériens, qui varient en fonction de la composition du microbiote et du régime. Un récapitulatif schématique des différents types d'interaction entre le microbiote et l'épithélium intestinal vis-à-vis de la prise alimentaire est présenté en figure 1.12.

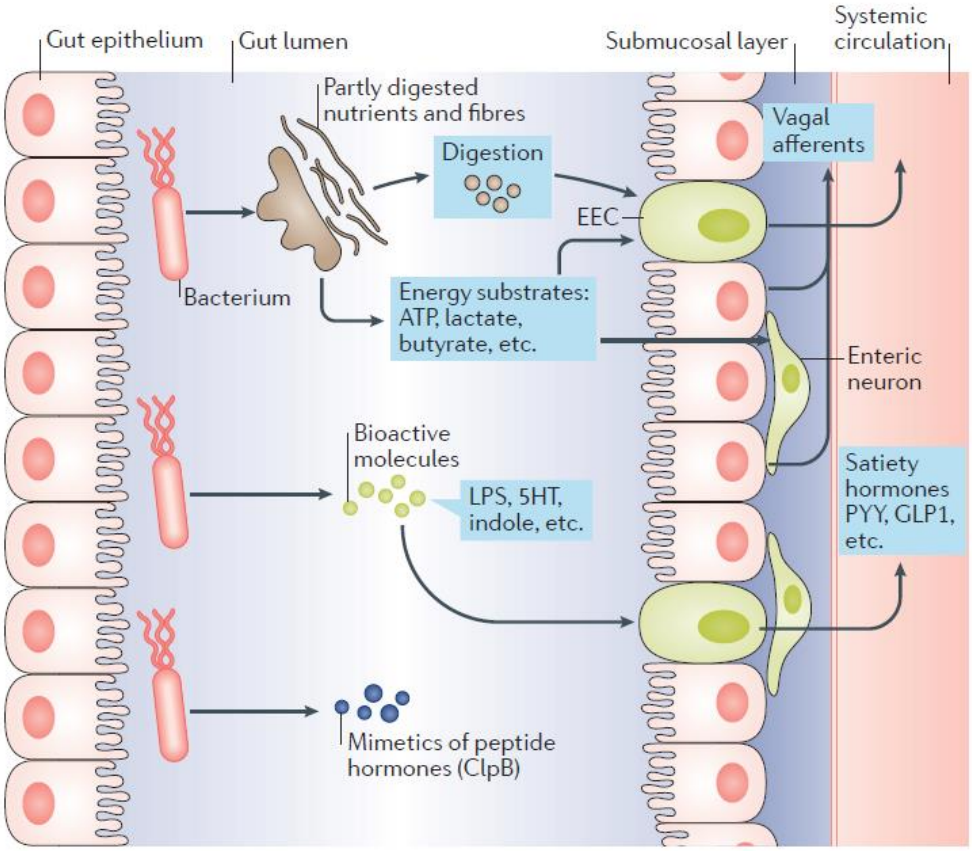


Figure 1.12. Mécanismes d'interaction entre le microbiote intestinal et l'épithélium intestinal vis-à-vis de la prise alimentaire. Les bactéries sont capables de fermenter les fibres et digérer les nutriments des aliments pour produire des molécules telles que les AGCC qui agissent comme substrat énergétique pour activer les cellules entéroendocrines (EEC). D'autres molécules bioactives telles que le LPS dans le cadre de l'inflammation ou la sérotonine (5-HT) induisent la sécrétion d'hormones satiétogènes. Certains métabolites bactériens agissent comme des mimétiques d'hormones de l'hôte, le plus connu étant ClpB. D'après [279].

3. La régulation de la prise alimentaire liée à l'inflammation induite par une hyperperméabilité intestinale

La consommation de WD sur le long terme engendre une dysbiose du microbiote intestinal associée à une augmentation de la perméabilité intestinale (Figure 1.13). Les variations de perméabilité intestinale à très court terme en réponse au WD sont moins claires, avec une étude qui a mesuré que la perméabilité paracellulaire chez le rat Wistar est significativement augmentée dans l'iléon après 1 semaine de WD (45% de lipides) et dans le colon après 3 semaines ainsi que la perméabilité transcellulaire dans le caecum et le colon après 3 et 6 semaines de WD [374]. En parallèle, la concentration plasmatique en LPS-binding protein (LBP, une molécule indicatrice du passage de LPS dans la circulation sanguine) augmente après 3 semaines de consommation de WD. Cette augmentation de la perméabilité et de la LBP est associée à une augmentation significative de la prise alimentaire durant les deux premières semaines de WD (kcal/jour) par rapport aux rats sous régime standard [374]. La mise en place de l'inflammation de bas grade, caractéristique de l'obésité, et l'augmentation de la perméabilité intestinale sont liées dans plusieurs études [13, 375, 376]. Le microbiote, et particulièrement les bactéries Gram négatives, porteuses de LPS, sont capables de se fixer au récepteur TLR4, ce qui participerait à la mise en place de l'endotoxémie métabolique avec l'établissement d'une inflammation de bas grade [377].

Un lien entre les modifications du microbiote induites par la consommation de WD, barrière intestinale et neuro-inflammation a été suggéré récemment par Bruce-Keller *et al.* [378] qui est la première à mettre en évidence un lien entre le microbiote intestinal d'animaux rendus obèses par la consommation de WD et la neuro-inflammation. En effet, le microbiote intestinal de souris obèses a été transplanté dans un modèle de souris dont le microbiote est déplété par traitement antibiotique à large spectre. L'hypothèse d'une altération de la fonction de barrière intestinale a été émise suite à la diminution de l'expression des gènes codant les protéines de jonctions serrées chez les souris colonisées par le microbiote de souris obèses, et la neuro-inflammation déterminée par l'augmentation de l'expression d'*iba1* et de *tlr4* (sur cerveau entier) sans récapituler le phénotype d'obésité.

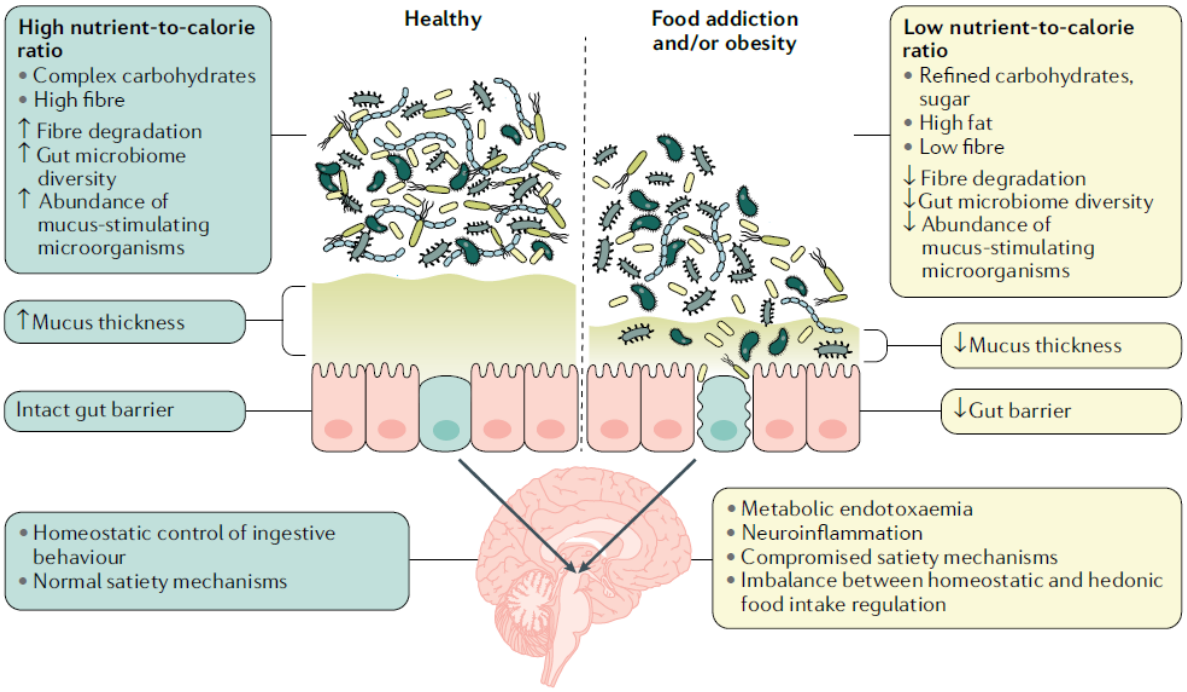


Figure 1.13. Schéma représentant comment l'altération de la barrière intestinale pourrait être à l'origine d'une neuroinflammation lors de la consommation d'un WD. La consommation à long terme de WD induit une dysbiose conduisant à la dégradation du mucus protecteur de la barrière intestinale et une augmentation de la perméabilité intestinale qui conduisent à une endotoxémie métabolique et une neuroinflammation impliqués dans la régulation de la satiété. D'après [312].

Les mécanismes qui sous-tendent la mise en place de la neuroinflammation hypothalamique lors du moment critique de transition d'un régime standard riche en fibres vers un WD sont mal connus. Son étude représente cependant une fenêtre de tir pour mettre en place des stratégies de prévention de l'obésité et du surpoids, puisque son intensité lors des premiers jours de consommation de WD est proportionnelle à la propension d'animaux à devenir obèses. Le microbiote intestinal commence à être reconnu pour son rôle dans le développement de la neuroinflammation mais ce rôle n'a pas été étudié lors de cette transition alimentaire. Ses variations de composition et d'activité durant cette phase critique, en parallèle de l'évolution de l'activité métabolique de l'hypothalamus en lien avec la neuroinflammation, peuvent fournir des pistes pour la découverte de mécanismes d'action du microbiote sur l'induction de l'inflammation hypothalamique. Plusieurs mécanismes d'interaction entre le microbiote et la régulation de la prise alimentaire ont déjà été identifiés. Les méthodes d'étude exploratoires en laboratoire sont coûteuses et chronophages compte tenu de la forte diversité des éléments à explorer lorsque l'on s'intéresse à l'action du microbiote sur la régulation de l'ingéré alimentaire. Des méthodes d'étude du microbiote intestinal sont continuellement développées pour permettre à la fois d'étudier davantage en profondeur l'impact d'un changement de régime sur la composition du microbiote ainsi que son éventuel impact sur l'hôte, notamment grâce à des outils de corrélations et d'intégration de données.

CHAPITRE 2
OBJECTIFS GENERAUX

Objectifs généraux de la thèse

Nous sommes continuellement exposés à des stimuli visuels et gustatifs qui nous poussent à consommer des aliments ultra-palatables, gras et sucrés, disponibles en grande quantité et à bas prix, qui induisent le surpoids et l'obésité. Le passage d'un régime équilibré à un régime gras et sucré sur du court terme est donc fréquemment rencontré au cours de nos vies. La réponse centrale suite à l'ingestion d'aliments palatables constitue ainsi une des pistes de compréhension de la sensibilité des individus à devenir obèses ou en surpoids [47, 48, 379–381]. Plusieurs études au cours de ces dernières années ont montré l'implication du microbiote intestinal dans la régulation du comportement alimentaire [279, 288, 364, 369, 382]. De plus, la composition et le métabolisme bactériens varient rapidement en fonction du régime alimentaire [236, 273–275]. Cependant, l'implication du microbiote dans la régulation du comportement alimentaire à court terme suite à l'ingestion d'aliments palatable est peu connu dans un contexte normo-pondéral. **L'objectif global de ce projet de thèse était donc de déterminer si le microbiote intestinal, par sa variation de composition et/ou d'activité, est capable d'influencer la régulation de la prise alimentaire chez le rongeur lors du passage d'un régime standard à un WD et si oui, dans quelle mesure et par quel(s) mécanisme(s)**.

La transition d'un régime équilibré riche en fibres et pauvre en lipides vers un régime gras et sucré s'accompagne d'une inflammation hypothalamique [138, 141, 157, 159, 160, 162, 164, 165, 193]. L'inflammation semble participer à l'hyperphagie induite lors de l'introduction d'un aliment gras et sucré chez le rongeur [156–158, 174]. Cette première phase d'hyperphagie semble elle-même liée à la mise en place sur le long terme de l'obésité chez ces animaux [164, 165]. Les mécanismes induisant cette inflammation hypothalamique ne sont pas tous identifiés et un rôle du microbiote intestinal peut être soupçonné dans sa mise en place. En effet, de nombreuses études ont montré un lien entre l'inflammation centrale et la dysbiose du microbiote intestinal en dehors du contexte de la régulation du comportement alimentaire [219, 383, 384]. **Le premier objectif de cette thèse était d'évaluer l'implication des variations de composition et d'activité du microbiote intestinal dans l'inflammation hypothalamique.** Cette partie a fait l'objet d'un article publié en ligne le 13/03/2021 dans la revue International Journal of Obesity.

L'alternance de la consommation d'un régime gras et sucré et d'un régime équilibré, fréquemment rencontrées dans nos modes de vie, induisent une prise de poids plus rapide chez le rongeur. Le comportement alimentaire sous WD des rongeurs soumis à plusieurs alternances de consommation d'un régime standard et d'un WD s'exacerbe avec

notamment une augmentation de l'ingéré alimentaire [385, 386]. Cette prise de poids, jusqu'à atteindre un phénotype obèse, est accompagnée de la présence d'un microbiote intestinal persistant, qui pourrait être impliqué dans ce regain de poids [246]. De plus, l'inflammation centrale joue un rôle dans la prise alimentaire lors de la transition d'un régime standard vers un WD. Cependant, l'impact de l'alternance de plusieurs cycles de WD sur la réponse inflammatoire centrale liée à la régulation de la prise alimentaire est inconnu, tandis que l'inflammation périphérique est modifiée dans ce contexte et joue un rôle dans le regain de poids qui suit une nouvelle consommation de WD [387, 388]. **Un second objectif a donc consisté à évaluer l'impact de plusieurs expositions à un régime gras et sucré entrecoupées par la consommation d'un régime équilibré sur la composition du microbiote intestinal en lien avec la réponse centrale qui régit la prise alimentaire (hédonique, homéostatique et inflammatoire)**. Un article en anglais non publié a été rédigé dans le cadre de cet objectif.

Dans l'hypothèse où le microbiote intestinal joue un rôle dans la réponse à l'introduction d'un régime gras et sucré, celui-ci pourrait être un marqueur prédictif de la réponse comportementale lors du changement de régime. **Un troisième objectif consistait à évaluer si la composition initiale du microbiote intestinal avant le changement de régime pouvait être prédictive de la prise alimentaire à très court terme**. Les résultats de cet objectif sont présentés sous la forme d'un article rédigé en français.

Bien que de nombreuses études aient montré un lien entre le microbiote intestinal et la régulation centrale du comportement alimentaire, tous les mécanismes expliquant ce lien n'ont pas été découverts. En particulier, les mécanismes issus du microbiote intestinal suite à un changement de régime qui peuvent être impliqués dans la réponse centrale qui régule la prise alimentaire pourraient permettre d'orienter vers de nouvelles pistes de soin et de prévention de l'obésité. **Le quatrième objectif de cette thèse a donc été de déterminer quelles voies de communication entre le microbiote et le cerveau sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire à court terme lors de l'exposition à un régime gras et sucré**. Ce quatrième objectif a fait l'objet d'une partie rédigée en français.

CHAPITRE 3
RESULTATS

I. Détermination de la réponse à court terme de l'axe microbiote-intestin-cerveau à un régime Western Diet et ses conséquences sur le comportement alimentaire chez le rongeur

La disponibilité quasi permanente et l'offre alimentaire actuelle (aliments gras et sucrés à haute densité calorique) sont des facteurs influençant les comportements alimentaires et qui participent largement à l'épidémie d'obésité et de surpoids. Ainsi, dans le contexte nutritionnel actuel, il est fréquent que les individus mangent régulièrement, voire exclusivement, des aliments à forte densité calorique conduisant à un excès d'apport calorique. La compréhension des mécanismes de dérégulation du comportement alimentaire aboutissant à une telle hyperphagie chez les individus consommant ce type d'aliment est nécessaire dans la lutte contre le surpoids et l'obésité.

Comme rappelé dans l'introduction, l'inflammation hypothalamique qui se met en place dès la première semaine de consommation de WD (régime riche en gras et sucres et pauvre en fibres) est un événement précoce qui précède la mise en place de l'obésité chez le rongeur. Cette inflammation hypothalamique participe à la régulation de prise alimentaire durant la première semaine de consommation de WD et est liée à la propension des animaux à devenir obèses sur le long terme [47, 48, 153]. S'intéresser à l'hypothalamus et à la mise en place de son inflammation précoce constitue donc une piste intéressante pour comprendre les mécanismes de développement de l'obésité. L'adaptation du microbiote aux changements de régime alimentaire, notamment à l'introduction de WD, est également très rapide [273, 275] tandis que des altérations de la composition du microbiote intestinal ont déjà été corrélées à une augmentation de l'inflammation du système nerveux central dans des contextes autres que l'obésité [219, 383]. Nous émettons donc **l'hypothèse que le microbiote participe à la mise en place de l'inflammation hypothalamique précoce en réponse au WD**. Pour répondre à cette question, nous proposons d'étudier l'évolution de l'axe microbiote-hypothalamus en réponse au passage d'un régime standard riche en fibres à un WD chez le rat. Pour cela, l'étude simultanée de la réponse à court terme du microbiote (composition et activité métabolique) et de l'hypothalamus lors du passage d'un régime standard (riche en fibres riche en énergie) à un WD a été réalisée.

Dans cette étude, un premier objectif consistait à confirmer que la prise alimentaire durant la première semaine de consommation de WD était bien liée à la mise en place de l'obésité sur le long-terme, en la corrélant à certains paramètres caractéristiques de celle-ci. Pour cela, une première expérience a été menée chez des rats soumis à un régime chow ou à un WD pendant 6 semaines. Les paramètres d'obésité (poids corporel et indice d'adiposité viscérale) ainsi que l'endotoxémie métabolique ont été corrélés à l'ingéré alimentaire de la première semaine de consommation de WD (Figure 1). D'après les

résultats de cette première expérience, **l'ingéré calorique durant la 1ère semaine de WD est corrélée positivement et significativement à la propension des animaux à devenir obèses, mais également à l'endotoxémie métabolique**.

Une seconde expérience a été menée chez des rats Wistar pour déterminer comment l'axe microbiote-hypothalamus évoluait à court terme en réponse à l'introduction de WD. Les animaux ont été euthanasiés sous régime standard juste avant passage au WD (T0) ou bien 2h (T2H), 1 jour (TD1), 2 jours (TD2) et 4 jours (TD4) après changement de régime. Le métabolome hypothalamique et le métabolome caecal ont été évalués pour ces 5 temps ainsi que la composition du microbiote caecal (séquençage de l'ADNr 16S). Les trois jeux de données ont été analysés séparément puis une intégration de données a été menée entre eux pour déterminer des liens potentiels entre l'évolution de la composition et de l'activité du microbiote caecal et l'adaptation hypothalamique à court terme en réponse au changement de régime. L'analyse métabolomique de l'hypothalamus au cours du changement de régime a montré une évolution très rapide du métabolome (dès 2h) avec notamment la modification de plusieurs marqueurs métaboliques du stress oxydant, suggérant une mise en place de ce dernier en amont de l'inflammation (Figure 2A et 2B). Le microbiote caecal était également rapidement impacté, dès 1 jour de WD (Figure 3A), avec une composition évoluant vers un environnement bactérien pro-inflammatoire caractérisé par une augmentation significative de l'abondance relative de bactéries de familles appartenant au phylum des Protéobactéries, des bactéries Gram$^+$ qui présentent du LPS caractéristiques de certaines maladies inflammatoires intestinales (Figure 3B). **L'intégration de données a permis d'identifier des groupes de bactéries, co-évoluant ensemble en réseaux, corrélés à l'augmentation du stress oxydant hypothalamique et à certains métabolites caecaux (Figure 4).** Ces bactéries étaient différentes de celles identifiées par l'analyse multivariée classique, ce qui montre que l'approche intégrative que nous avons utilisée est un outil complémentaire à l'approche classique qui permet d'identifier de nouveaux acteurs bactériens potentiels dans les processus étudiés. Parmi les métabolites caecaux, 6 ont été identifiés comme des métabolites candidats liant potentiellement le microbiote à la mise en place du stress oxydant hypothalamique (Figure 4). L'identification de ces métabolites n'a pas été possible jusqu'à présent mais ils constituent une piste pour évaluer par la suite le(s) mécanisme(s) via le(s)quel(s) le métabolome caecal, reflétant l'activité du microbiote caecal, pourrait réguler précocement le stress oxydant hypothalamique. De plus, plusieurs groupes de bactéries caecales ont été identifiés comme potentiellement impliqués dans la mise en place de l'inflammation hypothalamique. Toutefois, il n'est pas possible *in vivo* d'enrichir ou de dépléter spécifiquement le microbiote des animaux de ces bactéries (*via* l'utilisation d'antibiotiques ou de bactériophages par exemple). C'est pourquoi, afin d'évaluer le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de la prise alimentaire lors du changement de régime, une troisième expérience a été menée chez des rats axéniques dépourvus de microbiote intestinal.

Dans une troisième expérience, des rats axéniques ou avec un microbiote conventionnel ont été nourris soit avec un régime standard, soit avec un WD pendant 2 jours. Leur ingéré alimentaire a été mesuré quotidiennement et leur hypothalamus a été prélevé après euthanasie pour évaluer les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant et dans l'inflammation hypothalamique. Après deux jours de WD chez les rats avec un microbiote conventionnelle, des signes de stress oxydant (augmentation de *sod2* et de *glrx*) et d'inflammation hypothalamique (augmentation d'*il-6*) au niveau moléculaire ont été détectés (Figure 5B et 5C). Cette augmentation n'est pas retrouvée chez les rats axéniques, pour lesquels l'ingéré alimentaire après 1 jour de consommation de WD est significativement moins élevé (Figure 5A), ce qui suggère que **le microbiote intestinal joue un rôle dans la mise en place de ce stress oxydant et le début de l'inflammation hypothalamiques ainsi que dans la régulation de la prise alimentaire lors du passage à un WD**.

Dans ce premier article, nous avons donc montré que le passage d'un régime standard à un WD entrainait une évolution très rapide, dès 1 jour, de la composition du microbiote caecal vers un contexte pro-inflammatoire et en parallèle l'augmentation de marqueurs du stress oxydant au niveau hypothalamique qui pourrait être précurseur de l'inflammation hypothalamique. Notre approche par intégration de données suggère des liens de corrélation entre des sous-écosystèmes bactériens et des métabolites du stress oxydant au niveau hypothalamique. Ces liens microbiote-stress oxydant hypothalamique passent par 6 métabolites caecaux non identifiés. L'utilisation d'un modèle axénique nous a permis de confirmer le rôle du microbiote dans ce stress oxydant ainsi que dans la régulation précoce de la prise alimentaire, lors de la phase d'hyperphagie.

Cette première étude indique donc que **le microbiote est impliqué dans la réponse hypothalamique à court terme lors du passage à un WD**. Cependant, les modifications de microbiote induites par le changement d'aliment n'expliquent pas l'ensemble du phénotype d'adaptation des animaux au régime WD puisque les rats axéniques dépourvus de microbiote montraient quand même une hyperphagie transitoire, bien que moindre que celles des rats à flore conventionnelle.

International Journal of Obesity
https://doi.org/10.1038/s41366-021-00796-4

ARTICLE

Physiology and Biochemistry

Dietary switch to Western diet induces hypothalamic adaptation associated with gut microbiota dysbiosis in rats

Mélanie Fouesnard[1] · Johanna Zoppi[2] · Mélanie Petera[3] · Léa Le Gleau[4] · Carole Migné[3] · Fabienne Devime[4] · Stéphanie Durand[3] · Alexandre Benani[5] · Samuel Chaffron[6,7] · Véronique Douard[4] · Gaëlle Boudry[1]

Received: 3 June 2020 / Revised: 1 February 2021 / Accepted: 23 February 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

Abstract

Background Early hyperphagia and hypothalamic inflammation encountered after Western diet (WD) are linked to rodent propensity to obesity. Inflammation in several brain structures has been associated with gut dysbiosis. Since gut microbiota is highly sensitive to dietary changes, we hypothesised that immediate gut microbiota adaptation to WD in rats is involved in inflammation-related hypothalamic modifications.

Methods We evaluated short-term impact of WD consumption (2 h, 1, 2 and 4 days) on hypothalamic metabolome and caecal microbiota composition and metabolome. Data integration analyses were performed to uncover potential relationships among these three datasets. Finally, changes in hypothalamic gene expression in absence of gut microbiota were evaluated in germ-free rats fed WD for 2 days.

Results WD quickly and profoundly affected the levels of several hypothalamic metabolites, especially oxidative stress markers. In parallel, WD consumption reduced caecal microbiota diversity, modified its composition towards pro-inflammatory profile and changed caecal metabolome. Data integration identified strong correlations between gut microbiota sub-networks, unidentified caecal metabolites and hypothalamic oxidative stress metabolites. Germ-free rats displayed reduced energy intake and no changes in redox homoeostasis machinery expression or pro-inflammatory cytokines after 2 days of WD, in contrast to conventional rats, which exhibited increased SOD2, GLRX and IL-6 mRNA levels.

Conclusion A potentially pro-inflammatory gut microbiota and an early hypothalamic oxidative stress appear shortly after WD introduction. Tripartite data integration highlighted putative links between gut microbiota sub-networks and hypothalamic oxidative stress. Together with the absence of hypothalamic modifications in germ-free rats, this strongly suggests the involvement of the microbiota-hypothalamus axis in rat adaptation to WD introduction and in energy homoeostasis regulation.

Introduction

Obesity is the consequence of prolonged disruption of energy homoeostasis and hedonic/reward control of appetite [1], mainly regulated by the coordinated action of many brain

These authors contributed equally: Véronique Douard, Gaëlle Boudry

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41366-021-00796-4.

✉ Gaëlle Boudry
gaelle.boudry@inrae.fr

1 Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes, Rennes, France

2 TENS U1235, INSERM, Nantes, France

3 Clermont Auvergne University, INRAE, UNH, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, MetaboHUB Clermont, Clermont-Ferrand, France

4 Institut MICALIS, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

5 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Unité Mixte de Recherche 6265—Centre National de la Recherche Scientifique 13241—Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Université de Bourgogne, Dijon, France

6 Université de Nantes, CNRS (UMR6004), LS2N, Nantes, France

7 Research Federation (FR2022) Tara Oceans GO-SEE, Paris, France

Published online: 13 March 2021

regions including the brainstem, the hypothalamus and cortical or subcortical brain areas [1]. Among them, the hypothalamus integrates internal peripheral signals mostly from the gastrointestinal tract as well as from adipose tissue or pancreas [2]. It also integrates brainstem information originating from the vagus nerve and circulating peripheral signals to adapt energy intake and/or energy expenditure [3–6].

In rodents, long-term consumption of a Western diet (WD), i.e. a low-fibre, high fat and sugar diet, as opposed to a well-balanced diet (chow), leads to the development of obesity and metabolic disorders. However, this long-term condition is preceded by an asymptomatic period characterised by metabolic and behavioural adaptations to the acute dietary switch from chow to WD [7]. Indeed, although continuous exposure to WD leads to either no effect on energy intake [8, 9], hyperphagia in some studies [10, 11] or sporadic spikes of hyperphagia in others [12], the initial eating behaviour upon WD introduction is highly reproducible. Rodents exhibit a 1-day hyperphagic phase, due to the palatability of the diet [13], followed by a progressive normalisation of energy intake within a week [7, 14, 15]. At the hypothalamic level, major changes are observed, including molecular signatures of modified cell interactions, synaptogenesis and increased anorexigenic tone due to pro-opiomelanocortin neurons rewiring and neurogenesis [7, 16]. Moreover, 1–3 days of WD consumption induces hypothalamic inflammation, as demonstrated by increased mRNA levels of pro-inflammatory cytokines [17, 18]. In mice, this early phase is immediately followed by reactive gliosis, i.e. astroglial and microglial activation [19–21], likely limiting neuronal injury during this initial phase. Despite the resolution of hypothalamic inflammation within the week following WD introduction, continuous WD feeding will ultimately lead to a chronic and sustained inflammation in the hypothalamus [17, 21]. Interestingly, diet-induced obesity (DIO)-resistant mice display early hypothalamic inflammation and gliosis but with a lesser intensity [19] and a different pattern compared to DIO-prone mice [22]. Thus, greater intensity and/or altered resolution of early WD-induced hypothalamic inflammation could trigger later metabolic alterations. Furthermore, reduced hypothalamic microglia expansion prevents the characteristic increase in energy intake during the first week of WD consumption [23], suggesting that early hypothalamic inflammation is involved in the hyperphagia observed upon WD introduction. Likewise, the intensity of this early hyperphagic phase seems predictive of rodent obesity propensity on the long term [24, 25].

The factors initiating hypothalamic inflammation during short-term WD are ill defined. Several in vitro studies reported a direct action of nutrients such as saturated fatty acid and glucose in initiating pro-inflammatory cytokines release in various brain cell types [26, 27]. A proteomic analysis of mice hypothalami after 3 days on WD reported changes in proteins involved in cellular stress and mitochondrial function, indicative of oxidative stress [28]. Oxidative stress and inflammation are closely related pathophysiological processes, one of which can be easily induced by another. Reactive oxygen species (ROS) generated in brain tissues can modulate synaptic and non-synaptic communication between neurons and result in neuro-inflammation and cell death [29]. Thus, early oxidative stress may play a role in the induction of hypothalamic inflammation. A role for gut microbiota is also suspected. Indeed, several studies suggested a link between gut dysbiosis and inflammation in several areas of the brain [30, 31]. Faecal transfer from anxiety- and depression-like behaviours prone rats that exhibited gut dysbiosis and ventral hippocampus inflammation recapitulated rats behaviour and central inflammation [32], suggesting a possible causal link between gut dysbiosis and central inflammation. In the hypothalamus, no such relationship has been proved so far but a recent study in obese patients highlighted a significant association between hypothalamic inflammation, evaluated by magnetic resonance imaging and specific gut microorganisms [33]. Long-term WD consumption induces a decrease in gut microbiota diversity and profound compositional changes [8, 34]. Short-term adaptation of the gut microbiota to the WD switch is also expected since gut microbiota is highly responsive to acute dietary changes. Indeed, 8 h under WD are sufficient to induce significant composition changes in human microbiota-colonised mice [35]. Thus, we hypothesised that acute dietary switch from chow to WD results in early changes in microbiota composition and/or function that participates directly or indirectly to early hypothalamic inflammation in rats. To test this hypothesis, we determined how hypothalamic response as well as the gut microbiota composition and activity evolved during the first days following WD exposure, using 16S rRNA gene sequencing and caecal content and hypothalamic metabolomics analysis in conventional rats. Data integration tools were then used to highlight the potential links between microbiota changes and hypothalamic metabolic pathways associated to a pro-inflammatory context. Lastly, we used germ-free rats to investigate the potential connection between the gut microbiota and the early adaptation of hypothalamus to WD.

Methods

Animals

Animal protocols received written agreement from local ethics committees (Institutional Animal care and Use Committee UC Davis (experiment 1), APAFIS#2015102618593445 (experiment 2) and APAFIS#903–2015061809202358V3.33

(experiment 3)). Sample size was estimated following previous experiments, according to the variability of obtained results for each type of analysis. Animals were randomised in groups of similar body weight at the beginning of each experiment. No blinding was done during animal experiments, but the samples treatment was blinded. For all experiments the rats were housed individually under a 12:12 h light/dark cycle and maintained at 22 ± 2 °C. The light cycle was 7 a.m.–7 p.m. The animals were euthanized between 9 a.m. and 12 a.m.

Experiment 1

Ten male Wistar rats (9 weeks old, Harlan San Diego) had ad libitum access to water and chow diet (Purina Lab Diet 5001 rodent diet, fat 13% of energy, Supplementary Table 1). After acclimatisation period (1 week), rats were divided in two groups and fed ad libitum either chow or WD (Research Diet 12451, New Brunswick, USA, fat 45% of energy, Supplementary Table 1) for 6 weeks. Food intake (kcal and kcal g^{-1} of body weight per day) and body weight were measured weekly. After 6 weeks, rats were fasted overnight before euthanasia. Whole-blood glycemia was evaluated using Accu-check. Plasma was obtained by centrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C) and stored at −80 °C. Fat pads (mesenteric, epididymal and retroperitoneal fat) were dissected and weighted to evaluate visceral adiposity.

Experiment 2

Thirty-three Wistar male rats (8–9 weeks old; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) had ad libitum access to water and chow diet (Special Diets Services, Rat and Mouse no. 3 Breeding, Special Diet Service; Witham, UK, fat 11.5% of energy, Supplementary Table 1) during 1 week of acclimatisation. Then, 26 rats switched to a commercialised WD (Research Diet 12451 Supplementary Table 1). Food consumption (kcal and kcal g^{-1} of body weight per day) and body weights were recorded daily. Food intake was expressed as a percentage of the control food intake (the mean of the daily food intake during the 3 days preceding dietary change) for each animal. Groups of 6–7 rats were euthanized either before the dietary switch (T0) or 2 h (T2H), 1 (TD1), 2 (TD2) and 4 days (TD4) after WD introduction. Animals were fasted for 12 h then fed for 2 h with their respective diet before euthanasia. The 2 h-food intake was similar among the various WD-fed and chow-fed groups. Hypothalami and caecal contents were sampled and stored at −80 °C.

Experiment 3

Nine germ-free (obtained from the germ-free rodent facility Anaxem, Micalis Institute, France) and ten conventional male Fisher rats (Charles River, Arbresle, France) aged 8 weeks were housed individually for 3 weeks for acclimatisation in sterile and non-sterile incubators, respectively. Environmental sampling followed by bacterial culture tests were performed regularly to assess sterility. During acclimatisation, rats were fed sterilised (45kGy irradiation) chow (SAFE A03; Safe, Augy, France, fat 13.5% of energy, Supplementary Table 1) and sterilised water ad libitum. Germ-free and conventional rats were then divided into two groups receiving either irradiated chow or irradiated WD (45kGy irradiation) (SAFE 245HF, Safe, Augy, France, fat 45.9% of energy, Supplementary Table 1) for 2 days. Food intake of the four groups (kcal and kcal g^{-1} of body weight per day) was recorded by weighting the food every 24 h. The animals had access to food until euthanasia. After euthanasia, hypothalami were stored in RNA-later buffer at −80 °C before gene expression analysis and CONV rats caecal contents stored at −80 °C.

Plasma lipopolysaccharides binding protein (LBP)

Plasmatic LBP levels were determined via ELISA kit according to the manufacturer's recommendations (Biometec, Greifswald, Germany).

Determination of caecal microbiota composition

Total DNA extraction and V3–V4 PCR were performed as already described [36].

Hypothalamus and caecal content metabolomic profiles

Frozen hypothalami were analysed by mass spectrometry (ultra-high-performance liquid chromatography/tandem accurate mass spectrometry) performed by Metabolon Inc. (Durham, USA) (details in Supplementary methods 1). Caecal water samples were obtained from caecal contents as described in Supplementary methods 2. Untargeted caecal metabolomics profiles were acquired using gaz chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometer (QToF 7200; Agilent) (INRAE, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, MetaboHUB Clermont, Clermont-Ferrand, France) as described previously [37]. Data were processed under the Galaxy web-based platform Workflow4Metabolomics [38] to yield a data matrix containing variables (retention times, *m/z* ratio) and peak intensities corrected for batch effects (details in Supplementary methods 1).

Hypothalamic gene expression levels

Total RNA extraction, reverse transcription and qPCR from hypothalami of germ-free animals and their conventional

controls were performed as described previously [39]. Expression levels of genes were determined by qPCR using SYBR Green chemistry or TaqMan gene expression assays (Supplementary Table 2).

Relative expression levels of target genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, considering the geometric mean of housekeeping genes to determine the ΔC_T and the chow-fed conventional and germ-free rats group as reference groups to determine the $\Delta\Delta C_T$ for the conventional and the germ-free groups, respectively. Samples were excluded when considered as outliers following Dixon statistical test.

Statistics and data integration

Statistical analysis in experiments 1 and 3 were performed using Mann–Whitney tests between chow and WD groups and Spearman correlations using Prism GraphPad software v.7.00 (GraphPad Software, San Diego, USA). ANOVA or Kruskal–Wallis, followed by Tukey's or Dunn's HSD post hoc tests when significant, respectively, were used for experiment 2 when comparing time-groups, also using Prism GraphPad. Results were considered significant when $p < 0.05$.

Analyses of reads obtained after 16S rRNA gene sequencing from caecal content are detailed in Supplementary methods 3. PLS-DA were performed on normalised metabolomic data using the mixOmics R package v.6.10.1 and details of the analysis are provided in Supplementary methods 3. To perform data integration, the web application MiBiOmics [40], based on weighted correlation network analysis method (WGCNA) [41], was used and described in Supplementary methods 3.

Results

First week energy intake after dietary switch to WD was predictive of long-term obesity parameters

Several studies have shown that the intensity of the hyperphagic phase at normal weight following WD introduction is predictive of propensity to develop obesity on the long term [24, 25]. We confirmed that rats switched to WD displayed a first phase of increased energy intake followed by normalisation of energy intake (Fig. 1A (kcal g^{-1} of body weight) and Supplementary Fig. 1 (kcal)). After 6 weeks of WD, they exhibited greater body weight gain (Fig. 1B), final body weight (572 ± 15 vs. 513 ± 11 g, $p = 0.01$), visceral adiposity (5.8 ± 0.3 vs. $3.7 \pm 0.4\%$, $p = 0.002$), plasma LBP (0.63 ± 0.07 vs. 0.42 ± 0.04 µg ml^{-1}, $p = 0.02$) and a tendency for greater fasted glycemia (275.0 ± 46.7 vs. 166.6 ± 18.1 mg dl^{-1}, $p = 0.06$). We also confirmed that first week energy intake was positively correlated to final body weight (Fig. 1C) and visceral adiposity (Fig. 1D). Interestingly, first week energy intake was also positively correlated to fasted glycemia (Fig. 1E) and plasma LBP (Fig. 1F) measured at week 6. Thus, the intensity of this phase of increased energy intake upon dietary switch to WD seems predictive of later obesity parameters but also of metabolic and systemic inflammatory parameters.

The WD switch induced a rapid change in hypothalamic metabolomic profile and impacted hypothalamic pathways involved in redox homoeostasis and cell remodelling

We investigated the broad adaptation of the hypothalamus upon dietary switch to WD by analysing the evolution of hypothalamic metabolome at different time-points after a switch to WD in rats. Rats had a standard response in terms of energy intake and 4 days of WD resulted in an asymptomatic period without increase in visceral adiposity or body weight differences (Supplementary Fig. 2).

Multivariate analysis revealed that hypothalamic metabolome evolved very rapidly in response to WD. Indeed, T0 and T2H hypothalamic metabolomes were significantly different from each other's (Fig. 2A). The metabolic adaptation continued between T2H and TD1 and persisted after TD1 even if the changes were less severe than during the first 24 h following the diet switch (Supplementary Fig. 3). Metabolites significantly explaining the differences between times groups were selected according to their variable importance in projection (VIP) values, which represent how much they contribute to the obtained projection in Fig. 2A. The metabolites with criteria of VIP value >1 for the two first components emphasised that metabolomic changes occurred mainly in remodelling of cell membrane processes, arginine metabolism and hypothalamic redox homoeostasis system (Supplementary Table 3). Several metabolites of those pathways displayed significant levels variations or tendencies to vary across time, confirming their importance (Supplementary Table 4). First, WD introduction led to trending increase in oxidised glutathione (GSSG), suggestive of elevated oxidative stress (Fig. 2B). This was supported by significant changes in compounds involved in glutathione turnover suggesting hypothalamic redox homoeostasis impairment. The decrease in glutamate, glycine, 5-oxoproline and γ-glutamyl-tryptophan (γ-glutamyl-AA) indicated the use of the amino acids implicated in the glutathione synthesis and recycling while the significant increase in 2-hydroxybutyrate and ophthalmate suggested increased demand on the glutathione system. WD also led to a rapid and sustained increase in 13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid + 9-Hydroxy-10,12-octadecadienoic acid indicating a disruption of redox homoeostasis. The increase in homoarginine levels in association with a decrease in citrulline, ornithine and polyamines (putrescine, spermidine and spermine) suggested a modification of arginine metabolism

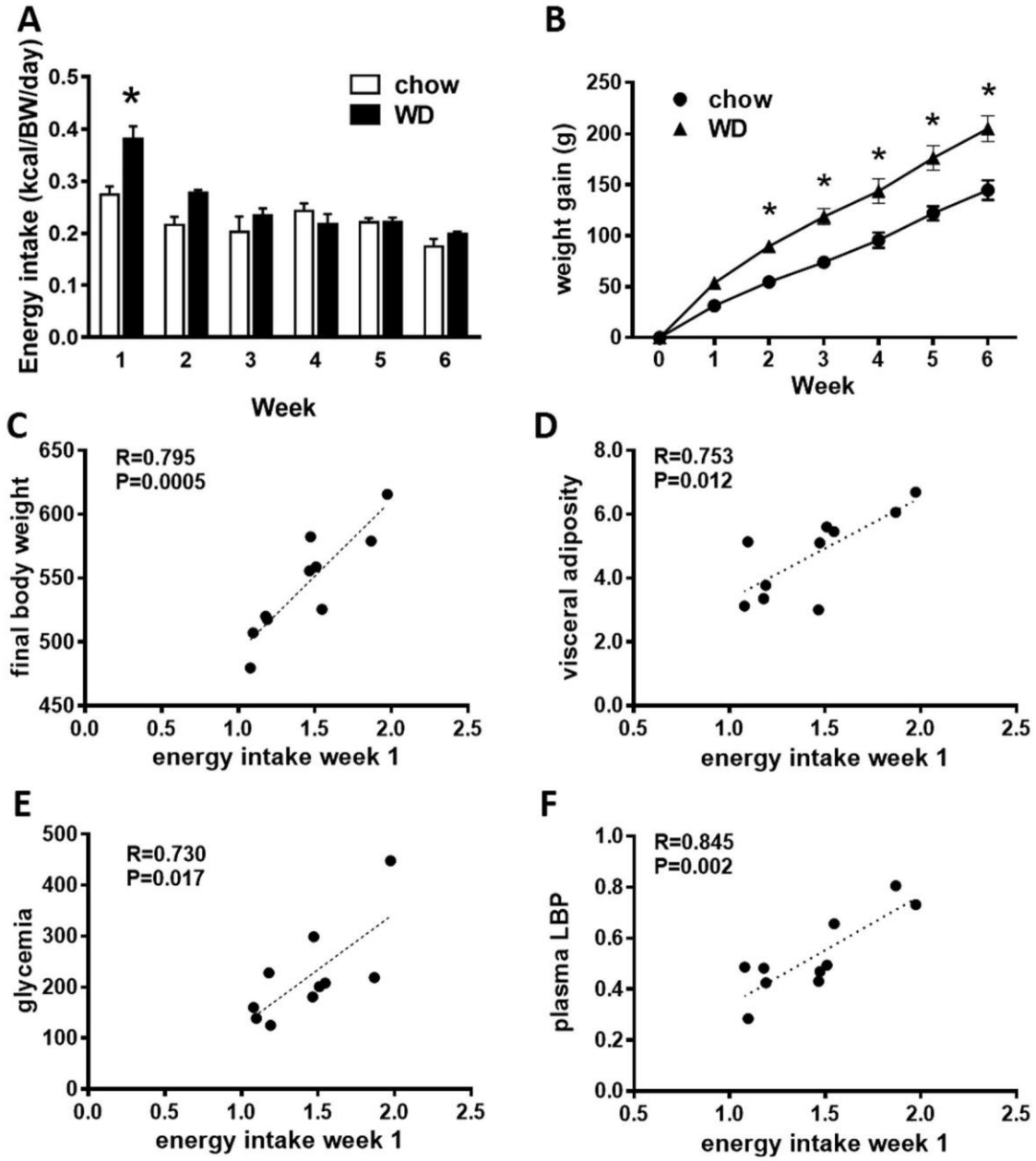


Fig. 1 First week energy intake after WD introduction is correlated to 6-week obesity phenotype. Energy intake (kcal/g of body weight/day) (**A**) and weight gain (**B**) after 6 weeks on WD or chow and correlations between first week energy intake and final body weight (**C**), visceral adiposity (**D**), fasted glycemia plasma LBP (**E**) and plasma LBP (**F**). Means ± SEM, $n = 5$/group, $^*p < 0.05$ (Mann–Whitney).

potentially interfering with nitric oxide (NO) synthesis (Fig. 2C). Membranes are primarily composed of glycerophospholipids conjugated to choline, ethanolamine, inositol and serine. The decrease in phosphocholine, phosphatidylcholine and acyl-glycerophosphorylcholine as well as the increase in diacylglycerol, cytidine 5′-diphosphocholine-choline, 5′-diphosphocholine -ethanolamine, cytidine monophosphate, glycerophosphorylcholine and glycerophosphorylethanolamine revealed some degree of membrane remodelling in the hypothalamus in response to WD (Fig. 2D).

The WD switch induced a rapid change in caecal microbiota composition and caecal content metabolomic profile

Multivariate analysis revealed that caecal microbiota composition evolved within 24 h after the first exposure to WD (Fig. 3A–C). Caecal microbiota composition, measured by Bray–Curtis β-diversity index (Fig. 3A), differed significantly from TD1 and onwards with significant differences between T0 or T2H and TD1, TD2 and TD4. The

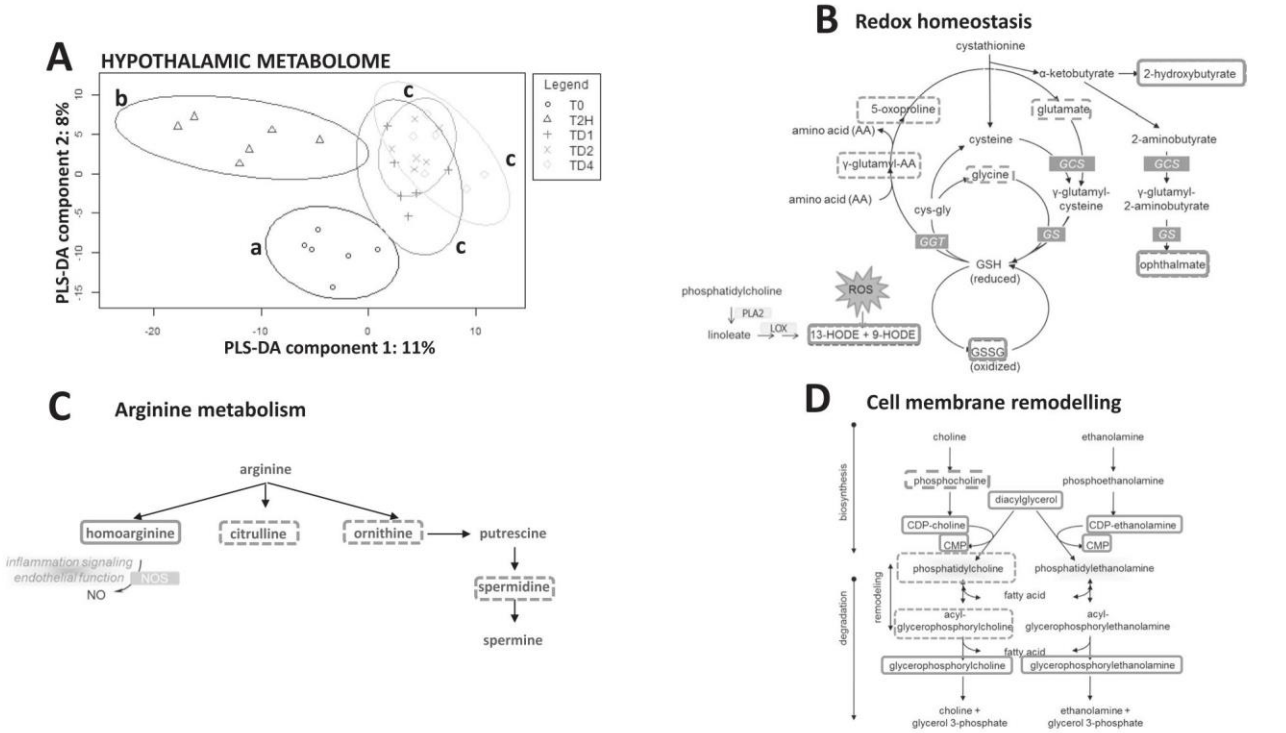


Fig. 2 Hypothalamic metabolome evolution during adaptation to WD in conventional rats. Evolution of hypothalamic metabolome represented by PLS-DA (first two components) after WD switch (**A**). Ellipses represent 95% confidence interval. $N = 6–7$/group. Different letters show significant differences (PERMANOVA between groups). Redox homoeostasis (**B**), arginine metabolism (**C**) and cell membrane remodelling (**D**) were impacted by the switch to WD according to pathway enrichment. Plain frame: significant increase and dotted frame: significant decrease.

Shannon index indicated a significant decrease in diversity starting from TD1 (Fig. 3A). At the phylum level (Supplementary Fig. 4) only Proteobacteria relative abundance increased significantly at TD1 when compared to T0 and T2H and did not vary significantly afterwards. Analysis of family relative abundance variations across time (Supplementary Table 5) revealed a significant increase in *Desulfovibrionaceae* (Proteobacteria phylum) and *Tannerellaceae* (Bacteroidetes phylum) from TD2 to TD4, while *Lactobacillaceae* (Firmicutes phylum) decreased significantly between T0/T2H and TD2/TD4 (Fig. 3B). Therefore, exposure to WD rapidly lowered gut microbiota diversity and shifted bacterial population towards a higher prevalence of "pro-inflammatory" bacteria. Caecal content metabolome analysis revealed marked significant changes in profile as soon as T2H and between T2H and TD1 (Fig. 3C) likely pointing out the influx of new food compounds into the lower gut. Despite a less severe evolution of the caecal metabolome after TD1, it kept changing afterward as indicated by the significant difference between TD1 and TD4 highlighting the adaptation of the microbiota and intestinal cell host metabolism to the WD.

Integrative network analysis revealed potential links between caecal microbiota and hypothalamic redox homoeostasis regulation

To unravel potential links between microbiota adaptation to WD and early hypothalamic oxidative stress, integrative network analysis was performed between microbiota composition, caecal metabolome and hypothalamic metabolome. Metabolites of redox homoeostasis pathway were among the best drivers of time group separation. We therefore identified hypothalamic sub-networks containing them using the MiBiOmics application (2-hydroxybutyrate and ophthalmate in one sub-network and 5-oxoproline and γ-glutamyl glycine in a second one). These two sub-networks were positively or negatively correlated to a caecal metabolomic sub-network (Fig. 4). This caecal metabolomic sub-network, as well as the two hypothalamic sub-networks, correlated positively and negatively to several caecal microbiota sub-networks. One was composed of 38 OTUs (Supplementary Table 6) and contained bacteria that correlated positively with hypothalamic ophthalmate and 2-hydroxybutyrate and negatively with 5-oxoproline and γ-glutamyl glycine through the previously mentioned caecal metabolites. OTUs correlating negatively

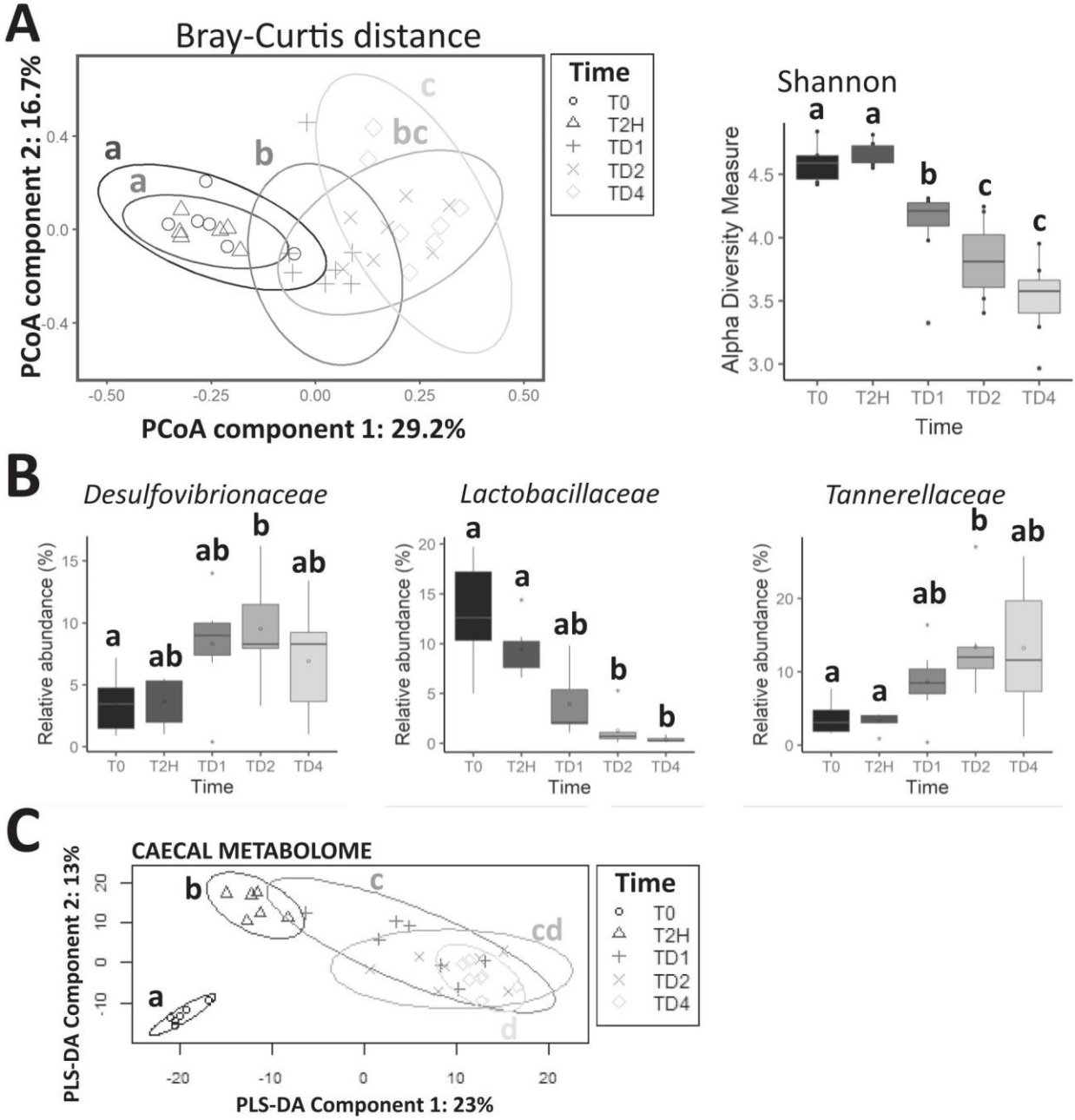


Fig. 3 Evolution of caecal microbiota diversity and composition during early adaptation to WD in conventional rats. Evolution of β-diversity (PCoA on Bray–Curtis distance) and α-diversity (Shannon index) (**A**) of *Desulfovibionaceae*, *Lactobacillaceae* and *Tannerellaceae* relative abundances (**B**) and of caecal content metabolome (represented by PLS-DA (first two components)) (**C**) at different time-points after a switch to WD. $N = 6–7$/group. Different letters indicate a significant difference after one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (Shannon, *Desulfovibrionaceae*) or Kruskal–Wallis followed by Dunn's post hoc test (*Lactobacillaceae*, *Tannerellaceae*). Data beyond the end of the whiskers were considered outliers (1 point = 1 sample). Outliers were not taken into account for statistical tests. Statistical significance is represented by lower case letters.

with ophthalmate and 2-hydroxbutyrate and positively with 5-oxoproline and γ-glutamyl glycine were members of four different microbiota sub-networks of various numbers of OTUs (from 12 to 241). Sub-networks of bacteria that were negatively correlated with hypothalamic oxidative stress markers were positively correlated with α-diversity indices.

Germ-free rats displayed lower energy intake and lower hypothalamic oxidative stress and inflammation activation after 2 days on WD

Data integration suggested that the link between hypothalamic oxidative stress and microbiota was driven by several

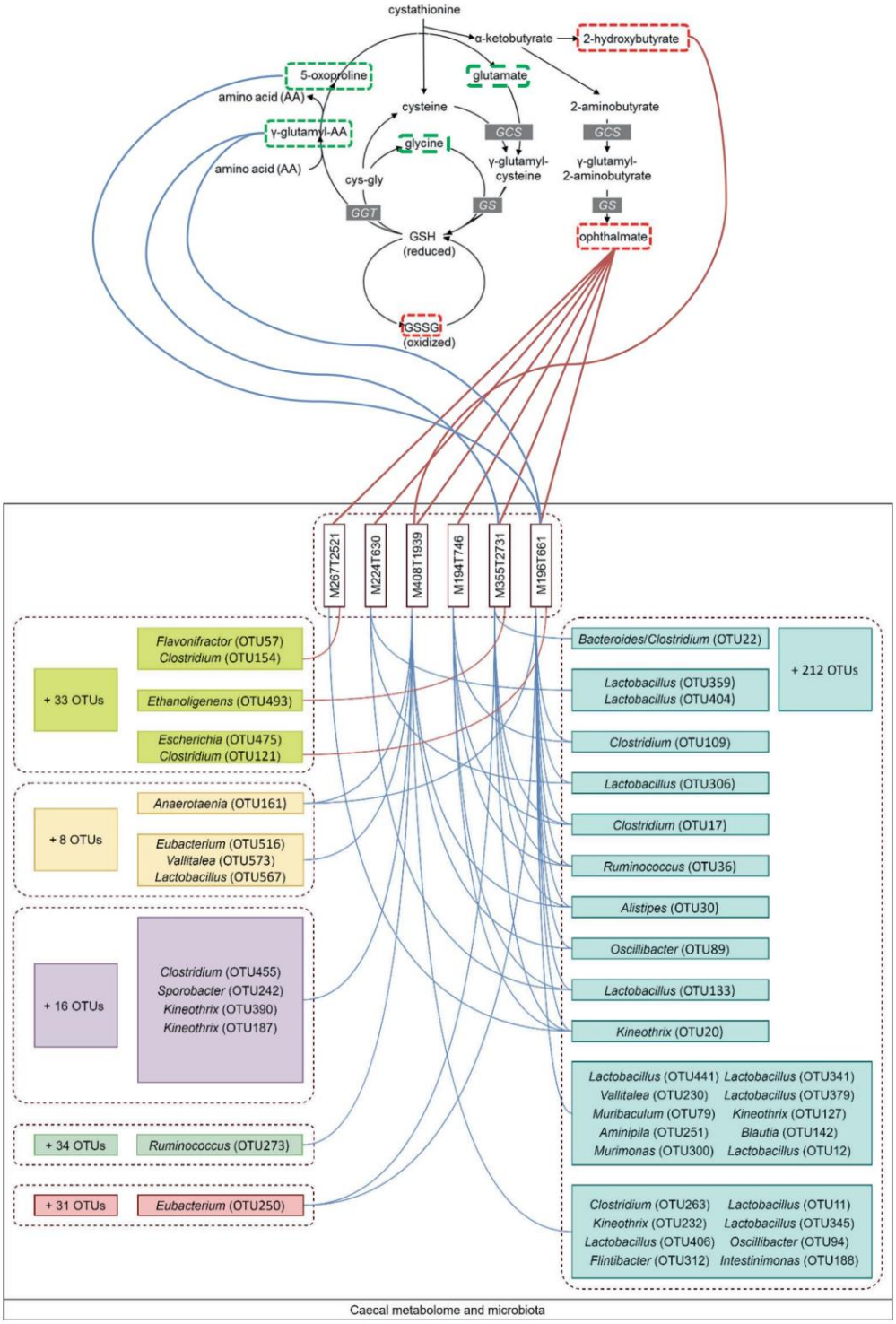


Fig. 4 Tripartite network showing links between caecal microbiota, caecal metabolome and hypothalamic oxidative stress. Pathway enrichment showing how redox homoeostasis is impacted by dietary switch is represented in the upper part of the figure. Correlations between hypothalamic metabolites, caecal metabolites and gut microbiota are showed with lines. Each sub-network is framed with dotted line. Each OTU is coloured according to their WGCNA sub-network. Each edge indicates a correlation between nodes with a correlation coefficient $|r| > 0.6$. A red edge indicates a positive correlation and a blue edge indicates a negative correlation. The total number of OTUs in each sub-network is framed with the network corresponding colour.

sub-networks of bacteria. Therefore, we used germ-free rats to investigate if removing microbiota signalling would alter early energy intake as well as hypothalamic oxidative and inflammatory response to WD. GF rats energy intake during the 5 days preceding WD introduction was not significantly different from that of CONV rats (0.26 ± 0.02 vs 0.26 ± 0.02 kcal g^{-1} of body weight, respectively). Similar to CONV rats, GF rats exhibited an increase in energy intake upon dietary switch to WD (Fig. 5A (kcal g^{-1} of body weight) and Supplementary Fig. 5 (kcal)). However, this increase was significantly lower in GF than in CONV rats ($p = 0.03$, Fig. 5A). Gut microbiota composition analyses in CONV rats showed a similar evolution to the one observed in experiment 2 (Supplementary Fig. 6) indicating a robust behavioural and microbial response to WD in the different experiments.

We then analysed the expression of several genes involved in hypothalamic redox homoeostasis. In CONV, but not in GF rats, mRNA levels of SOD2 and GLRX, involved in neutralisation of superoxide byproducts of oxidative phosphorylation in the mitochondria and reduction of disulfides in target proteins, respectively, were increased after 2 days of WD compared to chow diet ($p = 0.04$ and 0.02, respectively, Fig. 5B). This activation of redox maintenance machinery in CONV rats, but not GF ones, reinforces the idea that microbiota is involved in oxidative stress following the dietary switch to WD. Finally, we investigated the hypothalamic expression of pro-inflammatory cytokines. In CONV rats, IL-6 mRNA level, but not that of other cytokines or inflammatory markers, increased after 2 days of WD compared to chow ($p = 0.02$, Fig. 5C). In GF rats, none of these markers appeared altered.

Discussion

Oxidative stress: an early hypothalamic response to WD exposure

The hypothalamic response to short-term WD exposure at the metabolite scale revealed the immediate host response to the dietary switch, with the oxidative stress response being one of the main pathways quickly modified. First, disturbances in glutathione metabolism were observed after only 1 day of WD and the levels of oxidised glutathione increased after 2 days. The decreases in γ-glutamyl-AA and 5-oxoproline are probably due to their metabolism into glutathione in response to oxidative stress [42]. Ophthalmate, which markedly increased after 2 days of WD consumption, is also an oxidative stress biomarker linked to the glutathione metabolism [43]. Glutathione is the most important brain antioxidant and its alteration is known to contribute to neurodegenerative diseases [44]. Therefore, in the context of WD exposure, dysregulation of glutathione homoeostasis may be a key component involved in long-term impairment of hypothalamic functions. Increased homoarginine levels after 4 days of WD could also contribute to oxidative stress through ROS, NO or peroxynitrite formation [45]. Lastly, oxidative stress elevation is also confirmed at the molecular level by the increase in *sod2* and *glrx* expression levels after 2 days of WD consumption in conventional rats. These two genes encode antioxidant proteins and are overexpressed in response to oxidative stress elevation [46].

Acutely, production of physiological levels of ROS in the hypothalamus is necessary to maintain energy homoeostasis as they participate to brain lipid and glucose sensing [47, 48]. However, increased ROS level beyond physiological concentration can induce the production of transcription factors involved in inflammation [49]. Therefore, this early oxidative stress response could be one of the regulator of the early inflammation associated with WD consumption previously reported [22, 50].

Microbiota adaptation to WD: the setup of a pro-inflammatory intestinal environment

Caecal microbiota composition and activity were highly and rapidly impacted by the dietary switch. Caecal microbiota composition evolved towards a pro-inflammatory bacterial environment with an increase in *Desulfovibrionaceae* (Proteobacteria) relative abundance within 24 h. Proteobacteria as Gram-negative bacteria and *Desulfovibrionaceae* as sulfate-reducing bacteria contribute to inflammation in the intestinal epithelium [34, 51]. *Tannerellaceae* abundance increased in a similar manner. *Tannerellaceae* are endotoxin-producers and a member of this family, *Parabacteroides distasonis*, has been reported to be a microbial marker of inflammatory bowel disease in human [52]. Two days of WD consumption induced a drastic decrease of *Lactobacillaceae* relative abundance. *Lactobacillaceae*, and particularly members of the *Lactobacillus* genus, participate to the maintenance of intestinal barrier integrity by modulating tight-junction proteins expression [53]. Their decrease could contribute to bacteria and/or pro-inflammatory bacterial components passage across the intestinal epithelium, leading to systemic inflammation.

A potential link between specific bacteria and early hypothalamic oxidative stress following WD revealed by two different strategies: germ-free animals and data integration

Unlike in conventional rats, dietary switch from chow to WD in GF rats did not impact expression levels of genes

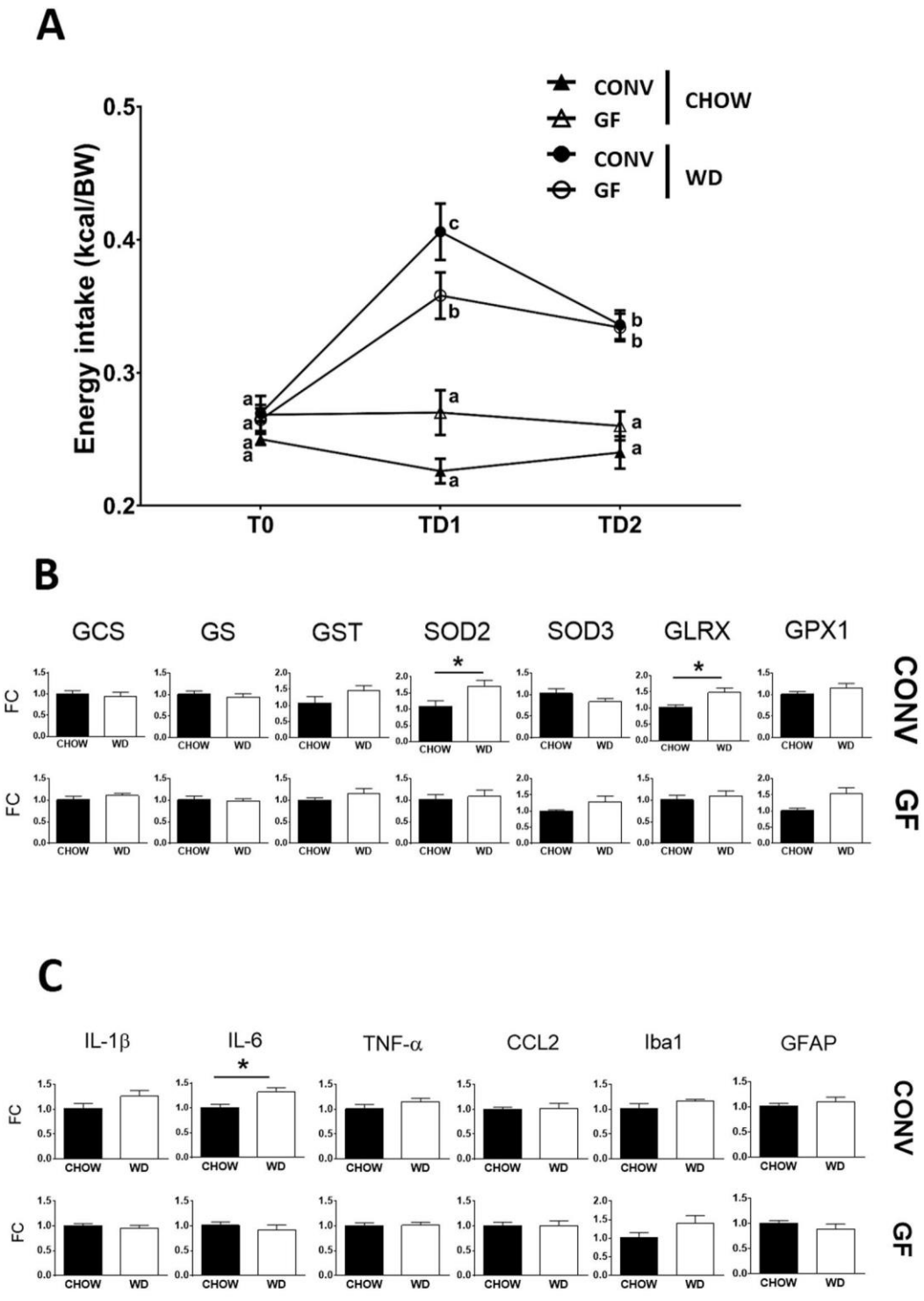


Fig. 5 Germ-free and conventional rat response to 2 days of WD consumption. Rats daily energy intake (kcal g of body weight/day) (**A**). Hypothalamic expression levels of genes involved in redox homoeostasis maintenance (**B**). Hypothalamic expression levels of genes involved in inflammation (**C**). Data are represented as means ± standard deviation, $n = 4$–5/group. For **A**, statistical significance is represented by lower case letters. For **B** and **C**, data were normalised within each microbial status according to the chow group and Mann–Whitney tests were performed for each gene between chow group and WD group.

involved in oxidative stress and inflammation. In conventional rats, the hypothalamic inflammatory response to WD remained modest since only IL-6 expression was upregulated. Hypothalamic inflammatory response to WD has also been associated by others to a modest increase in expression of IL-6 after 1 to 3 days of WD and no change in

IL-1β and TNF-α [17, 54, 55]. The lack of change in the GF rats suggests that the presence of gut microbiota participates to the early hypothalamic stress encountered shortly after WD introduction.

Data integration methods have been recently emphasised as new strategies to identify candidate biomarkers (genes, metabolites or bacteria) involved in studied processes [56, 57]. Here, we used a network-based integrative approach that highlighted sub-networks of bacteria associated with hypothalamic early oxidative stress through caecal metabolites. The first highlighted bacterial sub-network contains *E. fergusonii* and *F. plautii*, associated with human intestinal inflammatory disease [58, 59]. *F. plautii* also displayed invasive capacity in human intestinal immune cells [59]. Therefore, both bacteria could enhance intestinal inflammation and gut barrier disruption in response to WD and be distant actors of increased hypothalamic oxidative stress. A large sub-network, negatively correlated to hypothalamic oxidative stress metabolites, contained 11 members of the *Lactobacillus* genus whose lower abundance may be associated with alteration of the gut barrier function which could participate to hypothalamic oxidative stress induction [53]. Sub-networks of bacteria that were negatively correlated with hypothalamic oxidative stress markers were positively correlated with α-diversity indices, and vice versa, underlying the importance of a diverse gut microbiota to protect against stress and potentially pathogenic bacteria settlement [60]. Interestingly, no members from the *Tannerellaceae* and *Desulfovibrionaceae* families, whose relative abundance was significantly impacted by WD introduction, were linked to hypothalamic elevated oxidative stress. This highlights the strength of WGCNA sub-network selection, which identifies potential small bacteria ecosystems that evolve together, and is not only based on differences in relative abundance values. The unknown caecal metabolites highlighted by this approach are also potential key actors in the microbiota-gut-hypothalamus axis and oxidative stress but further work is needed to identify them. The mechanisms of action of "the pro-inflammatory intestinal environment" described in the current study in response to short WD exposure remain unknown. In addition to a potential passage of pro-inflammatory bacteria or bacterial components into the circulation, pro-inflammatory bacteria may also signal to the hypothalamus through the vagus nerve via nodose ganglion inflammation as described previously in the context of short-term exposure to WD in mice [54].

In conclusion, the present study suggests that early hypothalamic adaptation to WD is strongly linked to gut microbiota changes. Hypothalamus rapidly undergoes oxidative stress at the metabolite and molecular scale during WD switch that could induce hypothalamic inflammation. At the same time, caecal microbiota quickly evolves towards a composition encountered in pro-inflammatory intestinal diseases, which could participate to an early systemic and/or hypothalamic inflammation. Data integration revealed a potential link between gut microbiota members and oxidative stress through unknown caecal metabolites. This link highlights the importance of the intestinal bacterial ecosystem in its entirety, being modulated in response to dietary change and acting, as a network of diverse but cooperating bacteria, on host physiology.

Data availability

R code and raw metabolomic data used in this study are available upon request to the corresponding author. Raw microbiota sequences are available at Sequence Read Archive (BioProject ID 602836).

Acknowledgements We thank Mathilde Guerville and Annaëlle Sinquin as well as Helen Raybould. We thank Isabelle Nogret for her technical help. Caecal Metabolomic analysis were performed within the metaboHUB French infrastructure (ANR-INBS-0010). This work was partly funded by a grant from INRAE AlimH division.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Berthoud H-R. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. Obesity. 2006;14:197S–200S.
2. Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prévot V, et al. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. Endocrinology. 2009;150:5509–19.
3. Dietrich MO, Horvath TL. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. Trends Neurosci. 2013;36:65–73.
4. Nuzzaci D, Laderrière A, Lemoine A, Nédélec E, Pénicaud L, Rigault C, et al. Plasticity of the melanocortin system: determinants and possible consequences on food intake. Front Endocrinol. 2015;6. https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00143.
5. Pinto S. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. Science. 2004;304:110–5.
6. Pierce AA, Xu AW. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. J Neurosci. 2010;30:723–30.
7. Benani A, Hryhorczuk C, Gouaze A, Fioramonti X, Brenachot X, Guissard C, et al. Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. J Neurosci. 2012;32:11970–9.
8. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. 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. 2015;308:G840–51.
9. Guerville M, Hamilton MK, Ronveaux CC, Ellero-Simatos S, Raybould HE, Boudry G. Chronic refined low-fat diet

consumption reduces cholecystokinin satiation in rats. Eur J Nutr. 2019;58:2497–510.
10. Argueta DA, DiPatrizio NV. Peripheral endocannabinoid signaling controls hyperphagia in western diet-induced obesity. Physiol Behav. 2017;171:32–9.
11. Argueta DA, Perez PA, Makriyannis A, DiPatrizio NV. Cannabinoid CB1 receptors inhibit gut-brain satiation signaling in diet-induced obesity. Front Physiol. 2019;10:704.
12. Brenachot X, Nédélec E, Ben Fradj S, Boudry G, Douard V, Laderrière A, et al. Lack of hypothalamus polysialylation inducibility correlates with maladaptive eating behaviors and predisposition to obesity. Front Nutr. 2018;5:6.
13. Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M, Perello M. Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. PLoS ONE. 2014;9:e87478.
14. Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. Nat Neurosci. 2001;4:605–11.
15. Buckman LB, Thompson MM, Lippert RN, Blackwell TS, Yull FE, Ellacott KLJ. Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. Mol Metab. 2015;4:58–63.
16. Gouazé A, Brenachot X, Rigault C, Krezymon A, Rauch C, Nédélec E, et al. Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. PLoS ONE. 2013;8:e72029.
17. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest. 2012;122:153–62.
18. Mendes NF, Kim Y-B, Velloso LA, Araújo EP. Hypothalamic microglial activation in obesity: a mini-review. Front Neurosci. 2018;12:846.
19. Terrien J, Seugnet I, Seffou B, Herrero MJ, Bowers J, Chamas L, et al. Reduced central and peripheral inflammatory responses and increased mitochondrial activity contribute to diet-induced obesity resistance in WSB/EiJ mice. Sci Rep. 2019;9:19696.
20. Souza ACP, Souza CM, Amaral CL, Lemes SF, Santucci LF, Milanski M, et al. Short-term high-fat diet consumption reduces hypothalamic expression of the nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit (α7nAChR) and affects the anti-inflammatory response in a mouse model of sepsis. Front Immunol. 2019;10:565.
21. Sugiyama M, Banno R, Yaginuma H, Taki K, Mizoguchi A, Tsunekawa T, et al. Hypothalamic glial cells isolated by MACS reveal that microglia and astrocytes induce hypothalamic inflammation via different processes under high-fat diet conditions. Neurochem Int. 2020;136:104733.
22. Morari J, Anhe GF, Nascimento LF, de Moura RF, Razolli D, Solon C, et al. Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. Diabetes. 2014;63:3770–84.
23. André C, Guzman-Quevedo O, Rey C, Rémus-Borel J, Clark S, Castellanos-Jankiewicz A, et al. Inhibiting microglia expansion prevents diet-induced hypothalamic and peripheral inflammation. Diabetes. 2017;66:908–19.
24. Dourmashkin JT, Chang G-Q, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague–Dawley rats. Physiol Beh. 2006;87:666–78.
25. Vaanholt LM, Sinclair RE, Mitchell SE, Speakman JR. Factors influencing individual variability in high fat diet-induced weight gain in out-bred MF1 mice. Physiol Behav. 2015;144:146–55.
26. Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes: fatty acids and glial inflammation. J Neurochem. 2012;120:1060–71.
27. Hsieh C-F, Ching-Kuan L, Ching-Tien L, Liang-En Y, Jiz-Yuh W. Acute glucose fluctuation impacts microglial activity, leading to inflammatory activation or self-degradation. Sci Rep. 2018;9:16.
28. McLean FH, Campbell FM, Langston RF, Sergi D, Resch C, Grant C, et al. A high-fat diet induces rapid changes in the mouse hypothalamic proteome. Nutr Metab (Lond). 2019;16:26.
29. Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga A-M. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:1–14.
30. Spielman LJ, Gibson DL, Klegeris A. Unhealthy gut, unhealthy brain: the role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases. Neurochem Int. 2018;120:149–63.
31. Li J-M, Yu R, Zhang L-P, Wen S-Y, Wang S-J, Zhang X-Y, et al. Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: a benefit of short-chain fatty acids. Microbiome. 2019;7:98.
32. Pearson-Leary J, Zhao C, Bittinger K, Eacret D, Luz S, Vigderman AS, et al. The gut microbiome regulates the increases in depressive-type behaviors and in inflammatory processes in the ventral hippocampus of stress vulnerable rats. Mol Psychiatry. 2020;25:1068–79.
33. Kreutzer C, Peters S, Schulte DM, Fangmann D, Türk K, Wolff S, et al. Hypothalamic inflammation in human obesity is mediated by environmental and genetic factors. Diabetes. 2017;66:2407–15.
34. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: a common factor in human diseases. BioMed Res Int. 2017;2017:1–7.
35. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. Sci Transl Med. 2009;1:6ra14.
36. Arnaud AP, Rome V, Richard M, Formal M, David-Le Gall S, Boudry G. Post-natal co-development of the microbiota and gut barrier function follows different paths in the small and large intestine in piglets. FASEB J. 2020;34:1430–46.
37. Gao X, Pujos-Guillot E, Sébédio J-L. Development of a quantitative metabolomic approach to study clinical human fecal water metabolome based on trimethylsilylation derivatization and GC/MS analysis. Anal Chem. 2010;82:6447–56.
38. Giacomoni F, Le Corguille G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Petera M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics. 2015;31:1493–5.
39. Zhang X, Grosfeld A, Williams E, Vasiliauskas D, Barretto S, Smith L, et al. Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. FASEB J. 2019;33:7126–42.
40. Zoppi J, Guillaume J-F, Neunlist M, Chaffron S. MiBiOmics: an interactive web application for multi-omics data exploration and integration. Bioinformatics. 2020. https://doi.org/10.1101/2020.04.24.031773.
41. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics. 2008;9:559.
42. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. Mol Aspects Med. 2009;30:42–59.
43. Dello SAWG, Neis EPJG, de Jong MC, van Eijk HMH, Kicken CH, Olde Damink SWM, et al. Systematic review of ophthalmate as a novel biomarker of hepatic glutathione depletion. Clin Nutr. 2013;32:325–30.
44. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. Nutrients. 2012;4:1399–440.
45. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 2014;24:R453–62.
46. Hanschmann E-M, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from cofactors to

antioxidants to redox signaling. Antioxid Redox Signal. 2013;19:1539–605.
47. Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. Diabetes. 2006;55:2084–90.
48. Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, et al. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. Diabetes. 2007;56:152–60.
49. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:1–9.
50. Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon J-L, Blondeau N, Rovère C. Hypothalamic inflammation and energy balance disruptions: spotlight on chemokines. Front Endocrinol. 2017;8. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00197.
51. Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol. 2015;33:496–503.
52. Lopetuso LR, Petito V, Graziani C, Schiavoni E, Paroni Sterbini F, Poscia A, et al. Gut microbiota in health, diverticular disease, irritable bowel syndrome, and inflammatory bowel diseases: time for microbial marker of gastrointestinal disorders. Dig Dis. 2018;36:56–65.
53. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;298:G851–9.
54. Waise TMZ, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, et al. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. Biochem Biophys Res Commun. 2015;464:1157–62.
55. Baufeld C, Osterloh A, Prokop S, Miller KR, Heppner FL. High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of CNS resident microglia. Acta Neuropathol. 2016;132:361–75.
56. Moschen S, Higgins J, Di Rienzo JA, Heinz RA, Paniego N, Fernandez P. Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. BMC Bioinformatics. 2016;17:174.
57. Zhang S, Liu W, Liu X, Qi J, Deng C. Biomarkers identification for acute myocardial infarction detection via weighted gene co-expression network analysis. Medicine. 2017;96:e8375.
58. Gaastra W, Kusters JG, van Duijkeren E, Lipman LJA. Escherichia fergusonii. Vet Microbiol. 2014;172:7–12.
59. Armstrong H, Alipour M, Valcheva R, Bording-Jorgensen M, Jovel J, Zaidi D, et al. Host immunoglobulin G selectively identifies pathobionts in pediatric inflammatory bowel diseases. Microbiome. 2019;7:1.
60. Kriss M, Hazleton KZ, Nusbacher NM, Martin CG, Lozupone CA. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. Curr Opin Microbiol. 2018;44:34–40.

Supplementary methods 1. Hypothalamic samples metabolomic analysis details.

Hypothalamus samples were processed at Metabolon, Inc using their standard platform protocol described below:

Sample Accessioning: Following receipt, samples were inventoried and immediately stored at -80°C. Each sample received was accessioned into the Metabolon LIMS system and was assigned by the LIMS a unique identifier that was associated with the original source identifier only. This identifier was used to track all sample handling, tasks, results, etc. The samples (and all derived aliquots) were tracked by the LIMS system. All portions of any sample were automatically assigned their own unique identifiers by the LIMS when a new task was created; the relationship of these samples was also tracked. All samples were maintained at -80°C until processed.

Sample Preparation: Samples were prepared using the automated MicroLab STAR® system from Hamilton Company. Several recovery standards were added prior to the first step in the extraction process for QC purposes. To remove protein, dissociate small molecules bound to protein or trapped in the precipitated protein matrix, and to recover chemically diverse metabolites, proteins were precipitated with methanol under vigorous shaking for 2 min (Glen Mills GenoGrinder 2000) followed by centrifugation. The resulting extract was divided into five fractions: two for analysis by two separate reverse phase (RP)/UPLC-MS/MS methods with positive ion mode electrospray ionization (ESI), one for analysis by RP/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, one for analysis by HILIC/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, and one sample was reserved for backup. Samples were placed briefly on a TurboVap® (Zymark) to remove the organic solvent. The sample extracts were stored overnight under nitrogen before preparation for analysis.

QA/QC: Several types of controls were analyzed in concert with the experimental samples: a pooled matrix sample generated by taking a small volume of each experimental sample (or alternatively, use of a pool of well-characterized human plasma) served as a technical replicate throughout the data set; extracted water samples served as process blanks; and a cocktail of QC standards that were carefully chosen not to interfere with the measurement of endogenous compounds were spiked into every analyzed sample, allowed instrument performance monitoring and aided chromatographic alignment. Tables 1 and 2 below describe these QC samples and standards. Instrument variability was determined by calculating the median relative standard deviation (RSD) for the standards that were added to each sample prior to injection into the mass spectrometers. Overall process variability was determined by calculating the median RSD for all endogenous metabolites (i.e., non-instrument standards) present in 100% of the pooled matrix samples. Experimental samples were randomized across the platform run with QC samples spaced evenly among the injections, as outlined below in Figure 1.

Table 1: Description of Metabolon QC Samples.

Type	Description	Purpose
MTRX	Large pool of human plasma maintained by Metabolon that has been characterized extensively.	Assure that all aspects of the Metabolon process are operating within specifications.
CMTRX	Pool created by taking a small aliquot from every customer sample.	Assess the effect of a non-plasma matrix on the Metabolon process and distinguish biological variability from process variability.
PRCS	Aliquot of ultra-pure water	Process Blank used to assess the contribution to compound signals from the process.
SOLV	Aliquot of solvents used in extraction.	Solvent Blank used to segregate contamination sources in the extraction.

Table 2: Metabolon QC Standards.

Type	Description	Purpose
RS	Recovery Standard	Assess variability and verify performance of extraction and instrumentation.
IS	Internal Standard	Assess variability and performance of instrument.

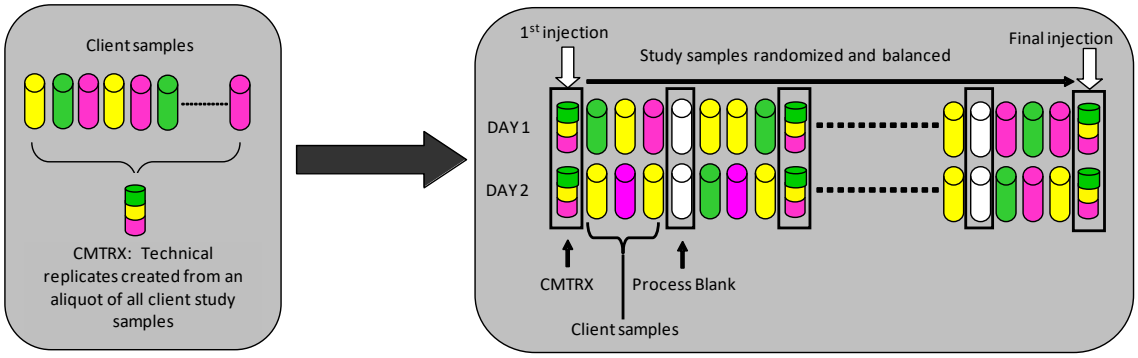


Figure 1. Preparation of client-specific technical replicates. A small aliquot of each client sample (colored cylinders) is pooled to create a CMTRX technical replicate sample

(multi-colored cylinder), which is then injected periodically throughout the platform run. Variability among consistently detected biochemicals can be used to calculate an estimate of overall process and platform variability.

Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy (UPLC-MS/MS): All methods utilized a Waters ACQUITY ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and a Thermo Scientific Q-Exactive high resolution/accurate mass spectrometer interfaced with a heated electrospray ionization (HESI-II) source and Orbitrap mass analyzer operated at 35,000 mass resolution. The sample extract was dried then reconstituted in solvents compatible to each of the four methods. Each reconstitution solvent contained a series of standards at fixed concentrations to ensure injection and chromatographic consistency. One aliquot was analyzed using acidic positive ion conditions, chromatographically optimized for more hydrophilic compounds. In this method, the extract was gradient eluted from a C18 column (Waters UPLC BEH C18-2.1x100 mm, 1.7 µm) using water and methanol, containing 0.05% perfluoropentanoic acid (PFPA) and 0.1% formic acid (FA). Another aliquot was also analyzed using acidic positive ion conditions, however it was chromatographically optimized for more hydrophobic compounds. In this method, the extract was gradient eluted from the same afore mentioned C18 column using methanol, acetonitrile, water, 0.05% PFPA and 0.01% FA and was operated at an overall higher organic content. Another aliquot was analyzed using basic negative ion optimized conditions using a separate dedicated C18 column. The basic extracts were gradient eluted from the column using methanol and water, however with 6.5mM Ammonium Bicarbonate at pH 8. The fourth aliquot was analyzed via negative ionization following elution from a HILIC column (Waters UPLC BEH Amide 2.1x150 mm, 1.7 µm) using a gradient consisting of water and acetonitrile with 10mM Ammonium Formate, pH 10.8. The MS analysis alternated between MS and data-dependent MSn scans using dynamic exclusion. The scan range varied slighted between methods but covered 70-1000 m/z. Raw data files are archived and extracted as described below.

Bioinformatics: The informatics system consisted of four major components, the Laboratory Information Management System (LIMS), the data extraction and peak-identification software, data processing tools for QC and compound identification, and a collection of information interpretation and visualization tools for use by data analysts. The hardware and software foundations for these informatics components were the LAN backbone, and a database server running Oracle 10.2.0.1 Enterprise Edition.

LIMS: The purpose of the Metabolon LIMS system was to enable fully auditable laboratory automation through a secure, easy to use, and highly specialized system. The scope of the Metabolon LIMS system encompasses sample accessioning, sample preparation and instrumental analysis and reporting and advanced data analysis. All of the subsequent software systems are grounded in the LIMS data structures. It has been modified to leverage and interface with the in-house information extraction and data visualization systems, as well as third party instrumentation and data analysis software.

Data Extraction and Compound Identification: Raw data was extracted, peak-identified and QC processed using Metabolon's hardware and software. These systems are built on a web-service platform utilizing Microsoft's .NET technologies, which run on high-performance application servers and fiber-channel storage arrays in clusters to provide

active failover and load-balancing. Compounds were identified by comparison to library entries of purified standards or recurrent unknown entities. Metabolon maintains a library based on authenticated standards that contains the retention time/index (RI), mass to charge ratio (m/z), and chromatographic data (including MS/MS spectral data) on all molecules present in the library. Furthermore, biochemical identifications are based on three criteria: retention index within a narrow RI window of the proposed identification, accurate mass match to the library +/- 10 ppm, and the MS/MS forward and reverse scores between the experimental data and authentic standards. The MS/MS scores are based on a comparison of the ions present in the experimental spectrum to the ions present in the library spectrum. While there may be similarities between these molecules based on one of these factors, the use of all three data points can be utilized to distinguish and differentiate biochemicals. More than 3300 commercially available purified standard compounds have been acquired and registered into LIMS for analysis on all platforms for determination of their analytical characteristics. Additional mass spectral entries have been created for structurally unnamed biochemicals, which have been identified by virtue of their recurrent nature (both chromatographic and mass spectral). These compounds have the potential to be identified by future acquisition of a matching purified standard or by classical structural analysis.

Curation: A variety of curation procedures were carried out to ensure that a high quality data set was made available for statistical analysis and data interpretation. The QC and curation processes were designed to ensure accurate and consistent identification of true chemical entities, and to remove those representing system artifacts, mis-assignments, and background noise. Metabolon data analysts use proprietary visualization and interpretation software to confirm the consistency of peak identification among the various samples. Library matches for each compound were checked for each sample and corrected if necessary.

Metabolite Quantification and Data Normalization: Peaks were quantified using area-under-the-curve. For studies spanning multiple days, a data normalization step was performed to correct variation resulting from instrument inter-day tuning differences. Essentially, each compound was corrected in run-day blocks by registering the medians to equal one (1.00) and normalizing each data point proportionately (termed the "block correction"; Figure 2 below). For studies that did not require more than one day of analysis, no normalization is necessary, other than for purposes of data visualization. In certain instances, biochemical data may have been normalized to an additional factor (e.g., cell counts, total protein as determined by Bradford assay, osmolality, etc.) to account for differences in metabolite levels due to differences in the amount of material

present in each sample.

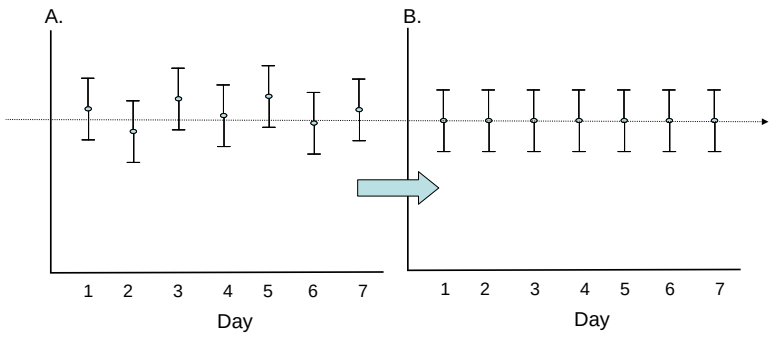


Figure 2: Visualization of data normalization steps for a multiday platform run.

Supplementary methods 2. Caecal content untargeted metabolomic analysis details.

Caecal water samples preparation:

Caecal contents were grinded (Precellys24; 5000rpm for 2x30sec, 20sec break) in 2mL impact resistant tubes filled with 0.6mL of beads (ZR Bashing Bead Lysis Tubes (0.1 and 0.5mm)) and MilliQ water (1mL per 100mg of sample). Grinded samples were then ultracentrifuged (171500g for 2 hours at 4°C). 2µL of NaN3 solution (100mg.mL^{-1}) was added per mL of supernatant. These caecal water samples were stocked at -80°C before untargeted metabolomics analysis.

GC sample preparation:

Caecal water samples were frozen and stored at -80°C for further analysis. Caecal water samples were thawed from -80°C to 4°C overnight. 600 µL of ice-cold methanol (-20°C) were added to 300µL caecal water sample for each sample in Eppendorf tube. The mixture was vortexed. After precipitation of the proteins, samples were kept in the freezer at -20°C for half an hour and then centrifuged (Sigma 3-16PK, Fischer Bioblok Scientific) at 15 000 rpm for 10 min at 4°C. 800µL of supernatant were transferred in a brown glass vial of 2mL before addition of 10 µL of [13C1]-L-valine (200 µg.mL^{-1}) and evaporation under EZ2.3 Genevac (Biopharma Technologies France). At the same time, a control derivatization sample (for which caecal water was substituted by milliQ water) was prepared in order to remove the background noise produced during sample preprocessing, derivatization, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) analysis. The obtained dry residues were dissolved by adding 80 µL of methoxylamine hydrochloride solution (15 mg.mL^{-1} in pyridine) to each vial, vortexed vigorously for 1 min and incubated for 24h at 37 °C in order to inhibit the cyclization of reducing sugars and the decarboxylation of α-keto acids. Then, 80µL of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) as catalyst were added in the mixture and derivatized for 60 min at 70°C. Before injection, 50µL of derivatized mixture (by trimethylsilylation) were transferred in a glass vial containing 100µL of heptane. In a similar manner, a sample pool was formed from 10µL

of each extracted and derivatized sample to monitor the drift of the spectrometer during GC-MS analysis.

Analytical sequences:

Injection order was randomized using a William's latin squares strategy. Four heptane blanks were injected at the beginning of each sequence, followed by four pool samples, and then one pool sample and one derivatization control sample after each set of 10 samples. Initial tuning and calibrating of the system were performed using perfluorotributylamine (PFTBA). Also, a calibration was made between each sample.

Gas chromatography and mass spectrometry:

Untargeted metabolic analysis were performed on an Agilent 7890B Gas Chromatograph, equipped with a 7693A Injector (SSL) Auto-Sampler (Agilent Technologies, Inc), coupled to an Agilent QTOF 7200 (Quadripole Time Of Flight) mass spectrometer. Separation was achieved on a fused silica column HP-5MS UI 30m x 0.25mm i.d. chemically bonded with a 5% phenyl-95% methylpolysiloxane cross-linked stationary phase (0.25 µm film thickness) (Agilent J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 $ml.min^{-1}$. 2 µl of derivatized sample were injected using 1:20 split. Temperatures of injector, transfer line, and electron impact (EI) ion source were set to 250 °C, 280 °C and 230 °C, respectively. The initial oven temperature was 60 °C for 2 min, ramped to 140°C at a rate of 10°C per minute, to 240°C at a rate of 4°C per minute, to 300°C at a rate of 10 °C per minute and finally held at 300°C for 8 min. The total run time was 49 min. Agilent ''retention time locking" (RTL) was applied to control the reproducibility of retention times (RT). [13C1]-L-valine (ISTD) was used to lock GC method (Gao *et al.*, 2010). The electron energy was 70 eV and mass data were collected in a full scan mode (m/z 55-700) using a resolution of 7000 (full width at half maximum) to 464 m/z. Acquisition rate was 5 spectra per second with acquisition time of 200ms per spectrum. Raw data files were transformed to mzdata files using Masshunter software (Agilent).

Data processing:

The obtained mzdata files were imported under the Galaxy web-based platform Workflow4Metabolomics (W4M) [389].

Mzdata files were processed using XCMS [390], which includes several steps that led to a data matrix containing retention times, m/z ratio and peak intensities [391]. These steps consisted of noise filtering, automatic peak detection and chromatographic alignment

allowing the appropriate comparison of multiple samples by further processing methods and quality controls with signal drift and batch effect correction.

To note, mass fragments with m/z-values of 73.0418, 74.0421, 75.0317, 76.0220 and 147.0716 are not specific for the differentiation of compounds. These mass fragments predominantly result from the derivatization reagent (TMS) and were thus excluded from workflow analysis.

Analytical correlations were filtered using the 'Metabolites Correlation Analysis' tool (Galaxy Version 1.0.1) with a correlation coefficient threshold of 0.9.

After these processing steps, 785 ions from caecal waters metabolome remained in datasets for statistical analyses.

Metabolite identification:

At first an in-house database was used to identify metabolites: pure compounds (standards) were previously analyzed in the same analytical conditions on the same instrument. The remaining unknown compounds were identified based on their exact masses that were compared to those registered in MassBank (https://www.massbank.eu) and HuMan DataBase (HMDB) (www.hmdb.ca) (with nominal masses and masses error 0.3 Da) or National Institute of Standards and Technology (NIST) library. Deconvolution of the raw data files was achieved using Agilent MassHunter software package (qualitative Analysis B.07.01) and the mass spectral data was compared against a personal compound database library (Agilent MassHunter Personal Compound Database and Library (PCDL) version B.07.00) containing spectra of pure compounds (standards) previously analyzed on the same instrument and NIST library.

As in Metabolon method (supplementary methods 1), obtained data were normalized by setting the median of each ion to 1. T0 values were considered as the control values and set to 1 to calculate the fold-changes between time-groups of each ion.

Supplementary method 3.

16S rRNA gene sequencing analysis

Reads obtained after 16S rRNA gene sequencing from caecal content were filtered and taxonomic affiliation (SILVA database version 132) was performed using dada2 R package v.1.14.0 on R v.3.6.1 (ref. 1). Data were normalized using Geometric Mean of Pairwise Ratios method with the GMPR R package v.0.1.3 (ref. 1). Diversity measures (Shannon

index from raw data and Bray-Curtis distance from normalized data) as well as composition analysis were performed using the phyloseq R package v.1.30.0 (ref. 3).

Data integration using the mixOmics R package

PLS-DA were performed on normalized metabolomic data using the mixOmics R package v.6.10.1 (M-fold cross-validation (5 folds, 100 repeats)) and the number of components corresponding to the lowest classification error rate obtained according to the balanced error rate was selected for each data set (4). Model performance was assessed using the perf function of mixOmics R package. PERMANOVA tests were performed between pairs of groups on PLS-DA coordinates with the vegan R package v.2.5-6. Hypothalamic metabolites of interest for further data integration were selected based on PLS-DA Variable Importance in Projection (VIP) scores (superior to 1 for components 1 and 2).

Data integration using the MiBiOmics web application.

To perform data integration, the web application MiBiOmics (5), based on Weighted Correlation Network Analysis method (WGCNA) (42) was used. Briefly, for each dataset, sub-networks of highly correlated Operational Taxonomic Units (OTUs) or metabolites were built. Each sub-network from one dataset was then correlated to sub-networks from the two other datasets. Hypothalamic sub-networks containing inflammation related metabolites were selected and OTU and caecal metabolites sub-networks that were highly correlated with them were kept. Specific hypothalamic metabolites, caecal metabolites and OTUs from these selected sub-networks that were highly correlated with each other were kept to build the final network. One network per dataset (microbiota, caecal metabolome and hypothalamic metabolome) was built by correlating all variables together using correlation parameters listed in table below.

Dataset	Softpower	Minimal module size	Type of correlation
Caecal microbiota	7	6	Biweight midcorrelation
Caecal ions	12	6	Spearman
Hypothalamic metabolites	14	6	Biweight midcorrelation

Parameters used to build the WGCNA network from each dataset. All networks were signed.

Inside each network, sub-networks (called “modules”) of highly correlated variables (OTUs, ions or metabolites) were used to find inter-sub-networks correlations between datasets. Hypothalamic sub-networks containing previously identified hypothalamic metabolites, using VIP score after PLS-DA, were retained. Sub-networks from the two other datasets that had a Pearson correlation coefficient between them and with the selected hypothalamic sub-networks superior to 0.6 (absolute value) were kept. Then, correlations between variables of these selected sub-networks (OTUs, ions or

metabolites) that were also superior to 0.6 (absolute value) were selected to build the final network. The taxonomic affiliations of OTUs retained after this selection were more precisely identified using the BLASTn tool on 16S rRNA gene reference database on the NCBI website (first hits presenting the higher percentage of identity and query cover, as well as the lowest E-value, were retained).

Supplementary table 1. Composition of the experimental diets. WD: Western diet.

	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	Chow	**WD**	**Chow**	**WD**	**Chow**	**WD**
Food reference #	Labdiet 5008	D12451	SDS N°3	D12451	SAFE A03	SAFE 245HF
Energy density *(kcal.g^{-1})*	3.4	4.7	3.6	4.7	3.3	4.7
Carbohydrate *(% energy)*	58	35	61.5	35	61.3	36.8
Protein *(% energy)*	29	20	27	20	25.2	17.3
Fat *(% energy)*	13	45	11.5	45	13.5	45.9
Irradiation	-	-	-	-	45kGy	45kGy

Supplementary table 2. References of primers or assay-on-demand (AOD) of genes which levels were determined by qPCR in the hypothalamus of experiment 3 rats. Gene names, primers sequences (forward and reverse) and hybridization temperatures (Tm, in °C) of each primer are listed for genes involved in oxidative stress (SYBR green technology). AOD are referenced for genes involved in inflammation (TaqMan technology). F: forward. R: reverse.

Type	Gene	Protein	Technology	Forward (F; 5'-3')	Reverse (R; 5'-3')	Tm (F-R; °C)	AOD
Reference genes	***actb***	β-actin	SYBR green	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatacagggaca	57-60	-
	rplp0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0	SYBR green	cgagaagacctctttcttccaa	agtctttatcagctgcacatcg	58-59	-
	rps18	18S	SYBR green	cttccacaggaggcctacac	tgaaacttctcggggatca	59-59	-
	actb	β-actin	TaqMan	-	-	-	Rn00667869_m1
Oxidative stress	***gcs***	Gamma-glutamylcysteine synthetase	SYBR green	gactgttgccaggtggatga	ttgtgggcaactggaacact	60-60	-
	gs	Glutathione synthetase	SYBR green	agcgtgccatagagaacgag	ggcatgtagccatctcggaa	60-60	-
	gst	Glutathione S-transferase	SYBR green	tctgaaaactcgggatgacc	caccagcttcatcccatca	57-57	-
	sod2	Superoxide dismutase 2	SYBR green	ggccatatcaatcacagcatt	tagcctccagcaactctcct	57-60	-
	sod3	Superoxide dismutase 3	SYBR green	cttgggagagcttgtcaggt	caccagtagcaggttgcaga	59-60	-
	glrx	Glutaredoxin-1	SYBR green	caacagaatggggagctgac	ggacgactgctgtcagtatgg	59-60	-
	gpx1	Glutathione peroxidase 1	SYBR green	tttcccgtgcaatcagttc	ggacatacttgagggaattcaga	56-58	-
Inflammation	***iba1***	Ionized calcium binding adapter molecule 1	SYBR green	cagacgcaccctctgatgt	ctccaagaatggggtgagc	59-58	-
	ccl2	Chemokine ligand 2	TaqMan	-	-	-	Rn00580555_m1
	tnfα	Tumor necrosis factor α	TaqMan	-	-	-	Rn01525859_g1
	il1β	Interleukin-1β	TaqMan	-	-	-	Rn00580432_m1
	il6	Interleukin-6	TaqMan	-	-	-	Rn01410330_m1

Supplementary table 3. Hypothalamic metabolites retained after PLS-DA. Metabolites were ordered according to their VIP scores for components 1 (comp1) and 2 (comp2) combined, with a filter on VIP score > 1. Data were then sorted in decreasing order according to comp1. Blue: arginine metabolism; yellow brown: lipids; red: redox homeostasis; green: cell membrane remodelling.

	VIP score				
Metabolite	comp1	comp2	comp3	comp4	comp5
trigonelline (N'-methylnicotinate)	2.967099	2.327452	1.96734	1.891237	1.824557
N-delta-acetylornithine	2.677039	2.231608	1.890086	1.93996	1.871615
4-guanidinobutanoate	2.612261	1.899909	1.622304	1.95395	1.893464
stachydrine	2.573225	1.893569	1.645883	1.438057	1.392574
dimethylarginine (SDMA + ADMA)	2.391624	1.811732	1.524908	1.548708	1.51177
adenosine 2'-monophosphate (2'-AMP)	2.375548	1.723198	1.526331	1.440993	1.39535
1-methylhistamine	2.345086	1.701932	1.430518	1.290088	1.247398
chiro-inositol	2.279936	1.757628	1.657332	1.81998	1.757433
N-acetylmethionine	2.23257	1.628505	1.410716	1.267446	1.228946
adenosine	2.225997	1.630498	1.484653	1.282629	1.237641
phenol sulfate	2.184963	1.798397	1.602626	1.388193	1.340937
1,2-dilinoleoyl-GPC (18:2/18:2)	2.161965	1.697343	1.43605	1.241138	1.197351
myo-inositol	2.107868	1.660423	1.41547	1.330963	1.284134
dihydroxyacetone phosphate (DHAP)	2.078272	1.61347	1.402904	1.221359	1.198442
gamma-glutamylphenylalanine	2.077705	1.754754	1.577668	1.362123	1.321503
ascorbate (Vitamin C)	2.07337	1.671731	1.422469	1.306378	1.278259
sedoheptulose-7-phosphate	2.043451	1.545887	1.336088	1.16735	1.13327
sphingomyelin (d18:1/24:1, d18:2/24:0)*	2.000773	1.537874	1.298484	1.16264	1.128468
N-acetylarginine	1.998233	1.680013	1.71195	1.481449	1.46866
ornithine	1.988632	1.827345	1.540504	1.34175	1.328292
sphingosine	1.986259	1.665612	1.506332	1.305795	1.278874
betaine	1.973483	1.517926	1.693891	1.473127	1.421958

gamma-glutamylglycine	1.957683	1.533044	1.296337	1.12463	1.135467
glutamate	1.95433	1.42138	1.196076	1.035399	1.026058
isoleucylglycine	1.941739	1.686504	1.442637	1.264458	1.219857
ophthalmate	1.941198	1.946435	1.820218	1.589336	1.53427
gamma-tocopherol/beta-tocopherol	1.891518	1.865859	1.569866	1.453405	1.428843
mannose	1.885384	1.409579	1.306274	1.138261	1.098879
pyridoxal	1.843703	1.726446	1.464267	1.272146	1.229361
N-acetylmethionine sulfoxide	1.821895	1.326288	1.253452	1.23801	1.194445
S-1-pyrroline-5-carboxylate	1.810042	1.569968	1.328378	1.243542	1.264332
argininate*	1.809936	1.777539	1.540621	1.800483	1.743385
S-adenosylhomocysteine (SAH)	1.786148	1.384803	1.220156	1.131286	1.098178
glycylleucine	1.771185	1.303137	1.097785	1.10654	1.102127
saccharopine	1.76639	1.684837	1.525747	1.406948	1.399582
N-stearoyl-sphingosine (d18:1/18:0)*	1.753165	1.449217	1.259461	1.099504	1.060755
riboflavin (Vitamin B2)	1.749434	1.274456	1.075587	1.096261	1.073063
3-indoxyl sulfate	1.743829	2.032844	1.71902	1.484597	1.43252
sphingomyelin (d18:2/23:0, d18:1/23:1, d17:1/24:1)*	1.741648	1.432937	1.315633	1.137042	1.113173
cysteine-glutathione disulfide	1.724007	1.528291	1.358179	1.172948	1.135616
phosphate	1.719617	1.281429	1.085497	1.08429	1.073132
1-methylimidazoleacetate	1.677472	1.242228	1.264018	1.092408	1.084649
N-palmitoyl-sphinganine (d18:0/16:0)	1.672615	1.306477	1.113162	1.15022	1.114158
nicotinamide	1.670557	1.471288	1.24773	1.132755	1.151215
adenine	1.66239	1.238584	1.171366	1.07014	1.076761
glycosyl ceramide (d18:2/24:1, d18:1/24:2)*	1.636255	1.248299	1.245039	1.100209	1.144937
glycosyl-N-erucoyl-sphingosine (d18:1/22:1)*	1.627778	1.231273	1.185623	1.043981	1.161701
1-(1-enyl-oleoyl)-2-oleoyl-GPE (P-18:1/18:1)*	1.622995	1.213792	1.12713	0.989152	1.029495
homoarginine	1.622429	1.38654	1.342804	1.628548	1.578586
ribose	1.621264	1.448516	1.222522	1.397801	1.359072

tyrosylglycine	1.614729	1.415211	1.198724	1.042181	1.071046
palmitoylcarnitine (C16)	1.6142	1.389293	1.35277	1.174926	1.145858
N-acetylleucine	1.608175	1.695569	1.523677	1.322244	1.291133
hypotaurine	1.6039	1.227555	1.207236	1.057527	1.021936
eicosanoylsphingosine (d20:1)*	1.601746	1.595686	1.402888	1.212961	1.184796
1-stearoyl-2-oleoyl-GPS (18:0/18:1)	1.588568	1.26979	1.345748	1.168816	1.145567
allantoin	1.583892	1.393437	1.423015	1.307729	1.272188
5-oxoproline	1.582148	1.688905	1.438293	1.382746	1.341958
betaine aldehyde	1.575888	1.143192	1.003153	1.129353	1.154183
spermidine	1.547189	1.150498	0.992662	0.891167	1.011594
allo-threonine	1.516206	1.146866	1.025229	0.888768	1.041244
arabitol/xylitol	1.507938	1.281318	1.166077	1.109923	1.177597
uracil	1.506264	1.654881	1.391302	1.203423	1.182282
2'-deoxyuridine	1.501329	1.177006	1.061819	1.05423	1.063853
oxalate (ethanedioate)	1.479072	1.076535	1.124774	1.255107	1.289749
1-oleoyl-2-arachidonoyl-GPE (18:1/20:4)*	1.477477	1.158108	1.436536	1.346282	1.298883
5-methyl-2'-deoxycytidine	1.471903	1.289128	1.959871	1.709547	1.649568
S-lactoylglutathione	1.46841	1.064838	1.186611	1.028412	1.026455
gamma-glutamyltryptophan	1.453006	1.143712	1.007564	0.956407	1.01829
gamma-glutamylleucine	1.449489	1.081773	1.428944	1.26728	1.275393
spermine	1.426909	1.068694	0.923797	0.874101	1.00591
1-(1-enyl-stearoyl)-2-arachidonoyl-GPE (P-18:0/20:4)*	1.426696	1.092009	1.234357	1.081395	1.053873
stearoyl-arachidonoyl-glycerol (18:0/20:4) [2]*	1.420048	1.511213	1.272818	1.216116	1.192991
carboxyethyl-GABA	1.415438	1.045962	0.911216	1.235809	1.210729
glucuronate	1.409812	1.102581	1.336281	1.517941	1.464638
lignoceroyl sphingomyelin (d18:1/24:0)	1.401477	1.017929	1.075266	1.080045	1.060716
1-methylguanidine	1.397159	1.444218	1.267171	1.095638	1.110505
4-cholesten-3-one	1.393239	1.594932	1.481809	1.296989	1.300039

glutathione, oxidized (GSSG)	1.373266	1.463682	1.230087	1.160986	1.138975
myristoylcarnitine (C14)	1.372085	1.082066	1.21196	1.051136	1.020533
1-(1-enyl-oleoyl)-GPE (P-18:1)*	1.371503	1.150986	1.142514	1.016956	1.003323
arachidonoylcarnitine (C20:4)	1.340738	1.233749	1.048129	1.078739	1.085302
oleoylcarnitine (C18:1)	1.337515	1.209781	1.203307	1.050469	1.01479
uridine	1.293719	1.094673	0.94187	0.813087	1.074955
orotidine	1.272032	2.04917	1.724908	1.492798	1.483633
13-HODE + 9-HODE	1.269184	1.661406	1.446336	1.287425	1.242673
gamma-glutamylhistidine	1.234133	1.23691	1.250944	1.111834	1.11339
hypoxanthine	1.185649	1.382172	1.176199	1.045001	1.020348
urea	1.18335	1.539447	1.519725	1.751115	1.710412
1-methylnicotinamide	1.180345	1.041064	0.910026	1.034238	1.024507
glycosyl-N-palmitoyl-sphingosine (d18:1/16:0)	1.178191	1.431418	1.335671	1.15814	1.117836
2-arachidonoylglycerol (20:4)	1.163004	1.592533	1.358337	1.23168	1.201949
gamma-glutamylvaline	1.157768	1.002545	1.009476	0.986275	1.005765
glycerophosphorylcholine (GPC)	1.139032	1.452545	1.314663	1.136428	1.108398
2-hydroxybutyrate/2-hydroxyisobutyrate	1.103702	1.998238	1.680059	1.454898	1.403773
1-dihomo-linolenylglycerol (20:3)	1.088362	1.267461	1.127794	1.229765	1.18767
citrulline	1.083079	1.545888	1.308442	1.142637	1.222846
myristate (14:0)	1.063034	1.377166	1.276282	1.116959	1.07803
1-(1-enyl-stearoyl)-GPE (P-18:0)*	1.042186	1.207819	1.465591	1.43497	1.386639
gamma-glutamylglutamine	1.017483	1.11443	0.949528	1.071438	1.073302
1-arachidonylglycerol (20:4)	1.001585	1.044528	1.168077	1.486293	1.44045

Supplementary table 4. ANOVA and post-hoc tests results on the significantly impacted metabolites after pathway enrichment. Metabolites were selected by the Metabolon platform after performing metabolic pathway enrichment. Values correspond to fold-change between the considered time group and T0, after setting the median to 1 for each metabolite. T0 values are set to 1. Significant result after ANOVA are indicated in the ANOVA column by a dark blue fill while tendencies are indicated by a light blue fill. A dark green or red background means that the post-hoc test result between the considered time and T0 is significant, respectively with a decrease or an increase in the considered metabolite level compared to T0. A light green or light red background means that the post-hoc test resulted in a tendency between the considered time and T0, respectively with a tendency to a decrease or an increase for this metabolite level compared to T0. Two different letters indicate a significant difference. An asterisk (*) indicates compounds that have not been officially confirmed based on a standard, but with confidence in its identity according to the metabolomic platform.

Pathway	Metabolite	ANOVA	T0	T2H	TD1	TD2	TD4
Redox homeostasis	ophthalmate	Significant	1	1.25	1.61	3.72	3.23
			a	a	a	bc	c
	gamma-glutamylphenylalanine	Significant	1	0.99	0.74	0.6	0.59
			a	ab	bcd	cd	d
	gamma-glutamyltryptophan	Significant	1	0.99	0.58	0.53	0.57
			a	a	b	b	b
	5-oxoproline	Significant	1	0.92	0.82	0.8	0.82
			a	ab	c	bc	bc
	2-hydroxybutyrate/2-hydroxyisobutyrate	Significant	1	1.22	1.2	1.34	1.32
			a	b	b	b	b
	gamma-glutamylglycine	Significant	1	1	0.82	0.84	0.79
			a	a	b	b	b
	13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid + 9-Hydroxy-10,12-octadecadienoic acid	Significant	1	1.36	1.63	1.83	1.63
			a	ab	b	b	b
	gamma-glutamylleucine	Significant	1	1.07	0.97	0.81	0.87
			a	a	abc	bc	c
	gamma-glutamylglutamine	Significant	1	1.12	0.92	0.99	1
			ab	a	b	b	ab
	glutamate	Tendency	1	0.94	0.99	1.03	1
			ab	a	ab	b	b
	glycine	Tendency	1	0.98	0.94	0.95	0.93
			a	ab	b	ab	b
	glutathione, oxidized (GSSG)	Tendency	1	1.07	1.15	1.27	1.16
			a	a	ab	b	ab
	gamma-glutamylvaline	Tendency	1	1.07	0.92	1.04	0.91
			ab	a	b	ab	b
	gamma-glutamylglutamate	Tendency	1	1.01	0.9	0.89	0.89
			ab	a	ab	b	b
Cell membrane metabolism	diacylglycerol (16:1/18:2 [2], 16:0/18:3 [1])*	Tendency	1	6.51	1.91	1.34	2.61
			ab	cd	abcd	bcd	d
	choline phosphate	Significant	1	1.02	0.94	0.97	0.93
			ab	b	ac	abc	c
	1,2-dilinoleoyl-GPC (18:2/18:2)	Significant	1	1.04	0.8	0.77	0.72
			a	a	b	b	b
	1-linoleoyl-2-arachidonoyl-GPC (18:2/20:4n6)*	Significant	1	0.96	0.85	0.92	0.86
			a	ab	c	abc	bc

	glycerophosphorylcholine (GPC)	Significant	1	1.12	1.12	1.39	1.26
			a	abc	abd	c	cd
	1-palmitoyl-2-linoleoyl-GPC (16:0/18:2)	Tendency	1	0.96	0.92	0.97	0.94
			a	ab	b	a	ab
	cytidine 5'-monophosphate (5'-CMP)	Tendency	1	1.11	1.04	1.03	0.96
			a	b	ab	ab	a
	cytidine-5'-diphosphoethanolamine	Tendency	1	0.93	1	1.18	1.14
			ab	b	ab	a	a
	cytidine 5'-diphosphocholine	Significant	1	0.99	0.92	1.15	0.98
			a	a	a	b	a
	glycerophosphoethanolamine	Tendency	1	1.1	1.01	1.17	1.09
			ab	abc	b	c	abc
Arginin metabolism	urea	Significant	1	0.9	0.94	0.83	0.73
			a	ab	a	b	c
	ornithine	Significant	1	0.93	0.79	0.77	0.75
			a	a	b	b	b
	homoarginine	Significant	1	1	0.92	1.4	1.96
			a	ab	b	cd	d
	homocitrulline	Significant	1	1.17	0.92	1.23	0.6
			a	a	a	a	b
	citrulline	Significant	1	0.87	0.82	0.83	0.77
			a	ab	b	b	b
	spermidine	Tendency	1	1.07	0.78	0.84	0.71
			a	a	ab	ab	b

Supplementary table 5. Relative abundances values (%) of caecal microbiota families across time. Values are expressed as means ± standard deviation.

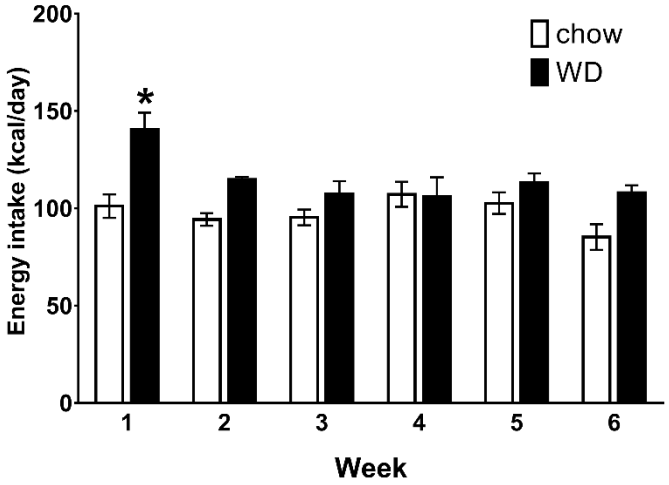
Family	T0	T2H	TD1	TD2	TD4
Bacteroidaceae	3.97 ± 2.91	2.38 ± 0.99	4.23 ± 2.34	6.83 ± 3.01	5.47 ± 3.6
Desulfovibrionaceae	3.5 ± 2.45	3.65 ± 2.01	7.37 ± 3.63	9.53 ± 4.03	6.93 ± 4.51
Lachnospiraceae	30.3 ± 6.88	30.6 ± 5.12	18.37 ± 3.42	25.39 ± 11.66	29.54 ± 13.17
Lactobacillaceae	13.03 ± 5.54	9.4 ± 2.83	2.98 ± 2.05	1.31 ± 1.8	0.39 ± 0.3
Muribaculaceae	6.7 ± 1.18	5.3 ± 1.05	3.43 ± 1.59	3.31 ± 1.5	2.43 ± 1.33
Peptostreptococcaceae	9.92 ± 6.57	11.02 ± 5.96	11.2 ± 4.59	11.39 ± 8.78	14.01 ± 15.48
Prevotellaceae	2.68 ± 2.14	4.13 ± 1.81	2.75 ± 2.1	0.8 ± 0.65	0.99 ± 0.86
Rikenellaceae	5.4 ± 3.62	5.32 ± 3.22	5.42 ± 3.49	6.76 ± 4.42	5.71 ± 4.4
Ruminococcaceae	17.58 ± 2.77	21.02 ± 5.33	15.92 ± 5.95	14.67 ± 3.66	13.21 ± 5.3
Tannerellaceae	3.72 ± 2.37	3.22 ± 1.24	7.28 ± 3.82	13.39 ± 6.39	13.23 ± 8.92

Supplementary table 6. Identity of bacteria identified after data integration. The taxonomy of each OTU that was strongly (Pearson correlation coefficient > 0.6 in terms of absolute value) correlated to selected caecal metabolites and hypothalamic oxidative stress-related metabolites was identified using basic local alignment search tool (BLAST) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). First BLAST hits results and characteristics on OTUs identified as positively and strongly correlated with pro-oxidant hypothalamic metabolites after data integration using WGCNA method are listed.

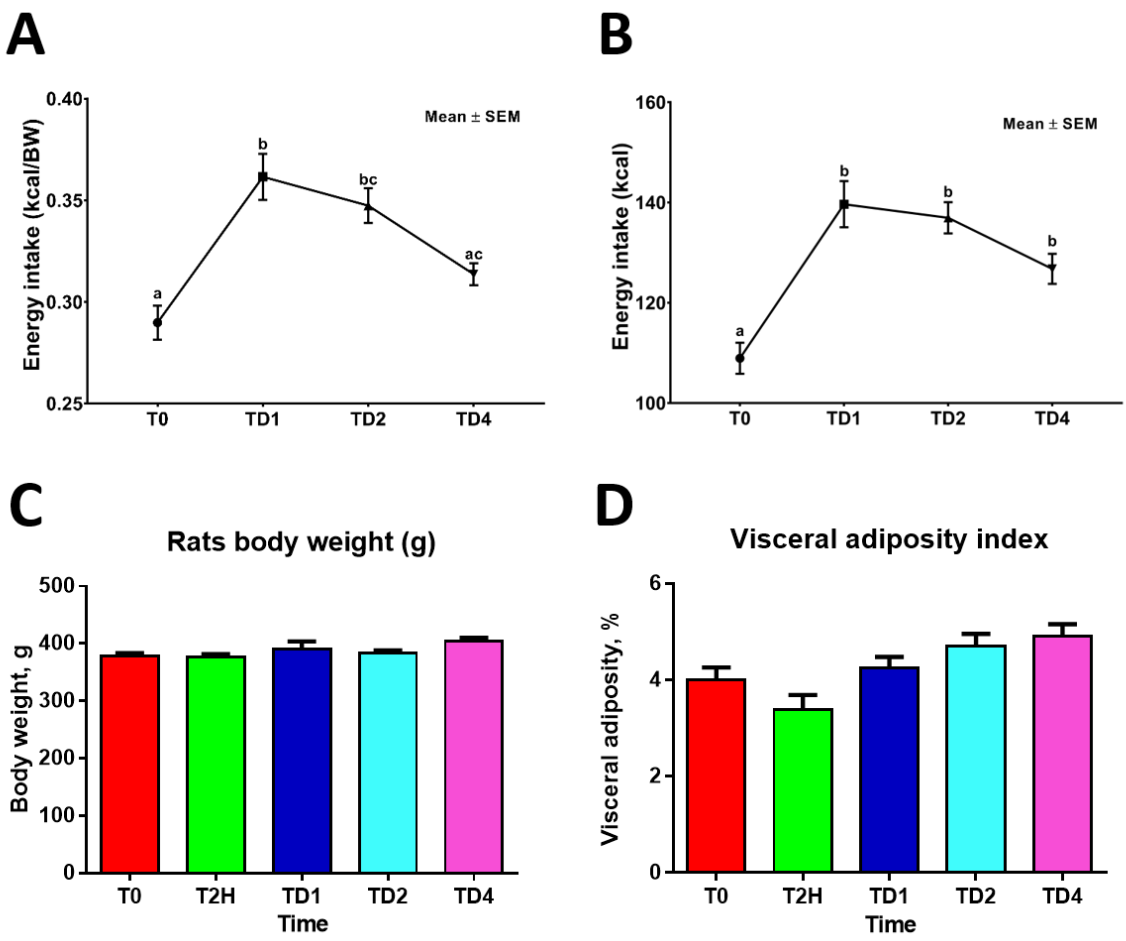
OTU	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	% identity	Accession
17	Uncultured bacterium clone OTU445_L_2_F0_126636 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	702	702	100%	0	99.48%	MG858281.1
109	Uncultured bacterium clone JD68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	100%	0	100.00%	JF794965.1
133	Lactobacillus johnsonii strain 0.1XD8_76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	MN081622.1
	Lactobacillus taiwanensis strain 0.1XD42_62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	MN081621.1
306	Lactobacillus johnsonii strain 0.1XD8_76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	MN081622.1
	Lactobacillus taiwanensis strain 0.1XD42_62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	MN081621.1
359	Lactobacillus johnsonii strain 0.1XD8_76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	MN081622.1
	Lactobacillus taiwanensis strain 0.1XD42_62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	MN081621.1
20	Uncultured bacterium clone denovo46872_N21_133494 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	100%	0	100.00%	MF257433.1
250	Eubacterium ventriosum strain ATCC 27560 16S ribosomal RNA, partial sequence	660	660	100%	0	97.15%	NR_118670.1
404	Lactobacillus taiwanensis strain BCRC 17755 16S ribosomal RNA, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	NR_044507.1
36	Ruminococcus albus 7 = DSM 20455 16S ribosomal RNA, partial sequence	569	569	100%	3.00E-162	93.26%	NR_074399.1
475	Escherichia fergusonii ATCC 35469 16S ribosomal RNA, complete sequence	713	713	100%	0	100.00%	NR_074902.1
121	[Clostridium] saccharogumia strain SDG-Mt85-3Db 16S ribosomal RNA, partial sequence	691	691	100%	0	98.96%	NR_043550.1
441	Lactobacillus taiwanensis strain BCRC 17755 16S ribosomal RNA, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	NR_044507.1
230	Vallitalea pronyensis strain FatNI3 16S ribosomal RNA, partial sequence	438	438	99%	9.00E-123	87.31%	NR_125677.1
79	Muribaculum intestinale strain YL27 16S ribosomal RNA, partial sequence	448	448	99%	1.00E-125	87.89%	NR_144616.1
251	Aminipila butyrica strain FH042 16S ribosomal RNA, partial sequence	630	630	100%	1.00E-180	96.11%	NR_159296.1
300	Murimonas intestini strain SRB-530-5-H 16S ribosomal RNA, partial sequence	664	664	100%	0	97.67%	NR_134772.1
341	Lactobacillus reuteri DSM 20016 16S ribosomal RNA, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	NR_075036.1
379	Lactobacillus taiwanensis strain BCRC 17755 16S ribosomal RNA, partial sequence	708	708	100%	0	99.74%	NR_044507.1
127	Kineothrix alysoides strain KNHs209 16S ribosomal RNA, partial sequence	630	630	100%	1.00E-180	96.11%	NR_156080.1
142	Blautia schinkii strain B 16S ribosomal RNA, partial sequence	643	643	100%	0	96.63%	NR_026312.1
12	Lactobacillus reuteri DSM 20016 16S ribosomal RNA, partial sequence	713	713	100%	0	100.00%	NR_075036.1
161	Anaerotaenia torta strain FH052 16S ribosomal RNA, partial sequence	553	553	100%	3.00E-157	93.26%	NR_151894.1
22	Bacteroides xylanolyticus strain X5-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	630	630	100%	1.00E-180	96.11%	NR_104899.1
	[Clostridium] xylanolyticum strain DSM 6555 16S ribosomal RNA, partial sequence	630	630	100%	1.00E-180	96.11%	NR_037068.1
30	Alistipes senegalensis JC50 16S ribosomal RNA, partial sequence	616	616	99%	4.00E-176	95.57%	NR_118219.1
57	Flavonifractor plautii strain Prevot S1 16S ribosomal RNA, partial sequence	702	702	100%	0	99.48%	NR_043142.1
154	[Clostridium] clostridioforme strain ATCC 25537 16S ribosomal RNA, partial sequence	610	610	100%	2.00E-174	95.08%	NR_044715.2
89	Oscillibacter valericigenes strain Sjm18-20 16S ribosomal RNA, complete sequence	619	619	100%	3.00E-177	95.60%	NR_074793.2
493	Ethanoligenens harbinense YUAN-3 16S ribosomal RNA, partial sequence	544	544	100%	2.00E-154	92.01%	NR_074333.1
575	Paludicola psychrotolerans strain NC1253 16S ribosomal RNA, partial sequence	573	573	100%	2.00E-163	93.54%	NR_158111.1
242	Sporobacter termitidis strain SYR 16S ribosomal RNA, partial sequence	512	512	100%	5.00E-145	90.44%	NR_044972.1

390	Kineothrix alysoides strain KNHs209 16S ribosomal RNA, partial sequence	558	558	100%	7.00E-159	93.52%	NR_156081.1
455	[Clostridium] saccharolyticum strain WM1 16S ribosomal RNA, partial sequence	632	632	100%	0	96.37%	NR_102852.1
187	Kineothrix alysoides strain KNHs209 16S ribosomal RNA, partial sequence	675	675	100%	0	98.19%	NR_156081.1
263	[Clostridium] methylpentosum strain R2 16S ribosomal RNA, partial sequence	569	569	100%	3.00E-162	93.32%	NR_029355.1
232	Kineothrix alysoides strain KNHs209 16S ribosomal RNA, partial sequence	669	669	100%	0	97.93%	NR_156081.1
406	Lactobacillus animalis strain KCTC 3501 16S ribosomal RNA, partial sequence	684	684	99%	0	98.70%	NR_041610.1
	Lactobacillus murinus strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	684	684	99%	0	98.70%	NR_112689.1
312	Flintibacter butyricus strain BLS21 16S ribosomal RNA, partial sequence	691	691	100%	0	98.96%	NR_144611.1
11	Lactobacillus animalis strain KCTC 3501 16S ribosomal RNA, partial sequence	713	713	100%	0	100.00%	NR_041610.1
	Lactobacillus murinus strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	713	713	100%	0	100.00%	NR_112689.1
	Lactobacillus apodemi strain ASB1 16S ribosomal RNA, partial sequence	713	713	100%	0	100.00%	NR_042367.1
345	Lactobacillus faecis strain AFL13-2 16S ribosomal RNA, partial sequence	505	505	74%	9.00E-143	98.26%	NR_114391.1
94	Oscillibacter valericigenes strain Sjm18-20 16S ribosomal RNA, complete sequence	608	608	100%	6.00E-174	95.08%	NR_074793.2
188	Intestinimonas butyriciproducens strain SRB-521-5-I 16S ribosomal RNA, partial sequence	553	553	100%	3.00E-157	92.49%	NR_118554.1
516	[Eubacterium] siraeum strain ATCC 29066 16S ribosomal RNA, partial sequence	571	571	100%	8.00E-163	93.01%	NR_118675.1
573	Vallitalea pronyensis strain FatNI3 16S ribosomal RNA, partial sequence	453	453	99%	3.00E-127	88.11%	NR_125677.1
567	Lactobacillus animalis strain KCTC 3501 16S ribosomal RNA, partial sequence	459	459	97%	7.00E-129	88.62%	NR_041610.1
	Lactobacillus murinus strain NBRC 14221 16S ribosomal RNA, partial sequence	459	459	97%	7.00E-129	88.62%	NR_112689.1
	Lactobacillus apodemi strain ASB1 16S ribosomal RNA, partial sequence	459	459	97%	7.00E-129	88.62%	NR_042367.1
273	[Ruminococcus] gnavus ATCC 29149 16S ribosomal RNA, partial sequence	568	568	100%	1.00E-161	93.26%	NR_036800.1

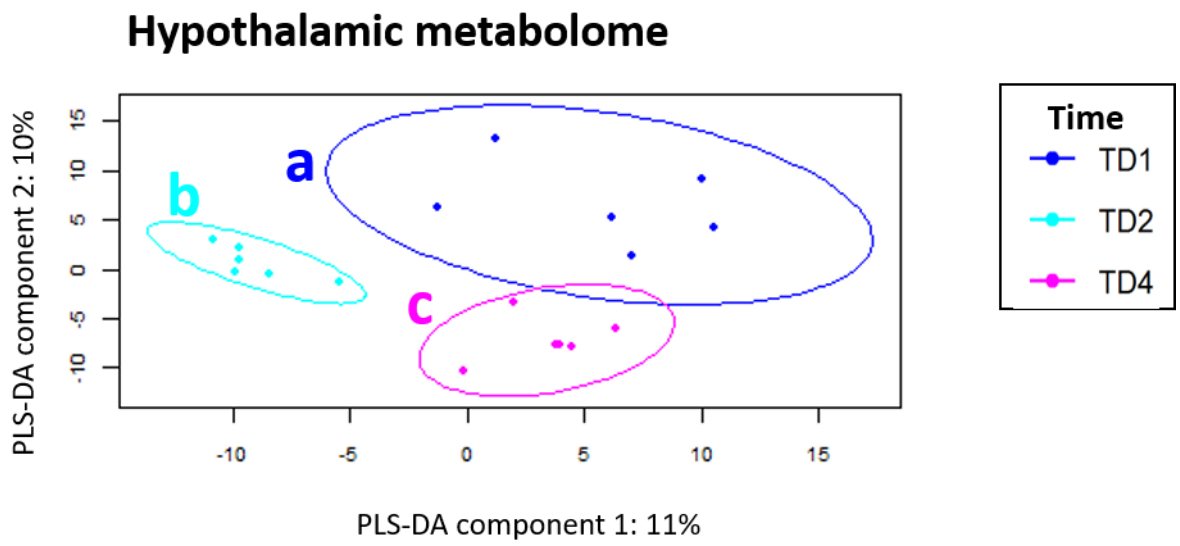
Supplementary figure 1. Unnormalized energy intake (expressed in kcal) of rats from experiment 1. An asterisk (*) indicates a significant different between chow and WD groups for the corresponding week in experiment 1 (*: $p<0.05$). A 2-way ANOVA was performed. Data are represented as means ± SEM.



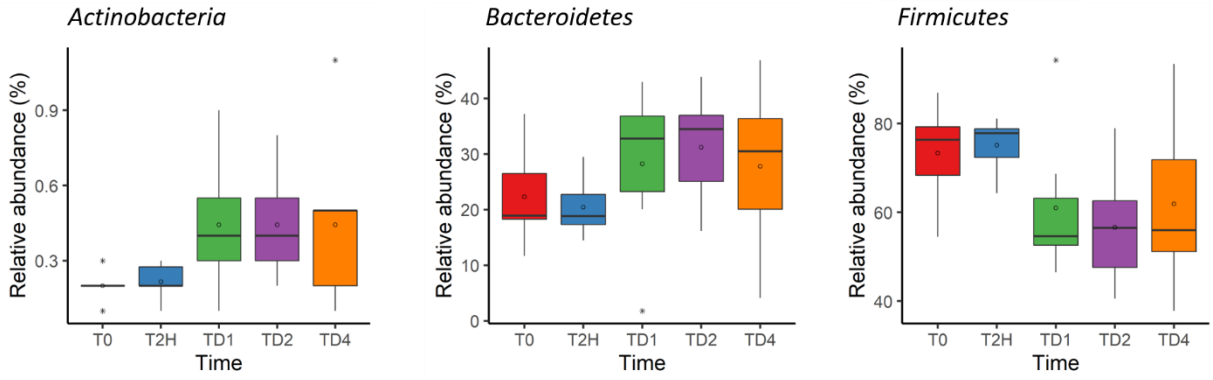
Supplementary figure 2. Energy intake in kcal.g^{-1} of body weight (A) and in kcal (B), body weight (C) and visceral adiposity index (D) of experiment 2 conventional rats. These parameters were measured before and after WD introduction. Data are represented as means±SEM. Two different letters indicate a significant difference after 1-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests.



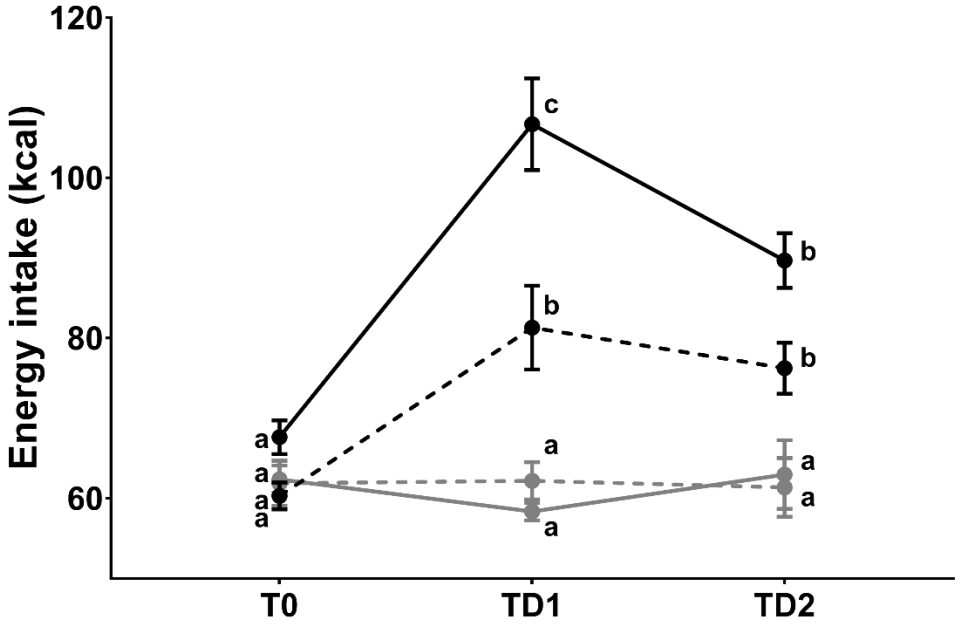
Supplementary figure 3. PLS-DA representation of hypothalamic metabolome, without T0 and T2H time groups. Represented data are normalized metabolomic data according to T0 group. Two different letters indicate a significant difference.



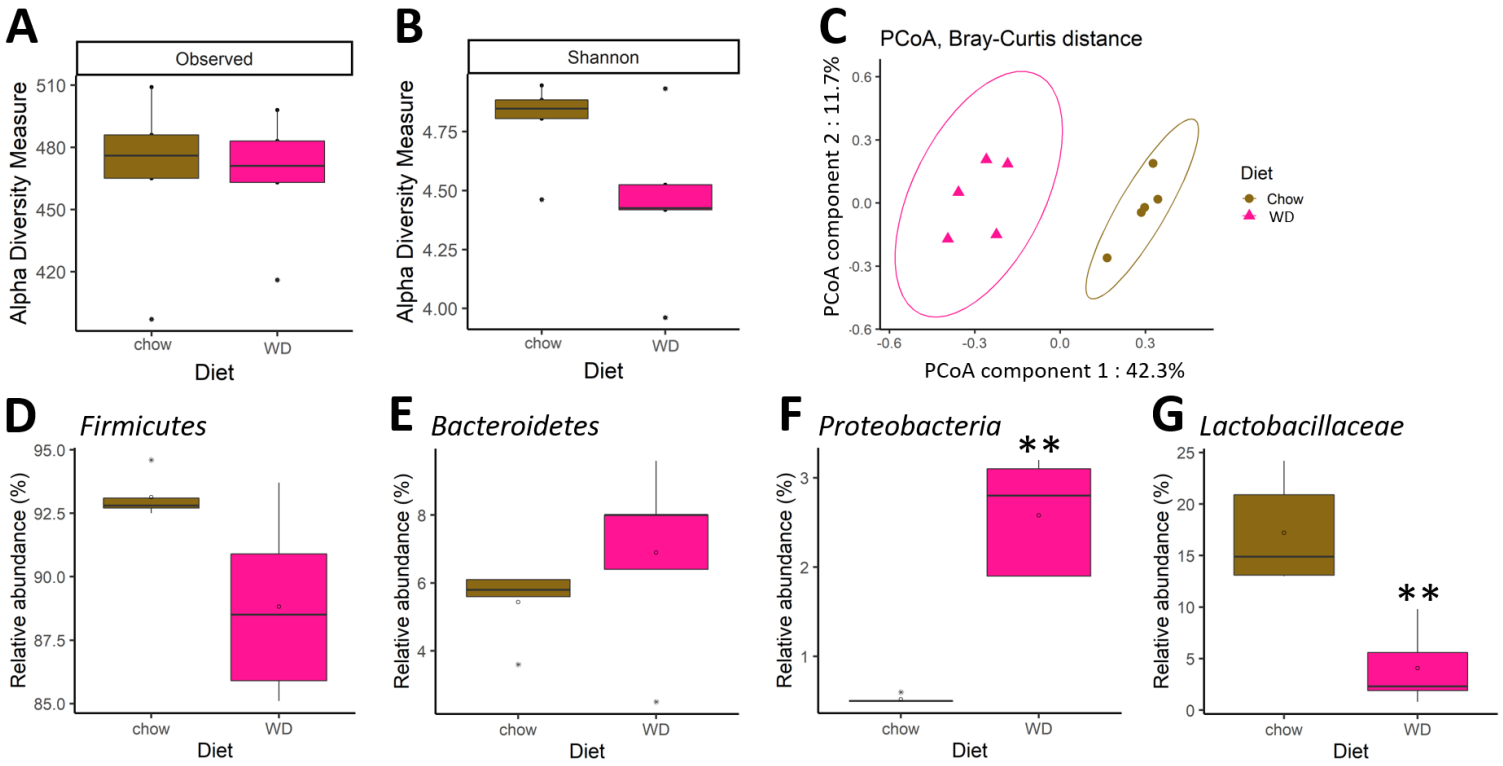
Supplementary figure 4. Relative abundances of Actinobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes phyla across time in experiment 2. Outliers are represented as asterisks.



Supplementary figure 5. Energy intake in kcal of experiment 3 rats. Data are presented as means ± SEM. Dotted lines correspond to germ-free (GF) animals whereas plain lines correspond to conventional (CONV) animals, either under chow diet (grey) or WD (black). Two different letters indicate a significant statistical difference, after 2-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests.



Supplementary figure 6. Evolution of caecal microbiota after WD switch in conventional rats (experiment 3). Evolution of alpha diversity (number of observed species (A) and Shannon index (B)), β-diversity (PCoA on Bray-Curtis distance) (C), Firmicutes (D), Bacteroidetes (E), Proteobacteria (F) and *Lactobacillaceae* (G) relative abundances before and 2 days after WD introduction. N=5/group. Asterisks (*) indicate a significant difference after Mann-Whitney test performed between the two diet groups (*:P<0.05; **:P<0.01). Data beyond the end of the whiskers were considered outliers (1 point per sample). Outliers were not taken into account for statistical tests.


A
Observed
Alpha Diversity Measure
510
480
450
420
chow
WD
Diet
B
Shannon
Alpha Diversity Measure
4.75
4.50
4.25
4.00
chow
WD
Diet
C
PCoA, Bray-Curtis distance
PCoA component 2 : 11.7%
0.6
0.3
0.0
-0.3
-0.6
-0.6
-0.3
0.0
0.3
PCoA component 1 : 42.3%
Diet
Chow
WD
D
Firmicutes
Relative abundance (%)
95.0
92.5
90.0
87.5
85.0
chow
WD
Diet
E
Bacteroidetes
Relative abundance (%)
8
6
4
chow
WD
Diet
F
Proteobacteria
**
Relative abundance (%)
3
2
1
chow
WD
Diet
G
Lactobacillaceae
Relative abundance (%)
25
20
15
10
5
0
**
chow
WD
Diet

Supplementary references

1. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods. 2016;13(7):581-583.

2. Chen L, Reeve J, Zhang L, Huang S, Wang X, Chen J. GMPR: A robust normalization method for zero-inflated count data with application to microbiome sequencing data. PeerJ. 2018;6:e4600.

3. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE. 2013;8(4):e61217.

4. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao K-A. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. PLOS Computational Biology. 2017;13(11):e1005752.

5. Zoppi J., Guillaume J.-F., Neunlist M. and Chaffron S. MiBiOmics: An interactive web application for multi-omics data exploration and integration. bioRxiv. 2020.

II. Impact de plusieurs cycles courts de WD sur l'axe microbiote-intestin-cerveau et la régulation du comportement alimentaire

En parallèle de la consommation régulière d'aliments à haute densité énergétique, 20% des individus adultes normo-pondérés en France pratiquent régulièrement des restrictions alimentaires plus ou moins drastiques [392]. Ainsi, l'alternance entre une alimentation énergétiquement dense et une restriction calorique se retrouve régulièrement chez les individus. Chez la souris, l'exposition répétée à un régime WD à court terme (alternance de 2 semaines de WD et de 2 semaines de régime standard) perturbe la régulation de l'ingéré alimentaire et entraine notamment une augmentation de la consommation de WD à chaque nouveau cycle de WD [386]. Par ailleurs, l'exposition à long terme au WD, jusqu'à atteindre un phénotype d'obésité, suivie de la consommation de régime standard jusqu'à un retour à un poids normal entraîne également une plus forte propension à prendre du poids lors de la réintroduction du WD [246]. Les mécanismes par lesquels des expositions répétées à un régime de type WD influencent le comportement alimentaire ne sont pas encore totalement élucidés.

Comme indiqué dans l'introduction, la régulation de l'ingéré alimentaire et le maintien de l'homéostasie énergétique sont des processus finement régulés qui font intervenir différentes régions et systèmes au sein du système nerveux central : hypothalamus, comme étudié dans le 1er chapitre, mais également le tronc cérébral (le noyau du tractus solitaire (NTS) et l'area postrema (AP)) qui intègrent aussi les signaux périphériques ainsi que le système de récompense alimentaire et plus particulièrement le striatum [126, 127]. Dans l'ensemble de ces régions, l'exposition au WD entraine une augmentation de l'inflammation [138, 393, 394] qui peut perturber à la fois la régulation homéostatique [138] et hédonique [394] du comportement alimentaire. Le microbiote intestinal est également largement modifié en réponse au WD et nous avons montré dans le 1er chapitre de cette thèse que la dysbiose intestinale induite en réponse au WD participait à la mise en place de l'inflammation dans l'hypothalamus. D'autres auteurs ont récemment montré qu'une dysbiose intestinale pouvait également induire une inflammation dans le tronc cérébral [149]. Or, chez le rongeur, une consommation de WD (d'une durée suffisante pour atteindre un phénotype obèse) entrecoupée de retours à un régime standard (d'une durée suffisante pour permettre le retour à un poids normal) induit une prise de poids plus rapide dès réintroduction du WD qui est associée à la persistance d'un microbiote modifié durant les périodes de wash out sous régime standard entre les expositions répétées au WD [246] (cf. Figure 3.1 ci-dessous). Dans cette étude, le microbiote fécal des souris gardait des marques du passage au régime WD alors qu'elles étaient revenues à un poids normal sous régime standard (microbiote cicatriciel).

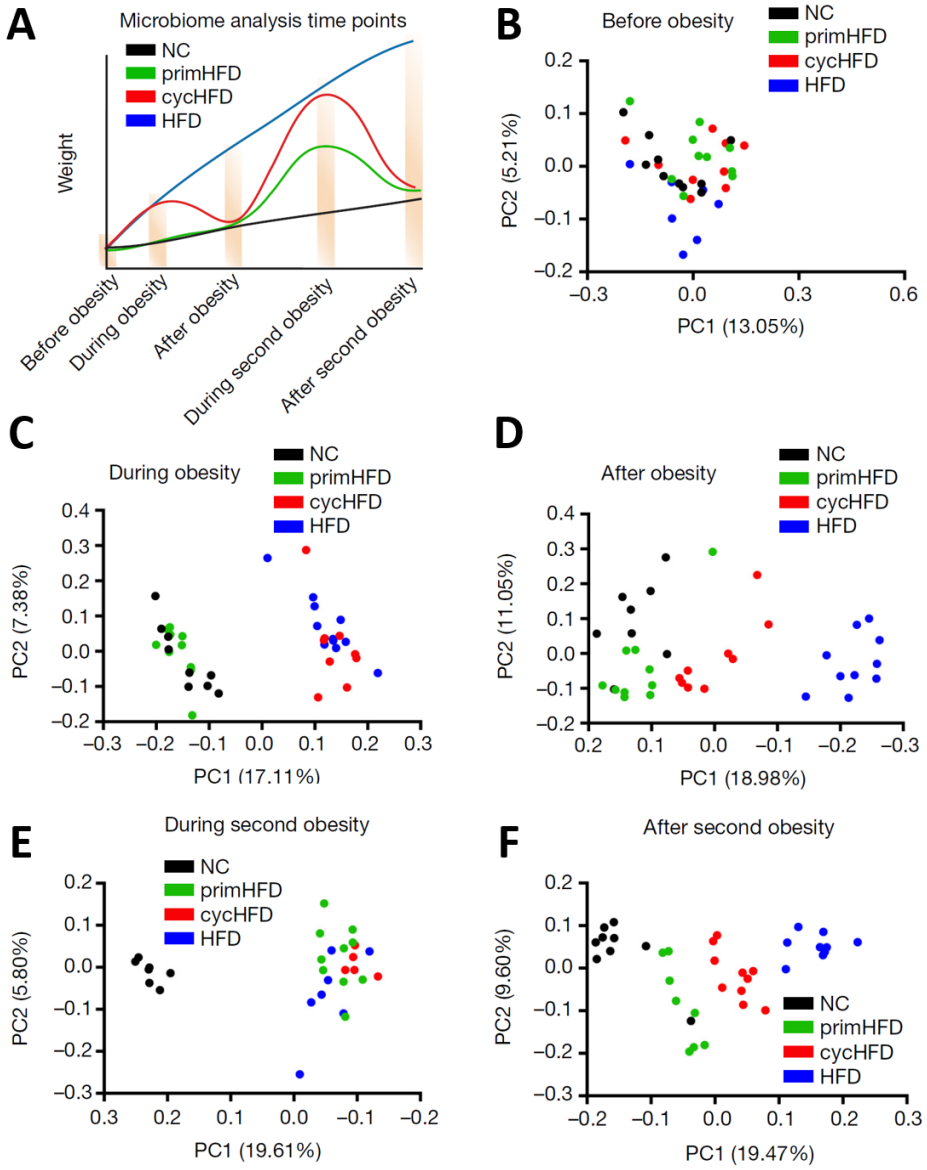


Figure 3.1. L'alternance d'expositions longues au WD jusqu'à atteindre un phénotype d'obésité, entrecoupées d'expositions au régime standard jusqu'à un retour à un poids normal chez la souris entraîne la persistance d'un microbiote persistant, aussi dit « cicatriciel ». **A.** Résumé du protocole suivi, avec un échantillonnage des fèces pour évaluer l'évolution de la composition du microbiote (diversité β) avant mise en place de l'obésité (« before first obesity », **B**), une fois la première phase d'obésité atteinte (« during obesity », **C**), lors du premier retour à un poids normal (« after obesity », **D**) puis lors de la seconde phase d'obésité (« after second obesity », **E**) et lors du second retour à un poids normal (« after second obesity », **F**), en se référant au groupe de souris qui suivait cette alternance de consommation de WD et de régime standard (groupe cycHFD). Leur microbiote était comparé à celui des souris qui étaient restées sous régime standard (groupe NC), de souris qui étaient restées sous WD (groupe HFD) et à un groupe de souris qui a suivi une seule phase de WD au moment de la deuxième réintroduction du régime dans le groupe cycHFD (groupe primHFD). D'après [246].

Dans le premier article de mon projet de thèse, nous avons montré que le microbiote était très rapidement impacté par le changement de régime avec un lien potentiel avec la réponse oxydante et inflammatoire hypothalamique. L'utilisation de rats axéniques a également montré que le microbiote était impliqué dans la régulation de la prise alimentaire à court terme lors des 24 premières heures d'exposition au WD. **Nous avons donc voulu dans un deuxième temps évaluer si des expositions courtes mais répétées à un WD pouvaient modifier l'adaptation de l'axe microbiote-cerveau (tronc cérébral, hypothalamus et striatum) au WD et avoir un impact sur la régulation de la prise alimentaire en l'absence de mise en place d'un phénotype obèse** (déterminé ici par rapport au poids des souris). Nous avons donc choisi des expositions courtes (7 jours) pour ne pas aller jusqu'à atteindre un phénotype d'obésité, afin de s'affranchir des effets pathologiques de l'obésité sur la physiologie de l'hôte (Figure 3A).

Pour cela, des souris C57BL6/N mâles ont été soumises à deux cycles d'une semaine de consommation de WD entrecoupés de 2 semaines de consommation d'aliment chow (groupe CYCL), durée permettant un retour à un poids similaire à celui des souris du groupe n'ayant jamais été exposées au régime WD (groupe CTRL) (Figure 1A). L'augmentation d'ingéré calorique (appelé pic d'hyperphagie) cumulé lors des 24 premières heures suivant l'introduction du régime WD n'a pas été impactée par le nombre de cycles (Figure 1B). En revanche, la prise alimentaire lors du premier jour de WD pendant la période jour (ingéré calorique cumulé lors des premières heures suivant l'introduction du WD) était significativement augmentée entre le 1er et le 3ème cycle (Figure 1C), avec une compensation, non-significative, de l'ingéré calorique en période nocturne. Afin d'identifier les mécanismes centraux impliqués dans ces modifications d'intensité de la période hyperphagique chez les souris CYCL, nous avons étudié l'inflammation et certains marqueurs de la régulation homéostatique et hédonique de la prise alimentaire dans le tronc cérébral, l'hypothalamus et le striatum chez des souris CTRL et CYCL juste avant (CTRL-chow et CYCL-chow) ou 1 jour après l'introduction du WD (CTRL-WD1d et CYCL-WD1d) (Figures 4 et 5). Dans le tronc cérébral, nous avons pu mettre en évidence que des expositions répétées au WD augmentaient l'expression de la protéine GFAP, un marqueur des astrocytes, et l'épaisseur de la barrière astrocytaire chez les souris CYCL-chow en comparaison aux souris CTRL-chow (Figure 3C et 3D). Au niveau du striatum, les expositions répétées au WD entrainaient une augmentation de l'expression du gène codant pour la tyrosine hydroxylase (*th*) et du gène codant pour le récepteur des opioïdes μ1 (*oprm1*) chez les souris CYCL-chow en comparaison aux souris CTRL-chow, indiquant respectivement une activation potentielle des systèmes dopaminergique et des opioïdes endogènes. Une interaction significative de l'exposition répétée au WD et du régime était également observée pour l'expression de certains marqueurs de l'inflammation dans l'hypothalamus (*il-1β* et *tnf-α*) et le striatum (*ccl2*) indiquant plutôt une diminution de l'expression de ces gènes lors de la réintroduction du WD dans le groupe CYCL-WD (Figure 4). **Ces données indiquent que l'exposition**

répétée au WD induit des modifications phénotypiques au niveau des trois zones de régulation du comportement alimentaire étudiées, à la fois quand les souris sont sous régime chow ou en réponse rapide au changement d'aliment.

Afin d'investiguer le rôle potentiel du microbiote nous avons ensuite étudié finement l'adaptation du microbiote intestinal au WD à la fois chez les souris CTRL (comparaison CTRL-chow et CTRL-WD1d) et chez les souris CYCL (comparaison CYCL-chow et CYCL-WD1d) (Figure 6) et également l'éventuelle mise en place d'un microbiote cicatriciel (comparaison CTRL-chow CYCL-chow) (Figure 7A). La diversité β n'était pas modifiée par l'exposition répétée au WD que les souris soient sous régime chow ou sous WD. En revanche, des modifications plus fines de composition du microbiote ont été observées entre les souris CTRL-chow et CYCL-chow avec notamment une augmentation de l'abondance relative des *Lachnospiraceae* chez les souris CYCL-chow en comparaison aux souris CTRL-chow. De plus, à l'échelle de l'OTU, 12 OTUs présentaient une abondance relative significativement plus élevée et 13 une abondance relative significativement plus faible entre ces deux groupes (Figure 7A). Ces changements de composition du microbiote étaient accompagnés de changements de son activité avec une augmentation significative de la concentration caecale en butyrate chez les souris CYCL-chow par rapport aux souris CTRL-chow. **L'ensemble de ces résultats confirme donc que des expositions courtes et répétées au WD conduisent à un microbiote cicatriciel qui diffère du microbiote de souris jamais exposées au WD, même sous régime chow, tant au niveau de sa composition que de son activité fermentaire.**

Afin de déterminer si ce microbiote cicatriciel était un inducteur direct de la modification de la prise alimentaire durant la période hyperphagique après plusieurs cycles de WD, un transfert de microbiote caecal entre des souris donneuses CYCL-chow et CTRL-chow (souris ayant reçu ou pas des expositions multiples au WD) a été réalisé vers des souris receveuses (traitées au polyéthylène glycol afin de dépléter leur microbiote) n'ayant jamais été exposées au WD (groupes MT-CYCL-chow et MT-CTRL-chow) (Figure 9A). Durant les 3 semaines qui ont suivi le transfert de microbiote, les souris receveuses ont été maintenues sous régime chow. Lorsqu'elles sont passées sous WD, les souris MT-CYCL-chow avaient une prise alimentaire plus élevée lors de la première heure d'exposition que les souris MT-CTRL-chow (Figure 9B), **confirmant un rôle de ce microbiote cicatriciel dans la modification de la réponse hédonique liée au « wanting ».** Chez les souris MT-CYCL-chow, la prise de poids à court terme (après 3 jours de régime WD) était également significativement plus élevée que chez les souris MT-CTRL-chow (Figure 9C).

Pour affiner l'étude du lien entre les modifications des systèmes de régulation du comportement alimentaire dans le tronc cérébral, l'hypothalamus et le striatum et les modifications du microbiote, nous avons de nouveau utilisé une approche d'intégration de données. Deux sous-réseaux de bactéries caecales qui co-évoluaient ensemble et étaient fortement abondants chez les souris CYCL-chow étaient corrélés positivement

avec plusieurs paramètres centraux. Au sein du premier sous-réseau, 14 OTUs (dont 6 identifiées en tant que *Kineothrix alysoides*) étaient positivement corrélées à l'épaisseur de la barrière astrogliale dans le tronc cérébral, aux niveaux d'expression géniques d'*agrp* dans l'hypothalamus et de *slc6a3* (transporteur de la dopamine) dans le striatum mais également aux concentrations caecales en acétate et en butyrate. Au sein du deuxième sous-réseau, 6 OTUs (dont 3 identifiées comme *Kineothrix alysoides* et 2 identifiées comme *Ruminococcus albus*) était corrélées positivement avec les niveaux d'expression géniques d'*agrp* dans l'hypothalamus et d'*oprm1* (récepteur opioïdergique) dans le striatum mais également positivement avec les niveaux d'expression géniques d'*iba1*, d'*il-1β* et de *tnf-α* dans l'hypothalamus. **Ainsi, cette approche par intégration de données nous a à nouveau permis de mettre en évidence des bactéries potentiellement impliquées dans le phénotype central et comportemental des souris exposées plusieurs fois au WD**. Des analyses complémentaires sont cependant à prévoir afin de confirmer d'une part le rôle causal du microbiote caecal dans les modifications de la phase hyperphagique, l'étude de transfert de microbiote n'ayant été réalisée que sur des groupes de 5 souris, et d'autre part afin de mieux comprendre le rôle des sous-réseaux bactériens, en lien avec leur activité métabolique dans le phénotype des souris CYCL.

Recurrent Western dieting induces a cicatricial caecal microbiota that participates to central food intake regulation disturbances.

Mélanie Fouesnard[1,2], Gaëlle Champeil-Potokar [3], Florence Boutillon[4], Léa Le Gleau [2], Selma Ben Fradj[5], Catherine Philippe[2], Alexandre Benani[5], Isabelle Denis [3], Gaëlle Boudry[1#], Véronique Douard[2*#]

[1]Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes, Rennes, France.
[2]Institut MICALIS, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France.
[3] UMR PNCA, INRAE, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France.
[4] UMS Biosit, INSERM, CNRS, Univ Rennes, Rennes, France
[5]Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Unité Mixte de Recherche 6265–Centre National de la Recherche Scientifique 13241–Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Université de Bourgogne, Dijon, France.

Corresponding author: Véronique Douard, veronique.douard@inrae.fr

#: these authors contributed equally to this manuscript.

Abstract

Alternating periods of excessive and restrained eating, a frequent dieting behavior that also occurs in normal weight individuals, is a risk factor for the development of overweight and obesity. When modeled in mice, these repeated high-energy Western diets (WD)/ low-energy standard chow diet cycles induce escalating WD consumption at each new WD cycle. However, the mechanisms that would explain how this increase in energy intake and the consequent weight gain remain obscure. Here, we tested the hypothesis that recurrent exposure to WD alters food intake regulation by changing intestinal microbiota and/or central inflammation levels. We showed that recurrent WD exposures increased energy intake specifically during the first hours following the re-introduction of WD. Inflammatory tone in food intake regulation-related central zones was lower after recurrent exposure to WD, either under chow or in response to WD, while expression of reward-related genes was enhanced. Recurrent exposures to WD induced changes in gut microbiota composition and metabolic activities which persisted even after the mice had returned to standard chow diet. Importantly, gut microbiota transfer from these mice to mice never exposed to WD changed the food intake behaviour in recipient mice when they were exposed to WD to resemble that of the donor mice. This directly implicates gut microbiota as a causal factor that contributes to the escalating overconsumption of palatable diet with recurrent exposure to WD.

Introduction

To combat global obesity pandemic, new strategies and treatments to prevent unhealthy weight gain are needed (Hebert et al., 2013; Kraak et al., 2009). Maintenance of optimal body weight is driven by a fine-tuned balance between energy intake and energy expenditure, which are both modulated by a complex interplay of a number of signaling pathways (Ferrario et al., 2016). Besides this physiological regulation of food intake, external cues can stimulate food intake in the absence of hunger (hedonic eating (Lowe and Butryn, 2007)) or drive restriction of energy intake below physiological need (Chen et al., 2016). Thus, even in normal weight individuals, periods of high caloric food intake alternate with periods of normal consumption and/or restrained eating. Several studies reported that alternating periods of excessive and restrained eating is a risk factor for the development of overweight and obesity (Herhaus and Petrowski, 2021). This human behavior has been modeled in mice with high energy (e.g. western diet, WD) and low energy diet (chow diet) cycles of different durations ranging from hours to months (Bake et al., 2014; Cifani et al., 2013, 2009; Simonds et al., 2018; Thaiss et al., 2016). Under all these cycling regimes, each new exposure to WD led to progressively higher levels of food consumption (Simonds et al., 2018), suggesting that repeated exposures to WD disturb food intake regulation.

Food intake is regulated by several homeostatic and non-homeostatic signals involving several brain regions (Alonso-Alonso et al., 2015). The mechanisms by which chronic or acute exposure to WD influence eating behavior is not yet fully elucidated but there is evidence that inflammation may play a major role. Indeed, hypothalamic and brainstem immunocompetent cells, such as microglia and astrocytes, are activated by WD feeding independently of its duration (Minaya et al., 2020; Thaler et al., 2012). Exposure of rodents to WD leads to transient hyperphagia which subsequently resolves, leading to a return to initial energy intake within 4 to 7 days (Benani et al., 2012; Butler et al., 2001; Valdivia et al., 2014). This initial increase in food intake seems directly linked to the early activation of hypothalamic microglia, since inhibiting microglia expansion prevents early hyperphagia in mice (André et al., 2017). Inflammation has also been linked to alteration in the reward response to food. Indeed, reactive gliosis, increased expression of cytokines, and NFκB transcriptional activity were all observed in the reward system of compulsive sucrose-seeking WD-fed mice (Décarie-Spain et al., 2018). Selective inhibition of the NFκB pathway in the reward system of these mice reversed the upregulated expression of inflammatory markers and blunted compulsive sucrose-seeking behavior (Décarie-Spain et al., 2018).

A role of microbiota in diet-driven eating behavior dysregulation has been suggested by several studies. Several reports suggested that WD-induced dysbiosis participates in brainstem and hypothalamic inflammation (Fouesnard et al., 2021; Kim et al., 2020). Gut microbiota metabolites can also modulate food intake independently of central inflammation. For example, acetate, a short chain fatty acid (SCFA) produced by the intestinal bacteria, is able to cross the blood-brain barrier and induce satiety (Frost et al., 2014). Bacterial membrane components such as LPS or bacterial secreted caseinolytic protease B (ClpB) also affect food intake regulation (Breton et al., 2016; Cawthon and de La Serre, 2018; Langhans, 2007). Moreover, food addiction has been associated with distinct microbiota composition in obese women (Dong et al., 2020) and probiotic intervention ameliorated food intake in obese women with food addiction (Narmaki et al., 2020).

Weight cycling, *i.e.* repeated weight loss and weight rebound along with restrictive diet obesity therapy has been attributed to the obesogenic memory of peripheral immune cells in rodent models (Sun et al., 2020; Zou et al., 2018). At the central level, priming of astroglial cells has been observed in several models, such

as LPS peripheral exposure (Zhang et al., 2020) or maternal WD (Bordeleau et al., 2020). In these models, reactivity of astroglial cells was blunted or exacerbated by previous expositions to the stimulus. Moreover, intestinal microbiota signature persists in mice with a history of obesity despite weight loss and this microbiota pattern promotes faster weight regain (Thaiss et al., 2016), suggesting that microbiota also retains a WD exposure memory. Thus, we hypothesized that repeated exposure to WD could alter food intake regulation through microbiota and/or central inflammation alteration. We tested this hypothesis by subjecting normal weight mice to several 1 week-WD exposures separated by 2 weeks of chow diet. Within the first hours of each re-exposure to WD, the increase in energy intake was gradually higher and led to progressively greater weight gain during each successive 1 week-WD periods. Using microbiota analysis and microbiota transfer we demonstrated the role of microbiota memory of the past exposures to WD in the motivation of mice for palatable WD.

Methods

Animals

The present protocols received written agreement from the local ethic committees (file no. APAFIS #2015102618572930 for experiments 1 and 2, and APAFIS#2020051821292405 for experiment 3). For all experiments, 7 weeks old mice were housed individually at arrival and fed a regular chow diet (chow V1124-000, SSniff, Germany) *ad libitum* under a 12:12h light/dark cycle (22 ± 2°C). WD (RD12451, Research diet, USA) was introduced at the beginning of the light cycle (resting period) for each cycle and mice were euthanized during the first half of the light cycle.

Experiment 1. Six male C57Bl6/N mice (Janvier labs, France) underwent 3 cycles of 1 week of WD consumption separated by 2 weeks of chow diet consumption. All diets were provided *ad libitum*. Six other mice received chow diet during the whole experiment. Food intake was measured during resting (diurnal, 8h from 9am to 5pm) and activity (nocturnal, 16h from 5pm to D+1 9am) periods during the first 2 days of WD consumption for each of the 3 WD cycles. Food intake was also measured daily during all the experiment. Experimental protocol is summarized in Fig. 1A.

Experiment 2. 30 male C57Bl6/N mice (Janvier labs, France) were divided into 4 groups of similar body weight: the 1st group (CTRL-chow, n=8) was fed the chow diet *ad libitum*, the 2nd (CTRL-WD 1D, n=8) was fed the chow diet then switched to a WD for 1 day before euthanasia, the 3rd group (CYCL-chow, n=7) underwent 2 cycles of 1 week of WD feeding separated by 2 weeks of chow diet consumption before euthanasia under chow diet and the last (CYCL-WD 1D, n=7) also underwent 2 cycles of 1 week of WD feeding before being euthanized after 1 day of a 3rd WD cycle. Experimental protocol is summarized in Fig. 3A. Food intake was measured daily during the whole experiment. Caecal content, hypothalami and striata were stored at -80°C after collection. Brainstems were dissected, fixed in 10% neutral buffered formalin (formaldehyde 4%, Diapath) for 24h at 4°C and then cryoprotected with sucrose (30% in PBS).

Experiment 3. *Donor mice*: 12 C57Bl6/N male mice (Envigo, France) were divided into 2 groups of similar body weight: the CTRL group was fed a chow diet during all the experiment and the CYCL group underwent 2 cycles of 1-week WD consumption separated by 2 weeks of chow diet consumption. The mice were euthanized at the end of the 2nd chow period. *Preparation of the inoculum*: Caecal contents were sampled from donor mice at the time of the euthanasia, diluted at a 1:50 (mass/volume) ratio in maltodextrin-trehalose diluent (Burz et al., 2019) and transferred to recipient mice or stored at -80°C. *Recipient mice*: 12 C57Bl6/N mice (Envigo, France) were gavaged 5 times in 2hrs with 200µL of a polyethylene glycol (PEG)

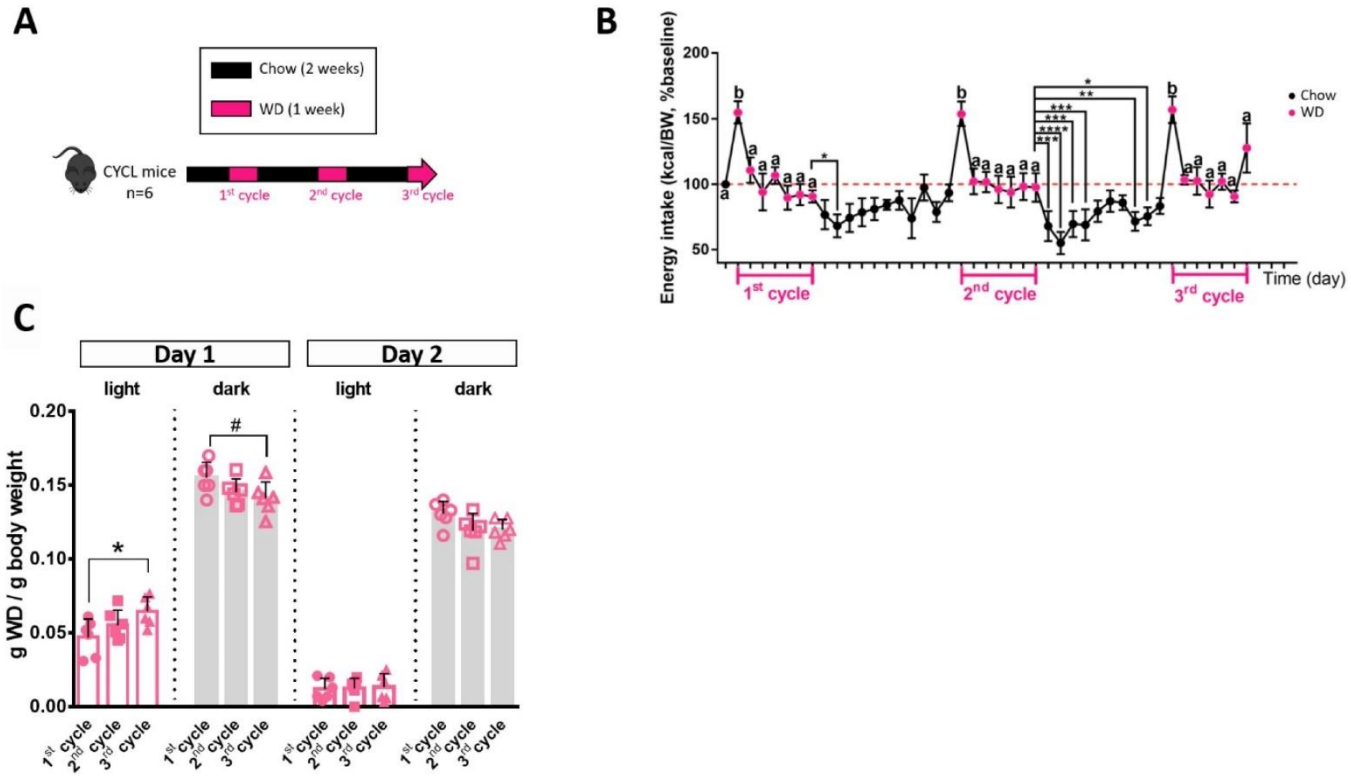


Figure 1. Recurrent exposure to WD altered WD consumption pattern upon WD re-introduction.

A: Schematic protocol of the experiment 1: Mice were subjected to three 1-week WD cycles (pink) separated by 2 weeks of standard (chow) diet consumption (black). **B**: Total energy intake per day of CYCL mice during the 3 WD cycles. The baseline (100%) is indicated by the red dotted line. WD days are indicated with pink points. Statistical differences between the last day of WD consumption and the chow diet following each cycle is represented with asterisks (*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ****: P<0.0001) while statistical differences between the initial food intake and food intake during WD consumption are indicated with letters (two different letters indicate a significant statistical difference (P<0.05)). **C**: Light (rest period) and night (activity period) periods energy intake during the first 2 days of WD consumption during each WD cycle. Mann-Whitney tests were performed between cycles within a period and a day (*: P<0.05, #: P<0.08).

solution (Macrogol, 4000, 425g/L in sterile water) to deplete their gut microbiota. They were then divided into 2 groups (MT-CTRL and MT-CYCL) of weight-matched mice. Four hours after the last PEG gavage, they were colonized by intra-gastric daily gavage of 200 µl of inoculum. The next two days after transfer, recipient mice were gavaged with 200µL of frozen/thawed inoculum. Two weeks after microbiota transfer, mice were transferred to indirect calorimetry cages (Promethion cages, Sable Systems International, Berlin, Germany). After 5 days of acclimatization, their eating behavior was monitored during the last 36 hrs under chow diet and 6 days after a switch to WD. Experimental protocol is summarized in Fig. 9A.

Determination of caecal microbiota composition

Total DNA was extracted from caecal content samples using GNOME DNA isolation kit (MP Biomedicals, Strasbourg, France). The V3-V4 hypervariable region of the bacterial 16S rDNA was amplified by PCR (forward primer: 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT ACGGRAGGCAGCAG-3', reverse primer: 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TACCAGGGTATCTAATCCT-3'; 94°C for 1min then 30 cycles at 94°C for 1min, 65°C for 1min and 72°C for 1min before a final step at 72°C for 10min). After quality checking by electrophoretic 2% agarose gel migration, obtained amplicons were sequenced using Illumina MiSeq technology (GenoToul platform, Toulouse, France). Sequences are available under the bioproject accession numbers PRJNA609247.

Determination of caecal SCFA levels

SCFA caecal levels were determined as previously described (Zhang et al., 2019).

Area postrema astroglial immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 20 µm thick serial horizontal brainstem sections containing the area postrema (AP) and tractus solitarius nucleus (NTS) to evaluate microglial and astroglial morphology. Non-specific sites were blocked by incubation with bovine serum albumin (BSA) (2% in PBS 0.1M; Triton X-100 0.3%) for 2h at room temperature. Astrocytes were labelled for GFAP by incubating the slices for 1hr with a monoclonal Cy3-anti-GFAP antibody (Sigma, France). Microglia were labelled for Iba1 by incubating the slices for 48hr at 4°C with a rabbit monoclonal anti-Iba1 antibody (Abcam, France), rinsed 3 times, then incubated for 24h at 4°C with a secondary Alexa 488-anti-rabbit antibody (Life Technologies, France). All antibodies were diluted 1:1000 in PBS-Triton-BSA 0.2%. Cell nuclei were labelled with bis-benzimide (0.5 µg/mL, Hoechst 33258, Sigma, France). Preparations were mounted in fluoroshield mounting medium (Sigma, France). IHC images from brain stem sections were acquired on a high-capacity digital slide fluorescence scanner (Pannoramic SCAN P150, 3D HISTECH) at 20x resolution, using the extended focus function scanner to generate images with extended depth of field from acquired Z-stacks (11 images, 1 µm interval, 10 µm total thickness).

Iba1-labelled microglial cells within the AP were manually counted on 1 slice per mouse. In the dorsal vagal complex (DVC) sections, the deployment of the astroglial barrier was quantified by measuring (i) the total GFAP area delineating the border between the AP and the NTS on images converted in binary format using an automatic thresholding method (Threshold: "Li" algorithm) on Image J software as previously described (Daumas-Meyer et al 2018), and (ii) 5 widths representative of the thickness of the barrier : dorsal-left, ventral left, dorsal right, ventral right, ventral central. Measures were performed on 1 slice per mouse, each slice being identically positioned to allow comparisons between groups. All measures were performed

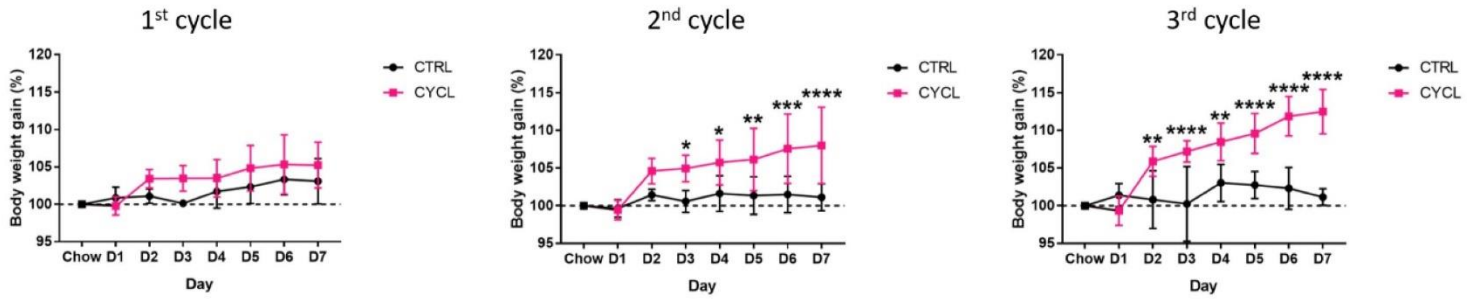


Figure 2. Recurrent exposure to WD enhanced body weight gain at each WD period consumption.

Mean body weight gain evolution of mice following each WD introduction (from D1 to D7) was expressed as a percentage of to their body weight under chow diet the day before dietary transition (chow) (%). Body weight evolution of cycling mice (CYCL) is represented by pink squares while body weight gain of control mice (CTRL) is represented by black points. A 2-way ANOVA was performed followed by Tukey's post-hoc tests for each WD cycle between CTRL and CYCL mice with *: $P<0.05$; **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ and ****: $P<0.0001$.

by the same experimenter who was blind to the groups.

Hypothalamic and striatum gene expression levels

Hypothalamus and striatum total RNA were extracted using miRVANA RNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA), following manufacturer's instructions as described previously (Zhang et al., 2019). Reverse transcription was performed from 1.5µg (hypothalamus) and 1.4µg (striatum) of total RNA using the cDNA high-capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems, Wattham, Massachusetts, USA) following manufacturer's instructions. Real-time PCR were performed on 1:7 diluted cDNA, based on TaqMan gene expression assays with predesigned Taqman primers and probes for mice (Assays-on-Demand™, Gene Expression Products; Applied Biosystems, Forster City, USA, Supplementary Table 1) as described previously (Beaumont et al., 2017). Ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (*rplp0*) was used as a reference gene for hypothalamus samples and *rplp0* as well as β-actin (*actb*) for striatum samples. Relative expression levels of target genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), considering the corresponding *rplp0* expression level (hypothalamus) or the geometric mean of *rplp0* and *actb* expression levels (striatum) for determining the ΔC_T for each sample and the CTRL-chow as the reference group to determine the $\Delta\Delta C_T$.

Statistics

Energy intake was calculated per mouse as a percentage of their baseline energy intake. The 3 days under chow diet before dietary change were used for each mouse to determine this baseline energy intake. For each mouse, this energy intake was divided by its body weight for normalization. To determine diurnal and nocturnal energy intakes, these values were divided by their respective duration in hours (8h and 16h, respectively).

Expression levels of mRNA, SCFA levels and immunohistology data between groups were compared using Mann-Witney tests on Prism GraphPad v.7.00 (GraphPad Software, San Diego, USA).

All bioinformatics analyses on caecal microbiota were performed using R software v.3.6.2 (R Core Team (2020), n.d.). 16S rDNA sequences from experiments 2 were first filtered according to sequencing quality, hypothetic chimera were removed and taxonomic affiliation was performed (SILVA 132S database), all using dada2 R package v.1.14.0 (Callahan et al., 2016, p. 2). A raw OTU table was obtained for further statistical analyses (files are available upon author request). Microbiota composition was analyzed from OTU table, associated phylogenetic tree and metadata (Additional files 3 and 4)) using the phyloseq R package v.1.30.0 (McMurdie and Holmes, 2013). Rarefied data were used for determining the number of observed species per sample whereas unrarefied (raw) data were used for determining Shannon index. Data were normalized using Geometric Mean of Pairwise Ratios (GMPR) method (Chen et al., 2018). Differential abundances of OTUs between groups (2 by 2 comparisons) were determined using DESeq2 method with DESeq2 R package v.1.26.0 (Love et al., 2014). Metabolic activity of caecal microbiota was predicted using PICRUSt2 software (Douglas et al., 2019). Output data were normalized using GMPR method as described above before performing t-tests between pairs of groups to assess significant differences. Groups of highly correlated OTUs were built using the miBiOmics web application MiBiOmics (Zoppi et al., 2020) based on WGCNA method (Langfelder and Horvath, 2008).

Results

Recurrent exposure to WD altered diurnal energy intake in the first hours following the dietary switch

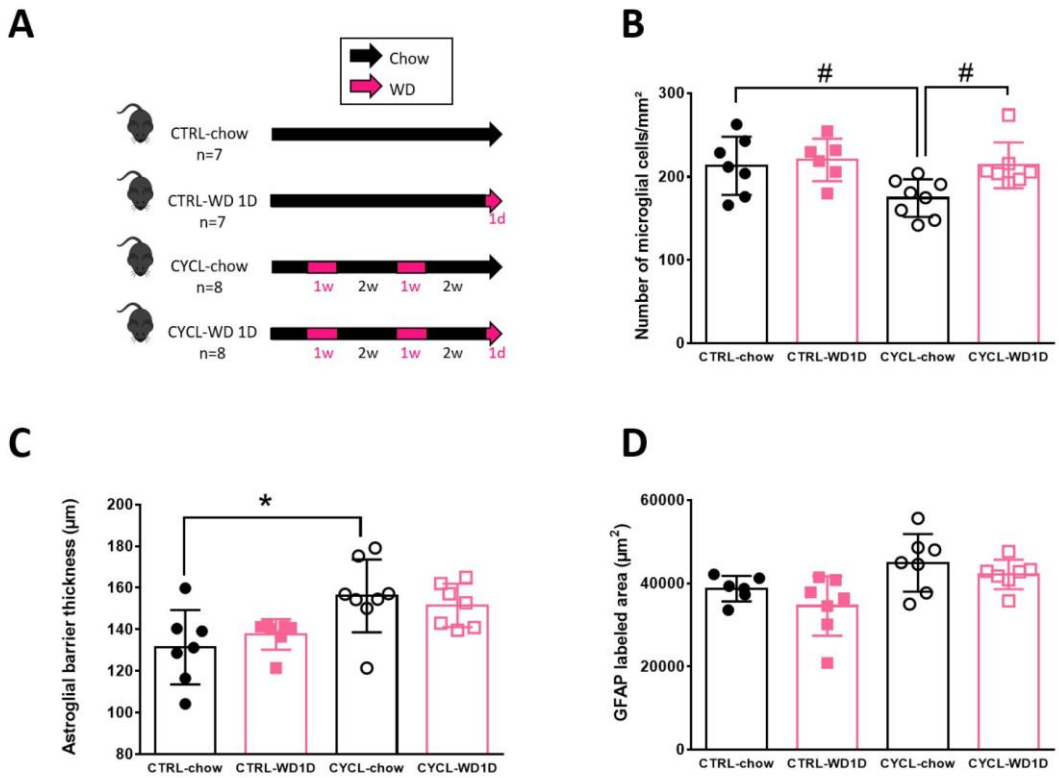


Figure 3. Recurrent exposure to WD altered brainstem glial reactivity.

A: Simplified protocol of experiment 2: 4 groups of mice were either submitted to only chow diet during all the experiment (CTRL-chow), submitted to 1 day of WD consumption at the end of the experiment before euthanasia (CTRL-WD 1D), submitted to 2 cycles of 1 week of WD consumption before being euthanized under chow diet (CYCL-chow) or submitted to 2 cycles of 1 week of WD consumption before being euthanized after 1 day of a 3rd WD cycle (CYCL-WD 1D). **B**: Density of microglial cells in the AP+NTS. **C**: Astroglial thickness in the AP. **D:** Astroglial area in the AP. Mann-Whitney tests were performed between groups (*: P<0.05, #: P<0.08).

To examine the impact of repeated exposure to WD on energy intake, CYCL mice underwent 3 cycles of 1 week of WD exposure separated by 2 weeks of chow diet consumption (Fig. 1A). In response to each WD introduction, mice showed a one-day hyperphagic phase followed by normalization of their energy intake normalization of their energy intake by day 2 of WD consumption (Fig. 1B). When back on chow diet, their daily energy intake decreased significantly when compared to the intake on the last day of WD (Fig 1B). This decrease was more pronounced and longer after the 2nd WD cycle than after the first one (Fig. 1B). By evaluating the WD consumption pattern during the light and dark periods of the day we discovered that most of the hyperphagia during the first day of the WD was due to massively increased intake during the light part of the day. Moreover, the consumption during the light phase of the first day of each WD cycle progressively increased and reached significance between the 1st (CYCL-1st cycle) and the 3rd WD-cycle (CYCL-3rd cycle) (Fig. 1C). During the dark (activity) period, there was no significant difference of energy intake at D1 between the 1st, 2nd or 3rd WD cycle under WD, despite a trend for decreased energy intake between the 1st and 3rd cycle (Fig. 1C). Consumption the 2nd day did not change between the WD cycles both during light and dark periods (Fig. 1C).

When normalized to their initial body weight, mice body weight increased during each WD

cycles and then returned to a body weight similar to that of CTRL mice (Supplementary Fig. 1). Therefore, at the beginning of each new WD cycle there was no body weight difference between CYCL and CTRL mice. However, when switched to WD, mice exhibited enhanced body weight gain at each cycle. Indeed, the relative body weight gain under WD was not significantly different from that of CTRL mice during the 1st WD cycle but was significantly higher from D3 of WD during the 2nd cycle and from D2 of WD during the 3rd WD cycle when compared to CTRL mice (Fig. 2).

Impact of recurrent exposure to WD on inflammation in the brainstem dorsal vagal complex, the hypothalamus and the striatum

Hypothalamic and brainstem inflammation, via the activation of microglia and astrocytes or cytokine production, has been observed in response to WD as early as 24h after dietary change and this inflammatory response seems involved in the regulation of food intake upon WD nutritional challenge (MacDonald et al., 2020). We hypothesized that these mechanisms may play a role in the early changes in eating pattern in mice exposed to repeated WD cycles. We first examined changes in AP and NTS microglial number in CYCL mice under chow (CYCL-chow) and after 1 day of WD (CYCL-WD 1D) and in age-matched CTRL mice under how (CTRL-chow) or after 1 day of WD (CTRL-WD 1D) (Fig. 3A). The number of microglial cells within the AP and NTS (an index of microglial activation) tended to be lower (P=0.07) in CYCL-chow mice compared to CTRL-chow mice and tended to increase (P=0.06) upon WD introduction in CYCL mice only (Fig. 3B). Then, we determined whether the deployment of the AP-NTS astroglial barrier changed in response to the recurrent exposure to WD. We evaluated the spreading of the AP-NTS astroglial barrier by measuring the thickness between the AP and the left and right NTS (Fig. 3C) as well as the total GFAP-labelled surface (Fig. 3D). Astroglial barrier thickness was increased (P=0.02) in CYCL-chow mice compared to CTRL-chow mice and stayed elevated upon WD switch (Fig. 3C). GFAP surface was not modified by recurrent WD cycles (Fig. 3D). Collectively, these data suggest that in the DVC recurrent WD exposures exacerbated the microglial response upon re-introduction of WD despite a prior increased in astroglial barrier thickness.

We next evaluated inflammatory tone in the hypothalamus and striatum by measuring inflammatory cytokines gene expression. In the hypothalamus, no increase in *il-1β, tnf-α*, *ccl2*, *iba1* or *il-6* expression level was observed after 1d of WD in CTRL mice (Fig. 4 and Supplementary Fig. 2). Surprisingly, in CYCL mice, 1d of WD significantly decreased *il-1β* (P=0.0002) and *tnf-α* (P=0.02) expression (Fig. 4). A similar tendency, yet not significant, was observed for *ccl2* expression level (Fig. 4) but not for *iba1* or *il-6* (Supplementary Fig. 2). In the striatum, 1d of WD significantly increased the expression level of *il-1β* (P=0.01) and *ccl2* (P=0.03) in CTRL mice (Fig. 4). A similar pattern was observed for *tnf-α* (P=0.06, Fig. 4) but not *iba1*or *il-6* (Supplementary Fig. 2). Interestingly, no such increase was observed in CYCL mice. Thus, recurrent exposure to WD seems to induce a lower inflammatory tone after 1d of WD (reduced cytokine expression level in the hypothalamus and absence of cytokine increase in the striatum) in key zones of food intake regulation.

Recurrent exposure to WD altered expression of genes involved in reward but not homeostatic response to WD.

The differences in energy intake pattern at D1 between WD cycles and in inflammatory markers in the hypothalamus and striatum suggest a possible alteration of the central pathways involved in both homeostatic and/or hedonic regulation of food intake. To explore this, we examined expression levels of genes encoding for the anorexigenic (POMC) and orexigenic (AgRP, NPY) neuropeptides in the hypothalamus and for the dopaminergic (tyrosi-

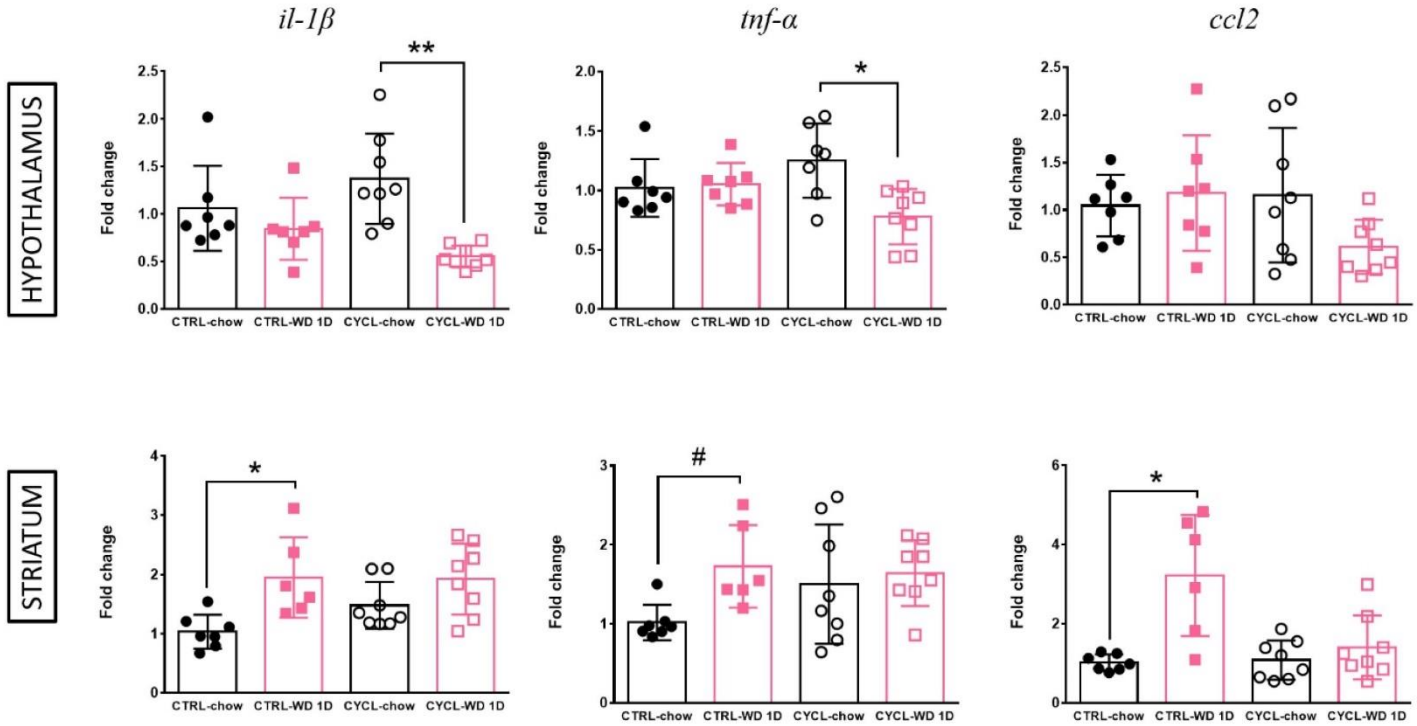


Figure 4. Recurrent exposure to WD blunted hypothalamic and striatal inflammatory markers.

Expression levels of *il-1β, tnf-α* and *ccl2* in the hypothalamus and striatum of mice in experiment 2. Mann-Whitney tests were performed between groups (*: P<0.05, #: P<0.08).

-ne hydroxylase (TH), sodium-dependent dopamine transporter (SLC6A3) and the DRD1 and DRD2 receptors) and opioidergic (preproenkephalin (PENK) and the μ-receptors OPRM1 (Gonzalez-Nunez et al., 2013; Nummenmaa et al., 2018)) in the striatum. Under chow diet, WD cycles did not affect *pomc, agrp* and *npy* expression levels (Fig. 5A and Supplementary Figure 3). One day of WD significantly reduced *pomc* (P=0.001) and *agrp* (P=0.003) expression levels in CYCL but not CTRL mice (Fig. 5A). Expression of *npy* was not altered by 1d of WD (Supplementary Figure 3). In the striatum, expression levels of *oprm1* (Fig. 5B) and *th* (Fig. 5C) was significantly increased in CYCL-chow compared to CTRL-chow mice (+57% P=0.03 and +37% P=0.002, respectively). Moreover, *th* and *sl6ca3* expression decreased after 1 day of WD in CYCL but not CTRL mice (P=0.02 and 0.05, respectively; Fig. 5C). Expression levels of *penk*, *drd1* and *drd2* was not altered by repeated exposure to WD or 1 day of WD (Fig. 5B-C and Supplementary Figure 3). Thus, WD cycles induced an increase in reward-linked gene expression levels in the striatum of mice even though they had been under chow diet for 2 weeks after the last WD cycle. On the contrary, WD cycles did not affect expression levels of hypothalamic genes involved in food intake regulation when mice were under chow diet but dramatically reduced their expression after 1d of WD.

Recurrent exposure to WD modified caecal microbiota composition and metabolic activity

The microbiota is now known to play a role in food intake behavior and weight gain (Bäckhed et al., 2004; Turnbaugh et al., 2006). Its composition and metabolism are also highly sensitive to dietary changes (Fouesnard et al., 2021) and changes in response to WD could persist even after a washout period (Thaiss et al., 2016). To determine whether recurrent exposure to WD affected caecal microbiota, differences in bacterial caecal ecosystem composition were determined between the CTRL and CYCL mice under chow or after 1 day of WD.

The number of observed OTUs decreased significantly between CTRL-chow and CYCL-chow (Fig.6A), but there was no additional effect of 1day of WD. Bray-Curtis derived dissimilarity matrices indicated that caecal bacterial composition was strongly affected by the exposure to WD regardless of the WD cycles (Fig. 6B). At the phylum level (Fig. 6C), Bacteroidetes relative abundance was not impacted by diet nor by cycling WD. Firmicutes relative abundance was reduced after 1 day of WD in CYCL (-20%, P<0.01) but not CTRL mice. Proteobacteria relative abundance was increased after 1 day of WD in CTRL (+154%, P<0.001) and CYCL (+644%, P<0.0001) mice, this increase being more pronounced in CYCL mice (Fig. 6C). At the family level, CYCL-chow mice displayed increased relative abundance of *Lachnospiraceae* compared to CTRL-chow mice (+25%, P<0.05; Fig. 6D). *Lachnospiraceae* relative abundance significantly decreased after 1 day of WD in both groups (-33%, P<0.05 in CTRL and -48%, P<0.001 in CYCL groups; Fig. 6D). *Desulfovibrionaceae* relative abundance increased significantly in response to WD in CTRL (+198%, P<0.01) and CYCL (+684%, P<0.001) mice, this increase being more pronounced in CYCL mice (Fig. 6D). *Muribaculaceae* relative abundance decreased in both CTRL and CYCL groups in response to WD while *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* and *Rikenellaceae* relative abundance increased in both groups in response to WD (Fig. 6D).

In order to examine in further details the impact of recurrent WD exposure on the microbiota composition, differential abundance analysis at the OTU level were performed between CTRL-chow and CYCL-chow mice. Under chow diet, recurrent exposure to WD significantly modified the abundance of 25 OTUs (Fig. 7A).

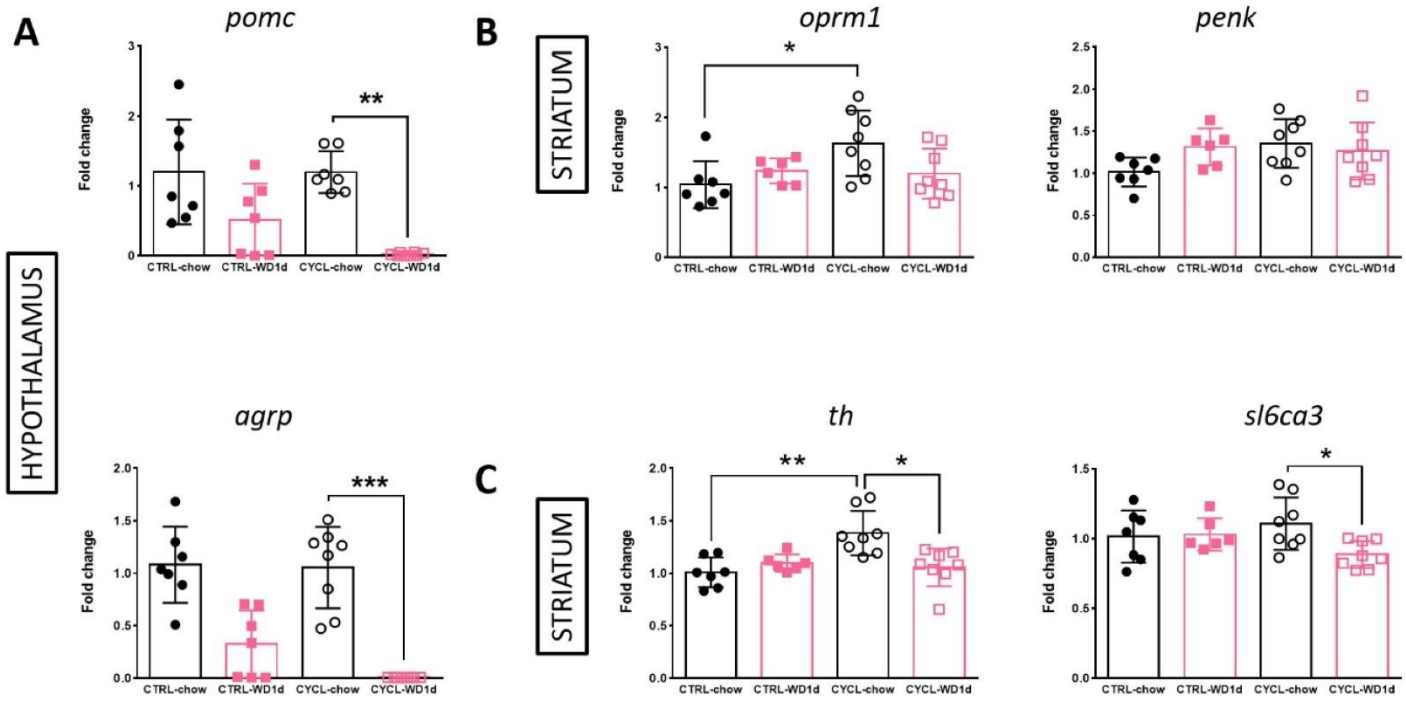


Figure 5. Recurrent exposure to WD altered hypothalamic and striatal food intake and reward gene expression.

A: Expression levels of anorexigenic (*pomc*) and orexigenic (*agrp*) in the hypothalamus. **B**. Expression levels of genes involved in the opioidergic system: the proenkephalin (*penk*) and the μ-receptor 1 (*oprm1*). **C**: Expression levels of genes involved in the dopaminergic system: the tyrosine hydroxylase (*th*), the sodium-dependent dopamine transporter (*slc6a3*). Mann-Whitney tests were performed between groups (*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

The majority of them (16/25) were members of the *Lachnospiraceae* family. 5 OTUs affiliated to *Kineothrix alysoides* displayed opposite evolutions with 3 being enriched and 2 being impoverished in CYCL mice under chow diet compared to CTRL mice. DESeq2 analysis were also performed to evaluate the interaction between WD cycles and diet (Fig. 7B). We selected only OTUs for which this interaction was significant, *i.e.* the OTUs whose abundance evolution upon 1d of WD was significantly different between CTRL and CYCL mice. Fourteen OTUs were significantly impacted by 1 day of WD diet in CTRL group but not in CYCL group. Among these OTUs, 3 were enriched after 1d of WD (*Falcatimonas natans*, *Muribaculum intestinale* and *Clostridium saccharolyticum*) while the other 12 were impoverished (among them 5 *Kineothrix alysoides* and 2 members of the *Clostridium* genus). On the contrary, ten OTUs were significantly impacted by 1 day of WD in CYCL mice but not in CTRL group with an enrichment of 2 *Acetatifactor muris*, 1 *Muribaculum intestinale* and 1 *Eubacterium siraeum* and an impoverishment of *Pseudoflavonifractor phocaeensis*, *Clostridium asparagiforme*, *Bacteroides caecimuris*, *Anaerocolumna cellulosilytica* and *Roseburia faecis* under WD. Finally, 4 OTUs had an abundance that had opposite evolution in CYCL or CTRL mice in response to WD. Two OTUs (*Clostridium saccharolyticum* and *Kineothrix alysoides*) were increased after 1 day of WD in CYCL mice while reduced in CTRL mice and 2 others (*Ruminococcus gnavus* and another *Kineothrix alysoides*) followed an opposite evolution (Fig. 7B).

Changes in intestinal bacteria community were associated with changes in the metabolic activity of the gut microbiota, evaluated through caecal SCFA level measurements and PICRUSt2, a bioinformatic software that predicts bacterial Metabolic functions based on the microbiota composition. The dietary switch and the recurrent exposure to WD affected total level of SCFA as well as the concentrations of acetate, butyrate and propionate (Fig. 8A-D). One day of WD profoundly reduced all SCFA caecal concentration regardless of the WD cycles (Fig. 8A-D). More interestingly, acetate, butyrate and total SCFA concentrations were 1.7 ($P=0.01$), 2.5 ($P<0.0001$) and 1.8 ($P=0.002$) times significantly higher in CYCL-chow than in CTRL-chow mice, indicating that changes in SCFA metabolism persist long after the WD was withdrawn (Fig. 8A, C-D). The same tendency was observed for propionate, yet not reaching significance (x1.7, $P=0.07$, Fig. 8B).

PICRUSt analysis at the superpathway level also unraveled the persistent impact of recurrent exposure to WD on several bacterial metabolic pathways (Table 1). Under chow diet, the microbiota of CYCL mice was significantly impoverished in several biosynthesis pathways (L-methionine, 2,3 butane-diol, guanosine and cysteine) while 5 times enriched in demethylmenaquinol-6 biosynthesis pathway. The sulfur oxidation pathway was also impoverished. In response to 1 day of WD, the microbiota of CTRL mice was 16 times enriched in glycol metabolism and degradation pathway, without any modification in CYCL mice. D-glucuronate degradation pathway was less present in CTRL mice after dietary change but increased in CYCL mice after 1 day of WD. Amino acids (L-isoleucine, L-threonine, L-serine and glycine, branched amino acids and L-methionine), nucleotides (adenosine, 5-aminoimidazole ribonucleotide, pyrimidine deoxyribonucleotides), pyruvate linked (geranylgeranyl diphosphate, (R,R)-butanediol, *Clostridium acetobutylicum* acidogenic fermentation, sulfolactate degradation) and heme (from uroporphyrinogen-III, glutamate and glycine) biosynthesis pathways were enriched after 1 day of WD in CYCL but not in CTRL mice. Glucose metabolism linked (UDP-glucose-derived and UDP-N-acetylglucosamine-derived antigens building blocks biosynthesis, glycolysis) and vitamins linked (tetrahydrofolate biosynthesis and salvage, thiamin diphosphate biosynthesis) pathways were also enriched in CYCL in res-

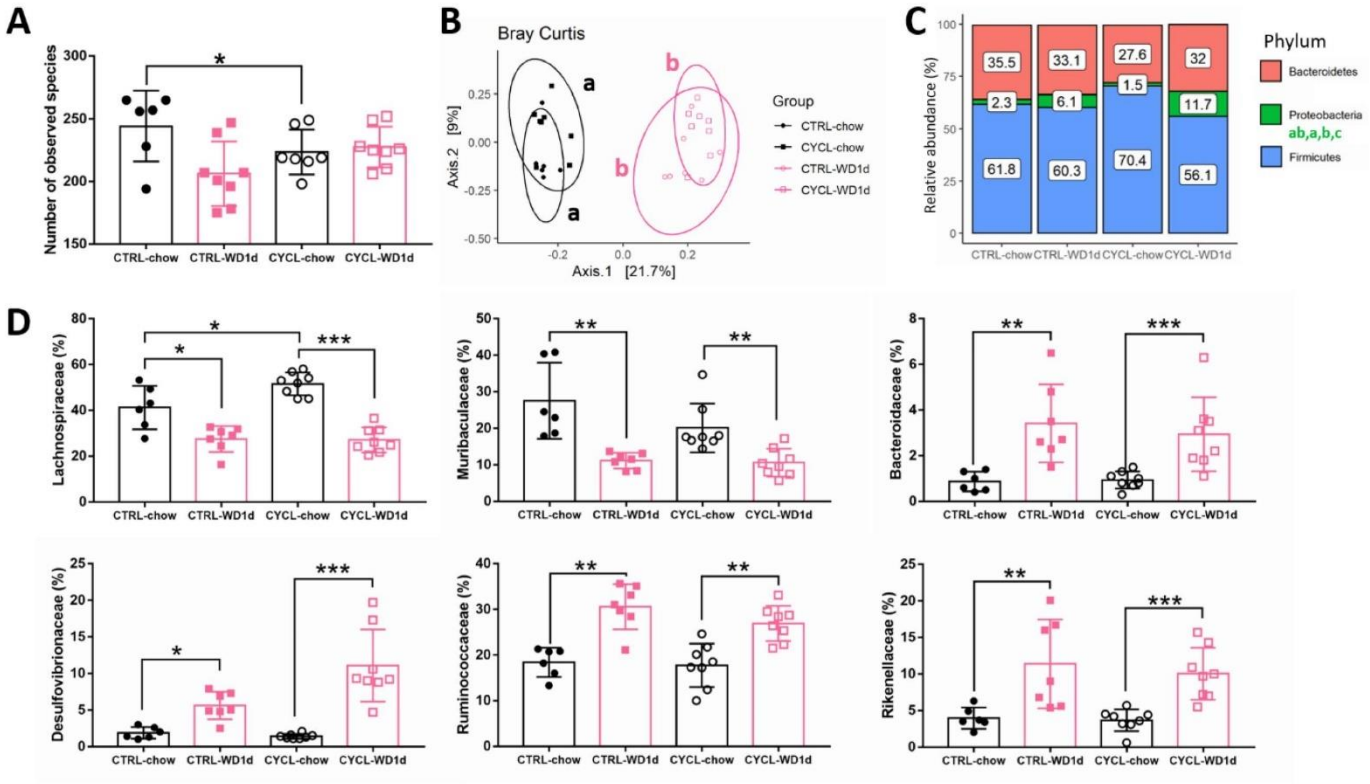


Figure 6. Recurrent exposure to WD affected caecal microbiota diversity and composition.

A: α-diversity (number of observed species). **B**: β-diversity (Bray-Curtis index) PCoA projection. The two axis represent the first two components of the PCoA. **C**: Relative abundances (%) of the three main phyla in each group. **D**: Relative abundance (%) of major families. A, C; D: Mann-Whitney tests were performed between groups (*: P<0.05), B: PERMANOVA were performed between each pair of groups and the results are represented with letters (two different letters indicate a significant statistical difference between groups).

-ponse to WD but not in CTRL mice. Only the N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminate degradation pathway was impoverished in CYCL mice under WD, while not modified in CTRL mice. Remarkably, while the enhancement in sulfur oxidation pathways was not significant after the first exposure to WD (between CTRL-chow and CTRL-WD1d) it was 17 times significantly increased in CYCL-WD1d compared to CYCL-chow mice.

Transfer of CYCL-chow caecal microbiota induced a greater motivation to eat WD

Recurrent exposure to WD led to long lasting changes in microbiota composition and metabolic activities even after CYCL mice had returned to the chow diet for 2 weeks. To determine whether CYCL-chow microbiota can drive the higher motivation of CYCL mice to eat WD upon its reintroduction, the caecal content of CYCL-chow mice and CTRL-chow mice was transferred to naïve mice that had never been exposed to WD (Fig. 9A). Three weeks after the transfer, eating behavior of recipient mice was monitored in metabolic cages before and after introduction of WD. There was no difference in body weight under chow diet just before WD introduction (MT-CTRL: 24.9 ±1.1g vs MT-CYCL: 25.1±0.4g, $P>0.05$) and no difference in chow diet consumption between the two groups (Supplementary Fig. 4). However, upon introduction of WD, MT-CYCL-chow mice were significantly prompter to eat WD during the 1st hour of dietary switch, compared to MT-CTRL-chow mice (Fig. 9B). However, over the 24 first hours of WD, total WD intake was not different between groups (Fig. 9B). During the 6 day of WD exposure, mice body weight gain (%) was significantly higher in MT-CYCL from day 4, compared to MT-CTRL mice (Fig. 9C) while energy expenditure (measured by respiratory exchange ratio) was similar under chow or under WD for both MT-CTRL and MT-CYCL mice (Supplementary Fig. 4).

Identification of bacterial subnetworks associated with brain phenotype

To better characterize the bacteria that drives the brain adaptation to repeated exposure to WD, we integrated microbiota and brain data from experiment 2 (Fig. 3A). Groups of highly correlated bacteria, also called sub-networks, were built from normalized data using MiBiOmics web application. Only the sub-networks that were specific of one of the four groups of mice were kept to investigate their correlation to host traits. Among the 11 modules that were constructed, 5 were selected afterwards (Fig. 10A). The blue sub-network was characterized by bacteria present in CTRL-chow mice that were not present in the other groups. Two other sub-networks (turquoise and yellow) were selected because they contained bacteria representatives of CTRL-WD 1D mice (yellow) or CYCL-WD 1D mice (turquoise) microbiota. The green and purple subnetworks were selected because they contained bacteria representative of CYCL-chow mice microbiota.

The blue subnetwork (representative of CTRL-chow mice microbiota) was positively correlated to hypothalamic *pomc* (Fig. 10B) and striatal *il-1β* (Fig. 9C) expression levels. The green subnetwork (representative of CYCL-chow mice microbiota) was positively correlated to genes involved in eating (hypothalamic *agrp)* and wanting (striatal *slc6a3*) (Fig. 10B), as well as brainstem astroglial barrier thickness (Fig. 10C) and caecal total SCFA, acetate and butyrate concentrations (Fig. 10D). The purple subnetwork (also mainly representative of CYCL-chow mice microbiota) was positively correlated to hypothalamic *agrp* and *pomc* and *oprm1* (liking) expression levels (Fig. 10B), as well as several inflammatory markers in the hypothalamus (*il-1β*, *tnf-α* and *iba1)* (Fig. 10C) and caecal total SCFA, acetate and propionate concentrations (Fig. 10D).

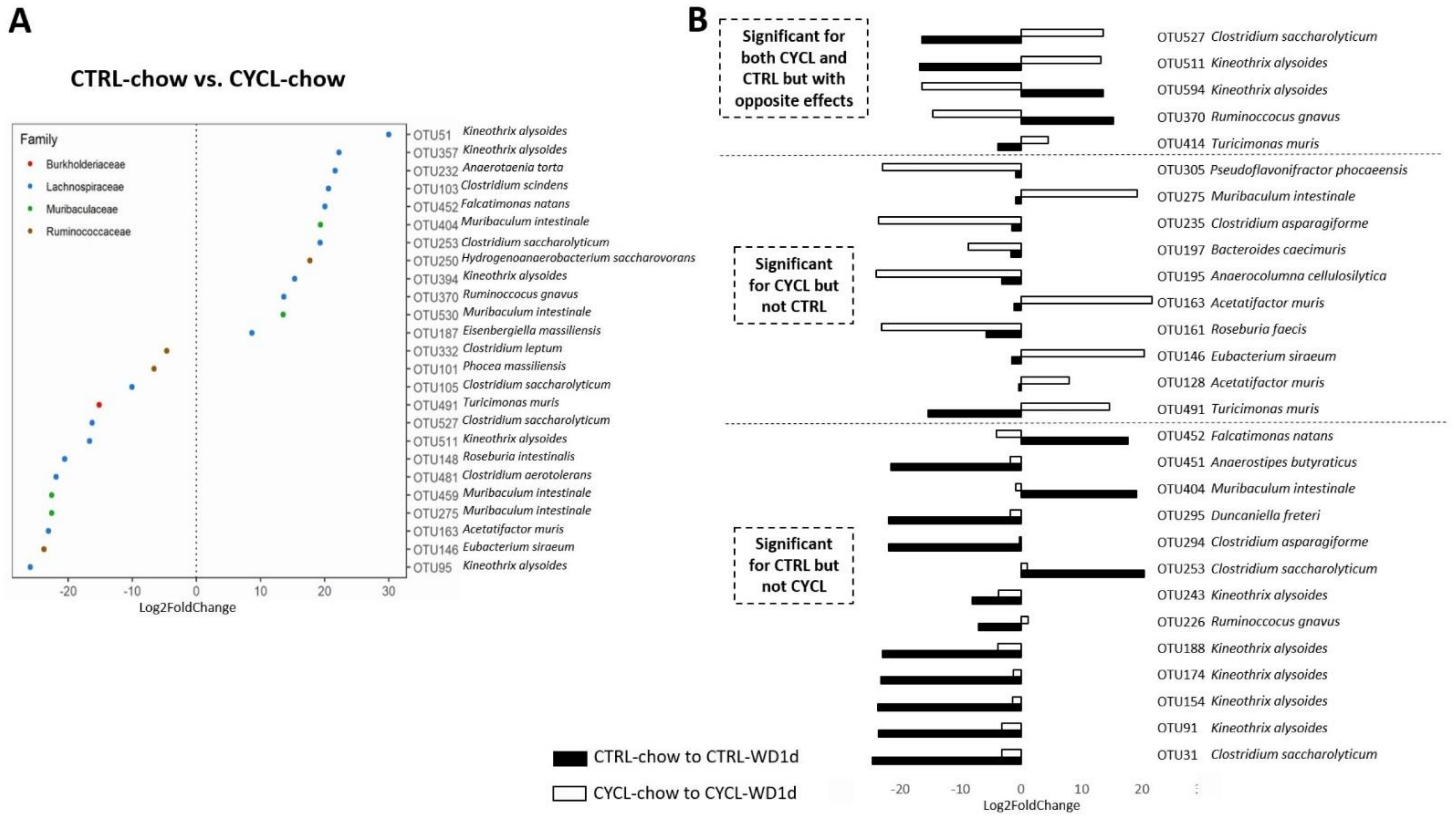


Figure 7. Recurrent exposure to WD affected caecal microbiota composition at the OTU level.

A: Log2 fold changes of OTUs whose abundance differed significantly between CTRL and CYCL mice under chow diet. Each OTU log2FC is represented by a point colored according to its family. Genera are indicated near the corresponding dotLog2 fold-changes (log2FC, x-axis) of abundances. **B:** Log2 fold changes of OTUs whose abundance differed significantly between CTRL and CYCL mice during dietary transition (chow to WD). OTUs taxonomic affiliation was performed using NCBI BLAST tool.

The yellow subnetwork (representative of CTRL-WD 1D mice microbiota) was negatively correlated to *agrp* expression levels (Fig. 10B) and positively correlated with the number of microglial cells in the NTS and AP and negatively with the number of GFAP-positive cells in the NTS and AP (Fig. 10C). It was also negatively correlated with caecal total SCFA, acetate and butyrate (Fig. 10D). The turquoise subnetwork (representative of CYCL-WD 1D mice microbiota) was negatively correlated to hypothalamic *agrp* and *pomc* and striatal *slc6a3* and *th* expression levels (Fig. 10B), as well as hypothalamic and striatal *il-1β* expression (Fig. 10C) and negatively with all caecal SCFA concentrations (Fig. 10D).

Inside each sub-network, OTUs that drive the correlations between the subnetworks and central gene expression levels were identified using PLS regression to determine which OTUs better represent the bacterial subnetwork while maximizing the correlation between this subnetwork and host traits. When the correlation was higher than a threshold (>|0.3|) and significant (P<0.05), OTUs presenting a VIP value (representing the importance of the OTU in the projection) > 1 were selected. We focused on the 2 networks (green and purple) that were representative of CYCL-mice under chow diet, as the microbiota of these mice recapitulated the food intake behavior upon WD introduction. Among the green bacterial subnetwork, OTUs identified as *Kineothrix alysoides* and *Clostridium aerotolerans*, explained the correlation between this bacterial subnetwork and *slc6a3* expression levels (Table 2). These bacteria were also largely correlated to caecal SCFA. Among the purple bacterial subnetwork, *Ruminococcus albus* and *Kineothrix alysoides* explained the correlation with hypothalamic *il-β* and *tnf-α* (Table 2). These bacteria were also correlated to caecal acetate and propionate concentrations.

Discussion

In this study, we show that recurrent exposures to WD increased the energy intake specifically during the first hours following the re-introduction of WD. Inflammatory tone in food intake regulation-related central zones was lower after recurrent exposure to WD, either under chow or in response to WD, while expression of reward-related genes was enhanced. We also describe the persistent changes in microbiota composition and metabolic activities induced by recurrent exposures to WD even after the mice had returned to standard chow diet. Importantly, transfer of gut microbiota from those mice was able to recapitulate changes in food intake behavior in recipient mice when they were exposed to WD, thereby directly implicating the gut microbiota as a causal factor that participate to the escalating overconsumption of palatable diet with recurrent exposure to WD.

Escalating WD consumption

Our results reveal that when recurrently fed WD *ad libitum* for 1 week, mice developed excessive consumption upon WD reintroduction that last at least 2 weeks after withdraw of the WD diet. Other studies showed that short-term meal of palatable food can drive future food anticipatory behaviors (Bake et al., 2014; Mistlberger and Rusak, 1987) and that this behavior can last at least 7 days after the palatable food has been withdrawn (Liu et al., 2016). However, most of these studies were performed in the context of scheduled WD meals (*e.g.* 2h of WD during the night period) leading to conditioning and anticipatory withdraw of the WD diet. Other studies showed that short-term meal of palatable food can drive future food anticipatory behaviors (Bake et al., 2014; Mistlberger and Rusak, 1987) and that this behavior can last at least 7 days after the palatable food has been withdrawn (Liu et al., 2016). However, most of these studies were performed in the context of scheduled WD meals (*e.g.* 2h of WD during the night period)

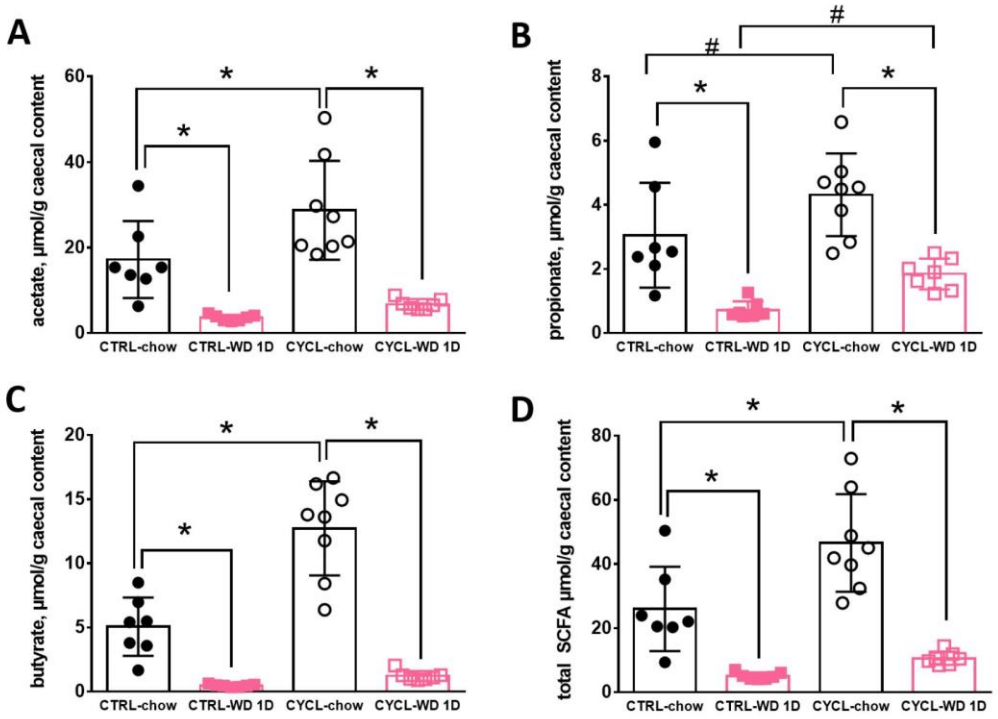


Figure 8. Recurrent exposure to WD affected caecal short chain fatty acids levels mice.

A: acetate, **B:** propionate, **C:** butyrate and **D:** total SCFA concentrations in the caecum of mice. Mann-Whitney tests were performed between groups (*: P<0.05, #: P<0.08).

leading to conditioning and anticipatory behavior. In our model, mice remained on WD for 7 consecutive days then were placed back to chow diet for 2 weeks and finally displayed higher consumption of WD only during the first hours of the new WD cycle. Therefore, our study emphasizes a potential "memory effect" of palatable food exposure that could settle down even in absence of scheduled meal. Noteworthy, under chow diet just before WD re-introduction, CYCL-mice exhibited enhanced reward-related (*th* and *oprm1*) gene expression, which could participate to the increased 'liking' and 'wanting' components of WD consumption. Interestingly, naltrexone, an opioid receptor antagonist, dose-dependently reduced mice 1st hour-overconsumption of a high-sucrose diet in a model of intermittent cafeteria diet exposure (1 day of cafeteria diet, 2 days of chow diet) (Moore et al., 2017), further reinforcing the potential role of the opioidergic system in this escalating WD consumption.

Despite this escalation of first hours WD intake, the overall energy consumption over the first 24hr remained stable, with a shift in the time course of excessive eating towards the beginning of renewed access and reduced WD consumption later on. This resembles the escalating patterns of excessive intake seen after deprivation from drugs of abuse (Heyser et al., 2003; O'Dell and Koob, 2007), and have been recapitulated in other models of palatable food access (Cottone et al., 2008; Simonds et al., 2018; Wojnicki et al., 2006). This similar food intake over the first 24h despite the binge eating of the first hours might be due to a stronger adaptation of the anorexic and orexigenic peptide (*pomc and agrp*) expression in the hypothalamus since a strong decrease of both *pomc* and *agrp* expression was noted in CYCL-mice after 1d of WD while this was not significant in CTRL-mice. Yet, the reason why anorexic and orexigenic peptide expressions were both decreased deserves further investigation.

Moreover, recurrent exposure to 1 week of WD did not affect the characteristic eating pattern response to WD introduction on a longer timescale since after the 24hr-hyperphagia, energy intake went back to the level that preceded the introduction of the WD within 1 day. Even though, mice displayed higher body weight gain at each new WD cycle suggesting the key role of factors influencing meal start on body weight gain. Decrease in energy expenditure was described by others in yoyo dieting mice (Simonds et al., 2018; Thaiss et al., 2016), and further studies are needed to evaluate energy expenditure in our model. In a human perspective, a long-term memory of anterior palatable consumption period on future palatable diet eating behavior may have durable and adverse effects on body weight gain. Thus, factors initiating the meals may be key element favoring excessive food intake and identifying those factors is therefore essential.

The role of inflammation on the central adaptation to recurrent exposure to WD

Acute or chronic consumption of WD induces transient and chronic, respectively, hypothalamic inflammation (Thaler et al., 2012). Acute and chronic exposure to WD also increased inflammation in the brainstem (Kim et al., 2020; Licursi et al., 2016). In the current study, we demonstrated that recurrent exposures to WD also alter the acute inflammatory response to WD in various region of the brain. We found an increase in the spreading of the astroglial barrier between the AP and the NTS in CYCL mice compared to CTRL mice, independently of the WD diet. Astrocyte deployment has been showed in the hypothalamus in response to high fat diets (Chowen et al., 2016) but we evidenced for the first time a long-lasting effect of 7 days of WD on astrocyte deployment in the brainstem. Astrocytes play a role in the diffusion barrier between the AP and NTS, where they filtrate blood-borne molecules (Wang and Bordey, 2008). Thus, the thicker astroglial barrier observed in CYCL-mice probably represents a protective mechanism towards peripheral signals. We also found an intriguing decrease in the number of microglial cells within the area including AP and NTS in CYCL-chow mice. The number of microglial cells generally increases in response to pro-inflammatory situations (Kim et al., 2020). The reduced number of microglial cells might be a downstream consequence of the increased thickness of the astroglial barrier, which reduces the entry of pro-inflammatory molecules. Despite this thicker astroglial barrier, the microglial density rapidly increased in response to 1 day of WD in CYCL-mice as observed in long-term WD feeding (Kim et al., 2020), suggesting that the microglial reactivity in the brainstem was intact and even exacerbated by recurrent WD since this increase was not observed during the first exposure to WD.

In our model, 1 day of WD was not sufficient to increase *il-1β, tnf-α* or *ccl-2* expression in the hypothalamus of CTRL-mice. Increase in cytokine expression in the hypothalamus has been observed as early as after 1d of WD in mice but with a 60%kcal lipid diet (Buckman et al., 2015; Morari et al., 2014; Thaler et al., 2012; Waise et al., 2015), which might account for the difference between our study (45% kcal fat) and these other studies. Indeed, several reports indicated increased cytokines expression with a 45%kcal fat WD at later time points, *i.e.* 3 days of WD (Kim et al., 2019; Terrien et al., 2019). Surprisingly, rather than accentuating inflammation, recurrent WD exposure dampened inflammation in the hypothalamus since the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines was reduced in CYCL-WD 1D mice. In contrast, we observed an increase in pro-inflammatory cytokines and chemokines expression in the striatum after 1d of WD in CTRL-mice, which is to our knowledge the first time inflammation is demonstrated in the striatum upon acute WD exposure.

Superpathway	CTRL-chow vs. CYCL-chow		CTRL-chow vs. CTRL-WD1d		CYCL-chow vs. CYCL-WD1d	
	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
2,3-butanediol biosynthesis	0.19	**	ns	ns	11.32	**
sulfate assimilation and cysteine biosynthesis	0.64	**	ns	ns	6.12	***
sulfur oxidation (Acidianus ambivalens)	0.69	*	ns	ns	16.94	***
L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)	0.71	**	ns	ns	6.52	***
guanosine nucleotides de novo biosynthesis II	0.76	*	ns	ns	4.46	***
demethylmenaquinol-6 biosynthesis I	5.02	*	ns	ns	ns	ns
D-glucuronate degradation	ns	ns	0.75	*	1.19	*
glycol metabolism and degradation	ns	ns	16.28	*	ns	ns
N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminate degradation	ns	ns	ns	ns	0.71	*
branched amino acid biosynthesis	ns	ns	ns	ns	1.35	*
L-isoleucine biosynthesis I	ns	ns	ns	ns	1.4	*
L-threonine biosynthesis	ns	ns	ns	ns	1.4	*
adenosine nucleotides de novo biosynthesis I	ns	ns	ns	ns	1.44	**
L-serine and glycine biosynthesis I	ns	ns	ns	ns	1.5	**
glycolysis and Entner-Doudoroff	ns	ns	ns	ns	1.57	**
geranylgeranyl diphosphate biosynthesis II (via MEP)	ns	ns	ns	ns	1.58	**
5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis	ns	ns	ns	ns	1.59	*
sulfolactate degradation	ns	ns	ns	ns	1.7	*
adenosine nucleotides de novo biosynthesis II	ns	ns	ns	ns	1.73	*
tetrahydrofolate biosynthesis and salvage	ns	ns	ns	ns	2.06	**
hexitol degradation (bacteria)	ns	ns	ns	ns	2.35	*
thiamin diphosphate biosynthesis I	ns	ns	ns	ns	2.37	****
UDP-glucose-derived O-antigen building blocks biosynthesis	ns	ns	ns	ns	2.42	**
UDP-N-acetylglucosamine-derived O-antigen building blocks biosynthesis	ns	ns	ns	ns	2.63	**
Clostridium acetobutylicum acidogenic fermentation	ns	ns	ns	ns	2.69	***
(R,R)-butanediol biosynthesis	ns	ns	ns	ns	3.64	*
L-methionine biosynthesis (transsulfuration)	ns	ns	ns	ns	3.72	***
heme biosynthesis from uroporphyrinogen-III	ns	ns	ns	ns	3.95	***
heme biosynthesis from glutamate	ns	ns	ns	ns	3.98	***
pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis (E. coli)	ns	ns	ns	ns	4.34	***
menaquinol-8 biosynthesis II	ns	ns	ns	ns	4.49	***
heme biosynthesis from glycine	ns	ns	ns	ns	8.73	***

Table 1. Putative bacterial metabolic superpathways impacted by recurrent exposure to WD. The putative superpathways, according to PICRUSt2 analysis, identified as significantly impacted by recurrent exposure to WD in chow-fed mice (CTRL-chow vs CYCL-chow) or after dietary transition from chow to WD in CTRL or CYCL groups are listed. *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ****: P<0.0001.

However, similarly to the hypothalamus, recurrent WD exposure dampened this inflammatory response to WD since no more increase of these pro-inflammatory cytokines and chemokines was observed in the striatum of CYCL-WD 1D mice. Collectively, these results indicate that recurrent WD dampen the inflammatory response to WD, except in the brainstem where rapid increase in microglia density occurred. The evaluation of the inflammation levels during the first hours following WD introduction (during the exact

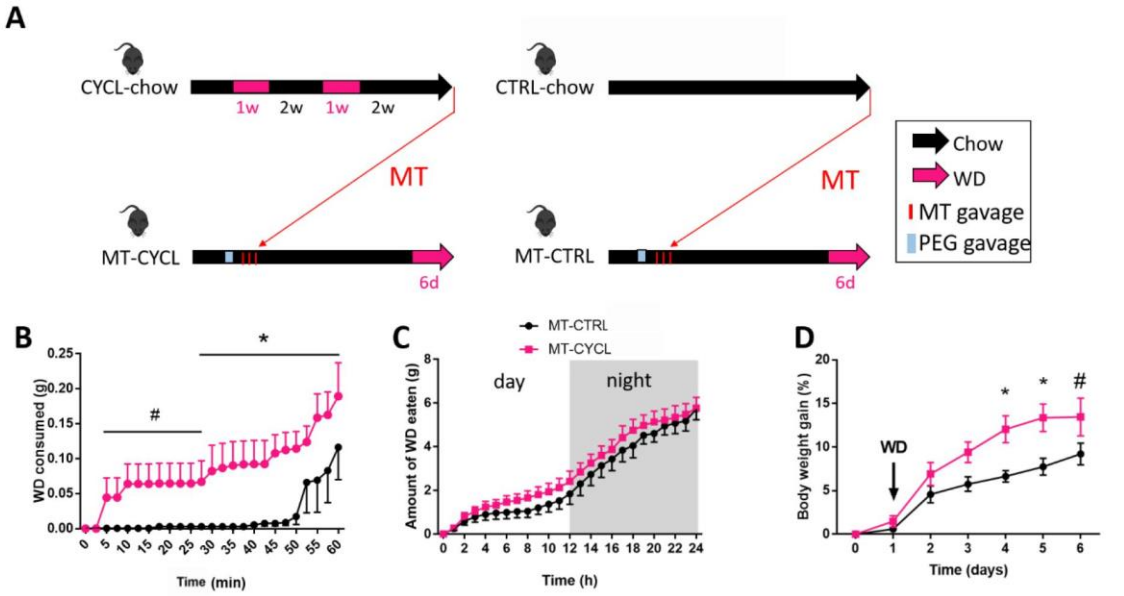


Figure 9. Microbiota transfer of CYCL-mice recapitulated the food intake pattern upon WD exposure.

A: Simplified protocol of experiment 3: The caecal microbiota of mice exposed to 2 cycles of 1 week of WD followed by 2 weeks of chow (CYCL-chow) or of control mice receiving only chow (CTRL-chow) was transferred to recipient mice (MT-CYCL and MT-CTRL, respectively). Recipient mice were exposed 3 weeks later to WD for 6 days in metabolic cages to monitor their food intake. **B:** Amount of WD consumed during the first hour following WD introduction. **C:** Amount of WD consumed during the 24 hours following WD introduction**. D:** Daily body weight gain after WD introduction. *: P<0.05, #: P<0.08.

time of excessive food intake) would help understanding the discrepancies between dampened hypothalamic and striatal inflammatory response and the exacerbated response of the microglia upon WD introduction despite enhanced astrocyte deployment in the brainstem.

The physiological consequences of WD-induced acute inflammation at the central level are not well defined. While chronic inflammation has been proved to be detrimental to brain function, a beneficial role of acute and transient inflammation is plausible. Indeed, inhibition of NFκB signaling in astrocytes prevented acute WD-induced astrocyte activation and resulted in a 15% increase in caloric intake in the first 24h after introduction of the diet (Buckman et al., 2015). Moreover, obesity-resistant mice strains exhibit early hypothalamic inflammation upon WD introduction but this inflammation is more transient and resolve earlier than in obesity-prone strains (Morari et al., 2014). Thus, we can speculate that acute transient inflammation in the central nervous system upon WD introduction is needed to fully adapt to the new nutritional state and that the dampened inflammatory tone in CYCL-mice under chow prevented appropriate adaptation to WD and may make the mice more susceptible to binge eating and weight gain.

The role of the permanent changes in microbiota composition and metabolism on food intake behavior

The effects of cycling WD on escalating WD intake were associated with permanent changes in microbiota composition and metabolism even after mice had returned to chow diet. Our study unravels the key role of microbiota memory of the past WD exposures on the excessive intake of palatable diet since the transfer of this altered

microbiota to naive mice never exposed to WD recapitulated the change in food intake upon WD exposure. One of the greatest increase of OTUs abundance found in CYCL mice under chow or WD was *Kineothrix alysoides*. *Kineothrix alysoides* has been associated with reduced anxiety-like behavior in anxious mice (Liddicoat et al., 2020). *Muribaculum intestinale* abundance was also increased in CYCL-chow compared to CTRL-chow mice. Interestingly, this bacterium has been associated to better performance in novel place recognition task in mice exposed chronically or intermittently to a cafeteria diet (Leigh et al., 2020), once again suggesting improved anxiety-like behavior associated with the presence of this bacteria. Anxiety-like behavior has been associated with decreased food-seeking behaviors (Peng et al., 2021) suggesting that the increased abundances of *Kineothrix alysoides* and *Muribaculum intestinale* may have affected food intake behavior indirectly by improving anxiety-like behavior in the CYCL mice. Behavioral tests to evaluate anxiety level in our mice would help clarify if such a link is possible.

Another feature of the CYCL-chow mice microbiota was the greater caecal concentrations of SCFA, including butyrate. Butyrate has been shown to modulate the synthesis of dopamine (Waymire et al., 1972) mainly by increasing the expression of *th* (DeCastro et al., 2005; Shah et al., 2006) as well as the expression of gene of the opioids system such as *penk* (Nankova et al., 2003). Importantly, expression levels of *th* and of a gene of the opioid signaling pathway (*oprm1*) were up regulated in the striatum of chow-fed mice that underwent recurrent WD exposure. Therefore, bacteria derived-butyrate may have an extended role in the regulation of dopamine and opioid synthesis in the striatum and then in the modulation of behavior, such as the reward system (Gonzalez-Nunez et al., 2013; Nummenmaa et al., 2018).

The role of the permanent changes in microbiota composition and metabolism on central inflammation

At the microbiota level, differences between CTRL and CYCL-mice under chow were not visible at the macroscopic level (*i.e.* β-diversity and phylum or families level) but the bacterial diversity (number of unique species) was reduced in CYCL-chow compared to CTRL-chow mice and several OTUs abundances differed between these two groups of mice. Diversity is a positive contributor to microbiota resilience, which is itself considered as a hallmark of healthy microbiota (Dogra et al., 2020). Decrease in bacterial diversity is therefore a favorable microbiota environment to develop diseases upon perturbations, but not in a stable environment as encountered in our CYCL-mice when they were under chow. More strikingly, microbiota activity was deeply influenced by repeated exposure to WD in mice under chow diet. Caecal concentrations of SCFA, which have anti-inflammatory properties (Chang et al., 2014; Usami et al., 2008; Vinolo et al., 2011) were increased in CYCL-mice under chow compared to CTRL-mice. This increase in SCFA concentrations could therefore participate to the reduced inflammatory tone observed at the central level. Enzymatic activity predicted by PICRUSt2 analysis did not highlight any modifications in SCFA pathways. However, it is important to note that bacteria can profoundly adapt their metabolism in response to external stimuli without any abundance modifications, the latter being the exclusive base of PICRUSt2 algorithm. Despite this limitation of this algorithm, the analysis identified several biosynthesis pathways as profoundly affected by repeated exposure to WD.

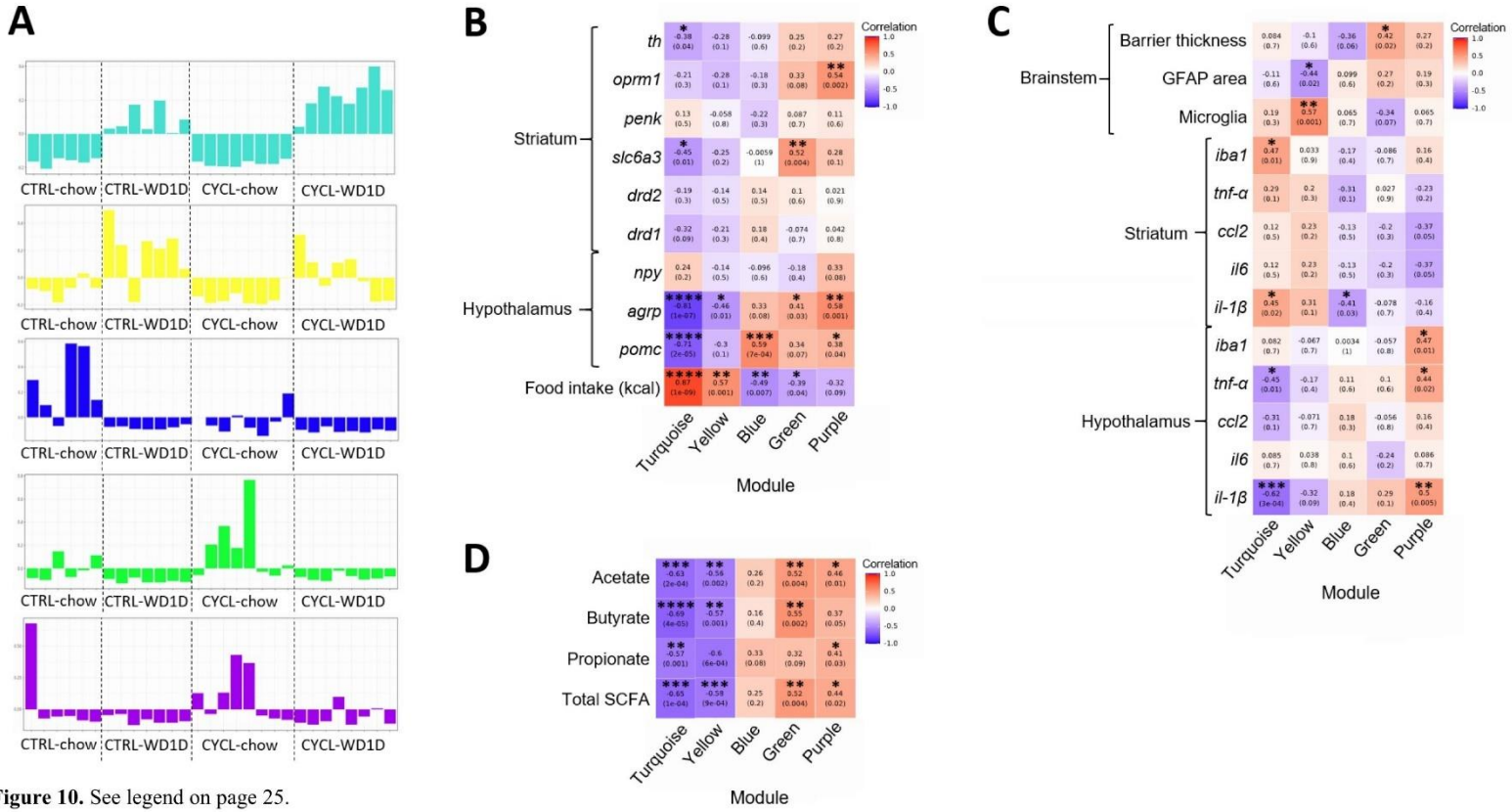


Figure 10. See legend on page 25.

Green (+50 OTUs)

Bacteria	OTU number	Relative abundance (%)				VIP value (when >1)			
		CTRL-chow	CTRL-WD1d	CYCL-chow	CYCL-WD1d	Acetate	Butyrate	Total SCFA	*slc6a3*
Kineothrix alysoides	51	ND	ND	2.1 ± 5.3	ND	5.24	4.54	5.03	4.88
Clostridium indolis	72	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.7 ± 1.2	1.19	1.61	1.37	<1
Clostridium aerotolerans	104	ND	ND	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.3	1.87	2.25	1.99	1.87
Kineothrix alysoides	179	0.0 ± 0.1	ND	0.5 ± 1.5	ND	1.49	1.9	1.7	2.2
Eisenbergiella massiliensis	187	ND	ND	0.6 ± 0.7	0.0 ± 0.1	<1	1.1	<1	<1
Kineothrix alysoides	188	ND	ND	0.4 ± 0.3	ND	1.51	1.78	1.58	1.79
Clostridium aerotolerans	266	ND	ND	0.4 ± 0.6	ND	1.05	1.13	1.07	<1
Anaerocolumna jejuensis	291	ND	ND	0.2 ± 0.4	ND	<1	<1	<1	1

Purple (+29 OTUs)

Bacteria	OTU number	Relative abundance (%)				VIP value (when >1)			
		CTRL-chow	CTRL-WD1d	CYCL-chow	CYCL-WD1d	Acetate	Propionate	*il-1β* (hypothalamus)	*tnf-α* (hypothalamus)
Ruminococcus albus	60	ND	ND	1.2 ± 1.8	0.1 ± 0.2	1.99	1.96	3.18	3.79
Kineothrix alysoides	80	ND	ND	0.5 ± 1.0	0.2 ± 0.4	2.19	1.44	<1	<1
Kineothrix alysoides	91	ND	ND	0.6 ± 1.0	ND	3.29	2.35	1.56	1.66
Ruminococcus albus	142	0.3 ± 0.5	ND	0.6 ± 1.0	ND	1.09	1.14	2.13	2.04

Table 2. OTU explaining the correlation between green and purple bacterial subnetworks and metadata in experiment 2. Each line corresponds to one OTU, which number is indicated in a column when it explained the correlation between the bacterial subnetwork and the corresponding metadata, according to PLS regression performed after WGCNA. Each OTU was identified according to BLAST NCBI tool.

Figure 10. Relationship between caecal microbiota composition and brainstem, hypothalamic and striatal traits or caecal SCFA. A: Sub-networks of bacteria that co-evolved together in experiment 2 were built using WGCNA method with the miBiOmics web application (Zoppi et al., 2020) with 1 color attributed per sub-network (turquoise, yellow, blue, green and purple). The contribution of each module in each mouse (x-axis of each graph, classified according to the experimental group) is represented by bar plots. These sub-networks were retained since they were representative of at least one of the experimental groups. **B**: Correlations between bacterial sub-networks and hypothalamic and striatal gene expression levels involved in food intake regulation. **C**: Correlations between bacterial sub-networks and hypothalamic and striatal gene expression levels as well as brainstem inflammatory markers. **D:** Correlations between bacterial sub-networks and caecal SCFA concentrations. Pearson correlations were used to build the matrix and correlation value as well as p-value (in parentheses) were indicated in each square. Statistical significance was indicated using asterisks (*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 and ****: P<0.0001).

Further work is needed to understand the physiological consequences of these bacterial metabolic alterations on our mice. Another pathway that was affected by repeated exposure to WD is the sulfur oxidation superpathway that was reduced in CYCL-chow compared to CTRL-chow mice. This could suggest reduced thiosulfate metabolization and H_2S production. H_2S has both beneficial and detrimental effects on the gut epithelium, depending on its concentration (Wallace et al., 2018). Thiosulfate and sulfate can also be part of the cysteine metabolism which involves glutathione (Kohl et al., 2019), a biomarker of oxidative stress when oxidized. Lower thiosulfate metabolism might thus alter the redox status of the gut epithelium. Interestingly, sodium thiosulfate attenuated glial-mediated neuroinflammation *in vitro* (Lee et al., 2016), providing another possible link between microbiota activity and central inflammation. Finally, our WGCNA approach identified *Ruminococcus albus* as a species present in CYCL-chow mice microbiota and correlating positively with central inflammatory traits. This species exhibited anti-oxidative neuroprotective properties in an elegant *in vitro* gut-brain axis model (Park et al., 2017), which seems inconsistent with our results. Further work is needed to understand if this bacterium is involved in central inflammation in our model.

Upon 1 day of WD exposure, CYCL-mice exhibited exacerbated changes in composition or metabolic activity of the caecal microbiota compared to CTRL-mice. This was particularly evident at the family level, especially for *Desulfovibionaceae*, which bloomed more under WD in CYCL-mice compared to CTRL mice. This increase is consistent with the major increase in the sulfur oxidation superpathway also observed, since members of this family are sulfate-reducing bacteria. In line with this finding, others found that relative abundance of *Desulfovibrionaceae* significantly increased in obese and metabolically impaired mice (Hildebrandt et al., 2009; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2012). This superpathway increase might lead to increased oxidative stress, as observed in the hypothalamus shortly after WD introduction (Fouesnard et al., 2021). Moreover, at the OTU level, *Acetatifactor muris* abundance increases in response to WD in the microbiota of CYCL-mice but not of CTRL-mice. *Acetatifactor muris* has been found in obese mice (Pfeiffer et al., 2012) and also aggravates mice chemical-induced colitis (Lee et al., 2019). On the other hand, *Roseburia faecis* was drastically reduced upon WD switch in CYCL- but not CTRL-mice. *Roseburia* ssp. are butyrate producers, whose abundance is reduced in intestinal inflammatory diseases (Tamanai-Shacoori et al., 2017). Collectively, these data suggest that a beneficial microbiota environment settle after recurrent WD when mice are under chow but that a pro-inflammatory microbiota bloom when mice are re-exposed to WD. Such a pro-inflammatory microbiota might mismatch the anti-inflammatory tone that develop at the central level under chow diet after recurrent episode of WD.

Conclusion

Overall, the results of the present work unraveled a long-term memory of anterior WD consumption period on eating behavior upon reintroduction of palatable diet and demonstrated that gut microbiota contributes to the escalating overconsumption upon reintroduction of WD. Recurrent WD exposures are also able to modulate the inflammatory status in food intake regulation-related brain region upon WD reintroduction but also between the WD cycles. The role the microbiota as a key factor regulating central inflammatory level and the potential role of reduced inflammatory in the inappropriate adaptation the food intake regulation in response to WD would need further investigation.

Acknowledgements

We thank Xu Fei Zhang for her technical help during animal experiment 1.

References

Alonso-Alonso, M., Woods, S.C., Pelchat, M., Grigson, P.S., Stice, E., Farooqi, S., Khoo, C.S., Mattes, R.D., Beauchamp, G.K., 2015. Food reward system: current perspectives and future research needs. Nutrition Reviews 73, 296–307. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv002

André, C., Guzman-Quevedo, O., Rey, C., Rémus-Borel, J., Clark, S., Castellanos-Jankiewicz, A., Ladeveze, E., Leste-Lasserre, T., Nadjar, A., Abrous, D.N., Laye, S., Cota, D., 2017. Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. Diabetes 66, 908–919. https://doi.org/10.2337/db16-0586

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 15718–15723. https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101

Bake, T., Morgan, D.G.A., Mercer, J.G., 2014. Feeding and metabolic consequences of scheduled consumption of large, binge-type meals of high fat diet in the Sprague–Dawley rat. Physiology & Behavior 128, 70–79. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.018

Beaumont, M., Jaoui, D., Douard, V., Mat, D., Koeth, F., Goustard, B., Mayeur, C., Mondot, S., Hovaghimian, A., Le Feunteun, S., Chaumontet, C., Davila, A.-M., Tomé, D., Souchon, I., Michon, C., Fromentin, G., Blachier, F., Leclerc, M., 2017. Structure of protein emulsion in food impacts intestinal microbiota, caecal luminal content composition and distal intestine characteristics in rats. Mol. Nutr. Food Res. 61, 1700078. https://doi.org/10.1002/mnfr.201700078

Benani, A., Hryhorczuk, C., Gouaze, A., Fioramonti, X., Brenachot, X., Guissard, C., Krezymon, A., Duparc, T., Colom, A., Nedelec, E., Rigault, C., Lemoine, A., Gascuel, J., Gerardy-Schahn, R., Valet, P., Knauf, C., Lorsignol, A., Penicaud, L., 2012. Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice. Journal of Neuroscience 32, 11970–11979. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012

Bordeleau, M., Lacabanne, C., Fernández de Cossío, L., Vernoux, N., Savage, J.C., González-Ibáñez, F., Tremblay, M.-È., 2020. Microglial and peripheral immune priming is partially sexually dimorphic in adolescent mouse offspring exposed to maternal high-fat diet. J Neuroinflammation 17, 264. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01914-1

Breton, J., Tennoune, N., Lucas, N., Francois, M., Legrand, R., Jacquemot, J., Goichon, A., Guérin, C., Peltier, J., Pestel-Caron, M., Chan, P., Vaudry, D., do Rego, J.-C., Liénard, F., Pénicaud, L., Fioramonti, X., Ebenezer, I.S., Hökfelt, T., Déchelotte, P., Fetissov, S.O., 2016. Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. Cell Metabolism 23, 324–334. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.017

Buckman, L.B., Thompson, M.M., Lippert, R.N., Blackwell, T.S., Yull, F.E., Ellacott, K.L.J., 2015. Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. Molecular Metabolism 4, 58–63. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.001

Burz, S.D., Abraham, A.-L., Fonseca, F., David, O., Chapron, A., Béguet-Crespel, F., Cénard, S., Le Roux, K., Patrascu, O., Levenez, F., Schwintner, C., Blottière, H.M., Béra-Maillet, C., Lepage, P., Doré, J., Juste, C., 2019. A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation. Sci Rep 9, 8897. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45173-4

Butler, A.A., Marks, D.L., Fan, W., Kuhn, C.M., Bartolome, M., Cone, R.D., 2001. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. Nat Neurosci 4, 605–611. https://doi.org/10.1038/88423

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods 13, 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Cawthon, C.R., de La Serre, C.B., 2018. Gut bacteria interaction with vagal afferents. Brain Research 1693, 134–139. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.01.012

Chang, P.V., Hao, L., Offermanns, S., Medzhitov, R., 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. Proc Natl Acad Sci USA 111, 2247–2252. https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111

Chen, J., Papies, E.K., Barsalou, L.W., 2016. A Core Eating Network and Its Modulations Underlie Diverse Eating Phenomena. Brain and Cognition 110, 20–42.

Chen, L., Reeve, J., Zhang, L., Huang, S., Wang, X., Chen, J., 2018. GMPR: A robust normalization method for zero-inflated count data with application to microbiome sequencing data. PeerJ 6, e4600. https://doi.org/10.7717/peerj.4600

Chowen, J.A., Argente-Arizón, P., Freire-Regatillo, A., Frago, L.M., Horvath, T.L., Argente, J., 2016. The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. Progress in Neurobiology 144, 68–87. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.001

Cifani, C., Di Bonaventura, M.V.M., Ciccocioppo, R., Massi, M., 2013. Binge Eating in Female Rats Induced by Yo-Yo Dieting and Stress, in: Avena, N.M. (Ed.), Animal Models of Eating Disorders, Neuromethods. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 27–49. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-104-2_3

Cifani, C., Polidori, C., Melotto, S., Ciccocioppo, R., Massi, M., 2009. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and midazolam. Psychopharmacology 204, 113–125. https://doi.org/10.1007/s00213-008-1442-y

Cottone, P., Sabino, V., Steardo, L., Zorrilla, E.P., 2008. Opioid-Dependent Anticipatory Negative Contrast and Binge-Like Eating in Rats with Limited Access to Highly Preferred Food. Neuropsychopharmacol 33, 524–535. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301430

Décarie-Spain, L., Sharma, S., Hryhorczuk, C., Issa-Garcia, V., Barker, P.A., Arbour, N., Alquier, T., Fulton, S., 2018. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. Molecular Metabolism 10, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.018

DeCastro, M., Nankova, B.B., Shah, P., Patel, P., Mally, P.V., Mishra, R., La Gamma, E.F., 2005. Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. Molecular Brain Research 142, 28–38.

Dogra, S.K., Doré, J., Damak, S., 2020. Gut Microbiota Resilience: Definition, Link to Health and Strategies for Intervention. Front. Microbiol. 11, 572921. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572921

Dong, T.S., Mayer, E.A., Osadchiy, V., Chang, C., Katzka, W., Lagishetty, V., Gonzalez, K., Kalani, A., Stains, J., Jacobs, J.P., Longo, V.D., Gupta, A., 2020. A Distinct Brain-Gut-Microbiome Profile Exists for Females with Obesity and Food Addiction. Obesity 28, 1477–1486. https://doi.org/10.1002/oby.22870

Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2019. PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference (preprint). Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/672295

Ferrario, C.R., Labouèbe, G., Liu, S., Nieh, E.H., Routh, V.H., Xu, S., O'Connor, E.C., 2016. Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. J. Neurosci. 36, 11469–11481. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2338-16.2016

Fouesnard, M., Zoppi, J., Petera, M., Le Gleau, L., Migné, C., Devime, F., Durand, S., Benani, A., Chaffron, S., Douard, V., Boudry, G., 2021. Dietary switch to Western diet induces hypothalamic adaptation associated with gut microbiota dysbiosis in rats. International Journal Of Obesity. https://doi.org/10.1038/s41366-021-00796-4

Frost, G., Sleeth, M.L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J.R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise Thomas, E., Bell, J.D., 2014. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. Nat Commun 5, 3611. https://doi.org/10.1038/ncomms4611

Gonzalez-Nunez, V., González, A.J., Barreto-Valer, K., Rodríguez, R.E., 2013. In Vivo Regulation of the μ Opioid Receptor: Role of the Endogenous Opioid Agents. Mol Med 19, 7–17. https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00318

Hebert, J.R., Allison, D.B., Archer, E., Lavie, C.J., Blair, S.N., 2013. Scientific Decision Making, Policy Decisions, and the Obesity Pandemic. Mayo Clinic Proceedings 88, 593–604. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.04.005

Herhaus, B., Petrowski, K., 2021. The effect of restrained eating on acute stress-induced food intake in people with obesity. Appetite 159, 105045. https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.105045

Heyser, C.J., Moc, K., Koob, G.F., 2003. Effects of Naltrexone Alone and In Combination With Acamprosate on the Alcohol Deprivation Effect in Rats. Neuropsychopharmacol 28, 1463–1471. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300175

Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill–Mix, S.A., Keilbaugh, S.A., Hamady, M., Chen, Y., Knight, R., Ahima, R.S., Bushman, F., Wu, G.D., 2009. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. Gastroenterology 137, 1716-1724.e2. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.042

Kim, J.D., Yoon, N.A., Jin, S., Diano, S., 2019. Microglial UCP2 Mediates Inflammation and Obesity Induced by High-Fat Feeding. Cell Metabolism 30, 952-962.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.010

Kim, J.S., Kirkland, R.A., Lee, S.H., Cawthon, C.R., Rzepka, K.W., Minaya, D.M., de Lartigue, G., Czaja, K., de La Serre, C.B., 2020. Gut microbiota composition modulates inflammation and structure of the vagal afferent pathway. Physiology & Behavior 225, 113082. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113082

Kohl, J.B., Mellis, A.-T., Schwarz, G., 2019. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism: Homeostatic impact of sulfite and H_2S on cysteine catabolism. British Journal of Pharmacology 176, 554–570. https://doi.org/10.1111/bph.14464

Kraak, V.I., Kumanyika, S.K., Story, M., 2009. The commercial marketing of healthy lifestyles to address the global child and adolescent obesity pandemic: prospects, pitfalls and priorities. Public Health Nutr. 12, 2027–2036. https://doi.org/10.1017/S1368980009990267

Langfelder, P., Horvath, S., 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics 9, 559. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559

Langhans, W., 2007. Signals generating anorexia during acute illness: Symposium on 'Eating, illness and the gut: is there disorder in the house?' Proc. Nutr. Soc. 66, 321–330. https://doi.org/10.1017/S0029665107005587

Lee, C., Hong, S.N., Paik, N.Y., Kim, T.J., Kim, E.R., Chang, D.K., Kim, Y.-H., 2019. CD1d Modulates Colonic Inflammation in NOD2−/− Mice by Altering the Intestinal Microbial Composition Comprising Acetatifactor muris. Journal of Crohn's and Colitis 13, 1081–1091. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz025

Lee, M., McGeer, E.G., McGeer, P.L., 2016. Sodium thiosulfate attenuates glial-mediated neuroinflammation in degenerative neurological diseases. J Neuroinflammation 13, 32. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0488-8

Leigh, S.-J., Kaakoush, N.O., Bertoldo, M.J., Westbrook, R.F., Morris, M.J., 2020. Intermittent cafeteria diet identifies fecal microbiome changes as a predictor of spatial recognition memory impairment in female rats. Transl Psychiatry 10, 36. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0734-9

Licursi, M., Alberto, C.O., Dias, A., Hirasawa, K., Hirasawa, M., 2016. High-fat diet-induced

downregulation of anorexic leukemia inhibitory factor in the brain stem: High-Fat Diet and Brain stem LIF. Obesity 24, 2361–2367. https://doi.org/10.1002/oby.21647

Liddicoat, C., Sydnor, H., Cando-Dumancela, C., Dresken, R., Liu, J., Gellie, N.J.C., Mills, J.G., Young, J.M., Weyrich, L.S., Hutchinson, M.R., Weinstein, P., Breed, M.F., 2020. Naturally-diverse airborne environmental microbial exposures modulate the gut microbiome and may provide anxiolytic benefits in mice. Science of The Total Environment 701, 134684. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134684

Liu, S., Globa, A.K., Mills, F., Naef, L., Qiao, M., Bamji, S.X., Borgland, S.L., 2016. Consumption of palatable food primes food approach behavior by rapidly increasing synaptic density in the VTA. PNAS 113, 2520–2525.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25, 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Lowe, M.R., Butryn, M.L., 2007. Hedonic hunger: A new dimension of appetite? Physiology & Behavior 91, 432–439. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.006

MacDonald, A.J., Holmes, F.E., Beall, C., Pickering, A.E., Ellacott, K.L.J., 2020. Regulation of food intake by astrocytes in the brainstem dorsal vagal complex. Glia 68, 1241–1254. https://doi.org/10.1002/glia.23774

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE 8, e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Minaya, D.M., Turlej, A., Joshi, A., Nagy, T., Weinstein, N., DiLorenzo, P., Hajnal, A., Czaja, K., 2020. Consumption of a high energy density diet triggers microbiota dysbiosis, hepatic lipidosis, and microglia activation in the nucleus of the solitary tract in rats. Nutr. Diabetes 10, 20. https://doi.org/10.1038/s41387-020-0119-4

Mistlberger, R., Rusak, B., 1987. Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content. Physiology & Behavior 41, 219–226. https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90356-8

Moore, C.F., Schlain, G.S., Mancino, S., Sabino, V., Cottone, P., 2017. A behavioral and pharmacological characterization of palatable diet alternation in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 163, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.10.013

Morari, J., Anhe, G.F., Nascimento, L.F., de Moura, R.F., Razolli, D., Solon, C., Guadagnini, D., Souza, G., Mattos, A.H., Tobar, N., Ramos, C.D., Pascoal, V.D., Saad, M.J., Lopes-Cendes, I., Moraes, J.C., Velloso, L.A., 2014. Fractalkine (CX3CL1) Is Involved in the Early Activation of Hypothalamic Inflammation in Experimental Obesity. Diabetes 63, 3770–3784. https://doi.org/10.2337/db13-1495

Nankova, B.B., Chua, J., Mishra, R., Kobasiuk, C.D., 2003. Nicotinic Induction of Preproenkephalin and Tyrosine Hydroxylase Gene Expression in Butyrate-Differentiated Rat PC12 Cells: A Model for Adaptation to Gut-Derived Environmental Signals. Pediatric Research 53, 113–118.

Narmaki, E., Borazjani, M., Ataie-Jafari, A., Hariri, N., Doost, A.H., Qorbani, M., Saidpour, A., 2020. The combined effects of probiotics and restricted calorie diet on the anthropometric indices, eating behavior, and hormone levels of obese women with food addiction **:** a randomized clinical trial. Nutritional Neuroscience 1–13. https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1826763

Nummenmaa, L., Saanijoki, T., Tuominen, L., Hirvonen, J., Tuulari, J.J., Nuutila, P., Kalliokoski, K., 2018. μ-opioid receptor system mediates reward processing in humans. Nat Commun 9, 1500. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03848-y

O'Dell, L.E., Koob, G.F., 2007. 'Nicotine deprivation effect' in rats with intermittent 23-hour access to intravenous nicotine self-administration. Pharmacology Biochemistry and Behavior 86, 346–353. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.01.004

Park, J., Lee, J., Yeom, Z., Heo, D., Lim, Y.-H., 2017. Neuroprotective effect of Ruminococcus albus on oxidatively stressed SH-SY5Y cells and animals. Sci

Rep 7, 14520. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15163-5

Peng, B., Xu, Q., Liu, J., Guo, S., Borgland, S.L., Liu, S., 2021. Corticosterone Attenuates Reward-Seeking Behavior and Increases Anxiety via D2 Receptor Signaling in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. The Journal of Neuroscience 41, 1566–1581.

Pfeiffer, N., Desmarchelier, C., Blaut, M., Daniel, H., Haller, D., Clavel, T., 2012. Acetatifactor muris gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from the intestine of an obese mouse. Arch Microbiol 7.

R Core Team (2020), n.d. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Shah, P., Nankova, B.B., Parab, S., La Gamma, E.F., 2006. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. Brain Research 1107, 13–23. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.097

Simonds, S.E., Pryor, J.T., Cowley, M.A., 2018. Repeated weight cycling in obese mice causes increased appetite and glucose intolerance. Physiology & Behavior 194, 184–190. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.05.026

Sun, M., Zheng, S., Gao, X., Lin, Z., 2020. The role of immune cells in obesogenic memory. Cell Mol Immunol 17, 884–886. https://doi.org/10.1038/s41423-020-0448-1

Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S.B., Bonnaure-Mallet, M., 2017. Roseburia spp.: a marker of health? Future Microbiol. 14.

Terrien, J., Seugnet, I., Seffou, B., Herrero, M.J., Bowers, J., Chamas, L., Decherf, S., Duvernois-Berthet, E., Djediat, C., Ducos, B., Demeneix, B.A., Clerget-Froidevaux, M.-S., 2019. Reduced central and peripheral inflammatory responses and increased mitochondrial activity contribute to diet-induced obesity resistance in WSB/EiJ mice. Sci Rep 9, 19696. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56051-4

Thaiss, C.A., Itav, S., Rothschild, D., Meijer, M.T., Levy, M., Moresi, C., Dohnalová, L., Braverman, S., Rozin, S., Malitsky, S., Dori-Bachash, M., Kuperman, Y., Biton, I., Gertler, A., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Aharoni, A., Segal, E., Elinav, E., 2016. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. Nature 540, 544–551. https://doi.org/10.1038/nature20796

Thaler, J.P., Yi, C.-X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschöp, M.H., Schwartz, M.W., 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J. Clin. Invest. 122, 153–162. https://doi.org/10.1172/JCI59660

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444, 1027–1031. https://doi.org/10.1038/nature05414

Usami, M., Kishimoto, K., Ohata, A., Miyoshi, M., Aoyama, M., Fueda, Y., Kotani, J., 2008. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor κB activation and tumor necrosis factor α secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. Nutrition Research 28, 321–328. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.02.012

Valdivia, S., Patrone, A., Reynaldo, M., Perello, M., 2014. Acute High Fat Diet Consumption Activates the Mesolimbic Circuit and Requires Orexin Signaling in a Mouse Model. PLOS ONE 9, e87478. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087478

Vinolo, M.A.R., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T., Curi, R., 2011. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. Nutrients 3, 858–876. https://doi.org/10.3390/nu3100858

Waise, T.M.Z., Toshinai, K., Naznin, F., NamKoong, C., Md Moin, A.S., Sakoda, H., Nakazato, M., 2015. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. Biochemical and Biophysical Research Communications 464, 1157–1162. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.097

Wallace, J.L., Motta, J.-P., Buret, A.G., 2018. Hydrogen sulfide: an agent of stability at the microbiome-mucosa interface. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 314, G143–G149. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00249.2017

Wang, B., Kong, Q., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., Wang, G., 2020. A High-Fat Diet Increases Gut Microbiota

Biodiversity and Energy Expenditure Due to Nutrient Difference. Nutrients 12, 3197. https://doi.org/10.3390/nu12103197

Wang, D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. Progress in Neurobiology S030100820800110X. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.015

Waymire, J.C., Weiner, N., Prasad, K.N., 1972. Regulation of Tyrosine Hydroxylase Activity in Cultured Mouse Neuroblastoma Cells: Elevation Induced by Analogs of Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 5.

Wojnicki, F.H.E., Roberts, D.C.S., Corwin, R.L.W., 2006. Effects of baclofen on operant performance for food pellets and vegetable shortening after a history of binge-type behavior in non-food deprived rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 84, 197–206. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.04.015

Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhao, L., 2012. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. ISME J 6, 1848–1857. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.27

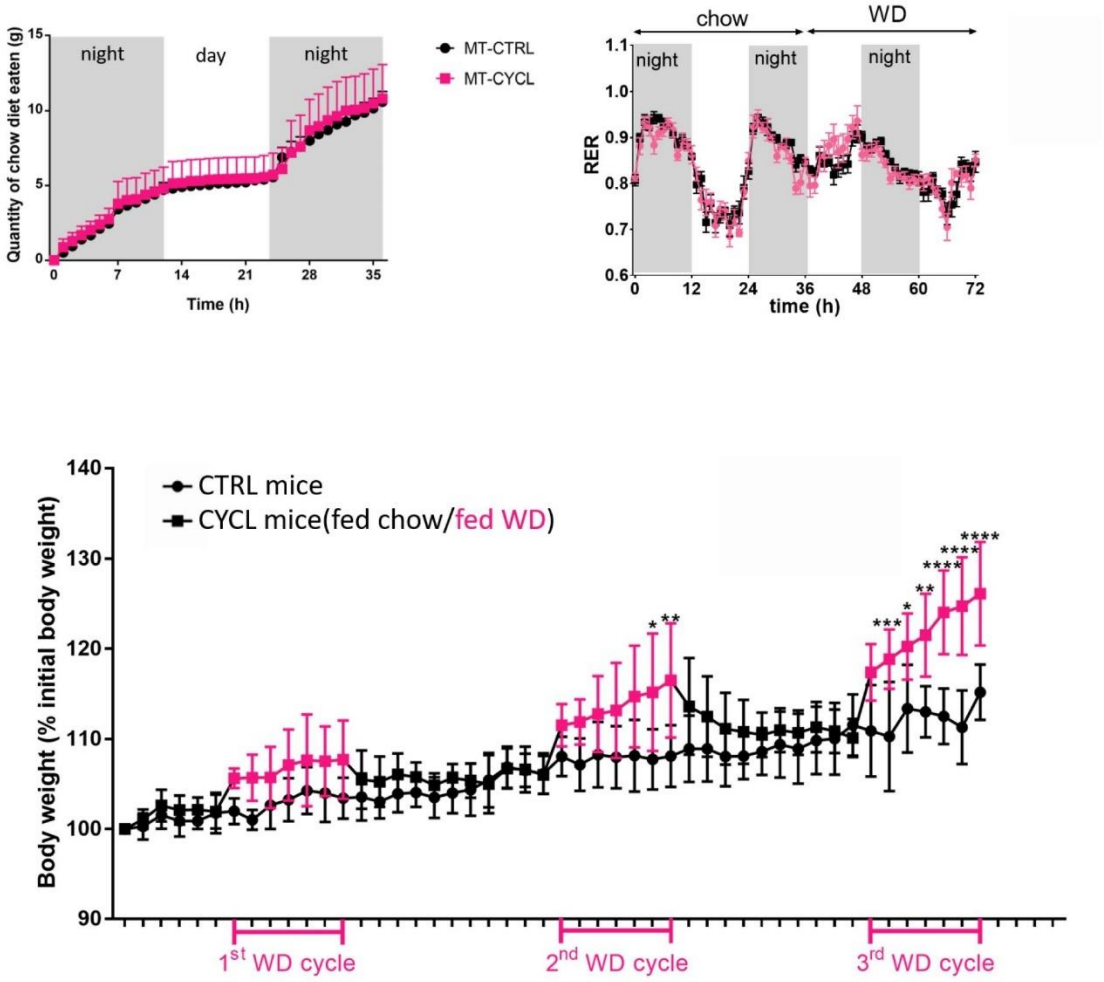
Zhang, H.-Y., Wang, Y., He, Y., Wang, T., Huang, X.-H., Zhao, C.-M., Zhang, L., Li, S.-W., Wang, C., Qu, Y.-N., Jiang, X.-X., 2020. A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment. J Neuroinflammation 17, 200. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01871-9

Zhang, X., Grosfeld, A., Williams, E., Vasiliauskas, D., Barretto, S., Smith, L., Mariadassou, M., Philippe, C., Devime, F., Melchior, C., Gourcerol, G., Dourmap, N., Lapaque, N., Larraufie, P., Blottière, H.M., Herberden, C., Gerard, P., Rehfeld, J.F., Ferraris, R.P., Fritton, J.C., Ellero-Simatos, S., Douard, V., 2019. Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. The FASEB Journal fj.201801526RR. https://doi.org/10.1096/fj.201801526RR

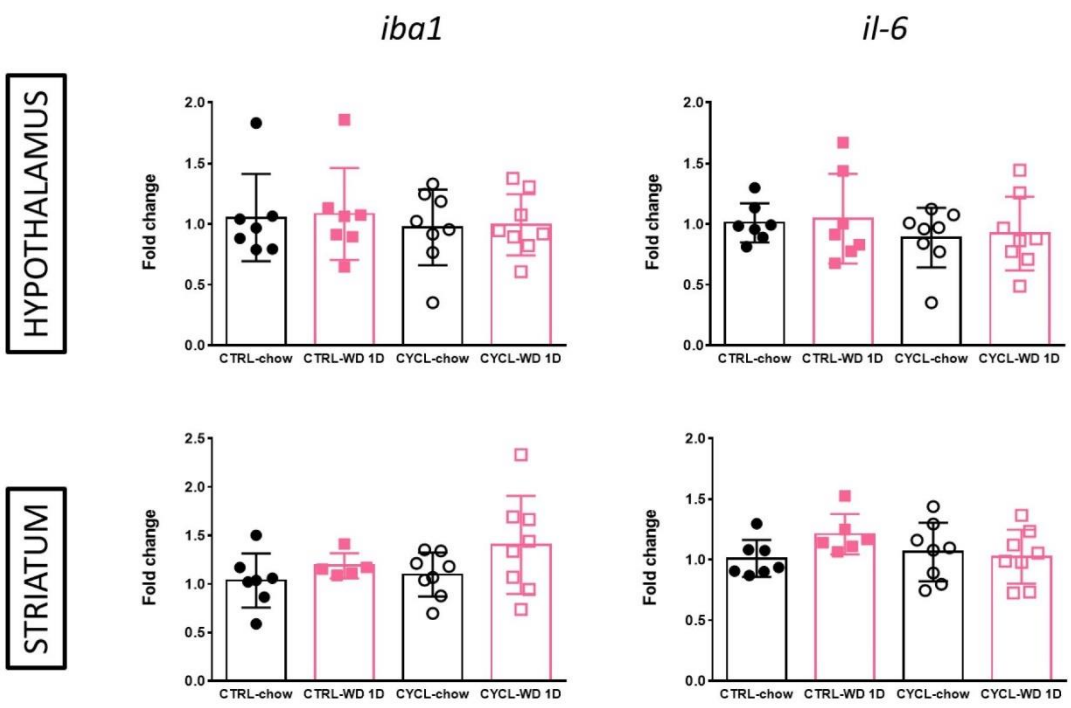
Zoppi, J., Guillaume, J.-F., Neunlist, M., Chaffron, S., 2020. MiBiOmics: An interactive web application for multi-omics data exploration and integration (preprint). Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/2020.04.24.031773

Zou, J., Lai, B., Zheng, M., Chen, Q., Jiang, S., Song, A., Huang, Z., Shi, P., Tu, X., Wang, D., Lu, L., Lin, Z., Gao, X., 2018. CD4+ T cells memorize obesity and promote weight regain. Cell Mol Immunol 15, 630–639. https://doi.org/10.1038/cmi.2017.36

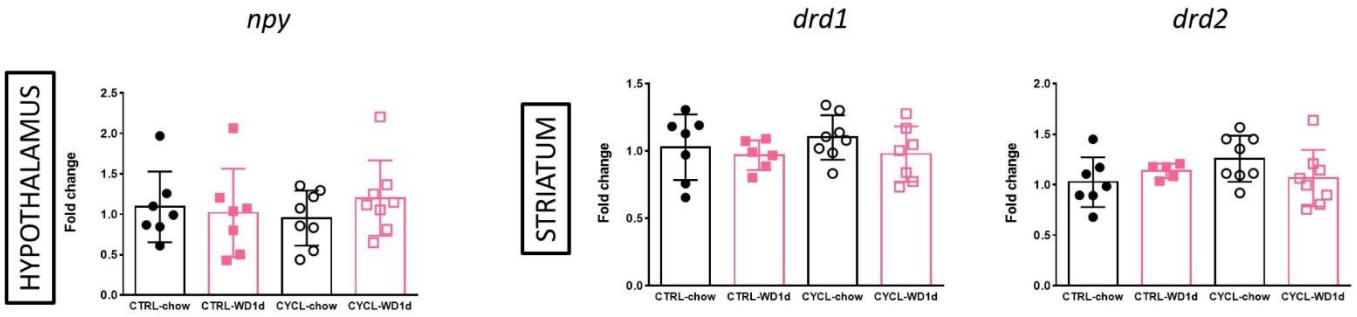
Supplementary materials



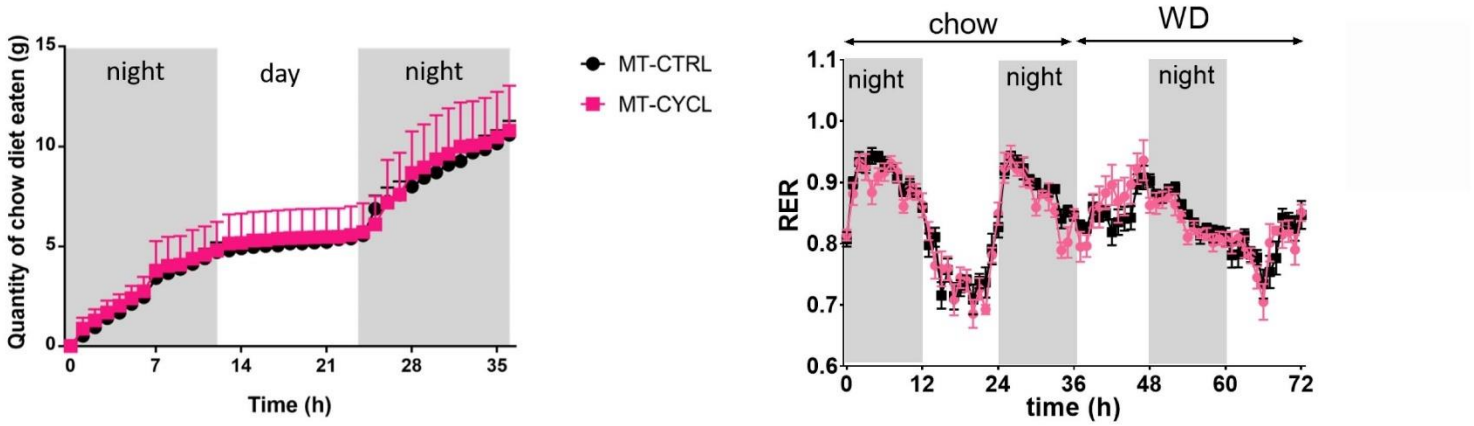
Supplementary figure 1. Mean body weight gain evolution of mice from experiment 1 following each WD introduction (from D1 to D7), compared to their body weight under chow diet at the beginning of the experiment (%). Body weight evolution of cycling mice (CYCL) is represented by squares (pink squares under WD, black squares under chow diet) while body weight of control mice (CTRL) is represented by black points. *: P<0.05



Supplementary figure 2. Gene expressions of *iba1* and *il-6* in the hypothalamus and striatum.



Supplementary figure 3. Gene expressions of *npy* in the hypothalamus and *drd1* and *drd2* in the striatum.



Supplementary figure 4. Amount of chow diet eaten by MT-CTRL and MT-CYCL mice before the exposition to WD and respiratory exchange ratio measured in metabolic cages before and after the switch to WD.

Gene	Tissue	AOD
agrp	hypothalamus	PN4453320
pomc	hypothalamus	Mm00435871_m1
npy	hypothalamus	Mm0141046_m1
actb	hypothalamus	Mm02619580_g1
syp	hypothalamus	Mm00436850_m1
oprm1	striatum	Mm01188089_m1
penk	striatum	Mm01212875_m1
drd1	striatum	Mm02620146_s1
drd2	striatum	Mm00438545_m1
th	striatum	Mm00447557_m1
slc6a3	striatum	Mm00438388_m1
ccl2	both	Mm00441242
il-6	both	Mm00446190_m1
il1ß	both	Mm00434228_m1
tnfα	both	Mm00443258_m1
iba1	both	Mm00479862_g1
il10	both	Mm01288386
rplp0	both	Hs00420895_gH

Supplementary table 1. AOD of genes used to determine expression levels of genes involved in food intake, reward system and inflammation in hypothalamus, striatum and brainstem of experiment 2 mice.

III. Aspect prédictif de la composition du microbiote vis-à-vis de de la prise alimentaire lors de la phase hyperphagique après l'introduction d'un WD

Auteurs : Mélanie Fouesnard[1], Selma Ben-Fradj[2], Gwenaëlle Randuineau[1], Alexandre Benani[2], Véronique Douard[3*] et Gaëlle Boudry[1*]

[1] Institut Numecan, INRAE, INSERM, Univ Rennes, Rennes, France.
[2] Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Unité Mixte de Recherche 6265–Centre National de la Recherche Scientifique 13241–Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Université de Bourgogne, Dijon, France.
[3] Institut MICALIS, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France.

* : ces auteurs ont participé à contribution équivalente

A. Introduction

Au cours des deux études précédentes, nous avons montré dans un premier temps que le microbiote intestinal était impliqué dans l'élévation du stress oxydant hypothalamique précoce induit par la consommation d'un régime WD et pourrait donc participer par cette voie à la mise en place de l'inflammation hypothalamique, elle-même liée à la phase hyperphagique rencontrée lors du changement de régime [1]. Dans un second temps, nous avons montré que la composition et l'activité du microbiote intestinal étaient modifiées par plusieurs expositions courtes au WD, sans prise de poids significative des animaux, et que ce microbiote cicatriciel participait à l'amplification de la phase hyperphagique au fur et à mesure des expositions au régime WD. Ces deux études nous ont donc permis de mettre en évidence le rôle des adaptations du microbiote au WD dans le comportement alimentaire lors du changement d'aliment.

L'intensité de la prise alimentaire durant la première semaine qui suit le changement alimentaire étant prédictive du phénotype d'obésité à long-terme [2, 3] et le microbiote intestinal étant impliqué dans la régulation de la prise alimentaire lors des premiers jours sous WD, nous avons voulu évaluer si le microbiote initial des souris pouvait être prédictif de la réponse comportementale au changement de régime lors du premier jour de WD. Pour cela, nous avons eu accès à des prélèvements de fèces réalisés avant et à différents temps après le changement d'aliment sur une cohorte de 30 souris pour lesquelles l'ingéré

calorique était mesuré quotidiennement pendant 8 jours. Nous avons ainsi tenté d'évaluer les liens entre la composition du microbiote fécal avant la transition alimentaire et l'intensité du pic d'hyperphagie lors du premier jour de consommation de WD dans cette cohorte.

B. Matériel et méthodes

1. Animaux

30 souris C57BL6/J (mâles, 7 semaines, Janvier Labs, France) ont été hébergées individuellement en cages classiques avec un cycle 12h-12h. Un régime chow *ad libitum* (2,9 kcal.g^{-1}, lipides : 22,4%kcal) était fourni avant l'introduction d'un WD (4,4 kcal.g^{-1}, lipides : 42,5%kcal) pendant 8 jours. Les fèces des souris ont été collectées avant changement de régime (D0) puis 1 jour (D1), 2 jours (D2), 5 jours (D5) et 8 jours (D8) après introduction du WD (Figure 3.2). L'ingéré alimentaire a été mesuré quotidiennement.

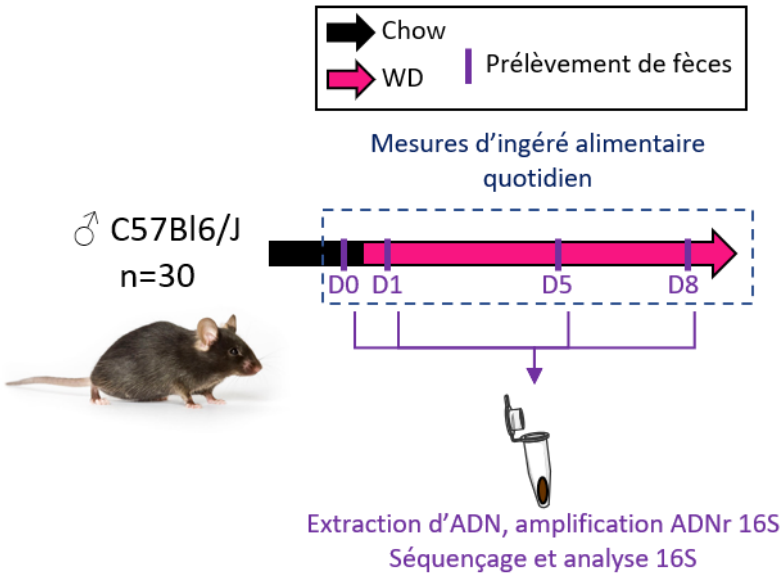


Figure 3.2. Protocole expérimental de l'expérience. Les souris ont été hébergées individuellement.

2. Analyse de la composition du microbiote

Une extraction d'ADN à partir des fèces à l'aide d'un kit commercial (ZD6010, Zymo Research) a été réalisée selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été amplifié par PCR (98°C pendant 30 sec ; 25 cycles avec 98°C pendant 10 sec, 45°C pendant 30 sec, 72°C pendant 30 sec ; stockage à 4°C) spécifique de la région V3-V4 de l'ADNr16S (primer sens V3F : 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' ; primer antisens V4R : 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCC-3' ; enzyme utilisée : Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530L, New England Biolabs)). L'intégrité de l'ADN amplifié a été vérifiée après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2% (50V pendant 1h dans un tampon TAE 1X). Les amplicons ont été séquencés sur plate-forme (GenoToul, Toulouse, France) avec la technologie Illumina MiSeq. Les séquences obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel R [4] : les séquences ont été filtrées et affiliées taxonomiquement à l'aide du package dada2 [5], un objet phyloseq [6] a été construit à partir des séquences filtrées et affiliées. Enfin, les données ont été normalisées à l'aide de la méthode « Geometric Pair Mean Ratios » (GMPR) [7]. Cette méthode de normalisation est adaptée à la prise en charge des possibles absences totales d'OTUs dans certains échantillons, ce qui peut être rencontré lors de changements drastiques d'environnement comme un changement de régime. Une première analyse du microbiote fécal des souris, échantillonné à D0, D1, D5 et D8, a été réalisée à l'aide du logiciel R [4] (package phyloseq v. 1.30) et de Prism GrapPad (v. 7.0) pour évaluer l'évolution de la diversité α (nombre d'espèces uniques, à partir des données raréfiées ; indice d'équitabilité de Shannon à partir des données brutes non raréfiées) ainsi que de la diversité β (indice de Bray-Curtis) au cours du temps, lors de l'introduction du WD.

3. Analyse statistique

L'ingéré alimentaire quotidien moyen et individuel des souris a été comparé de D0 à D8 par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn, les données ne suivant pas une loi Normale.

Afin de déterminer s'il existe un lien prédictif entre la composition du microbiote avant introduction du WD et l'ingéré alimentaire lors de la phase d'hyperphagie, deux approches statistiques ont été considérées : (i) une séparation des animaux selon leur ingéré alimentaire à D1, en considérant des groupes extrêmes en termes d'ingéré (les 10 souris qui ont le plus fort ingéré et les 10 souris qui ont le plus faible ingéré), avec une comparaison de leurs microbiotes à D0 ; (ii) une séparation des animaux selon leur

microbiote à D0 à partir de la représentation de la β-diversité, avec une comparaison de leur ingéré alimentaire à D1.

Au cours de la première approche, les souris ont été séparées selon leur ingéré alimentaire à D1 en deux groupes extrêmes : les données ne suivant pas une loi Normale pour les deux groupes, un test de Mann-Whitney a été réalisé pour déterminer si la différence d'ingéré était significativement différente entre eux. Le microbiote des souris des deux groupes a ensuite été comparé à l'aide du logiciel R [4] en utilisant le package DESeq2 [8] pour une comparaison à l'échelle de l'α-diversité, de la β-diversité et de l'OTU. Les OTUs ont été affiliées taxonomiquement à l'aide de l'outil BLAST du NCBI.

Au cours de la seconde approche, le microbiote des souris aggloméré à l'échelle du genre a été clusterisé à partir d'une projection (PCoA) de la β-diversité (indice de Bray-Curtis et distance weighted Unifrac) à D0. Ces groupes ont été construits à partir d'une approche précédemment publiée [9]. Pour cela, l'algorithme des k-médoïdes (partitioning around medoids, PAM) a été utilisé pour déterminer le nombre optimal de clusters à partir de la matrice de distance de Bray-Curtis et de weighted Unifrac à l'aide du package R cluster (version 2.1.0). En résumé, le nombre de clusters optimal est déterminé avec la méthode PAM via la fonction clusGap, basée sur une méthode publiée en 2001 par Tibshirani *et al.* [10]. Pour un ensemble de points, plus on augmente le nombre de clusters k, plus l'erreur $W(k)$ associée, qui représente une mesure de la dispersion entre les échantillons au sein d'un même cluster (la distance euclidienne a été utilisée ici), diminue. Cette diminution n'est pas linéaire : elle est d'abord forte puis atteint un coude avant de diminuer plus doucement, parfois en plateau, lorsque le nombre de clusters k augmente. Une façon de déterminer visuellement le nombre de clusters idéal est de représenter cette diminution de $W(k)$ en fonction du nombre de clusters k et de voir à quel k un coude est observé (Elbow method). Cette méthode graphique reste cependant arbitraire. Ainsi, le but de l'algorithme des k-médoïdes est de déterminer automatiquement le nombre de clusters qui correspond à ce coude. Une valeur est calculée en comparant, pour chaque nombre de clusters k, $\log(W(k))$ avec $E * (\log(W(k))$, cette dernière valeur correspondant à un modèle nul de distribution des échantillons et étant définie après un nombre défini de répétitions du calcul (bootstraps, ici 500). Le but est de maximiser l'écart (le « gap ») entre ces deux valeurs pour un nombre de clusters k défini (méthode « firstSEmax)). Une représentation graphique de l'évolution de la valeur du gap en fonction du nombre de clusters est alors obtenue : la plus haute valeur correspond au nombre de clusters optimal (voir exemple en Figure 3.5A). D'autres méthodes permettent de valider ce nombre. Le nombre optimal de clusters a également été déterminé en utilisant l'indice de Calinski-Harabasz (le rapport entre la variance inter-groupes et la variance intra-groupes, le nombre de clusters correspondant au maximum de cet indice étant sélectionné) (voir Figure 3.5B). Le nombre de clusters a ensuite été validé par l'indice de silhouette (Figure 3.5C). L'indice de silhouette correspond, pour chaque point (ici chaque échantillon), à la différence entre la distance qui sépare cet échantillon des autres échantillons du même cluster et entre la distance qui sépare cet échantillon des échantillons des autres clusters.

Plus cette différence est élevée, plus l'échantillon est proche des autres échantillons du cluster et plus on peut considérer que le clustering est correct. En revanche, lorsque la distance est négative, cela signifie que l'échantillon est plus proche des échantillons des autres clusters et que le clustering peut être remis en question [11]. La séparation entre clusters a été évaluée d'un point de vue statistique par PERMANOVA à partir des coordonnées de PCoA de la diversité β. Les valeurs d'ingéré alimentaire des clusters de souris ont ensuite été comparés par Kruskal-Wallis suivi de test post-hoc de Dunn en cas de résultat significatif du test.

C. Résultats et discussion

1. Les souris présentaient des profils alimentaires variables dans les jours qui suivaient le changement d'aliment

L'ingéré calorique quotidien des souris a été mesuré pendant les 8 jours qui suivaient le changement d'aliment. Comme attendu, une hyperphagie pendant les 24 premières heures suivant le changement d'aliment a été observée, suivie d'un retour en quatre jours à un ingéré calorique similaire à celui précédent le changement d'aliment (Figure 3.2A), à l'exception d'une souris qui présentait un pic d'hyperphagie considéré comme un outlier à D2 et qui a été donc été éliminée de l'analyse. Cependant, l'intensité du pic hyperphagique était variable, de 110% de l'ingéré pré-changement pour la plus faible consommatrice à 221% pour la plus forte consommatrice (Figure 3.3B). De même, la vitesse de retour à l'ingéré pré-changement était visiblement variable d'une souris à l'autre (Figure 3.3B).

2. Le microbiote fécal des souris changeait de composition dès 1 jour de WD et continuait à évoluer jusqu'à 8 jours de WD

L'étude de l'évolution des diversités α et β du microbiote fécal des souris a montré que la diversité α, que ce soit concernant le nombre d'espèces uniques (Figure 3.4A) ou l'équitabilité entre les espèces (indice de Shannon, Figure 3.4B), augmentait dès un jour de consommation de WD avant de revenir à un niveau similaire au niveau initial avant changement de régime. La diversité β, représentée ici par l'évolution de l'indice de Bray-Curtis au cours du temps, variait également significativement dès un jour de régime et continuait à évoluer jusqu'à 5 jours de consommation de WD avant de se stabiliser jusqu'à 8 jours (Figure 3.4C).

3. Les petites et grandes consommatrices de WD à D1 possédaient un microbiote initial légèrement différent

Notre première stratégie pour évaluer le lien entre microbiote initial des souris et hyperphagie a consisté à séparer les souris en deux groupes distincts selon leur ingéré calorique à D1 et d'analyser ensuite les différences de microbiote entre ces deux groupes de souris. L'analyse de l'ingéré alimentaire à D1 a permis de former deux groupes de 10 souris (les 10 souris qui ont l'ingéré alimentaire à D1, exprimé en %D0, le plus faible (groupe « petites ») et les 10 souris qui ont celui le plus fort (groupe « grandes ») dont l'ingéré alimentaire était significativement différent ($p<0.0001$ après test de Mann-Whitney) (Figure 3.5A).

A D1, ces deux groupes de souris ne présentaient pas de différence significative de leur diversité α (nombre d'espèces observées (Figure 3.4B) ou indice d'équitabilité de Shannon (Figure 3.4C)) ni de leur diversité β (indice de Bray-Curtis, Figure 3.5D).

Nous avons également analysé à l'échelle de l'OTU les différences de microbiote avant le changement d'aliment entre ces deux groupes de souris (Figure 3.5E). Au total, neuf OTUs présentaient une abondance significativement différente entre les deux groupes avant changement de régime (Figure 3.5E). Le groupe des grandes consommatrices de WD était enrichi en deux OTUs de la famille des *Lachnospiraceae* (*Roseburia intestinalis* et *Clostridium scindens*), une OTU de la famille des *Erysipelotrichaceae* (*Faecalibaculum rodentium*) et trois OTUs de la famille des *Ruminococcaceae* (*Anaerotruncus colihominis*, *Eubacterium coprostanoligenes* et *Oscillibacter ruminantium*). *Roseburia intestinalis* est une bactérie productrice de butyrate qui dégrade les fibres du régime [12] avec des effets bénéfiques sur l'hôte, tels qu'une diminution de l'inflammation systémique et une diminution des risques cardiovasculaires après colonisation chez le rongeur axénique [13], il est donc surprenant que son abondance dans le microbiote initial soit positivement associée à la prise alimentaire. *Clostridium scindens*, quant à elle, est une productrice d'acides biliaires secondaires qui joue également un rôle protecteur chez l'hôte en limitant l'infection par *Clostridium difficile* [14]. *Faecalibaculum rodentium* est également une bactérie productrice de butyrate, utilisée comme probiotique avec un effet protecteur vis-à-vis de l'induction de maladies métaboliques liées à la consommation de WD sur le long-terme chez le rongeur [15]. *Eubacterium coprostanoligenes* a des capacités de réduction du taux de cholestérol plasmatique [16] et pourrait donc avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la mise en place de l'obésité. Enfin, *Oscillibacter ruminantium* possède également un rôle protecteur de l'hôte par la production de butyrate [17] et son association positive avec des effets anti-inflammatoires intestinaux [18]. L'effet à très court terme de ces bactéries sur l'augmentation de la prise alimentaire au moment de la transition au WD reste à confirmer. Trois OTUs de la famille des *Lachnospiraceae* (deux *Acetatifactor muris* et une *Clostridium scindens*) étaient significativement plus présentes

à D0 dans le groupe des petites consommatrices de WD par rapport au groupe des grandes consommatrices. L'enrichissement en *Clostridium scindens* chez les souris petites consommatrices de WD est ici cohérent avec son rôle bénéfique pour l'hôte [14], même si son impact sur la prise alimentaire reste à confirmer. *Acetatifactor muris* est en revanche enrichie dans le microbiote intestinal d'individus obèses [19], son éventuel rôle bénéfique sur la régulation de la prise alimentaire au moment de l'introduction de WD reste donc à confirmer. D'autres prédicteurs tels que l'activité métabolique du microbiote pourraient être étudiés pour affiner l'étude de l'aspect prédictif du microbiote sur la prise alimentaire.

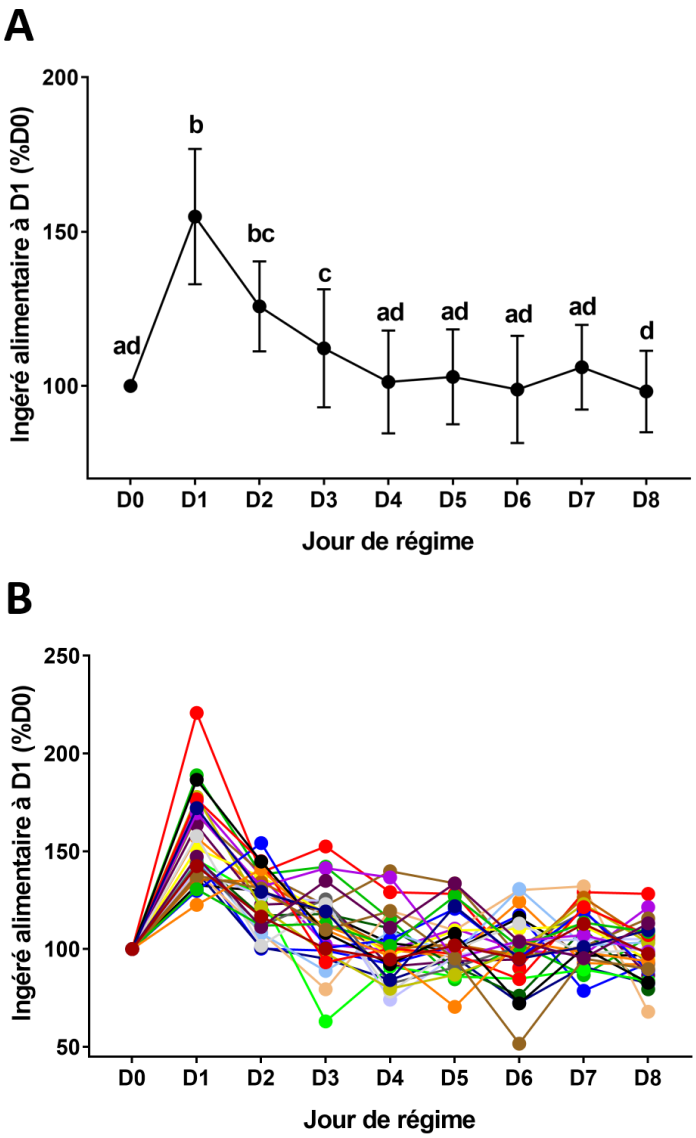


Figure 3.3. Ingéré alimentaire quotidien moyen (A, représenté par la moyenne ± écart-type) ou individuel (B, une couleur par souris) des souris, exprimé en pourcentage de l'ingéré contrôle (sous régime chow) de chaque souris (%D0). Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn a été réalisé entre les jours de régimes en **A**.

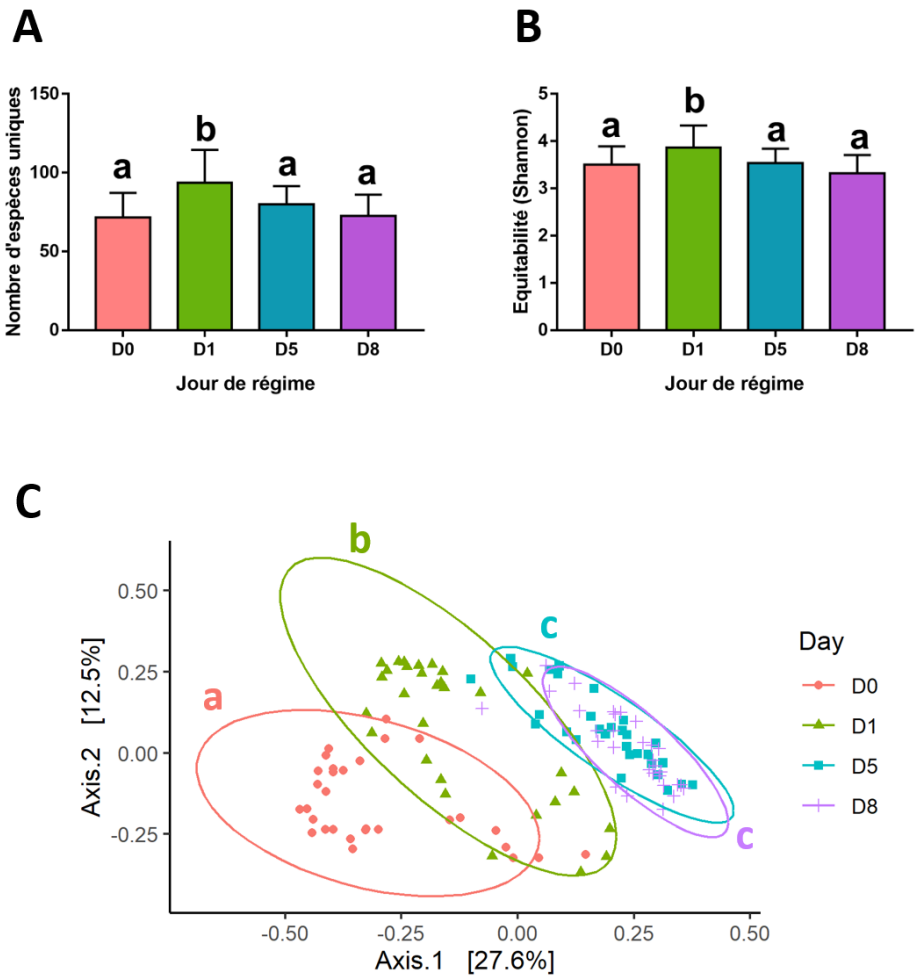


Figure 3.4. Evolution de la diversité α (**A** : nombre d'espèces uniques par échantillon et **B** : équitabilité entre les espèces (indice de Shannon) et de la diversité β (**C**) en fonction du jour de régime (« Day ») (D0 : avant changement de régime ; D1, D5 et D8 : un jour, cinq jours et huit jours après introduction d'un WD). Les données en **A** et **B** sont représentées en moyenne ± écart-type. Les différences entre les groupes ont été déterminées après test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn (**A** et **B**) ou par PERMANOVA (**C**). Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0,05$).

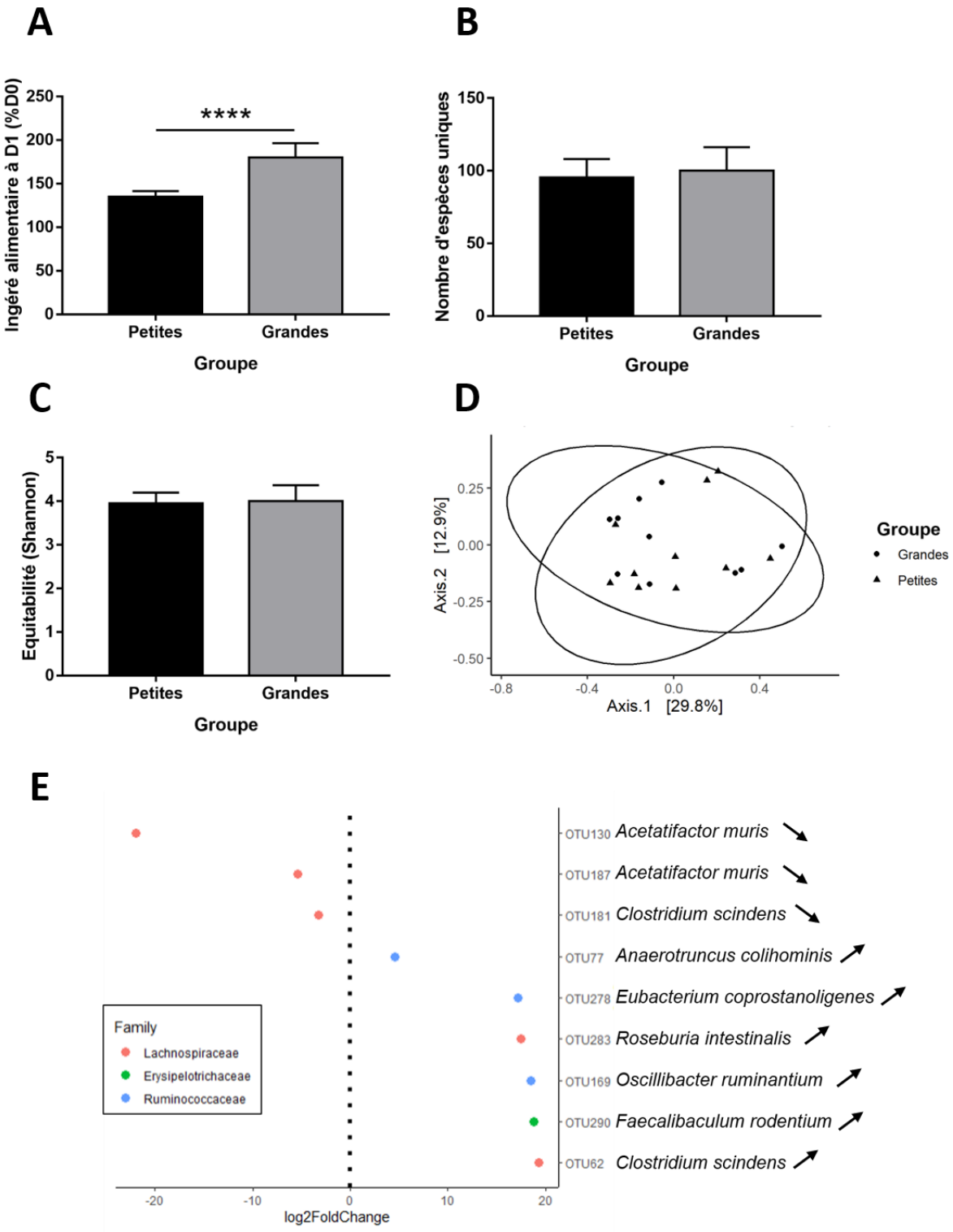


Figure 3.5. Voir légende page suivante.

Figure 3.5. Différences entre les groupes de souris petites consommatrices de WD à D1 (groupe « petites ») et grandes consommatrices de WD à D1 (groupe « grandes ») en termes de prise alimentaire à D1 (**A**), de diversité α (nombre d'espèces observées (**B**) et indice d'équitabilité de Shannon (**C**)), de diversité β (PCoA de Bray-Curtis (**D**)) et de composition à l'échelle de l'OTU de leur microbiote fécal à D0 (**E**). Pour E, une flèche ascendante indique une augmentation de l'abondance de l'OTU correspondante dans le groupe des grandes consommatrices tandis qu'une flèche descendante indique une diminution de l'abondance de cette OTU dans le groupe des grandes consommatrices, par rapport au groupe des petites consommatrices. Un test de Mann-Whitney a été réalisé sur les données d'ingéré alimentaire entre les deux groupes et sur l'indice d'équitabilité de Shannon, celles-ci ne suivant pas une loi Normale. Le nombre d'espèces uniques par échantillon suivait une loi Normale avec homoscédasticité des variances : un test t de Student a été réalisé entre les deux groupes. Les différences significatives sont indiquées par un astérisque (*) avec **** : $p<0.0001$. Les OTUs ont été identifiées à l'aide de l'outil BLAST du NCBI à partir des séquences de l'ADNr16S.

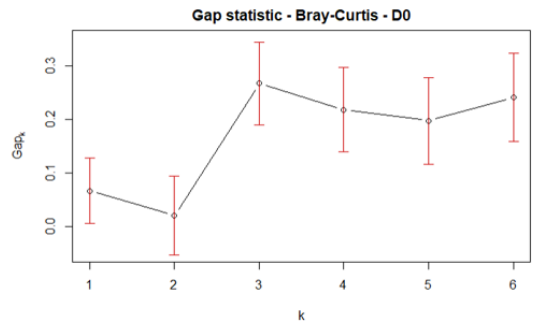
4. Séparer les échantillons à D0 selon la composition du microbiote intestinal ne permettait pas de les séparer selon leur ingéré à D1

Une autre stratégie consistait à déterminer si la composition initiale du microbiote intestinal avant changement de régime (caractérisée par la diversité β) permettait de prédire l'ingéré alimentaire des souris lors de la phase hyperphagique après introduction d'un WD. La méthode utilisée ici, décrite par Carlson *et al.* [9], consistait à créer des groupes de souris par clustering d'après la représentation graphique (PCoA) de la diversité β (distance de Bray-Curtis) avant changement d'aliment (D0) puis de comparer l'intensité de la prise alimentaire des souris appartenant à ces différents clusters durant la phase hyperphagique à D1.

Le nombre optimal de clusters permettant de séparer les échantillons selon la diversité β avant changement de régime a été calculé, à la fois par la méthode des k-médoïdes (Figure 3.6A) et l'indice de Calinski-Habarasz (Figure 3.6B), avec un gap maximal obtenu pour k=3 clusters ainsi qu'un indice de Calinski-Harabasz maximal pour 3 clusters également. L'indice de silhouette valide le fait que les échantillons sont bien répartis dans ces trois clusters, avec un indice positif pour chacun des échantillons (Figure 3.6C). Ainsi, un cluster (bleu) regroupait 9 souris, un cluster (rouge) regroupait 6 souris et un cluster (vert) regroupait 14 souris (Figure 3.6D). L'ingéré alimentaire de ces trois clusters à D1 a été comparé par Kruskal-Wallis mais n'a pas montré de différence significative après analyse statistique (Figure 3.6E). La même approche a été utilisée avec la distance weighted Unifrac, qui prend en compte la phylogénie des OTUs, et a donné le même

résultat (résultats non montrés). Les corrélations potentielles entre l'abondance normalisée à l'échelle des phyla, des familles et des genres à D0 avec l'intensité de la prise alimentaire à D1 ont également été vérifiées par corrélations de Pearson, ou de Kendall lorsque les données ne suivaient pas une loi Normale, à l'aide du logiciel R. Ces corrélations n'ont donné aucun résultat significatif (résultats non montrés).

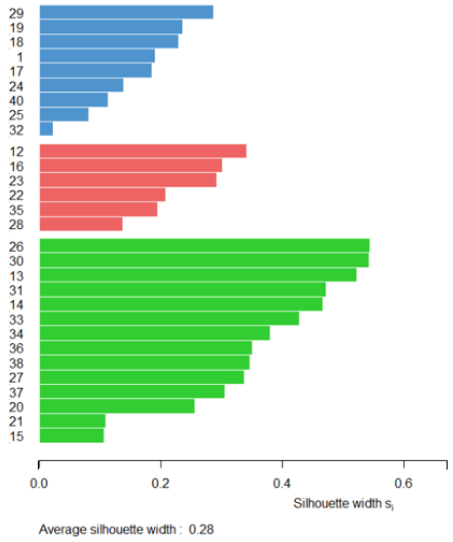
A



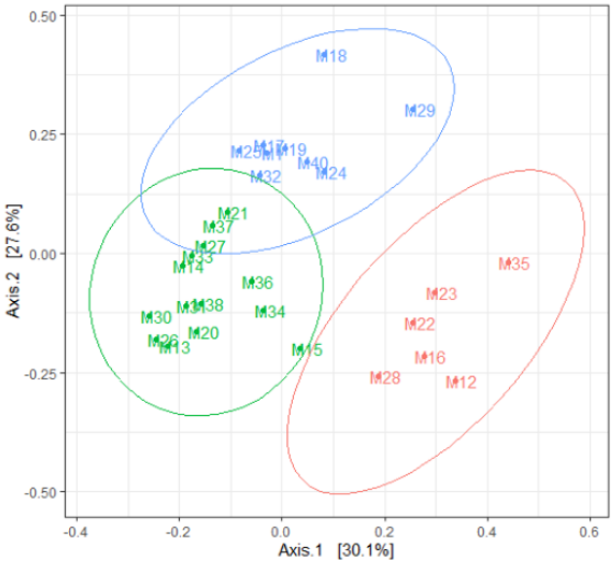
B

Nombre de clusters	Indice de Calinski-Harabasz
2	12,83
3	16,50
4	13,35
5	10,76

C



D



E

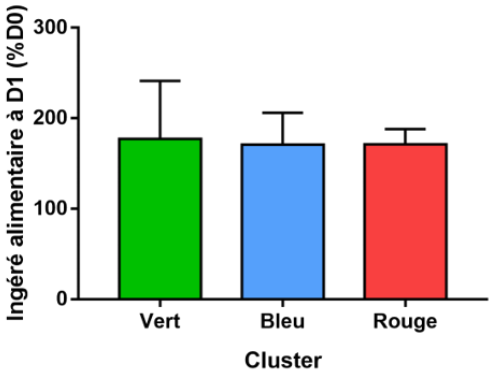


Figure 3.6. Voir légende page suivante.

Figure 3.6. La composition du microbiote fécal avant changement de régime n'est pas prédictive de l'ingéré alimentaire lors du premier jour de consommation de WD chez la souris. A. Statistique gap représentée en fonction du nombre de clusters construits à partir de la PCoA de l'indice de Bray-Curtis à partir des échantillons fécaux avant changement de régime. La courbe indique, par sa cassure à k=3 suivie d'un plateau, que 3 clusters sont idéaux pour séparer les échantillons. **B.** Indice de Calinski-Harabasz calculé à partir des données de PCoA de l'indice de Bray-Curtis en fonction du nombre de clusters testé, avant changement de régime. La valeur maximale de cet indice pour k=3 confirme que 3 clusters semblent être optimaux pour séparer les échantillons avant changement de régime. **C.** Silhouette obtenue pour chaque échantillon (le numéro de souris est indiqué à gauche en ordonnée) lorsque 3 clusters sont sélectionnés. La largeur de silhouette étant positive pour tous les échantillons, on peut considérer que le clustering est adéquat pour les échantillons avec ces trois clusters. **D.** Représentation de la diversité β (PCoA, Bray-Curtis), en retenant une séparation selon 3 clusters d'après les indices précédents, désignés par des couleurs différentes (rouge, vert et bleu) et par des ellipses. Chaque point correspond à une souris (« M ») dont le numéro est indiqué à côté. Les pourcentages de variations expliqués par les composants 1 et 2 sont indiqués en abscisse et en ordonnée, respectivement. **E.** Prise alimentaire à D1 (en %D0) des souris correspondant aux 3 clusters identifiés. Toutes les données n'étant pas distribuées selon une loi Normale, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé entre les trois groupes mais n'a montré aucune différence significative.

Nos deux approches ont donné des résultats légèrement différents mais qui pointent tous les deux vers une absence d'effet prédictif majeur du microbiote fécal initial des souris sur leur réponse en termes de comportement alimentaire au changement d'aliment. Des différences subtiles de microbiote fécal initial ont été observées entre les souris petites consommatrices et grandes consommatrices de WD après 1 jour d'introduction du régime avec quelques différences de microbiote à l'échelle de l'OTU. L'autre stratégie, qui consistait à partir de la représentation de la diversité β du microbiote fécal avant changement de régime n'a pas permis de prédire l'ingéré alimentaire à D1. Cette absence de différence peut en partie s'expliquer par l'utilisation du microbiote fécal, un microbiote qui va constituer un résumé de la composition très variable selon la région concernée du microbiote intestinal [20]. L'utilisation des fèces pour déterminer l'évolution du microbiote intestinal nous a permis de ne pas sacrifier les animaux et de réduire la variabilité qui pourrait être introduite en utilisant plusieurs groupes d'animaux sacrifiés aux différents temps. Cependant, chez la souris et dans d'autres modèles animaux, des différences significatives entre le microbiote caecal et le microbiote fécal ont été observées [21, 22]. L'utilisation du microbiote caecal pourrait constituer une bonne alternative mais ne permet pas de suivi longitudinal de l'évolution de sa composition chez un même animal soumis à un changement de régime.

De plus, l'utilisation ici de 30 animaux n'est probablement pas suffisante pour observer de fortes différences statistiques entre les groupes. Les changements de régime sont connus pour modifier drastiquement la composition du microbiote, pouvant induire une forte variabilité de réponse entre les individus d'une même étude [23], d'où la nécessité d'augmenter l'effectif total pour arriver à construire des groupes de taille suffisante permettant de distinguer le microbiote de souris qui ont un niveau d'hyperphagie différent en réponse au WD [24]. D'autres méthodes d'analyse du microbiote, qui ne sont pas basées uniquement sur les différences de diversité, l'ajout de données -omiques ou encore la confirmation que les clusters construits ici par le calcul de la puissance de la PERMOVA appliquée pourraient permettre de confirmer davantage que la séparation appliquée ici est pertinente [25]. Malgré ces limitations, d'autres études montrent que des biomarqueurs bactériens potentiels peuvent être identifiés malgré un effectif relativement restreint. En effet, une abondance initiale plus élevée d'*Akkermansia muciniphila* était prédictive entre autres d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline après traitement par un régime hypocalorique, au sein d'un effectif de 49 individus [26]. L'efficacité d'un prébiotique chez des patients obèses, l'inuline, dépend en partie de la composition et de l'activité du microbiote intestinal initial des individus [27]. Une autre étude, avec un effectif de 50 individus, a montré que les individus qui perdaient le moins de poids suite à une restriction calorique et en regagnaient le plus possédaient une abondance initiale plus élevée en bactéries dans l'ensemble des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* mais la composition du microbiote de façon générale n'a pas été identifiée comme un facteur prédictif des paramètres étudiés, de la même façon que notre étude n'a pas permis d'identifier des différences de composition générale entre les

groupes de souris [28]. Dans une autre étude, la propension à la perte de poids de 78 individus a été corrélée à l'abondance initiale des membres du phylum des Firmicutes [29]. Notre effectif de 30 souris est donc probablement faible pour déterminer si la composition initiale générale du microbiote intestinal est prédictive de l'intensité de la prise alimentaire après changement de régime. Cependant, les données obtenues avec la 1ère approche mériteraient d'être confirmées en étant reproduit dans une nouvelle cohorte ou pourraient également être comparés voire agrégés à des données déjà publiées , sous réserve que les échantillons aient été traités de façon similaire d'un point de vue technique et méthodologique lors de l'analyse des données de séquençage [24].

Enfin, on sait aujourd'hui que la composition du microbiote intestinal varie au cours de la journée selon le cycle circadien de l'animal et ces variations peuvent jouer un rôle dans l'établissement de certaines maladies métaboliques telles que le diabète de type II [30]. L'heure d'échantillonnage peut donc être une variable importante : échantillonner à heure fixe comme cela a été fait, sans couvrir la totalité du cycle circadien, ne permettrait peut-être pas d'observer certaines variations au cours de la journée qui expliqueraient les différences d'ingéré alimentaire. De plus, nous avons vu au cours du deuxième chapitre de cette thèse que si l'ingéré alimentaire sur les premières 24h d'introduction de WD ne variait pas avec le nombre d'expositions au WD, la quantité de calories ingérée durant les premières heures variait, en particulier dès 1h de consommation de WD. Il pourrait être intéressant d'étudier la réponse des animaux à l'introduction d'un WD en cages métaboliques pour évaluer si la composition initiale du microbiote intestinal peut être prédictive d'autres paramètres qui caractérisent la prise alimentaire tels que le nombre de repas, l'intervalle entre les repas ou encore le volume des repas lors des premières heures qui suivent le changement de régime.

Malgré les différences subtiles de composition du microbiote intestinal qui ont été observées entre les petites et grandes consommatrices de WD avant changement de régime, il est nécessaire d'approfondir ce type d'étude, notamment avec un effectif plus large, pour pouvoir conclure sur un rôle prédictif du microbiote intestinal sur la prise alimentaire sous WD.

D. Références

1. André C, Guzman-Quevedo O, Rey C, Rémus-Borel J, Clark S, Castellanos-Jankiewicz A, et al. Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. Diabetes. 2017;66:908–19.

2. Dourmashkin JT, Chang G-Q, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague–Dawley rats. Physiology & Behavior. 2006;87:666–78.

3. Vaanholt LM, Sinclair RE, Mitchell SE, Speakman JR. Factors influencing individual variability in high fat diet-induced weight gain in out-bred MF1 mice. Physiology & Behavior. 2015;144:146–55.

4. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org.

5. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods. 2016;13:581–3.

6. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE. 2013;8:e61217.

7. Chen L, Reeve J, Zhang L, Huang S, Wang X, Chen J. GMPR: A robust normalization method for zero-inflated count data with application to microbiome sequencing data. PeerJ. 2018;6:e4600.

8. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology. 2014;15. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

9. Carlson AL, Xia K, Azcarate-Peril MA, Goldman BD, Ahn M, Styner MA, et al. Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. Biological Psychiatry. 2018;83:148–59.

10. Tibshirani R, Walther G, Hastie T. Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. 2001;:13.

11. Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. Journal of Computational and Applied Mathematics. 1987;20:53–65.

12. La Rosa SL, Leth ML, Michalak L, Hansen ME, Pudlo NA, Glowacki R, et al. The human gut Firmicute Roseburia intestinalis is a primary degrader of dietary β-mannans. Nat Commun. 2019;10:905.

13. Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, et al. Interactions between Roseburia intestinalis and diet modulate atherogenesis in a murine model. Nat Microbiol. 2018;3:1461–71.

14. Greathouse KL, Harris CC, Bultman SJ. Dysfunctional Families: Clostridium scindens and Secondary Bile Acids Inhibit the Growth of Clostridium difficile. Cell Metabolism. 2015;21:9–10.

15. Ke X, Walker A, Haange S-B, Lagkouvardos I, Liu Y, Schmitt-Kopplin P, et al. Synbiotic-driven improvement of metabolic disturbances is associated with changes in the gut microbiome in diet-induced obese mice. Molecular Metabolism. 2019;22:96–109.

16. Li L, Baumann CA, Meling DD, Sell JL, Beitz DC. Effect of Orally Administered Eubacterium coprostanoligenes ATCC 51222 on Plasma Cholesterol Concentration in Laying Hens. Poultry Science. 1996;75:743–5.

17. Lee G-H, Kumar S, Lee J-H, Chang D-H, Kim D-S, Choi S-H, et al. Genome Sequence of Oscillibacter ruminantium Strain GH1, Isolated from Rumen of Korean Native Cattle. Journal of Bacteriology. 2012;194:6362–6362.

18. Fang X, Wang X, Yang S, Meng F, Wang X, Wei H, et al. Evaluation of the Microbial Diversity in Amyotrophic Lateral Sclerosis Using High-Throughput Sequencing. Front Microbiol. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.01479.

19. Pfeiffer N, Desmarchelier C, Blaut M, Daniel H, Haller D, Clavel T. Acetatifactor muris gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from the intestine of an obese mouse. Arch Microbiol. 2012;:7.

20. Flynn KJ, Ruffin MT, Turgeon DK, Schloss PD. Spatial Variation of the Native Colon Microbiota in Healthy Adults. Cancer Prev Res. 2018;11:393–402.

21. Stanley D, Geier MS, Chen H, Hughes RJ, Moore RJ. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. BMC Microbiol. 2015;15:51.

22. Pang W, Vogensen FK, Nielsen DS, Hansen AK. Faecal and caecal microbiota profiles of mice do not cluster in the same way. Lab Anim. 2012;46:231–6.

23. Healey GR, Murphy R, Brough L, Butts CA, Coad J. Interindividual variability in gut microbiota and host response to dietary interventions. Nutrition Reviews. 2017;75:1059–80.

24. Debelius J, Song SJ, Vazquez-Baeza Y, Xu ZZ, Gonzalez A, Knight R. Tiny microbes, enormous impacts: what matters in gut microbiome studies? Genome Biol. 2016;17:217.

25. Kelly BJ, Gross R, Bittinger K, Sherrill-Mix S, Lewis JD, Collman RG, et al. Power and sample-size estimation for microbiome studies using pairwise distances and PERMANOVA. Bioinformatics. 2015;31:2461–8.

26. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. Gut. 2016;65:426–36.

27. Leyrolle Q, Cserjesi R, D.G.H. Mulders M, Zamariola G, Hiel S, Gianfrancesco MA, et al. Prebiotic effect on mood in obese patients is determined by the initial gut microbiota composition: a randomized, controlled trial. Brain, Behavior, and Immunity. 2021;:S0889159121000180.

28. Kong LC, Wuillemin P-H, Bastard J-P, Sokolovska N, Gougis S, Fellahi S, et al. Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach. The American Journal of Clinical Nutrition. 2013;98:1385–94.

29. Korpela K, Flint HJ, Johnstone AM, Lappi J, Poutanen K, Dewulf E, et al. Gut Microbiota Signatures Predict Host and Microbiota Responses to Dietary Interventions in Obese Individuals. PLOS ONE. 2014;9:10.

30. Reitmeier S, Kiessling S, Clavel T, List M, Almeida EL, Ghosh TS, et al. Arrhythmic Gut Microbiome Signatures Predict Risk of Type 2 Diabetes. Cell Host & Microbe. 2020;28:258-272.e6.

IV. Etude des voies de communication entre le microbiote et le cerveau impliquées dans la régulation à court terme de l'ingéré alimentaire lors de l'exposition à un régime gras et sucré

Nous avons montré dans ce projet de thèse que le microbiote était impliqué dans les adaptations des acteurs cérébraux de la régulation de la prise alimentaire lors du passage d'un régime standard à un WD. Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que plusieurs voies de communication entre l'intestin et le cerveau peuvent expliquer l'impact du microbiote sur la régulation centrale du comportement alimentaire [1–3]. Cependant, les voies de communication intestin-cerveau activées au moment du passage d'un régime standard riche en fibres à un WD n'ont pas été identifiées.

Afin de les identifier, nous avons déplété le microbiote intestinal de souris par un cocktail d'antibiotiques à large spectre afin d'étudier la réponse en termes d'ingéré alimentaire ainsi que les modifications des acteurs de l'axe microbiote-cerveau dans les jours qui suivent le passage à un régime WD. L'utilisation d'un modèle antibiotique a été privilégié car il permet d'obtenir une diminution drastique de la flore microbienne en s'affranchissant des limites techniques et biologiques du modèle axénique.

A. La déplétion du microbiote intestinal induisait une diminution de la diversité α lors du changement de régime

1. Matériel et méthodes

Expérimentation animale : Des souris C57BL6/N mâles âgées de 7 semaines (Charles River, France) ont été soumises à un traitement antibiotique (vancomycine 45µg.mL^{-1}, streptomycine 1mg.mL^{-1}, ampicilline 1mg.mL^{-1}, colistine 1mg.mL^{-1}) dans l'eau de boisson durant 10 jours (n=20, groupe ABX) ou non (n=20, groupe CTRL). Les souris étaient hébergées individuellement en cage standard et placées sous régime chow ad libitum, en cycle normal 12h/12h (jour à 7h, nuit à 19h), à température (22°C) et humidité constantes. La moitié des souris de chaque groupe sont passées d'un régime standard à un WD pendant 5 jours (groupes CTRL-WD et ABX-WD) avant euthanasie tandis que l'autre moitié a été euthanasiée sous régime standard (groupes CTRL-chow et ABX-chow).

Analyse du microbiote : Le contenu caecal de souris euthanasiées sous régime standard et après 5 jours de WD a été collecté et stocké à -20°C avant extraction de l'ADN bactérien

à l'aide d'un kit commercial, selon les instructions du fabricant (Zymo Research D6010). La quantité d'ADN bactérien dans chaque échantillon a ensuite été déterminée par qPCR sur bactéries totales à l'aide de primers ciblant un motif commun à la plupart des bactéries. L'analyse des données de séquençage a été réalisée comme précédemment [4].

2. Résultats

Nous avons dans un premier temps vérifié que le traitement antibiotique induisait bien une diminution significative de la quantité de bactéries dans le contenu caecal. L'étude de la quantité d'ADN obtenue, rapportée en $ng.mg^{-1}$ de contenu caecal pour chaque échantillon, a montré que le traitement antibiotique (ABX-chow) induisait une forte déplétion de la quantité d'ADN bactérien sous régime standard par rapport au groupe contrôle (CTRL-chow) (Figure 3.7). Le passage au WD a induit une réaugmentation de cette quantité d'ADN dans le groupe ABX-WD par rapport à la quantité sous régime standard (ABX-chow), mais celle-ci restait significativement inférieure à celle du groupe CTRL-WD. Le traitement antibiotique a donc permis de diminuer de façon significative la quantité d'ADN bactérien retrouvée dans le caecum des souris, en particulier sous régime standard. Une réaugmentation de la quantité d'ADN a été observée pour les souris ABX recevant un régime WD : cette réaugmentation peut être le résultat de l'impact du passage d'un régime riche en fibres à un régime pauvre en fibres, qui induit une augmentation de la densité des selles. Ainsi, les bactéries se retrouveraient plus concentrées dans les échantillons sous WD que dans les échantillons sous régime standard, en raison d'une hydratation moins importante. On ne peut toutefois pas exclure que la réaugmentation de la quantité d'ADN observée sous WD pourrait être due à une favorisation de la croissance de bactéries persistantes malgré l'antibiothérapie, grâce au changement de contenu luminal induit par le changement de régime. En effet, des études ont montré que l'introduction d'un WD pendant un traitement antibiotique pouvait modifier l'activité métabolique des bactéries intestinales, suggérant que la nature du régime interagit avec l'antibiothérapie pour modifier l'activité du microbiote [5, 6]. Pour maintenir une très faible quantité d'ADN bactérien dans les contenus caecaux lors du passage au WD, un changement d'antibiothérapie (type d'antibiotique et/ou concentrations), selon les bactéries persistantes après traitement, pourrait être envisagé.

Cette diminution de la quantité d'ADN bactérien était accompagnée d'une modification de la diversité bactérienne. La diversité α (mesurée ici par le nombre d'espèces unique et par l'indice d'équitabilité de Shannon) n'était pas impactée sous régime standard par le traitement antibiotique (ABX-chow par rapport à CTRL-chow). Le traitement antibiotique a ainsi potentiellement induit une diminution de la quantité de bactéries sans modifier le nombre d'espèces uniques ni l'équitabilité entre les espèces au sein d'un même échantillon (Figure 3.7B et 3.7C, respectivement) sous régime standard. Dans le groupe

ABX-WD, contrairement au groupe CTRL-WD, le nombre d'espèces uniques et l'équitabilité entre les espèces d'un même échantillon étaient significativement diminuées. Cela suggère que l'introduction de WD dans un environnement où le microbiote a été majoritairement déplété induit un déséquilibre de la diversité bactérienne par rapport à la consommation d'un régime chow.

La diversité β, ou la diversité inter-échantillons, a été calculée à partir de la distance de Bray-Curtis (qui prend en compte la composition des échantillons) et de la distance weighted Unifrac (qui prend en compte la composition et la phylogénie des échantillons) (Figure 3.7D et 3.7E, respectivement). Les différences statistiques entre les groupes ont été déterminées par PERMANOVA à partir des matrices de distance. Le changement d'aliment a modifié la distance de Bray-Curtis entre les échantillons chez les souris contrôle (CTRL-WD vs CTRL-chow) mais pas chez les souris dont le microbiote avait été déplété (ABX-WD vs ABX-chow). Aucune différence significative de diversité β (weighted Unifrac) n'a été mesurée. Ces différences indiquent que le changement de régime chez des souris dont le microbiote est intact (groupes CTRL) a induit un changement de composition qui concerne des bactéries phylogénétiquement proches, puisque le changement de régime a induit une différence significative de composition seulement si on ne prend pas en compte la phylogénie.

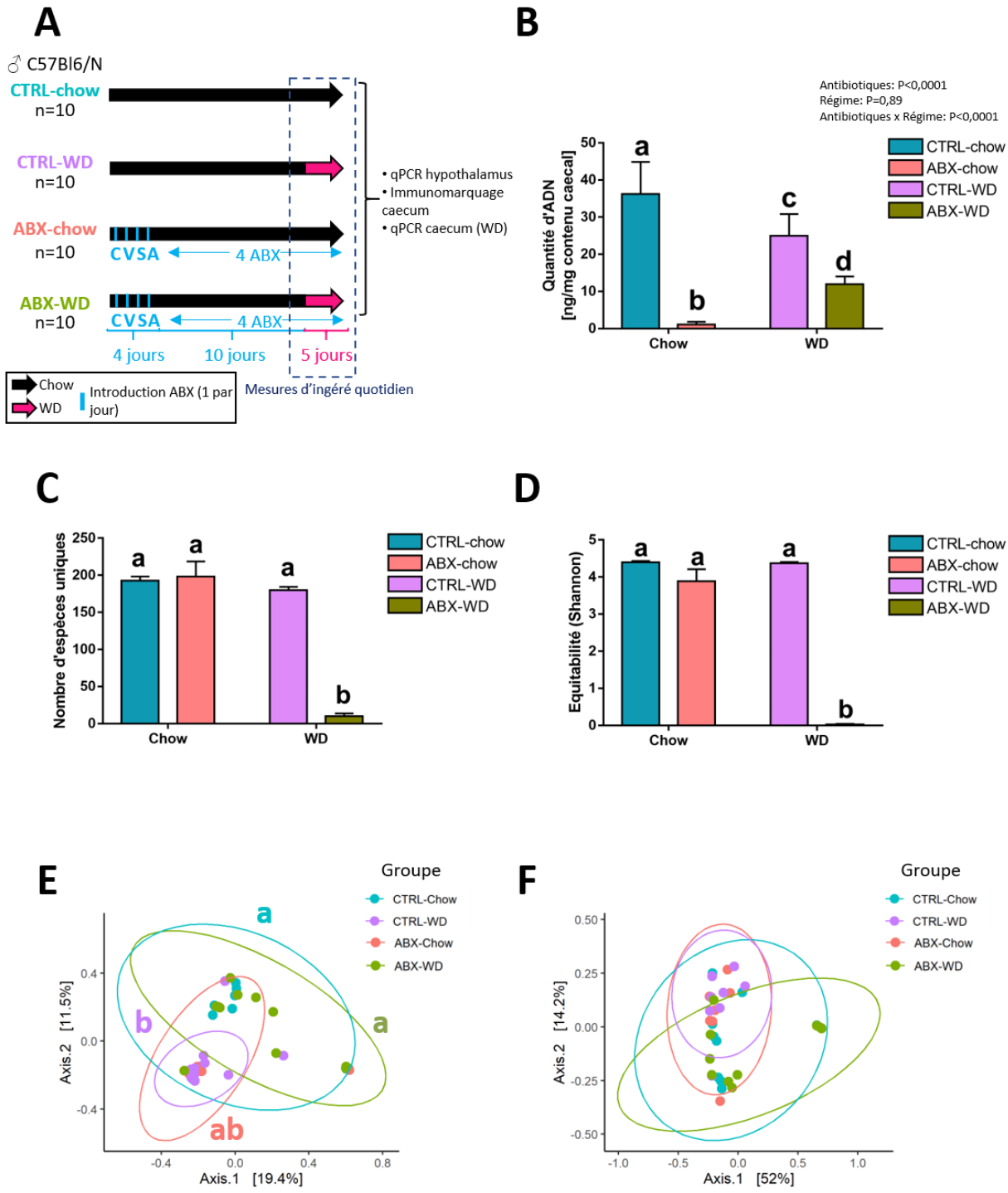


Figure 3.7. Voir légende page suivante.

Figure 3.7. Evolution de la diversité bactérienne sous traitement antibiotique (ABX), sous régime standard (Chow) ou après 5 jours de WD (WD). A. Résumé du protocole suivi. Quatre groupes de souris (n=10 par groupe) ont subi un traitement antibiotique (ABX) ou non (CTRL). Quatre antibiotiques ont été introduits un à un dans l'eau de boisson (C : colistine ; V : vancomycine ; S : streptomycine ; A : ampicilline) sur 4 jours avant un minimum de 10 jours sous traitement complet avant euthanasie. **B.** Concentration en ADN bactérien dans les contenus caecaux de souris traitées (ABX) ou non (CTRL) par un cocktail d'antibiotiques. Les mesures ont été faites sous régime standard (Chow) ou sous WD. Une ANOVA 2-voies suivie de tests post-hoc de Tukey a été effectuée entre les 4 groupes. Deux lettres différentes indiquent une différence significative. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type standard. **C et D.** Diversité α : nombre total d'espèces uniques (**C**) et indice d'équitabilité de Shannon (**D**). Un test de Kruskal-Wallis a été effectué entre les groupes. Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes. **E et F.** Diversité β : indice de Bray-Curtis (**E**) et distance weighted Unifrac (**F**). Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes après PERMANOVA.

B. La déplétion du microbiote induit une augmentation du rassasiement lors de l'introduction de WD

1. Matériel et méthodes

Mesure de la prise alimentaire en Biodaq : Des mesures plus précises de pattern alimentaire ont été réalisées à l'aide d'un système de cages métaboliques (système BioDaQ ; Centre des Sciences du Goût et l'Alimentation, Dijon, France). Les souris ont été placées en cages métaboliques après 10 jours de traitement antibiotique et alors qu'elles étaient encore sous régime standard. Leur comportement alimentaire a donc été mesuré sous chow et au moment de la transition vers un WD.

Prise alimentaire de souris axéniques : Des souris axéniques hébergées individuellement en isolateur stérile au sein de l'animalerie axénique ANAXEM (Institut Micalis, Jouy-en-Josas, France), avec les mêmes paramètres (cycle jour/nuit, conditions de température et d'humidité) que lors des deux expériences précédentes ont été soumises à un régime WD stérile. Après 1h, la quantité d'aliment WD consommée a été mesurée.

2. Résultats

Dans un premier temps, l'ingéré alimentaire des souris dont le microbiote a été déplété par traitement antibiotique ou pas a été mesuré quotidiennement lors des 5 jours suivant le changement de régime (expérience 1). Sous chow ou HFD, les souris sous antibiotiques ne présentaient aucune différence d'ingéré alimentaire à l'échelle quotidienne (24h) par rapport aux souris contrôle (Figure 3.8A). Compte tenu des résultats du chapitre 2 montrant que le microbiote influence le comportement alimentaire au cours des premières heures qui suivent le passage au WD, une caractérisation précise de la prise alimentaire a été réalisée dans un deuxième temps (expérience 2) (Figure 3.8B). Les souris ont été placées en cages métaboliques après 10 jours de traitement antibiotique et alors qu'elles étaient encore sous régime standard. Leur comportement alimentaire a donc été mesuré sous chow et au moment de la transition vers un WD. Aucune différence n'a été observée sous régime standard (résultats non montrés). Lorsque la consommation de WD était mesurée sur plusieurs jours, l'ingéré alimentaire total quotidien ne variait pas (résultats non montrés). En revanche, le nombre de bouts (équivalent d'un repas) était significativement plus élevé chez les souris ABX-Biodaq par rapport aux souris CTRL-Biodaq lors de la première heure de consommation de WD (Figure 3.8C). La taille des bouts tendait (P=0.052) à être diminuée chez les souris ABX-Biodaq par rapport aux CTRL-Biodaq (Figure 2D). Les autres paramètres de mesure d'ingéré alimentaire ne variaient pas (ingéré calorique total et durée des bouts ; résultats non montrés). Ces données suggèrent une augmentation de la motivation à manger qui les entrainerait à revenir plus fréquemment se nourrir mais également une augmentation du rassasiement chez les souris traitées avec les antibiotiques, induisant des bouts plus petits.

Afin de vérifier si l'effet observé sur l'ingéré alimentaire juste après l'introduction du WD n'était pas dû au mélange d'antibiotiques mais bien à la déplétion du microbiote intestinal, l'ingéré alimentaire de souris axéniques (AX-WD) et de souris contrôles conventionnelles (CONV-WD) a été mesuré par pesée après une heure d'exposition au WD (expérience 3, Figure 3.8E). Sous chow, aucune différence d'ingéré alimentaire n'a été observée entre les souris AX-chow et CONV-chow (résultats non montrés). Durant la première heure suivant l'introduction du WD, l'ingéré alimentaire des souris axéniques était significativement plus faible que celui des souris conventionnelles (Figure 3.8F). Il est difficile de conclure sur des différences éventuelles de rassasiement, satiété ou motivation alimentaire car il aurait fallu pour cela avoir une analyse du pattern alimentaire pendant cette heure de consommation du WD. Cependant, ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle l'absence de microbiote intestinal induit une augmentation du rassasiement qui engendrerait une diminution de la prise alimentaire totale sur l'heure de mesure.

Le contrôle du rassasiement passe notamment par la production de peptides satiétogènes tels que la CCK par l'intestin [7, 8]. Une des voies de communication entre le microbiote et le cerveau qui pourrait influer sur la prise alimentaire au moment du changement de régime pourrait donc être la production de peptides anorexigènes tels que la CCK par les

cellules entéroendocrines (EEC). Nous avons donc par la suite investigué la biologie des EECs dans l'intestin des souris déplétées ou non pour essayer de comprendre ces différences de rassasiement.

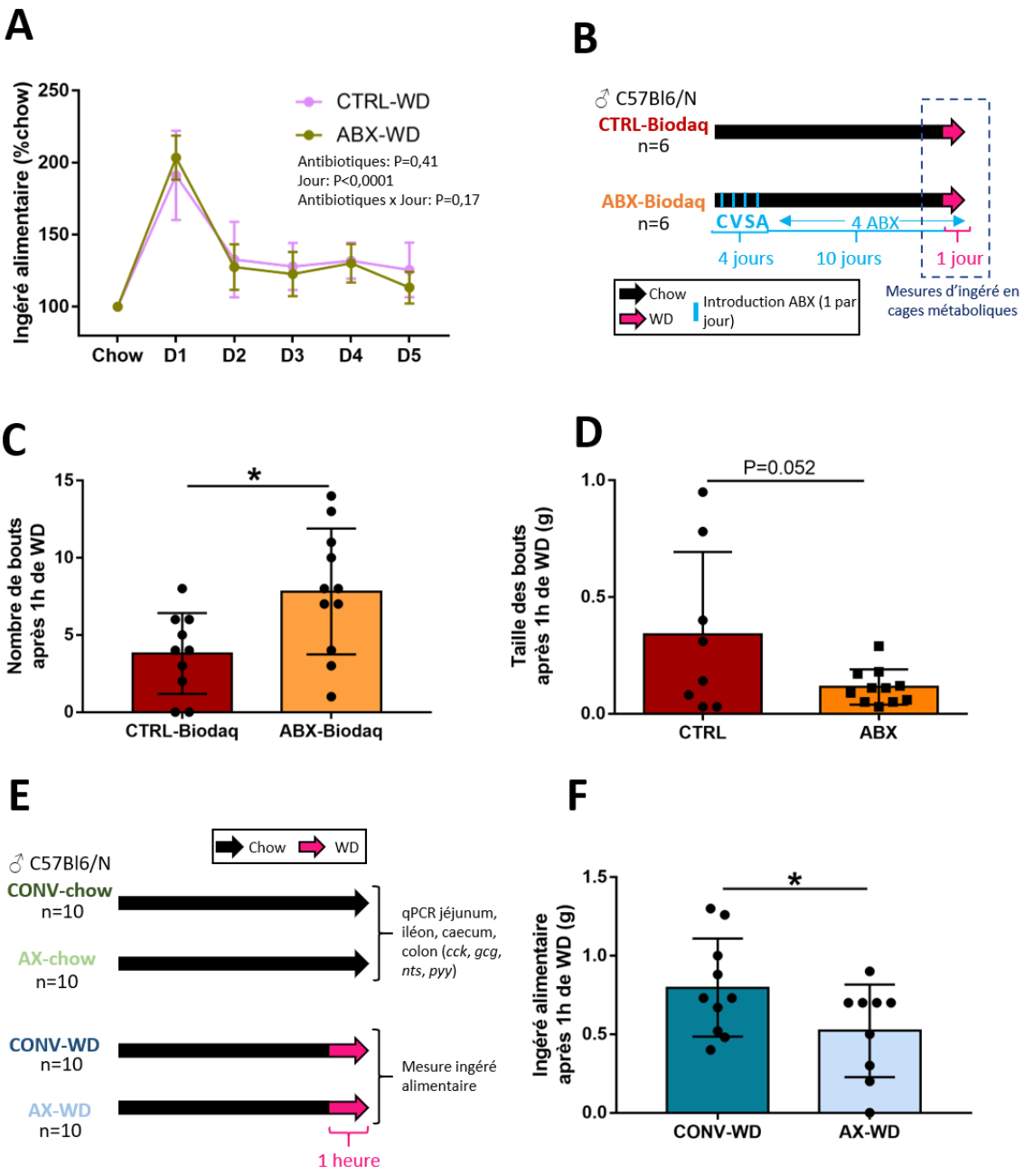


Figure 3.8. Voir légende page suivante.

Figure 3.8. A. Ingéré calorique quotidien des souris de l'expérience 1 avec (ABX) ou sans (CTRL) traitement antibiotique avant (chow) et après (D1 à D5, WD) introduction d'un WD (en % d'ingéré sous chow). Une ANOVA 2 voies a été effectuée, avec un effet significatif du jour de régime mais sans effet significatif du traitement antibiotique ni interaction significative entre ces deux facteurs **B.** Résumé du protocole suivi pendant l'expérience 2. Les souris ont été traitées par antibiotiques puis leur ingéré alimentaire a été mesuré pendant 1 heure après transition vers un WD en cages métaboliques. **C.** Nombre de bouts (équivalent d'un repas) après une heure de consommation de WD avec (ABX) ou sans traitement antibiotique (CTRL) chez les souris de l'expérience 2. **D.** Taille des bouts (en g) après 1 heure de consommation de WD avec (ABX) ou sans (CTRL) traitement antibiotique chez les souris de l'expérience 2. **E.** Résumé du protocole suivi pendant l'expérience 3. Des souris axéniques (AX) et leurs contrôles conventionnelles (CONV) sont passées d'un régime standard (chow) à un WD pendant 1 heure. **F.** Ingéré alimentaire (g) de souris conventionnelles (Conv-WD) et de souris axéniques (AX-WD) après une heure de consommation de WD. Une différence significative est indiquée par un astérisque (*) avec * : $P<0,05$.

C. La déplétion du microbiote intestinal induit une surexpression des gènes des peptides satiétogènes exprimés par les EEC caecales

1. Matériel et méthodes

Différents segments de l'intestin des souris (jéjunum, iléon, caecum et colon) traitées par antibiotiques ont été prélevés sous régime standard et après 5 jours de consommation de WD chez des souris après une répétition de l'expérience 1 (expérience 4). Ces segments ont également été prélevés chez les souris axéniques et leurs contrôles conventionnels de l'expérience 3 précédente. Les ARNs ont été extraits en suivant un protocole d'extraction des ARNs totaux au TRIzol (Life technologies, référence 15596) selon les instructions du fabricant. Après vérification de leur intégrité par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1%, les ARNs extraits ont été convertis en ADN complémentaires par rétrotranscription à l'aide d'un kit commercial selon les instructions du fabricant (Applied Biosystems, référence 4368814). Les niveaux d'expression des gènes codant pour les principaux peptides satiétogènes produits par les EEC ont été mesurés (*gcg*, *cck*, *nts* et *pyy*) dans chaque segment de l'intestin par PCR quantitative (technologie SYBR Green, référence 4309155) (95°C pendant 10 minutes ; 40 cycles à 95°c pendant 15 secondes puis 60°C pendant 1 minute ; courbe de fusion à 95°C pendant 15 secondes puis 60°C pendant 1 minute ; 95°C pendant 15 secondes et maintien à 4°C). Les séquences des amorces utilisées sont disponibles dans le Tableau 1.

Les éventuels outliers ont été supprimés après un test Q de Dixon avant de comparer statistiquement les groupes contrôles aux groupes testés (soit axénique, soit traité avec des antibiotiques) pour chaque gène dans chaque région de l'intestin (jéjunum, iléon, caecum et colon), sous régime standard. Selon la distribution des données, un test de Student ou un test de Mann-Whitney a été effectué.

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')
actb	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatacagggaca
gcg	tacacctgttcgcagctcag	ttgcaccagcattataagcaa
cck	agctgatttccccatccaa	gcttctgcagggactaccg
nts	agctggtgtgcctgactctc	ccagggctctcacatcttct
pyy	cctaccctgccaaaccag	ggacatctctttttccataccg

Tableau 3.1. Séquences des amorces utilisées pour évaluer les niveaux d'expression des gènes *gcg*, *cck*, *nts* et *pyy* dans différentes portions de l'intestin de souris traitées par antibiotiques et axéniques ainsi que de leurs contrôles.

2. Résultats

Dans le jéjunum des souris traitées par antibiotiques, les niveaux d'expression de *cck* et de *pyy* étaient significativement diminués d'environ 45% par rapport aux souris contrôle. Chez les souris axéniques, seul le niveau d'expression de *nts* était diminué du même ordre de grandeur (45%) par rapport aux souris conventionnelles (Figure 3.9B).

Dans l'iléon, les niveaux d'expression de tous les gènes (à l'exception d'une tendance pour *nts* chez les souris sous antibiotiques avec P=0,07) étaient diminués de 40 à 60% chez les souris sous antibiotiques et chez les souris axéniques par rapport à leurs contrôles respectifs (Figure 3.9B).

Contrairement au jéjunum et à l'iléon, les niveaux d'expression de ces gènes dans le caecum augmentait très fortement par rapport aux contrôles respectifs, à la fois chez les souris traitées avec les antibiotiques (*gcg* : +314% ; *nts* : +235% et *cck* : +906%) sauf pour *pyy* dont l'expression ne variait pas et chez les souris axéniques (*gcg* : +565% ; *nts* : +303% ; *pyy* : +106% et *cck* : +1618%). Les variations d'expression observées dans le colon étaient plus faibles que celles observées dans le caecum et concernaient la *cck* (+31%) chez les souris sous antibiotiques et *gcg* (+61%), *nts* (+61%) et *pyy* (+53%) chez les souris axéniques.

Ainsi, la déplétion du microbiote intestinal sous régime standard par traitement antibiotique a induit une forte surexpression de *gcg*, *cck* et *nts* mais pas de *pyy* dans le caecum. Le même pattern de surexpression est retrouvée chez les souris axéniques pour ces 3 peptides avec des augmentations plus marquées, ce qui confirme que les variations observées sont bien dues à l'absence de microbiote intestinal et non pas au traitement antibiotique. De façon intéressante, malgré ces augmentations d'expression, aucune différence d'ingéré alimentaire n'était mesurée sous régime chow et seule l'ingestion d'un régime WD a permis de mettre en évidence un effet sur la prise alimentaire de ces souris. Ceci suggère que les augmentations d'expression drastiques de ces peptides au niveau du caecum n'ont pas d'impact sur la régulation de la prise alimentaire sous régime chow ou que des compensations au niveau d'autres systèmes de régulation (partie proximale de l'intestin, système nerveux central) ont lieu. Il est toutefois intéressant de noter que l'expression de *cck* est diminuée dans le jéjunum des souris dont le microbiote a été déplété, c'est-à-dire dans une région de l'intestin où elle augmente le rassasiement son rôle n'étant pas connu dans les parties distales. Ainsi, une augmentation de l'expression de *cck* dans les parties distales pourrait compenser cette diminution observée dans le jéjunum et maintenir un ingéré alimentaire normal.

La forte surexpression notamment de la *cck*, chez les animaux déplétés (antibiotique ou axénique) dans les parties distales de l'intestin où elle n'est normalement pas exprimée

laisse entrevoir un rôle majeur du microbiote sur la plasticité transcriptionnelle des EEC que nous avons voulu explorer davantage.

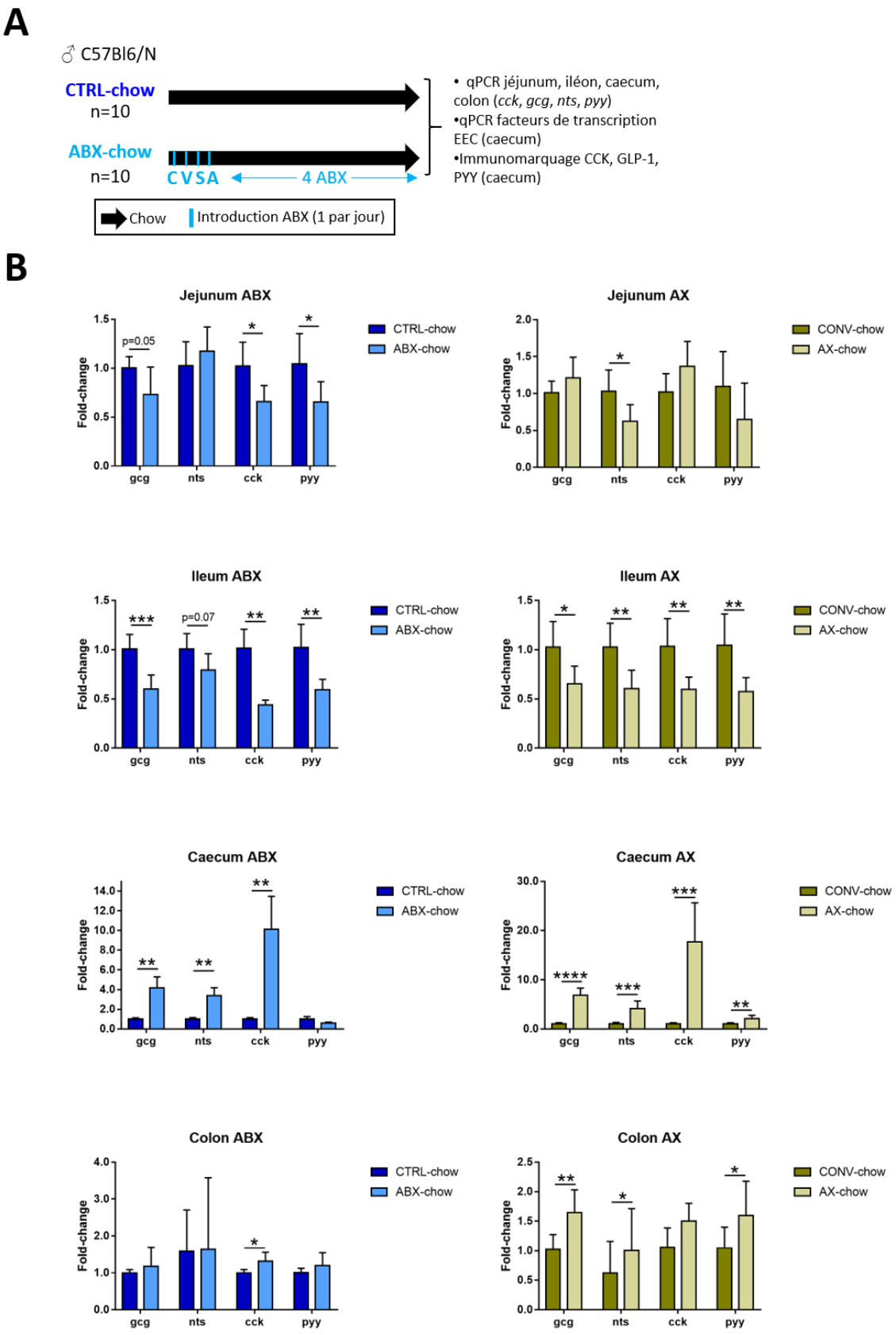


Figure 3.9. Voir légende page suivante.

Figure 3.9. A. Résumé du protocole suivi pendant l'expérience 4. Des souris ont été soumises (ABX-chow) ou non (CTRL-chow) à un traitement antibiotique à spectre large identique à celui utilisé pour les expériences 1 et 2. **B.** Niveaux d'expression des gènes impliqués dans la production de peptides satiétogènes par les EEC dans les différentes portions de l'intestin (jéjunum, iléon (ileum), caecum et colon) de souris traitées par antibiotiques (ABX-chow) et leurs contrôles (CTRL-chow) et de souris axéniques (AX-chow) et leurs contrôles (CONV-chow) sous régime standard (expériences 3 et 4). Pour chaque gène dans chaque portion de l'intestin, lorsque les données étaient distribuées normalement et que les variances entre les groupes contrôles et le groupe testé n'étaient pas statistiquement différentes, un T-test a été réalisé. Si les données n'étaient pas distribuées normalement et/ou si les variances différaient entre les deux groupes testés, un test de Mann-Whitney était réalisé. Les éventuels outliers ont été supprimés après un test Q de Dixon. Les différences significatives sont indiquées par un astérisque (* : $P<0.05$; ** : $P<0.01$; *** : $P<0.001$; **** : $P<0.0001$). En cas de tendance à une différence ($P<0.1$), la p-value est indiquée.

Deux hypothèses pouvant expliquer cette surexpression spécifique dans le caecum des souris déplétées ont été explorées : (i) l'absence de microbiote intestinal induit une plus forte prolifération des EEC dans le caecum et/ou (ii) l'absence de microbiote intestinal engendre une plus forte différenciation des cellules épithéliales en EEC, de façon précoce et/ou tardive lors de la migration des cellules épithéliales le long des cryptes intestinales.

D. L'absence de microbiote intestinal diminue la prolifération des cellules épithéliales caecales et induit des modifications de leur différenciation en EEC

1. Matériel et méthodes

Marquage Ki67 : Afin de déterminer si l'absence de microbiote intestinal induit des modifications de la prolifération des cellules épithéliales, un immunomarquage de Ki67 a été effectué sur des coupes de caecum, inclues en paraffine, de souris traitées ou non avec des antibiotiques et recevant un régime standard. Pour cela, les échantillons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (4% dans du PBS 1X) puis inclus en blocs de paraffine avant d'être coupés de façon transversale (5µm d'épaisseur). Les coupes ont été déparaffinées puis réhydratées dans un automate (Gemini AS Thermo Scientific ; 2x5 minutes dans du xylène, 5 minutes dans de l'éthanol 100%, 5 minutes dans de l'éthanol 90%, 5 minutes

dans de l'éthanol 80%, 5 minutes dans de l'éthanol 70% puis dans l'eau distillée). Les lames ont ensuite été incubées dans du tampon citrate tri-sodium (10mM, pH 6-6,5) pendant 40 minutes à 95°C. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée 3 fois pendant 5 minutes, puis dans du tampon PBS 1X pendant 5 minutes. Un tampon bloquant (sérum de cheval 3% (Sigma Aldrich, référence H1270), triton 0.3% (Sigma Aldrich, référence T87T87) dilués dans du PBS 1X) a été déposé sur chaque zone de coupe pendant une heure et a été suivi de 3 rinçages de 5 minutes au PBS 1X. L'anticorps anti Ki67 (abcam ab15580) dilué au 1/200ème dans le tampon bloquant a ensuite été déposé sur chaque coupe avant une incubation d'une nuit à 4°C. Après 3 rinçages au PBS1X, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire (Ozyme, référence 4412S) dilué au 1/200ème pendant 2h à température ambiante. Une goutte de milieu de montage contenant du DAPI a été déposée sur les coupes (Abcam ab10413). Les coupes ont été observées au microscope (Nikon Eclipse 80i, objectif x20) et des images représentatives sont présentées Figure 3.10A.

Coloration des mucines : Les coupes ont été déparaffinées puis réhydratées comme décrit précédemment avant d'être plongées successivement dans un bain d'acide acétique 3% (1min), de bleu d'Alcian 1% (10min ; référence 87023 Thermo Scientific), d'acide acétique glacial 3% (1min, référence 1 00063 1000 VWR), d'eau distillée (2 bains de 2min), d'acide per-iodique 0,5% (5min ; référence 053K5206 Sigma), d'eau distillée (2min), d'acide périodique et de réactif de Schiff (10min ; 87023 Thermo Scientific), de métabisulfite de sodium (3 bains de 1min ; référence 27 920 295 VWR) et d'eau distillée (2 bains de 2min).

RT-PCR : Les niveaux d'expression de facteurs de différenciation précoces, intermédiaires et tardifs ont été déterminés dans ces échantillons par qPCR (technologie Taqman avec le Taqman PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific) ; 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 10 minutes ; 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes puis 60°C pendant 1 minute) (Figure 3.11, liste des amorces en Tableau 3.1).

Gène	Technologie	Amorce sens (5'-3') (SYBR)	Amorce antisens (5'-3') (SYBR)	AOD (TaqMan)
math1	TaqMan	-	-	Mm00476035_s1
hes1	TaqMan	-	-	Mm01342805_m1
neurog3	TaqMan	-	-	Mn00437606_s1
pax4	TaqMan	-	-	Mm01159036_m1
pax6	TaqMan	-	-	Mm00443081_m1
insm1	TaqMan	-	-	Hs00357871_s1
arx1	TaqMan	-	-	Mm00545903_m1
neurod1	TaqMan	-	-	Mm01946604_s1
isl1	SYBR	AGCAACCCAACGACAAAACT	CCATCATGTCTCTCCGGACT	-
etv1	SYBR	CCCAGAGATTTTGCATATGACTC	GCCTTCTGTTCTGCTTGGA	-
trim35	SYBR	TATGAGGCCATTGCCAAGCA	GCGTTTTCGGCTCTTGTGTT	-
hoxb9	SYBR	AAAGTGATGAGCCTCGCTCC	GGCGTCTGGCTAGGTTACAG	-
crip1	SYBR	CCTTCTAGCTGCAGCCACTT	TAGGGCTTGCCTTCATGCTC	-
peg3	SYBR	TTTGGAGACAACTGGCAAGA	TGATCAACTGATCTCCCCTTG	-
nr4a2	SYBR	TCAGAGCCCACGTCGATT	TAGTCAGGGTTTGCCTGGAA	-
sox4	SYBR	ACAGCGACAAGATTCCGTTC	GTCAGCCATGTGCTTGAGG	-

Tableau 3.2. Références (Assay-on-Demand, AOD pour les séquences amplifiées par technologie TaqMan et séquences des amorces sens et antisens pour les gènes amplifiés par technologie SYBR) des amorces pour les gènes codant les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales en EEC.

2. Résultats

La diminution de l'immunomarquage positif à Ki67 dans le caecum des souris dont le microbiote a été déplété via les antibiotiques suggère une diminution de la prolifération cellulaire dans l'épithélium caecal de ces souris (Figure 3.10A). La surexpression de *gcg*, *cck* et *nts* observée chez ces animaux n'est donc pas causée par une augmentation de la prolifération cellulaire.

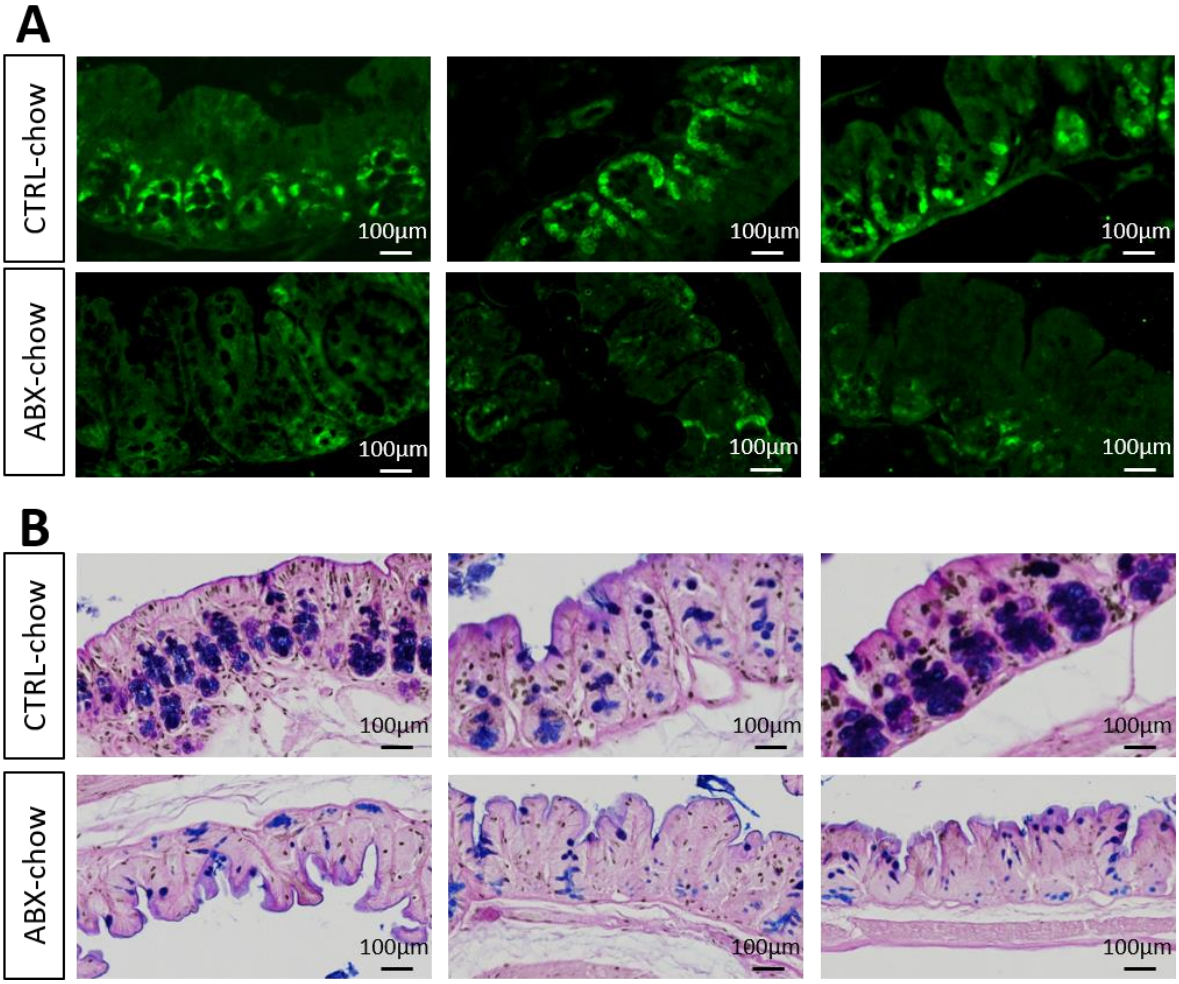


Figure 3.10. Immunomarquage de Ki67 (**A**, vert), un marqueur de prolifération cellulaire, et coloration des mucines (**B**) sur coupe de caecum de souris CTRL (CTRL-chow) ou traitées par antibiotiques (ABX-chow). L'acquisition a été réalisée au microscope (Nikon Eclipse 80i), au grossissement x20.

La surexpression de *gcg*, *cck* et *nts* rencontrée dans le caecum des souris dont le microbiote était déplété (Figure 3.9) pourrait être due à des modifications des processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Nous avons donc mesuré les niveaux d'expression des facteurs de transcription dans le caecum de ces animaux. La déplétion du microbiote intestinal par traitement antibiotique a induit une augmentation des niveaux d'expression de *neurog3* (+20%), *insm1*(+27%), *sox4* (+93%), *pax4* (+86%) et *isl1* (+44%) dans le caecum des souris sous régime standard. A l'inverse, une diminution des niveaux d'expression de *crip1* (-34%), de *neurod1* (-19%) et de *hoxb9* (-22%) a été mesurée après traitement antibiotique (Figure 3.11B).

Ces modifications d'expression de facteurs de transcription impliquent essentiellement des facteurs intermédiaires voire transitoires impliqués dans la différenciation des EEC, suggérant une potentielle réorientation du devenir des cellules déjà engagées dans le lignage sécrétoire (post *math1*) vers les EECs au dépend des cellules de Paneth et des cellules caliciformes (Figure 3.11A). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des colorations des mucines pour évaluer l'effet de la déplétion sur le nombre de cellules à mucus dans le caecum (Figure 3.10B). La déplétion du microbiote entraînait effectivement une diminution du nombre de cellules à mucus caecales. Ainsi, la déplétion du microbiote par les antibiotiques semble orienter la différenciation cellulaire vers les EEC au détriment des cellules caliciformes.

Parmi les facteurs de transcription tardifs dont le niveau d'expression était modifié (*hoxb9*, *isl1* et *crip1*) en réponse à l'absence de microbiote, *isl1* est un facteur de transcription qui a été identifié comme étant impliqué dans la régulation de l'expression de *gcg* et *cck* [9]. L'augmentation de son expression dans les souris ABX est donc cohérent avec le profil de surexpression de *cck* et *gcg* observé chez ces souris dans notre étude. En revanche, la diminution des niveaux d'expression de *hoxb9* et de *crip1* suggère une diminution de la différenciation des EEC en cellules L et N, ce qui supposerait une diminution de l'expression des gènes codant GLP-1 et NT, cette fois-ci à l'inverse de nos observations. Toutefois, de nombreuses études ont montré que les cellules L, sécrétant majoritairement le GLP-1, sont capables de co-exprimer plusieurs peptides dont PYY, NT et la CCK chez la souris [10–14]. Nous émettons donc l'hypothèse que l'augmentation simultanée de l'expression de *gcg*, *nt* et *cck* est le reflet de leur co-expression dans les mêmes EECs du caecum des souris dont le microbiote intestinal a été déplété. Nous avons vérifié cette hypothèse en analysant par marquage immuno-histochimique les co-expressions de GLP-1 et CCK dans le caecum des souris contrôle et ABX.

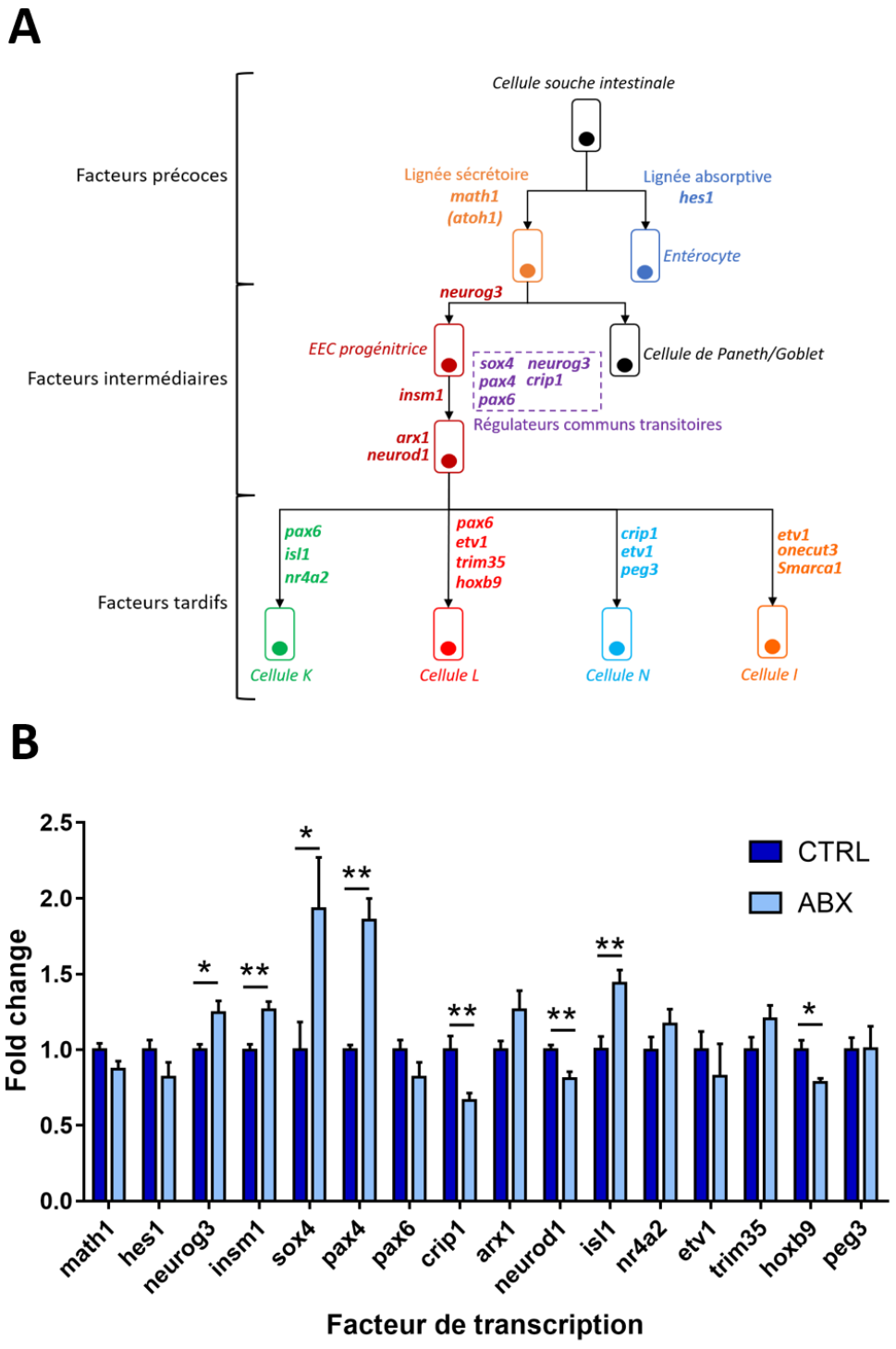


Figure 3.11. Détermination des niveaux d'expression de facteurs de transcription des cellules épithéliales intestinales en EEC dans le caecum de souris traitées (ABX) ou non (CTRL) par antibiotiques, sous régime standard. **A.** Schéma résumant les différents facteurs de transcription dont les niveaux d'expression ont été déterminés au cours de cette expérience. **B.** Niveaux d'expression des facteurs de transcription. Lorsque les données suivaient une distribution Normale avec homoscédasticité des variances, un test

T de Student était réalisé pour évaluer la différence entre CTRL et ABX. Sinon, un test de Mann-Whitney était mené. Un astérisque (*) indique une différence significative entre CTRL et ABX avec * : P<0,05 et ** : P<0,01.

E. La déplétion du microbiote intestinal induit une modification du motif d'expression protéique de GLP1- et de CCK par les EEC caecales

1. Matériel et méthodes

Des coupes de caecum des souris incluses en paraffine ont été déparaffinées comme décrit précédemment (paragraphe D.1). Une première incubation avec un anticorps primaire (GLP-1 : souris, abcam référence ab23472 dilué au 1/400ème ; PYY : chèvre, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, référence sc47318 dilué au 1/50ème ; CCK : lapin, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, référence sc2037 dilué au 1/100ème) a été réalisée pendant 16 heures à 4°C dans du sérum d'âne (1%, dilué dans du PBS 1X). Après rinçages au PBS 1X, les coupes ont été incubées dans l'anticorps secondaire approprié pendant 1 heure à température ambiante (Thermofisher Scientific ; anti-souris : Alexa Fluor 488y dilué au 1/700ème ; anti-chèvre : Alexa Fluor 647y dilué au 1/500ème ; anti-lapin : Alexa Fluor 555-conjugated donkey dilué au 1/750ème).

2. Résultats

Afin de déterminer si l'absence de microbiote intestinal induisait des modifications du motif d'expression de certains peptides satiétogènes dont les niveaux d'expression étaient surexprimés, des double-immunomarquages GLP-1/CCK et GLP-1/PYY ont été réalisés sur des coupes de caecum de ces souris traitées ou non avec des antibiotiques.

La densité totale de cellules CCK+ dans le caecum ne variait pas entre le groupe CTRL et le groupe ABX, avec toutefois une tendance à l'augmentation de la densité des cellules CCK+/GLP-1+ dans le groupe ABX par rapport au groupe CTRL (p=0,08) (Figure 3.12B). En parallèle, la densité totale de cellules GLP-1+ ne variait pas entre les deux groupes (Figure 3.12C). La forte surexpression caecale de *cck* et de *gcg* observée dans le groupe ABX ne s'explique donc pas par une augmentation de la densité totale de cellules CCK+ ou GLP-1+. Une augmentation de synthèse de GLP1 et CCK dans des cellules déjà GLP1+ et

CCK+ n'a pas été évaluée ici par l'intensité du marquage mais est cependant possible. En revanche, la déplétion du microbiote a induit une modification de la spécialisation tardive des EECs caecales, en particulier en ce qui concerne la co-expression protéique de GLP-1 et de CCK qui a tendance à être augmentée en absence de microbiote intestinal. Ces résultats suggèrent que le microbiote intervient dans la différenciation tardive des EECs et peuvent ainsi être cohérents avec certaines modifications des niveaux d'expression des facteurs de transcription impliqués dans cette différenciation tardive. En raison de problèmes de croisement d'anticorps, nous n'avons pas pu faire de triple voire quadruple marquages. Nous avons cependant prévu de vérifier les triple-ou quadruple expressions de GLP-1, CCK, PYY et NTS par hybridation *in situ* pour compléter ces résultats.

Nous avons ensuite cherché à identifiés les facteurs d'origine bactérienne influençant le remodelage des profils d'expression des peptides dans les EECs du caecum des souris ayant un microbiote appauvri.

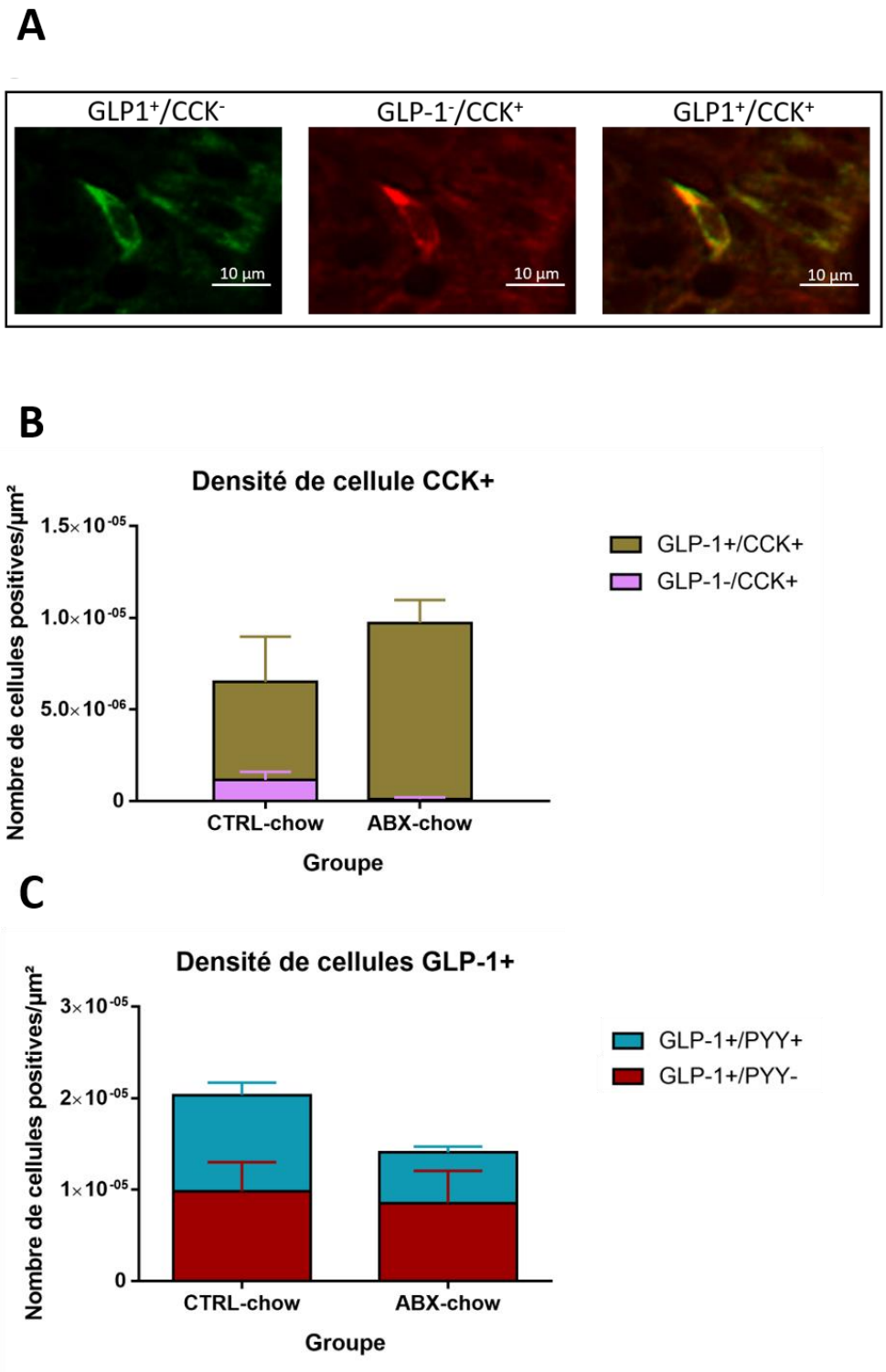


Figure 3.12. A. Exemple de cellule entéroendocrine doublement marquée GLP-1⁺ (vert, à gauche) et CCK⁺ (rouge, au milieu avec le merge en jaune à droite). **B**. Densité des cellules CCK+ dans le caecum de souris CTRL et ABX. **C**. Densité des cellules GLP-1+ dans le caecum des souris CTRL et ABX.

F. Les AGCC seuls ne sont pas à l'origine des modifications d'expression génique de *gcg*, *cck*, *nts* et *pyy* en absence de microbiote intestinal

1. Matériel et méthodes

AGCCs : Après extraction à l'acide phosphotungstique, les AGCCs ont été séparés sur colonne chromatographique en phase gazeuse (Agilent 6890, France) [15].

Acides biliaires : Après préparation des contenus caecaux [16], la composition à partir d'un catalogue de 28 acides biliaires fécaux a été déterminée par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie à haute pression en phase liquide (HPLC MS/MS) ([16], Faculté de médecine Pierre et Marie Curie – Site Saint-Antoine).

Cultures cellulaires : Les cellules STC-1 ont été maintenues dans un milieu riche (DMEM avec glucose (25mM) et GlutaMAX (Gibco, référence 61965)) supplémenté avec 17.5% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). La capacité des cellules à réguler l'expression de *cck*, *nts* et *gcg* en réponse à un stimulus chimique (comme par exemple les AGCCs) a été testée sur des cellules à 80% de confluence dans un milieu DMEM pauvre en glucose (1mM) (Figure 3.15A). Ce milieu a également été utilisé comme contrôle négatif (Figure 3.15B). Un milieu riche en glucose (25mM) supplémenté en forskaline (10µM) et isobutylmethylxanthin (IBMX, 10µM), connu pour favoriser l'expression des peptides, a été utilisé comme contrôle positif. Un milieu de test pauvre en glucose (1mM) correspondant à la condition du groupe CTRL (contenant un ratio de butyrate (2mM), propionate (0,7mM) et acétate (4mM)), un milieu de test pauvre en glucose (1mM) correspondant à la condition du groupe ABX (contenant un puits avec acétate seul à faible concentration (1mM)) et un milieu pauvre en glucose contenant de l'acétate seul à concentration équivalente au groupe CTRL (4mM)) ont été testés. Après 24h d'incubation à 37°C sous atmosphère à 5% de CO2, les cellules ont été récupérées dans le TRIzol avant extraction des ARNs totaux, RT et qPCR pour évaluer les niveaux d'expression de *gcg*, *cck*, *nts* et *pyy* selon le protocole décrit précédemment (paragraphe E.1).

2. Résultats

Des facteurs issus des activités métaboliques du microbiote ont été montrés comme pouvant réguler l'expression et la sécrétion des peptides gastro-intestinaux dont CCK,

GLP-1 et NT [17–24]. Parmi ces facteurs, les AGCCs et les acides biliaires ont largement été décrits comme étant de potentiels activateurs ou inhibiteurs, dans le cas de certains acides biliaires secondaires, de l'expression de certains de ces peptides et notamment de GLP-1 dont la régulation en réponse au microbiote a été la plus largement étudiées. Dans un premier temps nous avons donc caractérisé les AGCCs et les acides biliaires caecaux des souris contrôles et des souris ayant eu un traitement antibiotique.

Les concentrations en butyrate, acétate, propionate et en AGCCs totaux dans le contenu caecal des souris diminuaient drastiquement après traitement antibiotique, jusqu'à disparaître pour le butyrate et le propionate (Figure 3.13A). Une telle diminution n'est pas surprenante : la forte diminution de la quantité de bactéries dans le caecum (Figure 3.7B) a induit une diminution des AGCCs normalement produits par les bactéries présentes dans l'intestin distal à partir des fibres non digestibles du régime [25, 26]. La disparition du butyrate et du propionate suite au traitement antibiotique se traduit, en plus de leurs faibles concentrations, par une proportion d'acétate qui atteint presque 100% dans le contenu caecal des souris, par rapport aux souris contrôles dont les quantités d'AGCC et la variété était plus grande (acétate (62%), butyrate (24,8%), propionate (10,5%) et iso-AGCC (2,7%)) (Figure 3.13B).

Dans un deuxième temps, le profil d'acides biliaire a été réalisé à partir des contenus caecaux. Une diminution significative de la concentration totale en acides biliaires primaires (non métabolisés par le microbiote) et une quasi-disparition des acides biliaires secondaires ont été observées après déplétion du microbiote intestinal (Figure 3.14A). Malgré la diminution des quantités totales des deux grandes familles d'acides biliaires, une forte proportion d'acides biliaires primaires a été mesurée après traitement antibiotique (Figure 3.14B). Les deux acides biliaires primaires majoritaires dans le contenu caecal après traitement antibiotique étaient l'acide β-muricholique et l'acide déoxycholique.

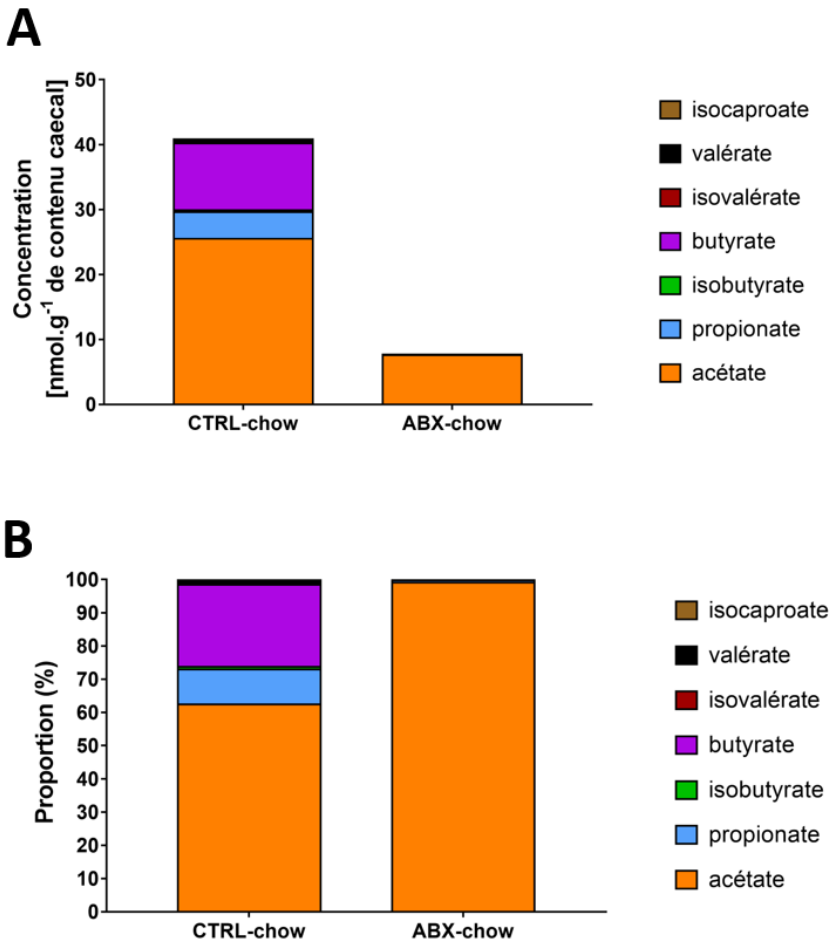


Figure 3.13. Concentrations (**A**) en µmol.g^{-1} de contenu caecal) et proportions (**B**) en AGCC mesurées dans les contenus caecaux des souris traitées par antibiotiques (ABX-chow) par rapport aux souris contrôles (CTRL-chow) (expérience 1), de contenu caecal.

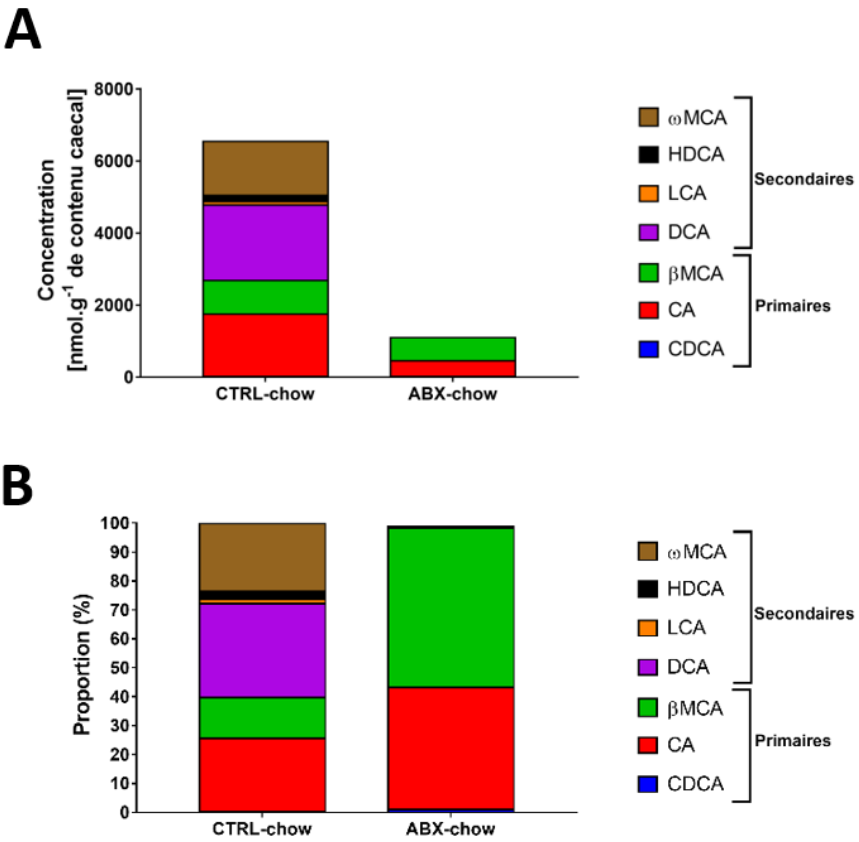
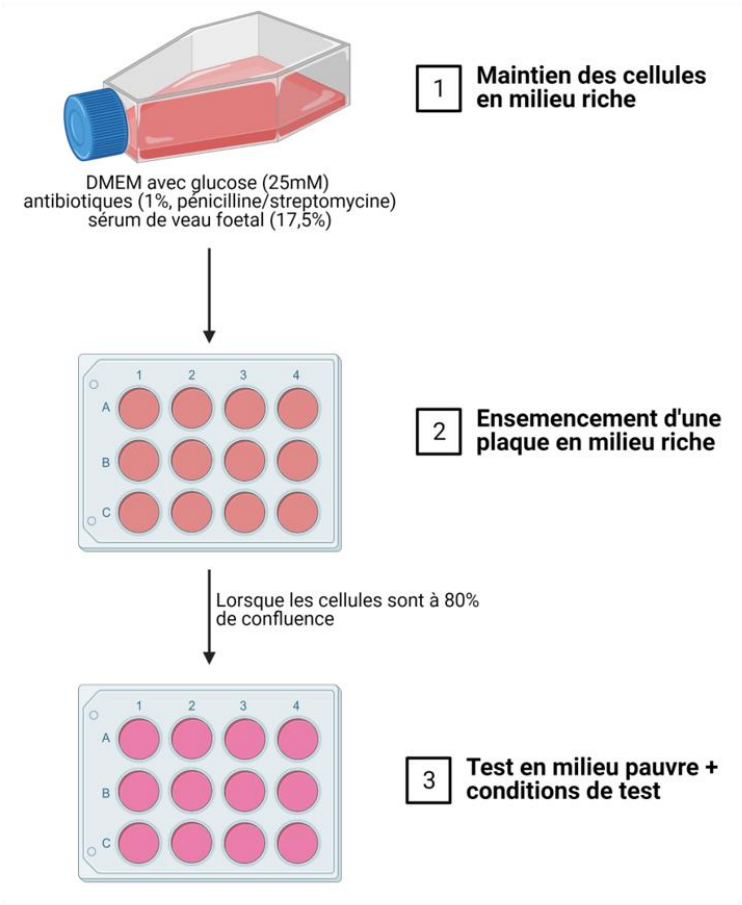


Figure 3.14. Concentrations (**A**) et proportions (**B**) des acides biliaires (légende commune aux deux panels) mesurées à partir des contenus caecaux de souris des groupes CTRL-chow et ABX-chow (expérience 1).

Nous avons donc montré des changements majeurs dans le profil de certains métabolites microbiens présents dans le contenu de caecum des souris après traitement antibiotique. Afin de déterminer si ces métabolites étaient capables de réguler l'expression des gènes *gcg*, *cck et nts,* nous avons utilisé un modèle murin d'EEC, les STC-1, cultivées *in vitro*. Nous avons testé les deux hypothèses suivantes : 1-L'acétate seul à faible concentration (en l'absence de butyrate et propionate) active-t-il l'expression de *gcg*, *cck* et de *nts*, sans influer sur celle de *pyy* ? et 2- Le mélange acétate/butyrate/propionate inhibe-t-il l'expression de de gcg, cck et nts, sans moduler l'expression de *pyy* ?

A



B

Hypothèse testée	Condition de culture correspondante	Contrôles
L'acétate seul en faible concentration induit une surexpression de *gcg*, *cck* et *nts* mais pas de *pyy*	Milieu pauvre en glucose avec acétate à faible concentration (1mM)	Contrôle positif (riche en glucose) Contrôle négatif Acétate en forte concentration (4mM) – concentration équivalente à celle du groupe CTRL
Le mélange acétate/butyrate/propionate n'induit pas de surexpression de *gcg*, *cck* et *nts*	Milieu pauvre en glucose avec un mélange d'acétate (4mM), de butyrate (2mM) et de propionate (0,7mM)	Contrôle positif (riche en glucose) Contrôle négatif Acétate seul (4mM) Butyrate seul (2mM) Propionate seul (0,7mM)

Figure 3.15. **A**. Schéma résumant comment les cellules STC-1 ont été maintenues et préparées aux tests en présence d'AGCC. **B**. Résumé des conditions de culture correspondant aux deux hypothèses testées à partir de la détermination en AGCC du contenu caecal de souris sous antibiotiques. Le contrôle positif (riche en glucose) correspond à la condition en milieu DMEM avec glutaMAX avec 25mM de glucose, 10µL de forskalin et 10µm d'IBMX. Le contrôle négatif, ou milieu pauvre en glucose, correspond au milieu DMEM avec 1mm de glucose.

Le contrôle positif a bien induit l'expression de *gcg*. La culture des STC-1 en présence d'acétate seul, indépendamment de sa concentration dans le milieu, n'a pas permis d'induire de surexpression de *gcg*, *cck* et de *nts*, contrairement à l'hypothèse de départ (Figure 3.16A, 3.16B et 3.16C). La culture des STC-1 en présence d'un ratio acétate/butyrate/propionate similaire à celui retrouvé dans le contenu de caecum des souris CTRL-chow a entraîné une surexpression de *cck* (Figure 3.16B) mais pas de *gcg* (Figure 3.16A) ni de *nts* (Figure 3.16C). Cette surexpression, contraire à l'hypothèse selon laquelle le ratio d'AGCC n'induit pas de surexpression de ces trois gènes, semble essentiellement due au butyrate seul, mais cette hypothèse devra être confirmée avec des effectifs plus importants. Ainsi, la culture des STC-1 en présence d'AGCC n'a pas permis de confirmer les deux hypothèses de départ. Ceci suggère que les AGCC ne sont pas impliqués, dans ce modèle cellulaire et en l'absence d'autres facteurs luminaux, dans la surexpression simultanée de *gcg*, *cck* et *nts* observée *in vivo* après traitement antibiotique. Nous avons cependant montré ici que les AGCC et plus particulièrement le butyrate sont des activateurs potentiels de l'expression de la CCK. Il a été au préalable montré dans d'autres lignées d'EEC que le propionate est un activateur de l'expression de la CCK [18]. Ces résultats inattendus semblent contradictoires avec nos données obtenues *in vivo*. On peut se demander pourquoi dans le caecum des souris (souris CTRL-chow) où les AGCC, et notamment le butyrate, sont en fortes concentrations l'expression de la CCK est réprimée. Ces données suggèrent qu'il existe potentiellement dans le caecum des souris CTRL-chow des facteurs inhibant l'expression de certains peptides, dont la CCK, et potentiellement répriment certains stades de la différentiation des EECS.

Le dosage de ces peptides dans la circulation sanguine pourrait permettre d'évaluer si ces peptides sont sécrétés afin d'explorer plus avant les conséquences physiologiques de leur surexpression dans les régions distales du tube digestif. Il a été montré que le taux de GLP-1 dans le sang portal était significativement augmenté chez des souris axéniques ou traitées par antibiotiques par rapport à leurs contrôles conventionnels, ce qui a pour effet de diminuer la vitesse du transit intestinal [27]. Une augmentation du taux de CCK circulant pourrait aussi être associée à sa surexpression et pourrait également participer à une diminution de la vitesse de transit en réponse à l'absence de métabolites produits par le microbiote intestinal [28]. Ainsi, la surexpression de ces peptides pourrait aussi avoir un rôle dans la récupération d'énergie à partir du contenu luminal en diminuant la vitesse de transit, par exemple en se fixant sur des récepteurs présents dans les cellules du tractus digestif.

D'autres éléments du contenu luminal pourraient être impliqués dans la surexpression de *gcg*, *cck* et *nts* ainsi que dans la modification du motif d'expression des peptides correspondants. Par exemple, les acides biliaires constituent de bons candidats. En effet, les acides biliaires primaires sont capables de se fixer sur le récepteur nucléaire farnesoid X receptor présent dans les EECs, entrainant une diminution de l'expression de *gcg* [21]. Une faible concentration d'acides biliaires primaires pourrait empêcher l'inhibition de l'expression de *gcg* par l'action de FXR et expliquer l'augmentation de l'expression de *gcg*

dans le caecum des souris ABX-chow. Les régulations de l'expression de la *cck* et de la *nts* par FXR n'ont pas été étudiées mais pourraient éventuellement être similaires. Ainsi, la forte surexpression de *gcg*, *cck* et *nts* pourrait correspondre à un état basal des EEC qui serait modifié par la présence de métabolites bactériens. Il serait donc intéressant de déterminer une condition activatrice de l'expression de ces trois gènes pour ensuite tester différents métabolites bactériens, tels que les AGCC retrouvés en conditions contrôle ou les acides biliaires secondaires (séparément puis ensemble) pour vérifier s'ils sont capables d'inhiber l'expression de ces gènes.

Enfin, une dernière hypothèse serait que des facteurs activateurs de l'expression des peptides seraient présents dans le contenu de caecum des souris sous antibiotiques. Afin de tester cette hypothèse, des cellules STC-1 pourraient être exposées à des eaux caecales issues de souris ABX, voire axéniques, et de souris CTRL afin de déterminer si l'absence de microbiote intestinal conduit à la présence d'éléments (notamment ceux issus du régime qui n'auraient pas été métabolisés par le microbiote) dans le contenu caecal qui permettent d'activer l'expression de ces peptides.

D'autre part, le modèle murin STC-1 utilisé, qui provient d'une tumeur intestinale, pourrait ne pas correspondre totalement aux cellules rencontrées dans le tissu caecal. L'utilisation d'autres types d'EEC voire d'organoïdes caecaux en culture cellulaire pourrait permettre de compléter ces résultats et d'identifier les facteurs du contenu luminal qui engendrent cette triple surexpression de gènes codant pour les peptides anorexigènes en l'absence de microbiote.

Ainsi, un mécanisme de communication entre le microbiote et le cerveau qui implique une modification de l'expression et du motif d'expression de peptides anorexigènes produits par les EEC peut être envisagé comme étant impliqué dans la régulation précoce de la prise alimentaire lors de l'introduction d'un WD. Le microbiote intestinal, *via* des facteurs encore non identifiés, est en effet capable de modifier la plasticité transcriptionnelle des EEC ainsi que leur différenciation. Cependant, malgré la forte surexpression des peptides anorexigènes, la prise alimentaire n'est que légèrement modifiée avec une augmentation du rassasiement sans diminution de la prise alimentaire quotidienne. Le rôle de la surexpression de ces peptides dans les parties distales de l'intestin est ainsi questionné et la modification du microbiote intestinal apparaît ici davantage comme un outil permettant d'investiguer leur biologie le long du tube digestif et plus particulièrement dans les régions distales du tube digestif.

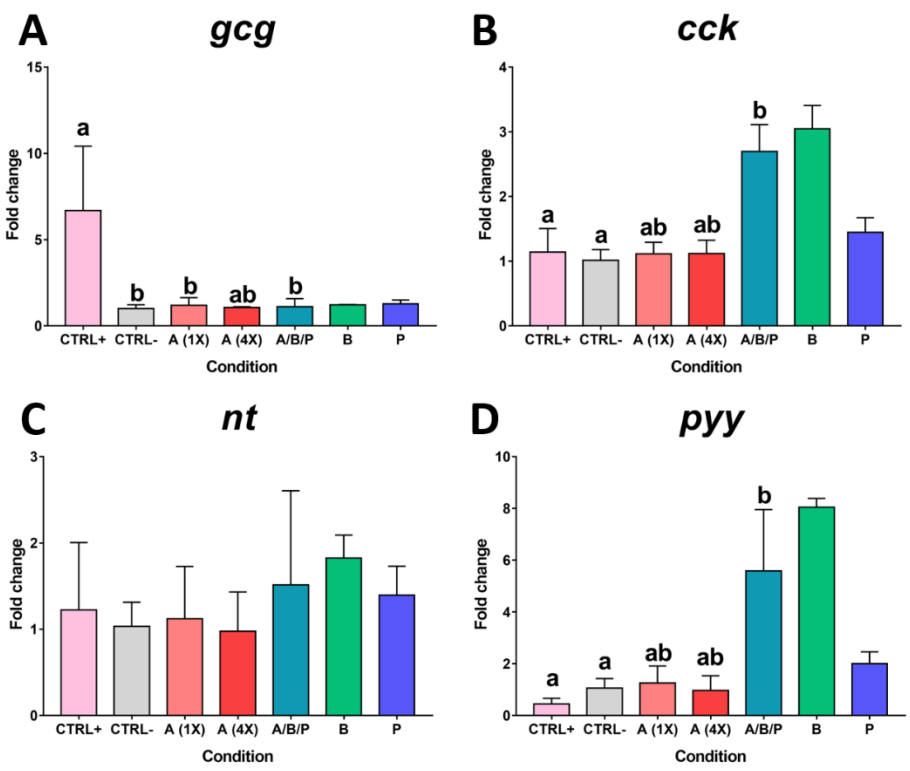


Figure 3.16. Niveaux d'expression des gènes *gcg* (**A**), *cck* (**B**), *nts* (**C**) et *pyy* (**D**) dans les EEC murines (STC-1) en culture. Le groupe CTRL+ correspond à des cellules cultivées en présence d'un milieu contrôle riche en glucose (25mM) avec forskaline (10µM) et IBMX (10µM) (n=11) ; le groupe CTRL- correspond à des cellules cultivées dans un milieu pauvre en glucose (1mM) (n=11) ; le groupe A/B/P correspond à des cellules cultivées dans un mélange d'acétate (4mM), de butyrate (2mM) et de propionate (0,7mM) (n=8) ; le groupe A (4x) et A (1X) correspond à des cellules cultivées dans d'acétate seul à une concentration de 4mM (A (4X), n=3) ou de 1mM (A (1X), n=5) ; les groupes B et P correspondent respectivement à des cellules cultivées dans de butyrate seul à 2mM (B, n=2) ou de propionate seul à 0,7mM (P, n=2) pendant 24h à 37°C 5%CO_2. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn lorsque celui-ci avait un résultat statistiquement significatif a été réalisé entre les groupes en excluant les groupes « butyrate » (B) et « propionate » (P) en raison de l'effectif trop faible. Deux lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0,05$).

CHAPITRE 4
DISCUSSION

I. Le microbiote intestinal a un impact sur la régulation de la prise alimentaire sous WD

L'objectif principal de ce projet de thèse était de déterminer si le microbiote intestinal, par sa composition et/ou son activité, avait un rôle sur la régulation de la prise alimentaire à court terme lors de l'introduction d'un WD. L'hypothèse principale à vérifier était que les variations de composition ou d'activité métabolique du microbiote intestinal pendant le changement de régime influaient sur la phase d'hyperphagie transitoire et/ou le retour à l'homéostasie énergétique qui suit la consommation de WD chez le rongeur (rat ou souris).

A. Reproductibilité des changements de microbiote suite à l'introduction d'un WD

Au cours de mon travail de thèse, plusieurs expériences ont été menées au cours desquelles la composition, et parfois l'activité, du microbiote intestinal (caecal ou fécal) ont été analysées (Tableau 4.1). Dans un premier temps, les différences de composition du microbiote intestinal avant changement de régime ont été évaluées entre les différentes expériences pour déterminer leur similitude ainsi que la capacité de cette composition à prédire la réponse à l'introduction du WD. Dans un second temps, les différences d'évolution en termes de composition et/ou d'activité métabolique du microbiote intestinal en réponse au WD ont été comparées entre certaines expériences. Il est important de noter que toutes les données ont été analysées bioinformatiquement avec les mêmes paramètres de nettoyage des séquences initiales, d'affiliation taxonomique et de normalisation. Les différences ou similitudes observées ne sont donc pas dues à une différence de méthodologie à ce niveau.

1. La composition du microbiote initial était comparable entre les expériences et pourrait être prédictive de la réponse au changement de régime

Comparer la diversité α, à la fois le nombre d'espèces observées par échantillon et l'équitabilité entre les espèces au sein de l'échantillon (indice de Shannon), au sein des microbiotes initiaux des animaux sous régime chow, démontre que la diversité α à l'état initial n'est pas similaire entre les espèces considérées (rat ou souris) et qu'elle est

significativement plus basse dans les échantillons fécaux par rapport aux contenus caecaux (Figure 4.1). Malgré ces différences, il est intéressant de noter que la diversité α reste comparable si on considère la même espèce et le même type d'échantillon (contenu caecal), même entre des expérimentations réalisées dans des animaleries différentes (cf. Tableau 4.1). De la même façon, à l'échelle du phylum, des variations étaient constatées entre les expériences (Figure 4.2A), cette fois-ci indépendamment du type d'échantillon ou de l'espèce considérée. Une majorité de Firmicutes était retrouvée dans les échantillons de toutes les expériences, avec une plus faible proportion de Bacteroidetes et une faible abondance de Proteobacteria. Cette répartition à l'échelle du phylum est similaire avec celle des nombreuses autres études publiées, qui montrent également une majorité de Firmicutes et de Bacteroidetes que ce soit chez le rongeur ou chez l'Homme [253, 254, 395]. A l'échelle de la famille (Figure 4.2B-F), les mêmes familles majoritaires étaient également retrouvées dans nos différentes expériences avec notamment une large proportion de *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Muribaculaceae* et *Ruminococcaceae*. A l'échelle de la famille, les différences les plus importantes étaient retrouvées pour les familles les moins abondantes au sein des échantillons. C'est finalement essentiellement à une échelle taxonomique inférieure, notamment à l'échelle du genre, que les différences étaient les plus fortes entre individus et entre les expériences. Cette variabilité peut être due à l'espèce étudiée (rat ou souris) [396], aux différents régimes chow utilisés, aux différentes animaleries [397] et/ou au type d'échantillon (fèces ou contenu caecal, [398]). Par exemple, l'utilisation d'un régime irradié dans l'expérience 2 de la partie I (chapitre 3) pourrait ainsi expliquer la légère baisse de diversité α (Figure 4.1A) par rapport aux autres échantillons issus de contenu caecal de rat [397]. Malgré cette variabilité de composition au niveau du genre, une activité métabolique commune en réponse à un même type de régime (chow ou WD) peut être supposée. En effet, la variabilité phylogénétique permet finalement de limiter la variabilité de l'activité métabolique, comme montré entre individus sains chez l'Homme [399, 400]. De plus, l'intégration de données menée dans le dans le chapitre 3 partie I a permis d'associer de nombreuses OTUs à seulement 6 métabolites caecaux, signe que les activités métaboliques sont communes à plusieurs bactéries. Bien que les expériences de ma thèse aient été menées dans des animaleries différentes avec différents régimes, la composition des microbiotes intestinaux restait comparable jusqu'à l'échelle de la famille pour les bactéries les plus abondantes.

Dans le chapitre 3 partie II, la notion de prédictibilité de l'ingéré alimentaire à partir de la composition initiale du microbiote intestinal des souris a été abordée. Bien que les différences de consommation de WD entre les souris lors de la phase hyperphagique étaient subtiles, elles permettaient de mettre en évidence des biomarqueurs bactériens potentiels. Une telle étude impliquait d'utiliser le microbiote fécal des animaux, pour permettre de mettre en évidence un lien entre microbiote avant changement de régime et le comportement alimentaire après changement de régime. Ainsi, les bactéries identifiées dans le microbiote fécal comme étant potentiellement prédictives de la prise alimentaire

lors de la phase hyperphagique peuvent différer de celles qui auraient été identifiées à partir du microbiote caecal [401]. L'effectif de cette expérience (30 souris) permettait également de séparer les souris petites et grandes consommatrices de WD de façon à avoir 10 individus par groupe, ce qui donne une meilleure puissance statistique qui ne peut pas être retrouvée dans les autres expériences de cette thèse si on applique la même séparation. Toutefois, certains points communs peuvent être retrouvés entre les bactéries identifiées dans le chapitre 3 partie II et les autres expériences de ma thèse. Par exemple, *Acetatifactor muris* était identifiée comme étant négativement associée avec un fort ingéré alimentaire dans le chapitre 3 partie III. *Acetatifactor muris* était plus abondante sous régime standard dans le microbiote de souris n'ayant jamais été exposé au WD par rapport à celui des souris qui ont subi plusieurs cycles de WD. Ce point commun est intéressant car ces deux groupes de souris concernent celles qui ont une plus faible propension à consommer du WD lors de son introduction. De la même façon, le microbiote des souris grandes consommatrices était enrichi en une OTU affiliée à *Clostridium scindens* dans le chapitre 3 partie III, tout comme les souris CYCL-chow du chapitre 3 partie II, bien qu'une autre OTU affiliée aussi à *Clostridium scindens* soit appauvrie dans ces mêmes groupes, ce qui limite les conclusions concernant cette espèce. A l'inverse, *Roseburia intestinalis* était enrichie chez les grandes consommatrices du chapitre 3 partie III mais associées positivement aux souris CTRL-chow du chapitre 3 partie II. Davantage de travaux sont nécessaires pour confirmer ces résultats qui sont prometteurs.

B. L'introduction de WD induit une variation très précoce de la composition du microbiote intestinal vers un contexte pro-inflammatoire

Il est d'autre part intéressant de déterminer si les variations de composition dues à l'introduction du WD sont similaires entre les différentes expériences. L'introduction de WD induisait toujours une diminution précoce de la diversité α, en accord avec les études ayant mesuré l'évolution de cette diversité sous WD [402–404], à l'exception du chapitre 3 partie III, ce qui peut s'expliquer par l'utilisation du microbiote fécal au lieu de caecal (Figure 4.4). Des variations de composition ont été observées de façon très précoce lors du passage d'un régime standard à un WD, notamment à l'échelle du phylum ou de la famille. A l'échelle du phylum, l'abondance des Protéobactéries était augmentée au cours de l'expérience 2 du chapitre 3 partie I chez le rat après 1 jour de WD ainsi qu'après 2 jours de WD chez le rat au cours de l'expérience 3 du chapitre 3 partie I. Une tendance à l'augmentation des Protéobactéries a été également mesurée en réponse au WD dans le chapitre 3 partie II ainsi qu'entre les souris CTRL et CYCL sous régime standard au sein du chapitre 3 partie II suggérant un effet à long terme du WD sur ce phylum même après le retrait du régime. L'augmentation de l'abondance des Protéobactéries suggère une

évolution vers un microbiote caractéristique de maladies intestinales inflammatoires [405]. A l'échelle de la famille, les *Desulfovibrionaceae* ont été identifiées dans les trois expériences comme significativement enrichies en réponse au WD (Figure 4.3). Cette famille fait partie des Protéobactéries, a été retrouvée dans un contexte de maladie intestinale inflammatoire [406, 407] et est enrichie dans le microbiote d'individus obèses [407]. En ce qui concerne les familles identifiées comme les plus abondantes et communes aux différentes expériences à l'état initial (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Lactobacillaceae* et *Muribaculaceae*), le changement de régime a eu une tendance à induire des variations similaires d'abondance relative pour les trois expériences. Une diminution des *Lachnospiraceae* et des *Lactobacillaceae* a été mesurée. Les *Lachnospiraceae* sont une famille très vaste : leur rôle, de façon générale, est bénéfique avec une forte capacité de fermentation des fibres du régime [408–410] entrainant la production d'AGCC (butyrate et acétate notamment) [411–414]. Quelques exceptions à ce rôle bénéfique sont retrouvées pour certains membres de cette famille avec une augmentation de l'abondance des *Lachnospiraceae* chez les individus obèses humains [415], parfois en lien avec le développement de maladies métaboliques liées à l'obésité [416] comme le diabète de type II chez la souris [417], ainsi que dans certaines maladies intestinales à contexte pro-inflammatoire [418]. De la même façon, l'abondance relative des *Lactobacillaceae* était diminuée en réponse au WD (Figure 4.3). Les *Lactobacillaceae* sont associées à des régimes riches en fibres [419, 420] avec un effet bénéfique sur la barrière intestinale [421, 422] voire dans certaines maladies métaboliques [423]. Cette diminution est retrouvée chez le rat sous WD pendant 16 semaines [424] et une supplémentation en fibres promeut leur croissance malgré la consommation de WD pendant 12 semaines, avec un effet anti-inflammatoire au niveau de l'intestin chez la souris [425]. Dans un contexte d'obésité chez l'Homme, les *Lactobacillaceae* sont parfois enrichies [264, 426, 427], de la même façon que pour les *Lachnospiraceae*, tandis qu'elles sont appauvries dans d'autres études [428]. Cependant, malgré ces exceptions, qui peuvent s'expliquer par le fait que certaines souches ne soient pas toujours bénéfiques pour l'hôte avec une association positive avec le gain de poids [429], ces deux familles sont davantage associées à un microbiote bénéfique, voire anti-inflammatoire. Ceci suggère une évolution très précoce et commune vers un microbiote davantage pro-inflammatoire en réponse au WD dans nos expériences. L'abondance relative des *Ruminococcaceae* ne variait pas ou augmentait dans le contenu caecal des animaux soumis à 1 ou 2 jours de WD (Figure 4.3). Cette famille est enrichie chez la souris soumise à un WD sur des temps plus longs, particulièrement dans le cadre de l'obésité [378, 430, 431]. De la même façon que pour les familles précédentes, l'effet des modifications d'abondance de *Ruminococcaceae* chez l'hôte peut être bénéfique pour l'hôte : l'abondance des *Ruminococcaceae* augmente chez la souris en réponse à l'ingestion de fucoidan, un prébiotique, en association avec une diminution de l'inflammation intestinale chez l'hôte [432]. L'abondance des *Muribaculaceae* est réduite dans deux expériences de cette thèse. Leur abondance est également réduite chez la souris en réponse à la consommation de WD pendant 12 semaines [433]. Certaines *Muribaculaceae* sont associées positivement à un contexte intestinal inflammatoire [434] tandis que

d'autres y sont négativement associées [435]. Ainsi, pour toutes ces familles très abondantes sous régime standard dans nos échantillons, des évolutions similaires étaient constatées entre les expériences malgré les différences d'espèce, de souche ou encore d'animalerie (Tableau 4.1). Malgré le fait que ces familles soient larges et que leur impact sur la physiologie de l'hôte, en particulier l'inflammation, ne soit pas homogène entre toutes les études pour chacune d'elles, l'augmentation de l'abondance des Protéobactéries et la chute de celle des *Lachnospiraceae* et des *Lactobacillaceae* en particulier oriente davantage vers la mise en place précoce d'un microbiote pro-inflammatoire de façon générale.

Dans le contexte de la mise en place de l'obésité, plusieurs études ont tenté d'identifier des biomarqueurs bactériens fortement associés au statut d'obésité [250, 257, 261–265] : bien que ces études mettent en avant certaines bactéries, celles-ci varient largement. Au cours de ma thèse, l'étude de la réponse du microbiote au WD à l'échelle de l'OTU a permis de déceler des changements d'abondance de bactéries particulières, mais spécifiques de chaque expérience. Ces résultats sont en accord avec le fait qu'il est difficile d'identifier des biomarqueurs bactériens communs au statut pondéral ou aux régimes alimentaires chez l'Homme, qui présente une forte variabilité inter-individuelle de composition du microbiote intestinal. Une approche visant à analyser les variations de groupes de bactéries qui co-évoluent ensemble et dont les variations de composition sont corrélées aux paramètres caractérisant le comportement alimentaire peut permettre d'identifier de potentiels biomarqueurs bactériens impliqués dans le comportement alimentaire. Cette approche a été utilisée dans quelques études pour associer des variations du microbiote intestinal à l'échelle du groupe de bactéries plutôt que des bactéries isolées et ainsi les corréler à des variations physiologiques de l'hôte [436–438]. Ces études ont par exemple permis de mettre à jour l'existence de groupes de bactéries, robustes entre les individus et jamais identifiées précédemment dans ce cadre, associés à la maladie de Crohn [436], des biomarqueurs bactériens intestinaux associés au cancer du poumon [437] ou à l'encéphalomyélite [438]. C'est cette approche qui a été choisie dans le chapitre 3 partie I ainsi que dans le chapitre 3 partie II. Elle a permis d'identifier des groupes de bactéries, qui n'avaient pas été précédemment identifiés par une analyse de composition bactérienne plus classique, associées aux modifications centrales induites par le WD.

Chapitre	Espèce	Âge des animaux	Souche	Animalerie	Echantillon	Premier jour d'échantillonnage post-WD	Régime chow	Régime WD
1 - Expérience 2	Rat	8-9 semaines	Wistar	Rennes	Contenu caecal	1	Teklad 2016 (Envigo) : 3,0 kcal.g^{-1} ; lipides: 12%kcal; glucides : 66%kcal	Research Diet 12451: 4,7 kcal.g^{-1} ; lipides: 45%kcal; glucides : 35%kcal
1 - Expérience 3	Rat	8 semaines	Fisher	Jouy-en-Josas	Contenu caecal	2	SAFE A03 Stérile: 3,3 kcal.g^{-1} ; lipides: 13,5%kcal; glucides : 61,3%kcal	SAFE 245HF Stérile : 4,7 kcal.g^{-1} ; lipides: 45,9%kcal; glucides : 36,8%kcal
2	Souris	7 semaines	C57Bl6/N	Jouy-en-Josas et Rennes	Contenu caecal	1	Teklad 2016 (Envigo) 3,0 kcal.g^{-1} ; lipides: 12%kcal; glucides : 66%kcal	Research Diet 12451: 4,7 kcal.g^{-1} ; lipides: 45%kcal; glucides : 35%kcal
3	Souris	7 semaines	C57Bl6/J	Dijon	Fèces	1	2,9 kcal.g^{-1}, lipides : 22,4%kcal ; glucides: 72,4%kcal	4,4 kcal.g^{-1}, lipides : 42,5%kcal ; glucides: 40,8%kcal
4	Souris	7 semaines	C57Bl6/N	Rennes	Contenu caecal	5	Teklad 2016 (Envigo) 3,0 kcal.g^{-1} ; lipides: 12%kcal; glucides : 66%kcal	Research Diet 12451: 4,7 kcal.g^{-1} ; lipides: 45%kcal; glucides : 35%kcal

Tableau 4.1. Caractéristiques des expériences. L'expérience correspondante, l'espèce et la souche étudiées, l'effectif par groupe, le type d'échantillon ainsi que le premier jour d'échantillonnage après introduction du WD sont indiqués.

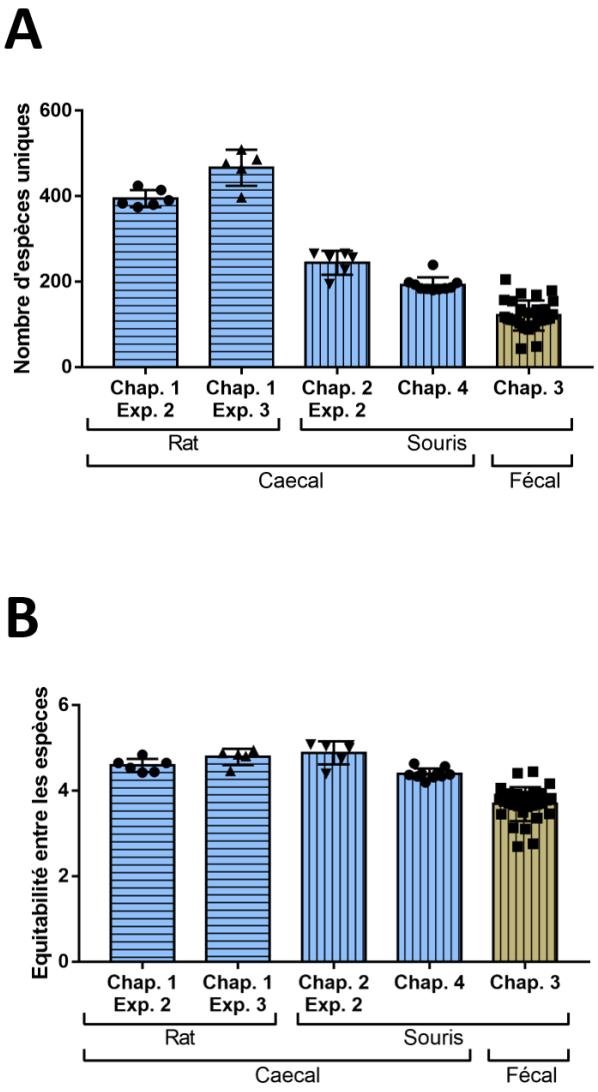


Figure 4.1. Comparaison de la diversité α (nombre d'espèces uniques en A et équitabilité entre les espèces au sein des échantillons en B) entre les expériences. Une ANOVA 1 voie a été menée en B tandis qu'un test de Kruskal-Wallis a été mené en A (les données n'étant pas distribuées normalement pour tous les groupes), suivis d'un test post-hoc de Dunn. Deux lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes. Les expériences dont le type d'échantillon était du contenu caecal sont indiquées par des histogrammes bleus tandis que l'expérience dont le type d'échantillon était du contenu fécal est indiquée par un histogramme marron. Les lignes horizontales indiquent une expérience dont le modèle était le rat tandis que des lignes verticales indiquent une expérience dont le modèle était la souris. Un point correspond à un échantillon.

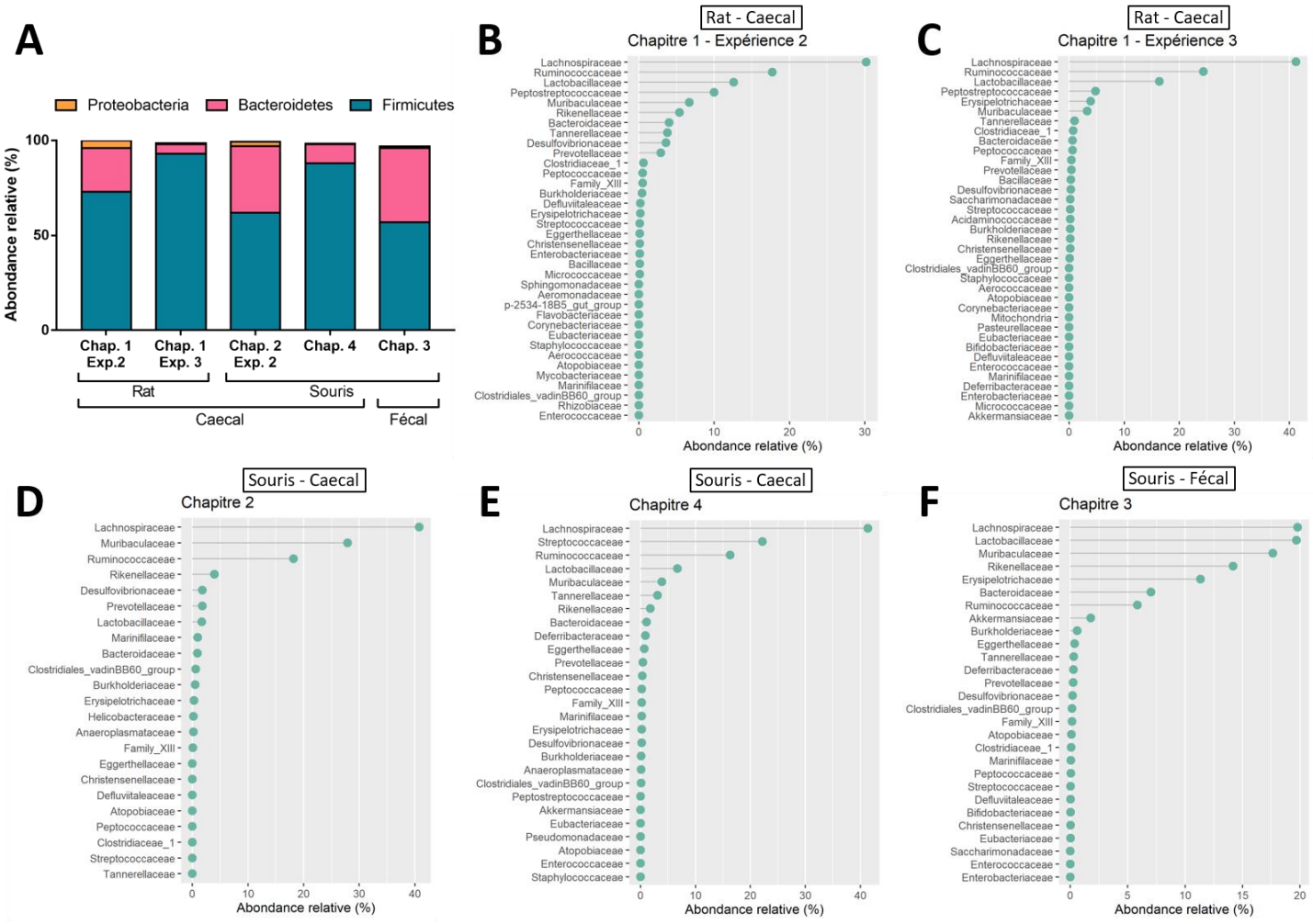


Figure 4.2. Composition initiale du microbiote en termes de phyla (A) ou de familles (B-F) pour chaque expérience.

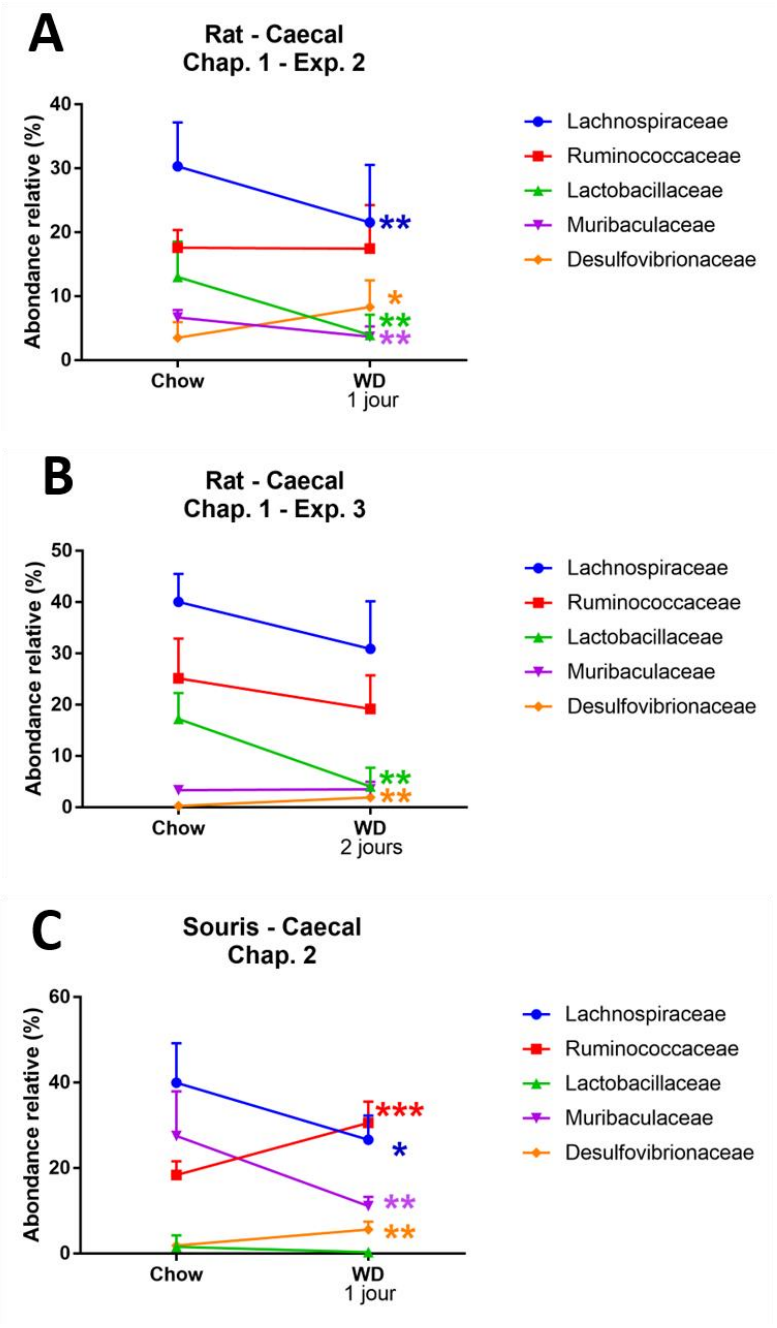


Figure 4.3. Evolution de l'abondance relative de familles bactériennes retrouvées communément à toutes les expériences à l'état initial en forte abondance entre régime standard (Chow) et le premier échantillonnage sous WD. Une différence statistique entre Chow et WD est indiquée pour chaque famille au sein de chaque expérience par des astérisques (*) avec ** : P<0,01 ; *** : P<0,001 et **** : P<0,0001.

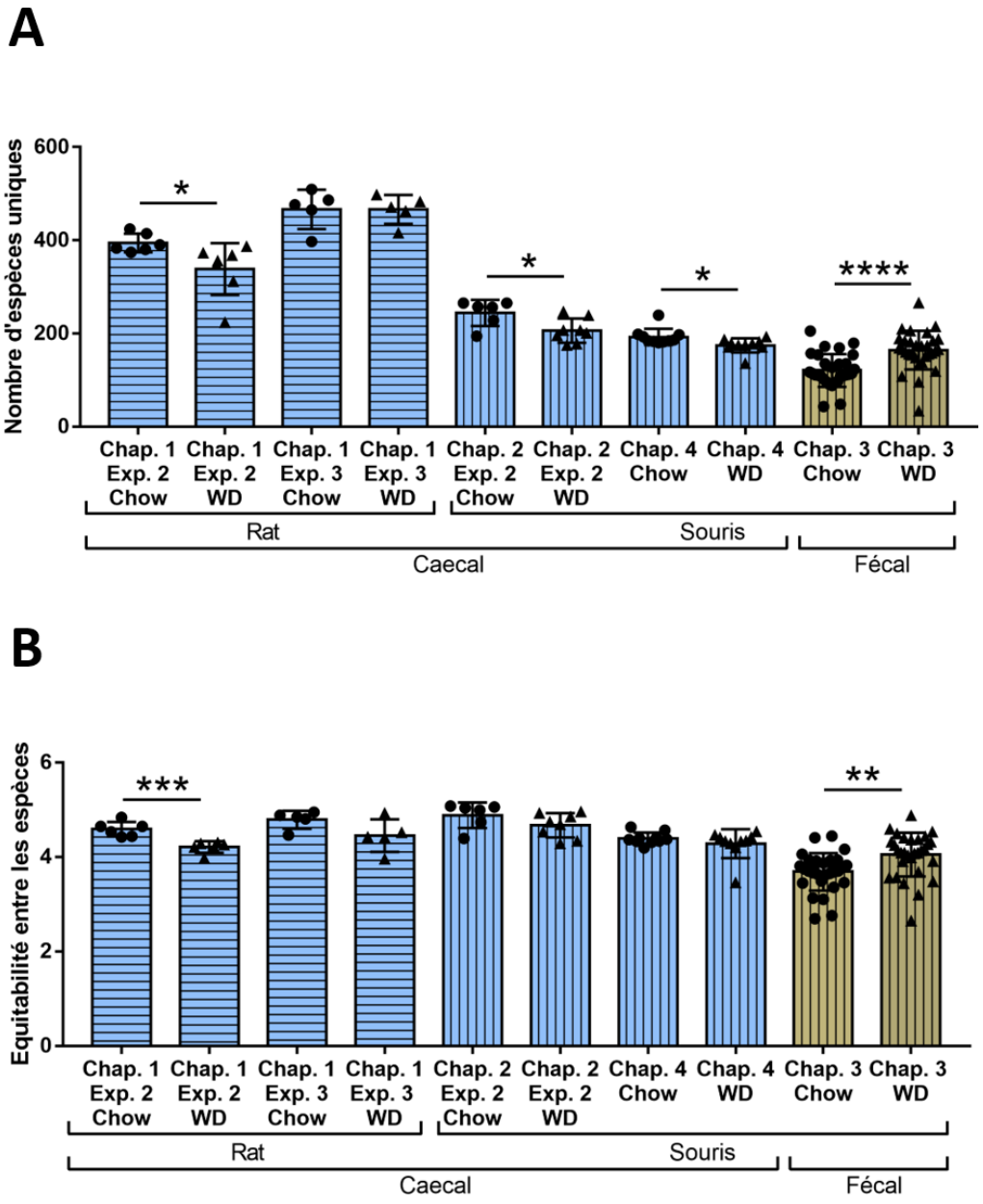


Figure 4.4. Evolution de la diversité alpha (nombre d'espèces unique (**A**) ou indice de Shannon (**B**)) du microbiote intestinal (caecal ou fécal) au cours de chaque expérience. Les différences entre régime standard (Chow) et WD ont été déterminées par test t de Student avec * : P<0,05 ; ** :P<0,01 ; *** : P<0,001 et **** : P<0,0001.

C. Modifier le microbiote intestinal modifie la prise alimentaire à très court terme en réponse au WD

Mesurer le comportement alimentaire en termes de prise alimentaire lors de l'introduction du WD a été le sujet central de ce projet de thèse. Lors de l'introduction d'un WD chez le rongeur, une première phase d'hyperphagie transitoire est observée pendant le 1er jour de consommation, suivie d'un retour à l'homéostasie énergétique [44, 45, 162]. Cette phase d'hyperphagie suivie d'un retour à l'homéostasie énergétique est très robuste chez le modèle rongeur. De plus, l'ingéré alimentaire lors de la première semaine de consommation de WD est prédictif de la propension à développer une forte obésité dans ce modèle [47, 48], d'où l'intérêt d'étudier particulièrement cette période. L'hypothèse que le microbiote pouvait jouer un rôle soit sur la phase d'hyperphagie transitoire d'environ 24h et/ou sur la phase de retour à un ingéré alimentaire normal nous a conduit à mesurer quotidiennement l'ingéré alimentaire dans la grande majorité des expériences menées. Dans toutes les expériences réalisées au cours de ma thèse, les rongeurs présentaient la même réponse réponse au WD avec une phase d'hyperphagie de 24h suivie d'un retour à un l'homéostasie énergétique en moins d'une semaine.

Une mesure plus précise de l'ingéré alimentaire à très court terme montre que les variations d'ingéré suite à un transfert de microbiote (chapitre 3 partie II) ou suite à un traitement antibiotique à large spectre (chapitre 3 partie IV) surviennent dans les toutes premières heures suivant l'introduction du WD. Les souris traitées par antibiotiques (chapitre 3 partie IV) présentaient un nombre de bouts (équivalent d'un repas) plus important lors de la première heure suivant l'introduction du WD, malgré une absence de modification des autres paramètres caractérisant la prise alimentaire, suggérant un potentiel plaisir à manger plus fort ou bien un rassasiement plus important chez ces souris qui reviennent plus souvent consommer ce régime. En parallèle, les souris axéniques (chapitre 3 partie IV) avaient un ingéré alimentaire diminué lors de cette première heure de WD, confirmant que le microbiote semble jouer un rôle dans la régulation de la prise alimentaire à très court terme lors de l'introduction de WD dans ce modèle. Les souris ayant été colonisées avec le microbiote issu de souris exposées au préalable à deux cycles d'une semaine de WD (chapitre 3 partie II) consommaient le régime plus rapidement lors de la première heure d'introduction par rapport aux souris transplantées avec un microbiote de souris n'ayant jamais été exposées au WD. Le microbiote intestinal semble donc jouer un rôle dans le pattern de prise alimentaire à très court terme, *i.e.* lors des premières heures de consommation de WD.

Ces résultats suggèrent soit que l'aspect hédonique (motivation, plaisir) est affecté par le microbiote intestinal lors du changement de régime, avec une motivation plus forte des animaux à consommer l'aliment palatable, soit que le rassasiement ou la satiété sont augmentés, ce qui est cohérent notamment avec d'une part l'augmentation du nombre de

repas malgré un ingéré total identique chez les souris traitées par antibiotiques et d'autre part la diminution de l'ingéré alimentaire chez les souris axéniques. En ce qui concerne l'aspect hédonique, plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats. Par exemple, des éléments de reconnaissance de l'aliment peuvent être modifiés par le microbiote intestinal tels que l'épithélium olfactif [439], ce qui pourrait sur la prise alimentaire. De plus, l'absence de microbiote intestinal chez des souris axéniques modifie l'expression de gènes impliqués dans le système de récompense tels que la dopamine, en augmentant le turnover des peptides associés [300], ce qui suggère que le microbiote peut influer sur la régulation de ces systèmes. Des études montrent également que le microbiote a un rôle dans les phénomènes d'addiction, qui impliquent les mêmes structures cérébrales que celles qui régulent le plaisir et la motivation [440]. Par exemple, l'addiction à l'alcool a un impact sur la composition et l'activité métabolique des bactéries intestinales, dont le transfert à des souris naïves permet de récapituler la surconsommation d'alcool [441–443]. Des expériences supplémentaires pourraient permettre de confirmer et d'affiner cette composante hédonique dans ce modèle, comme par exemple l'utilisation de boîtes de Skinner dans le cadre d'un conditionnement opérant (avec un choix entre un WD ou un régime standard par exemple). D'autres structures impliquant d'autres systèmes régulateurs de la récompense, tels que le système endocannabinoïdes pourraient être davantage étudiés à la lumière de mes résultats, sachant que le blocage des récepteurs à endocannabinoïdes diminue la récompense liée à la consommation de WD chez la souris [385]. La modulation de la régulation hédonique chez les souris soumises à plusieurs WD peut aussi être associée à une diminution de l'anxiété des souris, qui auront davantage tendance à chercher la nourriture dans leur environnement [444]. Une bactérie dont l'abondance est significativement modifiée en réponse à plusieurs WD, *Kineothrix alysoides*, est associée à une diminution de l'anxiété chez la souris [445] tandis que *Muribaculum intestinale*, enrichie après plusieurs WD, est associée à une meilleure capacité d'exploration de l'environnement chez la souris sous WD [446]. D'autres bactéries pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation de l'anxiété *via* la régulation hédonique de la prise alimentaire.

Mes résultats suggèrent que le microbiote est impliqué dans la régulation hédonique de la prise alimentaire. Celle-ci supplante la régulation homéostatique en présence d'un aliment palatable [121, 447, 448], conduisant à l'hyperphagie caractéristique de l'introduction d'un WD chez le rongeur [43–45]. Cet aspect hédonique est primordial à prendre en compte dans un contexte où la nourriture énergétiquement dense et hautement palatable est en permanence disponible, et participe donc à l'épidémie d'obésité et de surpoids. Cet aspect est mis en avant dans le chapitre 3 partie II de ma thèse avec une consommation plus précoce du WD chez les souris soumises à plusieurs expositions au WD qui, comme le montre les résultats des expériences de transfert de microbiote, est directement liée à leur microbiote caecal. Une situation intéressante à étudier serait de comparer l'impact d'un nombre différent de cycles et/ou de cycles de WD de durées différentes sur la composition du microbiote et en parallèle sur la structure

des repas et la prise alimentaire à très court terme. Il est important de noter qu'au cours de ma thèse le WD a toujours été introduit pendant la phase diurne, qui correspond à la phase de repos des souris. Ce choix nous a permis de façon indirecte de mesurer la motivation des souris à consommer cet aliment puisque cette période est normalement une période de faible consommation alimentaire. Il est à noter cependant que cette introduction de l'alimentation durant la phase de repos peut également perturber la synchronisation des horloges biologiques et ainsi participer à la dérégulation de la prise alimentaire observée lors du passage au WD [449, 450]. Des oscillations de composition du microbiote à l'échelle nycthémérale peuvent avoir un impact sur l'induction de maladies métaboliques telles que le diabète de type II [239, 451]. Une approche visant à identifier les oscillations de composition du microbiote au cours de l'introduction du régime, c'est-à-dire sur une fenêtre de temps plus courte que la journée, pourrait permettre de préciser le rôle du microbiote intestinal dans ce phénomène. On pourrait également imaginer étudier l'évolution de groupes de bactéries sur des fenêtres de temps encore plus courtes après introduction du régime, par exemple à l'échelle du repas, car la dynamique du microbiote en fonction du repas est particulière et sa perturbation peut générer des modifications métaboliques chez l'hôte [451, 452].

Bien que l'ingéré alimentaire à l'échelle quotidienne soit robuste et que des variations de prise alimentaire aient été observées en déplétant le microbiote, d'autres paramètres pouvant expliquer ces modifications ainsi que les variations entre les résultats des différentes expériences n'ont pas été étudiés. La dépense énergétique des animaux, mesurable en cages métaboliques seulement, peut varier entre les expériences. Plusieurs expositions au WD ont un impact sur la régulation de la dépense énergétique qui pourrait interférer avec la régulation de la prise alimentaire [246, 386]. Seules les expériences menées suite au transfert de microbiote ont permis d'obtenir des données sur cet aspect. Il serait intéressant de compléter nos données notamment chez les souris donneuses ou encore les souris traitées aux antibiotiques. De plus, le dosage de la leptine et de l'insuline circulantes, la mesure de l'adiposité (notamment viscérale) ou encore des tests de tolérance au glucose, facteurs qui varient suite à l'introduction d'un WD et qui peuvent influer sur la régulation de la prise alimentaire [196, 343, 453] pourraient apporter d'autres éléments de réponse aux variations d'ingéré observées. [196, 343, 453]. Le microbiote intestinal peut également participer à la mise en place de l'insulino-résistance [377]. Ainsi, dans le cadre de ma thèse, d'autres facteurs participant à la régulation de la prise alimentaire pourraient aussi être influencés par les variations précoces du microbiote intestinal.

D. Identification des marqueurs bactériens qui pourraient expliquer les modifications de la prise alimentaire sous WD

Il peut être plus intéressant de raisonner en termes d'activité bactérienne qu'en termes de composition, pour déterminer le lien entre les variations du microbiote et les modulations de la prise alimentaire sous WD. En effet, plus que la composition en elle-même, c'est l'activité métabolique bactérienne, potentiellement commune à différentes bactéries, qui est capable d'influencer sur certaines fonctions physiologiques de l'hôte. Comme montré dans le chapitre 3 partie I, le métabolome caecal chez des rats soumis à un WD variait de façon très précoce dès 2h de consommation du régime. Ainsi, les variations d'activité du microbiote sont plus précoces que les variations de composition (même si on ne peut pas exclure que les variations de métabolome observées reflètent en partie l'arrivée de composants du régime alimentaire dans le caecum). L'échelle de temps de l'adaptation des activités métaboliques des bactéries du caecum est d'ailleurs similaire à celle des changements du comportement alimentaire observés en réponse au WD. Les métabolites ou protéines d'origine bactérienne sont capables d'agir soit directement sur le cerveau pour réguler la prise alimentaire [369] ou d'agir de manière indirecte en modifiant notamment les fonctions de l'épithélium intestinal [335, 337] ou d'autres organes [454]. Cependant de nombreux composés et métabolites d'origine bactérienne potentiellement impliqués dans la régulation de la prise alimentaire restent à identifier. Afin d'identifier ces composés d'origines bactériennes plusieurs approches ont été envisagées au cours de mon travail de thèse : une approche métabolomique (chapitre 3 partie I), une approche ciblée (chapitre 3, parties II et IV) et une approche bio-informatique (chapitre 3 partie II). La nature précise des métabolites identifiés *via* l'approche métabolomique est demeurée largement inconnue malgré les efforts de la plateforme pour les identifier, ce qui ne nous a pas permis de creuser leurs potentiels rôles directs ou indirects dans l'adaptation du comportement alimentaire des rats lors du passage au WD. Cependant, parmi les métabolites bactériens déjà identifiés comme participant à la régulation de la prise alimentaire [279, 333, 455, 456], les AGCCs pourraient jouer un rôle important dans les modifications du comportement alimentaire en réponse au WD. Nous avons donc choisi de les étudier dans le chapitre 3 partie II. Chez les souris sous régime standard qui ont subi plusieurs cycles de WD, les AGCCs étaient présents en plus forte concentration (notamment l'acétate et le butyrate) que chez les souris qui n'avaient jamais été exposées au WD. L'acétate est capable d'agir centralement en réduisant l'appétit [364] tandis que le butyrate augmente l'expression de gènes impliqués dans la régulation hédonique du comportement alimentaire tels que la tyrosine hydroxylase [457, 458] ou la pre-proenkephaline [459]. La déplétion du microbiote intestinal par traitement antibiotique (chapitre 3 partie IV) a induit dans le caecum une forte diminution de la concentration des AGCCs et une composition constituée presque exclusivement d'acétate. Malgré ces fortes modifications, la prise alimentaire était

semblable aux souris contrôles au moment du passage au WD et seul le pattern de prise alimentaire sur les premières heures de WD était modifié avec une augmentation du nombre de repas. Il nous a donc semblé important d'aller au-delà des AGCCs, sans pour autant revenir à des analyses métabolomiques en raison des problèmes d'identification des métabolites rencontrés. Des outils bioinformatiques permettent de réaliser une prédiction d'activité métabolique bactérienne à partir du séquençage de l'ADNr16S (tels que PiCRUST2 [460] ou Piphillin [461]). Là encore, ces outils ont des limites car ils restent prédictifs et directement liés à la composition bactérienne déterminée après séquençage, avec les éventuels biais d'analyse qui lui sont propres [462, 463]. Ainsi, dans le chapitre 3 partie II, malgré une forte diminution des AGCCs en réponse au changement de régime, aucune voie liée au métabolisme bactérien des AGCCs n'a été identifiée par PICRUSt2, ce qui peut être expliqué par le fait qu'une même bactérie, sans modification de son abondance dans le contenu caecal, est capable d'activités métaboliques différentes selon la nature de ce contenu (différents substrats métaboliques). Enfin, le LPS est capable d'influer sur la prise alimentaire au niveau central [370, 371, 464] et pourrait jouer un rôle dans nos études compte tenu de l'évolution de la composition du microbiote intestinal vers un contexte davantage pro-inflammatoire. Les concentrations plasmatiques en LPS n'ont pas été mesurées dans les expériences de ma thèse, mais pourraient être modifiées très précocement en réponse au régime. Une augmentation de la concentration plasmatique de LPS a été mesurée chez la souris après 1h de WD, sans que l'absence de son récepteur (TLR4) n'ait d'impact sur la régulation de la prise alimentaire, ce qui ne confirme pas que le LPS ait un lien avec la régulation précoce de la prise alimentaire sous WD (Ben-Fradj *et al.*, 2021). Il est possible que des métabolites bactériens autres soient à l'origine des variations de prise alimentaire observées, notamment lors des premières heures de changement de régime. L'identification des métabolites caecaux du chapitre 3 partie I pourrait apporter de nouveaux éléments de réponse. Mener une approche similaire dans les autres contextes de consommation de WD (comme par exemple après plusieurs cycles de WD ou sous traitement antibiotique) permettrait de confirmer les biomarqueurs identifiés dans le chapitre 3 partie I ou d'en découvrir de nouveaux.

II. Lien potentiel entre les modifications du microbiote et la mise en place de l'inflammation centrale suite au WD

L'inflammation centrale, et plus particulièrement l'inflammation hypothalamique, est activée très précocement chez le rongeur en réponse à l'introduction d'un WD et induit une augmentation de la prise alimentaire, elle-même liée à la propension des animaux à devenir obèses sur le long-terme [153, 160–162, 174, 176, 465–467]. Comme nous l'avons discuté précédemment le microbiote en s'adaptant notamment au régime alimentaire semble bien participer à la régulation de la prise alimentaire en réponse à l'introduction du WD. Dans ce projet de thèse nous nous sommes également intéressés aux liens entre les modifications du microbiote intestinal et la mise en place de l'inflammation hypothalamique. D'autre part, le rôle potentiel du microbiote et de l'introduction du WD sur l'induction de l'inflammation dans d'autres structures cérébrales participant à la régulation de la prise alimentaire, le tronc cérébral et le striatum, sera également discuté.

A. Les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires sont-ils des marqueurs d'inflammation hypothalamique ?

Nous avons mesuré l'incidence du changement de régime sur l'inflammation hypothalamique en évaluant l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans nos études 1 et 2 soit après une seule ou plusieurs expositions au régime. Ces données ont été résumées dans le Tableau 4.2. L'introduction de WD a induit dans nos expériences une augmentation des niveaux d'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'autres marqueurs moléculaires de l'inflammation entre 1,5 et 2 fois (Tableau 4.2), avec une augmentation de l'expression d'*il-6* chez le rat après 2 jours de WD (chapitre 3 partie I). Ces changements d'expression sont en accord avec les études ayant conclu à une inflammation hypothalamique (Tableau 1.1). Cependant, après un jour de WD chez la souris, que ce soit après une ou plusieurs expositions au régime, ces augmentations d'expression de marqueurs d'inflammation n'étaient pas retrouvées dans l'hypothalamus, contrairement à certaines études qui montraient des augmentations d'expression de ces marqueurs à 24h [138, 162, 165]. Il est possible que des augmentations d'expression soient présentes seulement dans certains noyaux hypothalamiques et/ou de façon transitoire avec une résolution après 24h, ce qui empêche leur visualisation lorsque l'hypothalamus entier est étudié et/ou seulement sur cette fenêtre de temps [44]. Une augmentation de l'inflammation hypothalamique précoce peut cependant être envisagée en dehors de l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, puisque d'autres acteurs tels que les astrocytes et la microglie sont précocement activés par la

consommation de WD [160, 162, 165]. D'autres méthodes de mesure de l'inflammation hypothalamique pourraient être envisagées, dont un dosage des cytokines hypothalamiques ainsi qu'un marquage permettant de mettre en évidence l'activation de la microglie et des astrocytes. D'autre part, des études ont relevé un lien entre le temps de relaxation T2, un signal IRM, et l'inflammation hypothalamique chez des individus obèses [138, 145], ce moyen pourrait donc être utilisé chez des animaux ou humains vigiles pour évaluer une réponse inflammatoire hypothalamique, et ce potentiellement après une courte exposition au WD (par exemple lors d'un repas). Un autre type d'approche, l'approche métabolomique, a été menée dans le chapitre 3 partie I en se basant sur le fait que certaines voies métaboliques étaient impactées en cas d'inflammation cérébrale [468, 469] ou que ce type d'analyse permet de mettre à jour d'éventuels acteurs de l'inflammation [470] qui pourraient être exprimés en amont de l'inflammation mesurée par les marqueurs moléculaires ou protéiques. Cette approche a permis de mettre en avant une augmentation précoce du stress oxydant à l'échelle métabolomique. Le stress oxydant peut précéder l'induction de l'inflammation hypothalamique [471]. La production excessive de ROS suite à l'ingestion d'un régime riche en lipides induit l'inflammation neuronale dans d'autres régions du cerveau (en l'occurrence le cortex) chez le rat [472]. La consommation sur le long terme de WD chez la souris induit l'activation de la nitric oxide syntase par la microglie, ainsi qu'une astrogliose dans l'ARC, et intervient ainsi dans l'inflammation hypothalamique [180]. Il est ainsi possible que la consommation de WD induise à très court terme une activation de la microglie, qui n'a pas été mesurée au cours de cette thèse, et que la production de ROS par celle-ci induise une augmentation du stress oxydant qui a été quant à elle détectée par l'approche métabolomique du chapitre 1. Il est également possible que le stress oxydant précède la mise en place de l'inflammation dans l'hypothalamus suite à la consommation de WD. Seule une mesure de la cinétique de l'activation de la microglie hypothalamique, sur un pas de temps plus court durant les premières 24h de consommation de WD, pourrait permettre de trancher entre ces deux hypothèses sur notre échelle de temps.

B. Le rôle potentiel du microbiote dans l'induction de l'inflammation hypothalamique précoce

Dans le chapitre 3 partie I, après 2 jours de consommation de WD, une augmentation de l'expression d'*il-6* était mesurée chez les rats conventionnels, qui n'était pas retrouvée chez les rats axéniques. La présence d'un microbiote intestinal serait donc nécessaire à l'augmentation de l'expression d'*il-6* en réponse au WD chez le rat. Les niveaux d'expression de deux gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant (*glrx* et *grx*) étaient augmentés chez les rats conventionnels en réponse à 2 jours de WD mais pas chez les animaux axéniques (chapitre 3 partie I), suggérant un rôle du microbiote intestinal

dans la mise en place du stress oxydant hypothalamique en réponse au WD. Il serait intéressant de compléter cette mesure par des analyses chez des animaux soumis à un WD pendant une fenêtre de temps à la fois plus précise (de l'introduction jusqu'à 1 jour, durant la phase hyperphagique) et plus longue pour voir l'évolution de l'expression de ces gènes. Une étude a en effet mesuré une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ainsi que pour *gfap* dans l'hypothalamus seulement quelques heures après introduction du WD [159]. D'autre part, il est important de souligner que les animaux axéniques présentent des anomalies développementales, notamment cérébrales [300], qui pourraient être à l'origine des différences observées avec les rats conventionnels. Une maturation et une densité anormale de la microglie en conditions physiologiques ont notamment été observées chez des animaux axéniques [473]. Dans cette étude, un rétablissement d'une densité microgliale normale par administration d'AGCCs aux souris axéniques a été montré [473]. Ainsi, la diminution de l'ingéré alimentaire lors de la phase hyperphagique mesurée chez les rats axéniques dans le chapitre 3 partie I pourrait être due à une diminution de l'activation précoce de la microglie, liée à l'absence d'AGCCs. De plus, les variations du métabolisme des AGCC observées dans le chapitre 3 partie II chez les animaux ayant été exposés à plusieurs cycles de WD pourraient induire des modifications de l'activation de la microglie hypothalamique et ainsi être impliquées dans les différences de réponse inflammatoire lors de l'introduction du WD entre les souris CTRL et CYCL.

Un lien potentiel entre les modifications du microbiote intestinal suite à la consommation de WD et une augmentation du stress oxydant hypothalamique a été montré dans le chapitre 3 partie I. En effet, certaines bactéries intestinales dont l'abondance augmente en réponse au WD, sont associées à des contextes intestinaux pro-inflammatoires, notamment l'augmentation de l'abondance de bactéries appartenant au phylum des Protéobactéries [405]. L'induction de l'inflammation peut être due à l'augmentation du stress oxydant [474]. De plus, la diminution de l'abondance de certaines espèces de *Lactobacillus*, constatée en réponse au WD, est associée à une augmentation du stress oxydant localement [475]. Ce type de lien pourrait suggérer que l'induction d'un microbiote pro-inflammatoire peut influer sur la génération d'un stress oxydant.

Les expositions répétées au WD chez la souris ont induit une astrogliose dans le tronc cérébral sous régime standard, qui reste à vérifier dans l'hypothalamus. Cette astrogliose pourrait ainsi être causée par une augmentation locale du stress oxydant, potentiellement en lien avec des modifications du microbiote intestinal. Les passages sous régime standard entre chaque période de consommation de WD ont été accompagnés d'une restriction calorique volontaire des souris. Une restriction calorique sur le long terme chez la souris permet la croissance de bactéries intestinales qui ont un rôle bénéfique sur l'état inflammatoire de l'intestin [476], ce qui est cohérent avec la diminution de l'abondance relative de bactéries pro-inflammatoires retrouvée lors du retour à un régime standard après plusieurs expositions au WD ainsi qu'avec la diminution de l'expression des marqueurs inflammatoires dans l'hypothalamus chez ces souris. De plus

amples études sont nécessaires pour vérifier si ces modifications d'expression de marqueurs d'inflammation sont liées à une restriction calorique.

Espèce/Souche	Temps d'exposition au WD	Marqueur(s) d'inflammation ou de stress oxydant	Zone cérébrale concernée	Chapitre de la thèse
Rat Wistar	Dès 2h	**Métabolomique** : augmentation du stress oxydant	Hypothalamus	1
Rat Fisher conventionnel	2 jours	**qPCR :** *il-6* (+30%) ; *sod2* (+60%) ; *glrx* (+40%)	Hypothalamus	1
Rat Fisher axénique	2 jours	**qPCR** : pas de modifications	Hypothalamus	1
Souris C57Bl6/N	1 jour	**qPCR** : pas de modifications	Hypothalamus	2
Souris C57Bl6/N	1 jour, après 2 expositions précédentes	**qPCR** : *il-1β* (-60%) ; *tnf-α* (-40%)	Hypothalamus	2
Souris C57Bl6/N	1 jour	**Immunohistochimie IBA1** : pas de modifications	Tronc cérébral	2
Souris C57Bl6/N	1 jour, après 2 expositions précédentes	**Immunohistochimie** IBA1: augmentation du nombre de cellules microgliales (+20%)	Tronc cérébral	2
Souris C57Bl6/N	1 jour	**qPCR** : *il-1β* (+90%) ; *ccl2* (+220%)	Striatum	2
Souris C57Bl6/N	1 jour, après 2 expositions précédentes	**qPCR** : pas de modifications	Striatum	2

Tableau 4.2. Evolution des marqueurs d'inflammation ou de stress oxydant mesurés au cours des expériences de cette thèse en réponse au WD.

C. L'introduction d'un WD induit une inflammation précoce d'autres structures cérébrales impliquées dans la régulation du comportement alimentaire

Les données des parties I et II du chapitre 3 indiquent que le microbiote semble participer à la régulation du comportement alimentaire *via* un effet sur sa régulation hédonique, dans les premières heures qui suivent l'introduction du régime WD. L'hypothalamus joue un rôle d'intégrateur clé des signaux homéostatiques [45, 477, 478] mais d'autres structures cérébrales sont également impliqués dans la régulation du comportement alimentaire. Parmi ces structures, le tronc cérébral est un autre intégrateur des signaux périphériques, notamment en provenance de l'intestin et du microbiote intestinal [59, 63, 72, 83], tandis que le striatum participe à la régulation hédonique de la prise alimentaire. L'induction de l'inflammation au sein de ces deux structures a donc été étudiée en lien avec les variations de microbiote.

L'induction de l'inflammation au sein du tronc cérébral a été mesurée à travers les acteurs de la glie : les astrocytes et la microglie. Après plusieurs expositions au WD, l'épaisseur moyenne de la barrière astrocytaire chez la souris était augmentée sous régime standard, tandis que le nombre de cellules microgliales était diminué. L'augmentation de l'épaisseur de la barrière astrocytaire pourrait avoir un rôle protecteur des neurones notamment vis-à-vis de l'induction de l'inflammation [479], ce qui expliquerait la diminution du nombre de cellules microgliales constatée en parallèle et l'absence d'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires en réponse au WD (données non montrées). Plusieurs expositions au WD pourraient induire dans notre cas un maintien de cette augmentation de l'épaisseur de la barrière astrocytaire. Les origines de ces variations d'épaisseur de de cette barrière ne sont pas connues : dans le cadre de la consommation de WD, elle pourrait avoir pour origine une augmentation de l'afflux de lipides circulants, une augmentation d'éléments circulants pro-inflammatoires originaires du microbiote intestinal ou encore une augmentation de la leptinémie [54, 480]. Cette augmentation de l'épaisseur de cette barrière en réponse au WD, caractéristique d'une augmentation de l'inflammation des astrocytes, pourrait avoir un rôle protecteur des neurones adjacents qui participent à la régulation de la prise alimentaire. En effet, Buckman *et al.* ont montré dans une étude que l'inhibition de la voie NF-κB dans les astrocytes du tronc cérébral induit une augmentation significative de la prise alimentaire sous WD chez le rongeur [162].

D'autre part, dans le striatum l'expression de la plupart des cytokines pro-inflammatoires était augmentée après un jour de WD chez les souris CTRL. A notre connaissance, un tel effet n'a encore jamais été montré. Cette surexpression des cytokines dans le striatum n'était en revanche pas retrouvée après plusieurs expositions au WD. Cette absence d'augmentation pourrait être due à une sensibilité moindre au régime des souris exposées à plusieurs WD au niveau du striatum, potentiellement consécutivement à l'augmentation

de l'épaisseur de la barrière astrocytaire du tronc cérébral. Cette hypothèse reste cependant à vérifier. L'induction de l'inflammation très précoce, *via* l'augmentation de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, pourrait ici avoir un rôle protecteur pour préserver l'homéostasie énergétique et limiter la motivation à manger, ce qui n'est pas retrouvé après plusieurs expositions au WD. En effet, l'inflammation striatale est associée à une dérégulation du système dopaminergique [481, 482] avec une anhédonie notamment dans les cas de dépression [482]. De plus amples travaux sont nécessaires pour caractériser davantage le rôle de l'inflammation striatale dans la régulation du comportement alimentaire.

D. Implication des variations du microbiote intestinal dans les modifications des marqueurs inflammatoires liés au tronc cérébral et au striatum

Des corrélations positives et significatives ont été déterminées entre l'évolution de certains groupes bactériens et les marqueurs moléculaires de l'inflammation dans le tronc cérébral et le striatum dans notre chapitre 3 partie II suggérant un lien entre l'abondance de ces bactéries et la mise en place de l'inflammation centrale. L'inflammation du tronc cérébral était relativement faible sous régime standard après exposition à plusieurs cycles de WD (augmentation de l'épaisseur de la barrière astrocytaire mais une diminution du nombre de cellules microgliales) et le microbiote de ces souris était appauvri en bactéries pro-inflammatoires. En revanche, la densité des cellules microgliales a augmenté après la 3ème exposition au WD ainsi que l'abondance de bactérie $Gram^-$ telles que les Protéobactéries. L'injection systémique de LPS est capable d'induire une augmentation de l'activation de la microglie chez l'Homme [483]. Ainsi, on peut supposer que l'augmentation de l'abondance des Protéobactéries, telles que les *Desulfovibrionaceae,* lors de la 3ème exposition au WD pourrait être liée à l'activation de la microglie du tronc cérébral des souris CYCL sous WD. Un dosage du LPS circulant pourrait permettre de valider cette hypothèse. D'autre part, un dosage des cytokines a été réalisé dans les plasmas des rats conventionnels et axéniques soumis à un WD (chapitre 3 partie I), sans montrer de différences significatives entre les groupes, suggérant une absence d'inflammation systémique 2 jours après introduction d'un WD. Une inflammation transitoire de l'intestin a été observée chez le rongeur soumis pendant 1h à un WD, résolue après quelques heures, sans se propager aux autres sites, comme montré dans une étude menée par l'équipe d'Alexandre Benani (Ben-Fradj *et al.*, 2021, CSGA, CNRS, Dijon, France ; soumis). On peut imaginer qu'un même type d'inflammation transitoire a lieu au niveau du CNS durant le premier jour de consommation de WD, en lien avec les modifications de l'inflammation intestinale. Suivre l'inflammation du CNS au cours des premières 24h d'exposition au régime permettrait de caractériser la cinétique de son

activation, en parallèle des évolutions de composition et d'activité du microbiote. De plus, la dysbiose très précoce observée dans toutes les expériences menées au cours de cette thèse pourrait participer à l'activation de la microglie du NTS avant de participer à l'activation de la microglie hypothalamique observée dans de nombreuses études au cours de la première semaine de consommation de WD et dont le blocage de l'expansion permet de diminuer la prise alimentaire [153].

Le transfert de microbiote de souris exposées à plusieurs cycles de WD vers des souris naïves a induit une plus forte motivation à manger chez les souris receveuses, ce qui va dans le sens d'une dérégulation du système de la récompense alimentaire. Cette dérégulation est cohérente d'une part avec l'hypothèse d'un rôle protecteur de l'inflammation précoce du striatum qui n'est pas retrouvée après plusieurs cycles de WD et suggère un rôle du microbiote intestinal dans cette dérégulation. Vérifier l'absence d'induction de l'inflammation (*via* des mesures d'expression des cytokines) dans le striatum des souris receveuses permettrait de consolider cette hypothèse. De plus, un rôle du microbiote dans la régulation dopaminergique dans le striatum a été suggéré dans le cadre de comportements compulsifs tels que la surconsommation d'alcool avec une corrélation positive entre l'expression du récepteur dopaminergique 1 et certaines bactéries intestinales [484]. Dans le cadre de ma thèse, ce type de corrélation entre l'expression de récepteurs dopaminergiques et l'évolution de l'abondance de certaines bactéries ou de certains groupes de bactéries n'a pas été retrouvé, après 24h de consommation de WD, mais pourrait être retrouvée à plus court terme entre l'introduction de WD et ces 24h, ce qui expliquerait les modifications de la motivation à manger lors de la 1ère heure après introduction du régime.

Bien entendu, les lipides du régime peuvent également participer aux adaptation comportementales et inflammatoires observé dans mes travaux. En effet, les lipides issus du WD sont capables d'activer la voie TLR4 [195]. Déterminer le WD active également la glie chez des animaux dont le microbiote a été déplété, permettrait de déterminer la part jouée par le régime, et notamment les lipides, dans cette activation. Le taux de lipides du régime pourrait aussi jouer un rôle dans l'induction de cette inflammation, comme suggéré par Kim *et al.* en 2020 [149], qui rapportaient que la consommation pendant trois semaines de WD à 45%kcal provenant des lipides induisait une inflammation du ganglion noueux mais pas du NTS [485] tandis qu'inversement la consommation d'un WD à 60%kcal issus de lipides pendant la même durée induisait une inflammation du NTS mais pas du ganglion noueux [486]. Le régime à 60% de kcal issus des lipides ayant induit une plus forte dysbiose du microbiote que celui à 45% de kcal issus des lipides, les auteurs ont suggéré qu'une plus forte dysbiose était liée à une inflammation de structures davantage en aval au niveau du tronc cérébral, avec une inflammation des ganglions noueux avant une inflammation du NTS. Dans notre cas, à très court terme, il serait donc intéressant d'établir une cinétique d'activation de l'inflammation dans l'ensemble de ces structures

(ganglions noueux, NTS, hypothalamus et le striatum) en parallèle d'une cinétique d'évolution de la composition et de l'activité du microbiote, afin de préciser la cascade d'activation de l'inflammation.

Pour conclure, l'introduction d'un WD induit une augmentation du stress oxydant hypothalamique qui peut être le signe d'une induction de l'inflammation précoce ou bien la précéder. Ce stress oxydant est lié à des modifications de composition et de l'activité du microbiote intestinal. D'autre part, après plusieurs expositions au WD, le changement de régime induit une inflammation du tronc cérébral caractérisée par une activation de la glie (augmentation du nombre de cellules microgliales). Enfin, le striatum, impliqué dans la régulation hédonique du comportement alimentaire, subit également de façon très précoce, dès un jour de WD, mais qui n'est pas retrouvée après plusieurs expositions au WD. Les fortes corrélations retrouvées dans les deux premiers chapitres de cette thèse entre les modifications du microbiote et les différents marqueurs d'inflammation et l'utilisation du modèle axénique suggèrent un lien entre ces deux acteurs. Caractériser l'évolution de l'inflammation à très court terme de ces trois structures cérébrales avec ou sans microbiote et en étudiant l'évolution des différents acteurs de cette inflammation, permettrait de confirmer ces liens potentiels. De plus, les interactions entre les différentes structures qui participent à la régulation hédonique et homéostatique de la prise alimentaire [121] pourraient être importantes à identifier dans le cadre d'un passage au WD en lien avec les modifications du microbiote intestinal, par exemple par l'intermédiaire de modèles génétiques KO spécifiques de certains gènes ou régions.

III. Voies de communication entre le microbiote et le cerveau impliquées dans la régulation du comportement alimentaire lors de l'introduction de WD

A. Identification des voies impliquées lors de la transition au WD

Un rôle du microbiote dans la régulation de la motivation à manger et/ou sur la régulation de la satiété a été suggéré dans mes travaux. Le 2ème objectif de ma thèse était de déterminer, par quel(s) mécanisme(s) le microbiote intestinal pouvait agir sur la régulation du comportement alimentaire.

Plusieurs voies de communication ont été identifiées dans la littérature entre l'intestin, son microbiote et le cerveau. Les cellules entéroendocrines (EECs) répondent à des stimuli provenant du la lumière intestinal, et notamment à des stimuli liés à l'activité

métabolique du microbiote intestinal tels que les AGCC [487], les acides biliaires, ou le LPS [488]. Les peptides sécrétés par les EECs participent à la régulation centrale du comportement alimentaire via la circulation générale ou via nerf vague [489–492] [493–495]. Certains métabolites bactériens peuvent aussi être transports par la circulation sanguine et traverser la barrière hématoencéphalique au niveau des organes circumventriculaires [369]. Les perturbations de la barrière intestinale et notamment l'inflammation induite par la dysbiose du microbiote intestinal sont également capables de moduler certaines réponses au niveau du système nerveux central de l'hôte par exemple via l'activation de la production de cytokines pro-inflammatoires [496].

La consommation de WD induit sur le long-terme (1, 3, 6 semaines une augmentation de la perméabilité intestinale [497–500], et a été associée à la mise en place d'une endotoxémie métabolique. Chez l'Homme, 4h à 5 jours de consommation de WD n'induisent pas de modifications de la perméabilité intestinale [501, 502], malgré une augmentation des endotoxines dans le sang [502]. Afin de déterminer le rôle évntuelle d'une altération de la perméabilité dans nos modèles, la perméabilité intestinale a été mesurée dans le chapitre 1 chez les rats axéniques et leurs contrôles conventionnels sous régime standard ou après 2 jours de WD. La perméabilité basale (sous régime standard) était fortement augmentée chez les rats axéniques (Figure 4.5). En revanche, 2 jours de WD n'ont pas affecté la perméabilité caecale quel que soit le statut microbiologique des rats. Nous avons également étudié la perméabilité caecale chez les souris traitées ou non avec des antibiotiques, sous régime standard ou après 2 jours de régime WD. Aucun effet de l'antibiothérapie n'était observé sous régime standard contrairement au modèle axénique. La consommation du régime WD n'a pas non plus modifié la perméabilité caecale (Figure 4.6C et 4.6D). Ainsi, dans nos différents modèles, la perméabilité intestinale du caecum ne semble pas être la voie de communication majeur de l'axe intestin-cerveau. Cependant, une augmentation de la perméabilité intestinale a été mesurée à très court terme dès 1 heure après l'introduction d'un WD chez la souris, dans le jéjunum, par l'équipe d'Alexandre Benani (Figure 4.7). Cette modification à très court terme pourrait être présente dans certains de nos modèles et éventuellement participer aux modifications de la prise alimentaire constatées après seulement quelques heures de WD dans le chapitre 3 partie IV.

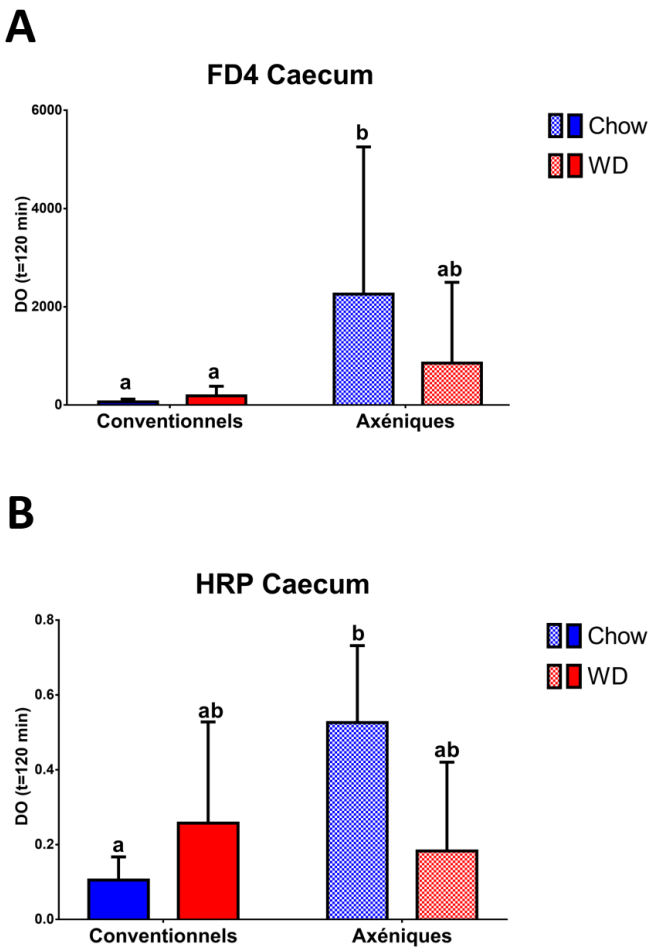


Figure 4.5. Perméabilité caecale paracellulaire (A) et transcellulaire (B) chez les rats axéniques (Ax) et leurs contrôles conventionnels (Conv) sous régime standard (Chow) ou WD (WD). Les différences entre les groupes ont été vérifiées statistiquement par ANOVA une voie : deux lettres différentes indiquent une différence significative à un temps donné.

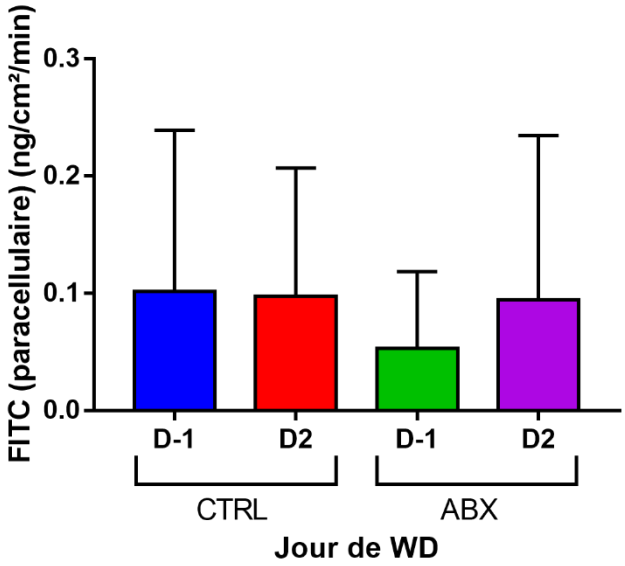


Figure 4.6. Evolution de la perméabilité caecale paracellulaire (flux en ng/cm^2/min) chez les souris CTRL (CTRL) et après traitement antibiotique (ABX) avant (D-1) ou après 2 jours (D2) de WD.

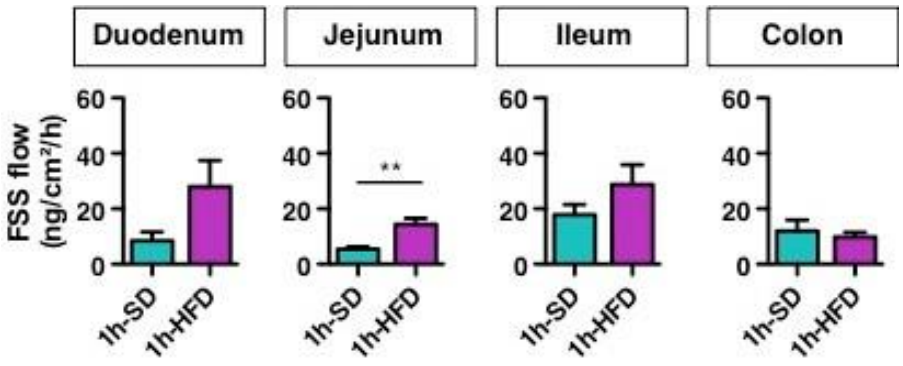


Figure 4.7. Perméabilité intestinale paracellulaire (flux en ng/cm^2/h) chez la souris soumise à 1h de WD (1h-HFD) par rapport à 1h de régime standard (1h-SD) dans le duodénum, jéjunum, iléon et colon. D'après Ben-Fradj *et al.*, 2021 (soumis). Les différences entre les deux régimes ont été déterminées par test t de Student avec ** : P<0.01.

B. Lien entre les modifications de la régulation des EEC et les modifications du microbiote intestinal

La satiété est régulée par la production de peptides anorexigènes par les EECs le long du tractus gastro-intestinal. Ainsi, dans ce travail de thèse, l'impact de l'absence de microbiote intestinal sur l'épithélium intestinal, et particulièrement sur la prolifération, la régulation transcriptionnelle et l'activité des EECs, a été évalué sous régime standard (chapitre 3 partie IV). Cependant, nous avions aussi échantillonné des tissus de souris ayant reçu un traitement antibiotique et ayant été soumises à 2 ou 5 jours de WD afin d'évaluer le rôle de ces peptides dans la communication microbiote-cerveau lors du changement d'aliment.

Les niveaux d'expression des gènes codant pour *gcg*, *cck*, *nt* mais pas *pyy* étaient largement surexprimés en absence de microbiote intestinal sous régime standard, particulièrement dans le caecum. Cette surexpression spécifique du caecum était également retrouvée chez les souris axéniques. Le changement de régime a induit une faible augmentation des niveaux d'expression de *gcg* et *pyy* et une diminution de l'expression de *cck*, soulignant que l'absence de microbiote intestinal avait un effet plus fort que le régime en lui-même sur la plasticité transcriptionnelle des EECs (Figure 4.8). Grâce à une collaboration avec l'équipe d'A. Benani (CSGA, CNRS, Dijon), le dosage du GLP-1 circulant a été réalisé chez des souris soumises au même traitement antibiotique et a montré une augmentation significative des concentrations plasmatiques de GLP-1 par rapport aux animaux qui n'avaient pas suivi de traitement antibiotique, sous régime standard. Un dosage de la CCK circulante est envisagé pour vérifier que la surexpression observée dans le caecum en absence de microbiote est également accompagnée de l'augmentation des concentrations circulantes de ce peptide. Le GLP-1 est normalement sécrété tout au long du tube digestif mais plus abondamment dans l'intestin distal [503]. On peut ainsi supposer qu'une surexpression dans les parties distales accompagnée d'une surexpression protéique amplifierait son rôle de peptide anorexigène. Le rôle des peptides satiétogènes produits dans les régions distales du tube digestif sur la régulation de la prise alimentaire n'est pas clairement défini [504]. D'autre part, la cause de cette surexpression en absence de microbiote intestinal reste à identifier car les principaux facteurs induisant l'expression de *gcg*, *cck* et *nt*, tels que les AGCCs ou les acides biliaires, sont issus de l'activité du microbiote intestinal [326–328, 345–347, 349, 455]. D'autres facteurs issus du régime seul pourraient expliquer la surexpression de ces gènes, en particulier en l'absence de microbiote intestinal qui empêcherait la digestion d'éléments du régime tels que les fibres, des protéines ou des lipides qui jouent notamment un rôle dans l'activation de l'expression de ces peptides [323, 505].

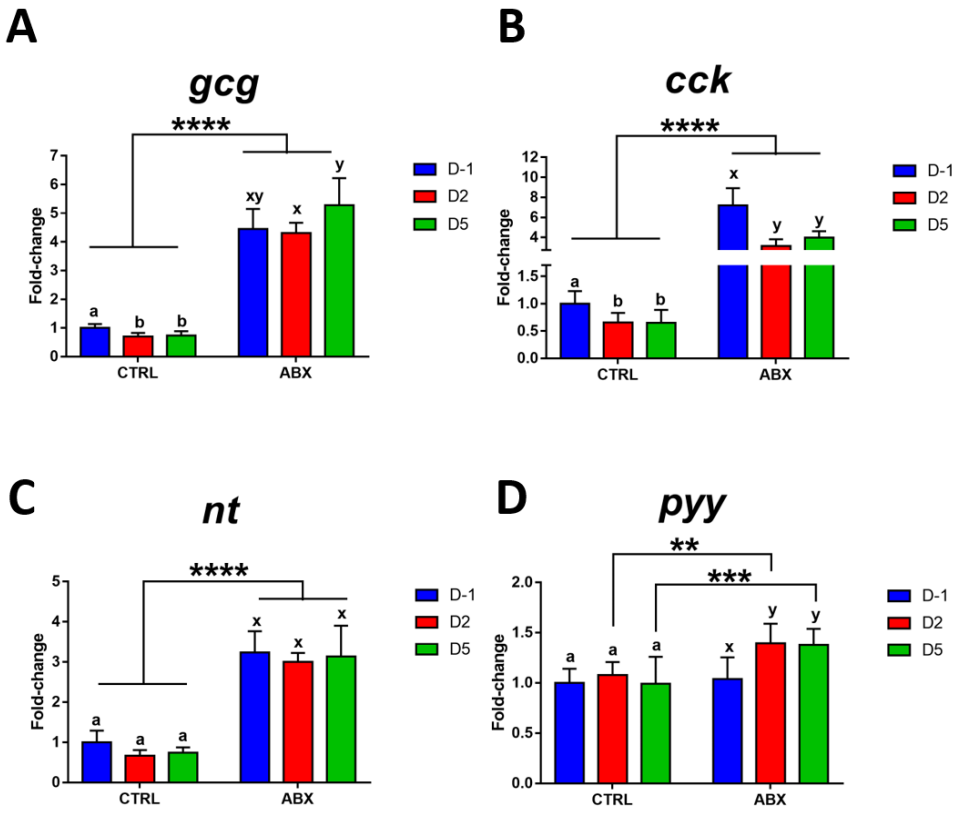


Figure 4.8. Impact du passage au WD sur les niveaux d'expression de gcg (A), cck (B), nt (C) et pyy (D). Deux lettres différentes indiquent une différence significative au sein d'un même groupe (CTRL (a,b) ou ABX (x,y)) après ANOVA 1 voie. Les astérisques indiquent des différences significatives au sein d'un même jour entre les groupes avec **:P<0,01 ; *** :P<0,001 et **** :P<0,0001 après ANOVA 2-voies suivie d'un test post-hoc de Tukey.

L'utilisation d'antibiotiques, en plus d'induire une surexpression de *cck*, *nt* et *gcg*, a induit des modifications de la prise alimentaire à très court terme avec une augmentation du nombre de bouts (repas) dès la 1ère heure d'introduction de WD, en association avec une tendance à la diminution de la taille des bouts sans modification de l'ingéré total sur cette première heure. Un effet sur le rassasiement a dont été suspecté, possiblement en lien avec la forte surexpression de *cck*. Il serait intéressant de confirmer l'impact de cette absence de microbiote sur le rassasiement en déterminant finement le comportement alimentaire d'animaux axéniques en cages métaboliques, ce qui reste aujourd'hui techniquement impossible. Toutefois, la mesure de l'ingéré alimentaire sur la 1ère heure de consommation de WD montre une diminution significative de l'ingéré total de souris axéniques par rapport aux contrôles conventionnels, ce qui est cohérent avec une augmentation de la satiété ou du rassasiement qui pourrait résulter d'une surexpression plus marqué de la CCK chez les souris axénique que chez les souris ayant reçu un traitement antibiotique. L'épithélium intestinal, en particulier dans les parties distales, est donc très plastique en réponse aux variations du microbiote intestinal, mais cette forte plasticité n'est pas retrouvée ensuite au niveau de la prise alimentaire. En effet, malgré une forte surexpression des peptides anorexigènes, les animaux présentaient toujours une hyperphagie lors des premières 24h de régime WD. La motivation à manger supplante donc l'action des peptides satiétogènes de l'intestin. Il est aussi possible que des mécanismes compensatoires se soient mis en place empêchant l'action anorexigène des peptides. Même s'il apparait difficile de conclure sur l'importance de la voie endocrine dans la régulation de la prise alimentaire dans nos modèles, nos travaux ont malgré tout permis de révéler d'éventuelles nouvelles caractéristiques endocrines de l'intestin distale (production de CCK, plasticité transcriptionnelle), dont les fonctions et voies de communication avec le reste de l'organisme restent à explorer.

D'autres voies de communication microbiote/cerveau pourraient être explorées, notamment la communication *via* le nerf vague dont l'activation peut dépendre du microbiote et participer à la régulation de la prise alimentaire [506]. Cette voie paraît d'autant plus intéressante à explorer que des modifications de l'inflammation du tronc cérébral ont été observées suite à plusieurs expositions au WD avec un lien potentiel avec le microbiote intestinal. Des travaux récents ont notamment montré qu'une dysbiose du microbiote intestinal induit une inflammation du tronc cérébral *via* l'activation du nerf vague, et qu'un telle inflammation était positivement corrélée à la mise en place de l'obésité sur le long terme [507]. Cela suggère que le nerf vague constitue également une voie de communication pouvant être impliquée dans la régulation de la prise alimentaire à court terme lors du passage au WD. Enfin certains métabolites bactériens peuvent traverser la barrière intestinale [508, 509]. L'approche métabolomique du chapitre 3 partie I a montré une augmentation du stress oxydant hypothalamique qui était positivement corrélée avec certains métabolites caecaux non identifiés. Utiliser l'approche métabolomique et analyser en parallèle les métabolites du contenu caecal et du plasma pourrait permettre de déterminer si une telle voie de communication entre le

microbiote et cerveau était active dans notre modèle. Les métabolites caecaux mis en avant dans le chapitre 3 partie I constituent de bons candidats pour démarrer une analyse ciblée des métabolites bactériens circulants. Ainsi, bien qu'un impact fort du microbiote sur la régulation transcriptionnelle des EECs ait été identifié pendant ma thèse, le lien entre ces modifications et la régulation de la prise alimentaire reste à clarifier mais ne semble pas privilégié dans nos modèles de rats et souris avec un microbiote complexe. D'autres voies de communication microbiote-intestin-cerveau pourraient être impliquées dans les modifications observées à très court terme, par exemple le passage dans la circulation sanguine de métabolites bactériens non identifiés, ou encore le rôle du nerf vague.

IV. Importance de l'approche méthodologique pour l'identification de liens potentiels entre le microbiote et le cerveau

A. Importance du choix du modèle animal

Au cours de ce projet de thèse, le modèle rongeur a été utilisé pour étudier l'impact à très court terme de l'introduction d'un WD sur la régulation de la prise alimentaire. L'utilisation d'un modèle de rongeur (rat et souris) axénique ainsi que de deux modèles de souris dont le microbiote a été déplété soit par traitement antibiotique, soit par PEG, a permis d'évaluer d'une part l'impact de l'absence de microbiote sur la régulation de la prise alimentaire et de ses acteurs et d'autre part l'impact du transfert de microbiote caecal sur la physiologie de l'hôte.

Dans le cadre de ma thèse, l'utilisation du modèle de rat axénique a montré que l'absence totale de microbiote intestinal avait un impact sur la prise alimentaire via la régulation hédonique engendrant la phase hyperphagique moindre, avec une diminution significative de l'ingéré sur 24h. En parallèle, l'utilisation de souris axéniques avec une mesure de l'ingéré alimentaire sur la première heure a également montré une diminution de la prise alimentaire totale au moment du passage au WD. L'absence de bactérie intestinale semble donc affecter l'aspect motivation du comportement alimentaire lors de l'exposition à un aliment palatable. L'utilisation d'un modèle murin traité pendant 10 jours avec un mélange d'antibiotiques à spectre large (chapitre 3 partie IV) n'a pas, malgré la forte déplétion du microbiote intestinal, permis de retrouver cette baisse significative de l'ingéré au cours des 24 premières heures suivant l'introduction du WD. En revanche, l'utilisation du modèle antibiotique a montré que la déplétion du microbiote avait un impact sur la régulation à très court terme de la prise alimentaire, avec une augmentation

du rassasiement au cours de la 1ère heure de WD, sans modification de la prise alimentaire totale sur cette heure. L'absence chronique de microbiote intestinal (animaux axéniques) semble avoir un impact sur la régulation de la prise alimentaire dans une fenêtre de temps plus large, avec une diminution de la prise alimentaire sur la première journée de consommation de WD (chapitre 3 partie I), tandis que 10 jours de traitement antibiotique, qui ne permettaient pas une déplétion totale du microbiote intestinal, induisaient des modifications de prise alimentaire lors des premières heures de WD mais pas à l'échelle de la journée entière. De façon intéressante, certains gènes qui participent à la régulation homéostatique du comportement alimentaire ont un niveau d'expression modifié chez les rats axéniques, avec une augmentation de l'expression d'*agrp* et de *npy*, d'après les résultats du chapitre 3 partie I (expérience 3, Figure 4.9). En parallèle, il a été montré que les rongeurs axéniques surexprimaient GLP-1 dans les parties distales de l'intestin avec un rôle potentiel dans la régulation de la vitesse de transit [344]. Cela suggère d'une part que l'absence de microbiote modifie l'activité de l'épithélium intestinal pour induire la satiété et d'autre part que cette augmentation de signaux satiétogènes est compensée centralement, au moins par l'ARC. Il pourrait donc y avoir un impact du temps passé en absence de microbiote sur la régulation de la prise alimentaire : tester l'impact d'un traitement antibiotique plus long pourrait permettre de déterminer si le temps passé en absence de microbiote intestinal est corrélé avec une augmentation de la satiété chez le rongeur. Ainsi, à très court terme après changement de régime, c'est davantage la régulation hédonique qui est modifiée en lien avec le microbiote tandis que la régulation homéostatique pourrait être impactée à plus long terme.

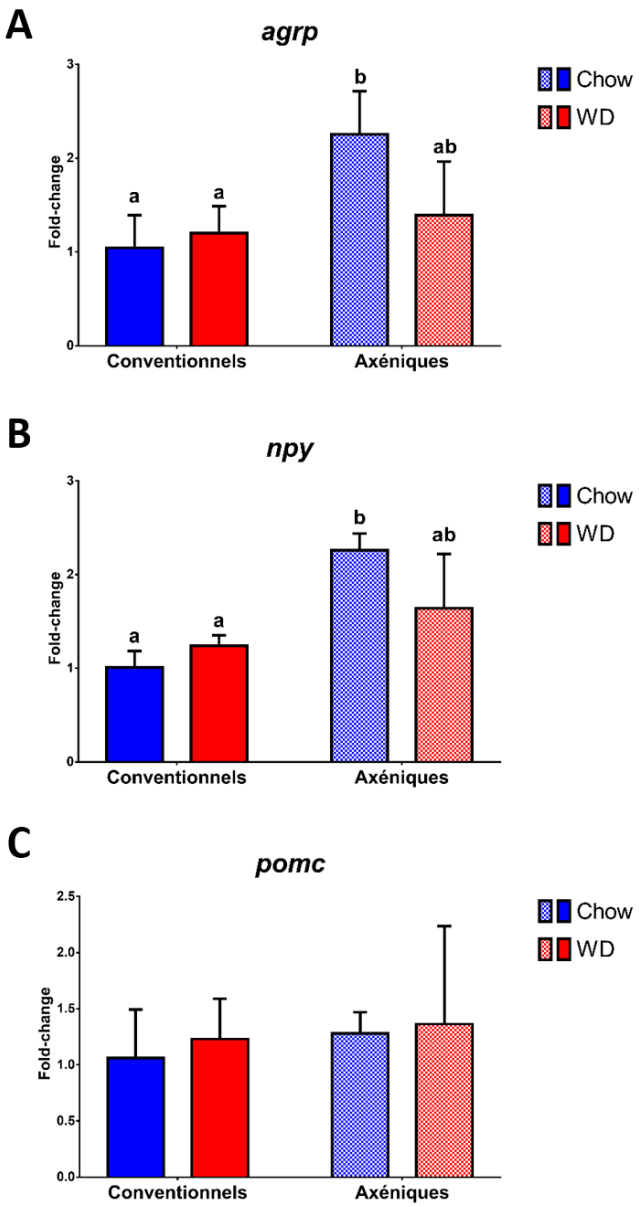


Figure 4.9. Niveaux d'expression des gènes *agrp*, *npy* et *pomc* chez le rat axéniques (AX) et conventionnel (Conv) avant (Chow) et après 2 jours de WD (WD).

Lorsque l'on confronte les résultats obtenus avec ces deux modèles, il semble donc que les effets observés sur la prise alimentaire avec déplétion du microbiote par traitement antibiotique, notamment sur les premières heures de changement de régime, sont accentués dans le modèle axénique, suggérant que ces deux modèles sont complémentaires pour étudier l'impact de l'absence de microbiote sur la régulation de la prise alimentaire. Le modèle axénique présente l'avantage d'être totalement dépourvu de microbiote intestinal, ce qui reste difficile voire impossible à obtenir par déplétion d'un microbiote complexe. Cependant, l'effet observé sur la prise alimentaire dans les modèles axéniques peut être dû à d'autres facteurs que l'absence de microbiote intestinal. En effet, l'absence de microbiote au niveau de l'épithélium olfactif des animaux pourrait modifier la reconnaissance de l'aliment palatable avec un impact sur la quantité ingérée de cet aliment [439]. D'autre part, le modèle axénique présente des anomalies de développement intestinal et du système nerveux central qui pourraient impacter la régulation de la prise alimentaire [510–513]. Ces anomalies de développement rendent ainsi difficiles les interprétations des résultats obtenus. Les résultats obtenus après traitement antibiotique permettent de s'affranchir des problèmes de développement. Dans notre cas, les antibiotiques étaient dilués dans l'eau de boisson, ce qui implique que les animaux ne recevaient pas tous la même quantité d'antibiotiques en fonction de leur consommation hydrique. En parallèle, cette méthode présente l'avantage que les antibiotiques sont administrés de manière continue sur 24h, contrairement à un gavage ponctuel, même quotidien. La faible variabilité de quantité d'ADN obtenue par mg de fèces dans le chapitre 3 partie IV indique que 10 jours de traitement antibiotique sont suffisants pour permettre une déplétion significative du microbiote intestinal. Le choix des antibiotiques est également important : il ne doit pas être retrouvé dans la circulation de l'hôte pour s'affranchir d'effets sur l'hôte. De plus, certains cocktails sont répulsifs chez le rongeur, notamment ceux contenant du metronidazol, pouvant induire une diminution de la consommation hydrique et du poids des animaux [514, 515]. Cette aversion peut obliger l'utilisation d'édulcorants dans l'eau de boisson [516–518] qui peuvent fausser les mesures de prise alimentaire [519, 520]. L'ensemble de ces paramètres avaient été pris en compte dans notre étude et les antibiotiques étaient introduits un par un afin d'éviter tout effet sur la prise alimentaire et le gain de poids sous régime standard [327]. L'avantage du traitement antibiotique est aussi de permettre une combinaison ciblant certains types de bactéries pour favoriser la croissance d'autres. Cette approche pourrait être utilisée dans notre cas, par exemple en essayant d'éliminer les bactéries Gram$^-$ qui sont considérées comme étant pro-inflammatoires pour vérifier leur impact sur la physiologie de l'hôte. Que ce soit en l'absence de microbiote intestinal (modèle axénique) ou après déplétion par l'utilisation d'antibiotiques, la réponse de l'épithélium était modifiée avec une adaptation à cette absence de microbiote qui se traduit notamment par une modification de l'activité transcriptionnelle des EECs caecales (chapitre 3 partie IV). Ces deux modèles s'éloignent donc de la physiologie normale des animaux en termes de communication entre l'intestin et le cerveau, rendant les résultats et particulièrement

l'identification des mécanismes de communication entre microbiote et cerveau difficiles à interpréter.

Une alternative au traitement antibiotique est l'utilisation de PEG qui permet d'éliminer le microbiote intestinal de façon mécanique, par lavages successifs *via* le gavage des animaux. L'avantage de cette méthode est de s'affranchir du traitement antibiotique tout en permettant une déplétion suffisante du microbiote pour permettre un transfert [521], ce qui a été réalisé dans le chapitre 3 partie II. De plus, cette méthode de déplétion du microbiote a été réalisée par gavages suivi presque immédiatement (seulement 4h après) du transfert de microbiote, ce qui permet de supposer qu'aucun impact, ou très faible, du gavage sur l'épithélium intestinal n'interfère dans l'interprétation des résultats bien que cette hypothèse reste à vérifier. Le transfert de microbiote de souris soumises à plusieurs cycles de WD vers des souris n'ayant jamais été exposées au WD a permis de démontrer que le microbiote intestinal modifié après ces multiples expositions était responsable d'une augmentation de la motivation à manger durant la 1ère heure de régime. Cette approche est complémentaire de l'approche par traitement antibiotique, avec l'évaluation de l'effet du microbiote modifié plutôt que de l'absence du microbiote. Cependant, nous n'avons pas encore vérifié la composition des microbiotes caecaux des souris donneuses ou receveuses (séquençage en cours) qui permettra de valider complètement le modèle de transfert. Malgré les différences d'approche expérimentale, toutes les expériences ont pointé vers un effet du microbiote intestinal sur la régulation de la prise alimentaire durant les premières heures de WD, avec un effet sur la composition hédonique et plus précisément sur la motivation à manger des animaux.

B. Importance de l'approche bioinformatique

Au cours de ma thèse, l'analyse bioinformatique des résultats de séquençage a été primordiale pour faire ressortir des marqueurs bactériens dans les modèles étudiés, en lien avec la régulation de la prise alimentaire et certains autres facteurs étudiés (tels que l'expression des gènes impliqués dans cette régulation ou encore des modifications de marqueurs d'inflammation). Cette analyse implique tout d'abord un traitement des résultats de séquençage avant l'analyse statistique de ces résultats.

1. La préparation des données de séquençage à l'analyse bioinformatique

Les résultats bruts de séquençage peuvent varier en fonction de la méthode d'extraction, d'amplification de l'ADNr16S (selon les régions étudiées, les types de bactéries identifiées ne sont pas les mêmes ([522])) et la méthode de séquençage utilisée. Dans notre cas, la région hypervariable V3-V4 a toujours été utilisée pour l'amplification de l'ADNr16S, qui est la région la plus utilisée lors de l'analyse du microbiote intestinal car elle est celle qui présente la plus forte hétérogénéité et permet donc de couvrir le plus de bactéries possible [522].

L'absence d'exhaustivité des bases de données de référence pour l'affiliation taxonomique est également un facteur induisant de la variabilité dans l'analyse des résultats. Dans le cadre de ma thèse, l'affiliation taxonomique a été réalisée à partir de l'algorithme implémenté dans le package R dada2 [523], qui permet de corriger les séquences obtenues grâce à l'établissement d'un modèle d'erreur établi à partir des résultats de qualité de séquençage Illumina. Contrairement à une méthode classique de clustering, par exemple l'évaluation de la distance entre deux séquences Illumina pour déterminer un taux de similarité entre elles, cet algorithme permet de s'affranchir des erreurs de séquençage pour obtenir des amplicon sequence variants (ASVs), qui diffèrent des OTUs par le fait qu'une séquence corrigée par l'algorithme correspond à un ASV tandis qu'une OTU correspond à un groupe de séquences hautement similaires. Pour plus de facilité de lecture, le terme OTU a été utilisé tout au long de cette thèse. L'utilisation de dada2 peut donc permettre une réduction des erreurs de séquençage, ce qui a un impact sur la diversité α en limitant son augmentation artificiellement induite par la prise en compte de séquences qui différeraient uniquement à cause d'erreurs de séquençage mais qui seraient reconnues comme des OTUs différents [524]. Une comparaison de la méthode dada2 et du clustering classique montre toutefois que les différences de communauté à une haute échelle taxonomique (au-dessus du genre) restent similaires quelle que soit la méthode utilisée [524].

L'utilisation de différentes bases de données pour l'affiliation taxonomique peut également faire varier les résultats, que ce soit entre des bases différentes ou pour une même base de données, celles-ci étant régulièrement mises à jour. Deux grandes bases de données, Greengenes [525] et SILVA [526], sont disponibles pour l'affiliation de l'ADNr16S : la base de données SILVA a été utilisée dans ma thèse, celle-ci étant plus fournie que Greengenes et davantage mise à jour [527]. D'autres bases de données 16S sont disponibles telles que la ribosomal database project (RDP) [528] et la base de données du NCBI [529]. J'ai utilisé la base de données du NCBI de façon manuelle pour l'annotation à l'échelle de l'espèce de certaines OTUs identifiées comme étant des biomarqueurs des phénomènes étudiés : cette base de données contient à la fois les

séquences de Greengenes, SILVA et RDP et pourrait être envisagée à l'avenir pour l'affiliation taxonomique des séquences en vue d'une standardisation des méthodes [530].

La méthode de normalisation peut grandement faire varier les résultats. La méthode utilisée dans ma thèse (Geometric Mean of Pairwise Ratios, GMPR [531]) permet de prendre en compte une spécificité des données de séquençage du microbiote d'animaux ayant subi des traitements différents : l'absence d'OTUs dans certains échantillons alors qu'elles sont présentes, parfois en fortes quantités, dans d'autres échantillons selon le traitement [532]. D'autres méthodes de normalisation des données de séquençage du microbiote permettent de prendre en compte les variations de nombre de séquences entre les échantillons. Cependant ces méthodes induisent une élimination excessive d'OTUs ou faussent légèrement les absences d'OTUs en les transformant artificiellement de façon à les rendre non nulles (une OTU absente dans un échantillon sera annotée comme présente en 1 exemplaire par exemple). Ces méthodes sont implémentées dans les packages R DESeq2 [533] ou edgeR [534], et originellement pensées pour les données de RNAseq pour lesquelles l'absence totale de données pour un gène donné est rare.

Ainsi, la méthode de préparation des données utilisée au cours de ma thèse a permis de sélectionner des OTUs en limitant l'impact des erreurs de séquençage, de les affilier avec une base de données fournie et régulièrement mise à jour avant une normalisation préalable qui est adaptée aux données de séquençage du microbiote intestinal et qui permet de conserver une caractéristique importante de ces échantillons, *i.e.* les fortes variations d'abondance entre échantillons. Ces caractéristiques d'analyses et de process des données était parfaitement adaptées à nos modèles de changement de régime alimentaire et de déplétion du microbiote. L'utilisation de cette même approche pour toutes les expériences menées favorise la comparaison entre échantillons et a permis de démontrer que malgré des animaleries, des espèces, des souches ou encore des régimes différents, un microbiote initial ainsi qu'une évolution similaire en réponse au WD était retrouvée entre les expériences. Une standardisation des méthodes est ainsi primordiale, notamment pour envisager des méta-analyses entre différentes études et favoriser par exemple la découverte de biomarqueurs bactériens de maladies.

2. Recherche de biomarqueurs bactériens : identification de bactéries individuelles *vs.* Identification de groupes de bactéries

La découverte de biomarqueurs bactériens des modifications de prise alimentaire chez le rongeur a été réalisée bioinformatiquement via deux types d'approche : (i) la recherche de bactéries individuelles fortement impactées par le changement de régime ou par les

multiples expositions au régime et (ii) l'identification de groupes de bactéries, qui co-évoluent ensemble en réseau, qui sont corrélés aux variations des marqueurs étudiés.

L'identification de bactéries significativement impactées par le changement de régime ou par l'exposition à plusieurs WD a été réalisée à l'aide du package DESEq2, qui a l'avantage de prendre en compte la taille des échantillons pour évaluer les fold-change par rapport aux approches classiques statistiques (test t ou ANOVA une voie) et à partir des données normalisées par la méthode GMPR [533]. Cette approche permet d'identifier à l'échelle de l'OTU quelles bactéries sont significativement différentiellement abondantes entre deux conditions [535–537]. Des alternatives récentes à DESEq2 auraient également pu être utilisées dans le cadre de nos expériences telles que MiRKAT qui permet d'évaluer les différences significatives à partir de plusieurs matrices de distance en simultané [538], des alternatives à la gestion des outliers [539] ou à la prise en charge de l'absence des OTUs [540], mais n'ont pas été utilisées car trop récentes pour avoir suffisamment de recul sur les résultats obtenus par rapport à DESeq2[541]. L'approche utilisée pendant ma thèse a permis d'identifier des biomarqueurs potentiels des modifications de la prise alimentaire. Toutefois, ces biomarqueurs n'étaient pas toujours retrouvés entre les expériences, ce qui peut s'expliquer par le fait que ce sont des bactéries isolées qui peuvent avoir des rôles métaboliques redondants au sein d'un écosystème constitué de plusieurs bactéries, malgré leur affiliation taxonomique différente. Il a ainsi paru plus intéressant de raisonner à l'échelle du groupe de bactéries qui co-évoluent ensemble, afin de permettre l'identification de plusieurs bactéries dont l'abondance n'est pas forcément significativement impactée par le changement de régime.

L'utilisation du WGCNA [542] permet de construire des groupes de bactéries co-évoluant ensemble en fonction du critère de séparation des groupes, par exemple le changement de régime. Dans le cadre de ma thèse, cette méthode a été étendue de façon à déterminer des corrélations entre ces groupes de bactéries et d'autres données tels que les données de métabolomique de l'intestin et de l'hypothalamus dans le chapitre 3 partie I. Cette méthode d'analyse a été possible grâce à la mise à disposition d'une application web, MiBiOmics, [543]. Des alternatives, notamment mixOmics [544] ou l'analyse de co-inertie multiple [545, 546], permettent également cette intégration entre plusieurs jeux de données, avec des résultats qui peuvent être complémentaires à ceux obtenus avec MiBiOmics [543]. Une différence principale entre mixOmics, et plus particulièrement la méthode DIABLO [547], et MiBiOmics, est que DIABLO construit ces réseaux avec *a priori*, c'est-à-dire en sélectionnant les éléments qui apparaissent déjà comme impactés par la condition choisie, avant de réaliser les corrélations qui mettent à jour les relations potentielles entre les jeux de données. Il serait toutefois intéressant de compléter les résultats obtenus par ce type d'approche pour les confronter à ceux déjà obtenus avec MiBiOmics. MiBiOmics présente ainsi l'avantage de conserver des bactéries ou métabolites qui ne sont pas significativement impactés par la condition étudiée, ce qui facilite l'identification de nouveaux biomarqueurs des phénomènes étudiés. Un autre avantage non négligeable de cette application est sa simplicité d'utilisation, sans nécessité

de connaissance en codage. Dans notre cas, son utilisation a permis de mettre à jour des groupes de bactéries qui n'avaient pas forcément de fortes variations d'abondance entre les groupes mais qui s'avéraient être de potentiels biomarqueurs de l'élévation précoce du stress oxydant hypothalamique en réponse au changement de régime. Cette approche au niveau de la composition pourrait être complétée par une identification de groupes d'activités métaboliques prédites, en utilisant MiBiOmics avec des résultats de prédiction métabolique obtenus par exemple avec PICRUSt2 [460]. Toutefois, comme vu dans le chapitre 3 partie II, cette approche reste prédictive et basée sur les résultats de séquençage 16S : elle doit être complétée ou confortée par une analyse biologique de l'activité bactérienne, par exemple en dosant les AGCCs, dont les variations de concentrations n'ont pas été traduites par des variations d'activité de fermentation par PICRUSt2. L'identification de groupes de bactéries ou de métabolites bactériens comme biomarqueurs des modifications de prise alimentaire est pertinente car elle permet d'identifier de potentiels écosystèmes qui auront, ensemble, une activité commune, d'après le faible nombre de métabolites bactériens liés aux groupes de bactéries identifiés dans le chapitre 1. Cette approche paraît plus adaptée dans le cadre d'une analyse exploratoire comme celle menée au cours de ma thèse.

Conclusion

L'objectif principal de ma thèse était (i) de déterminer si le microbiote intestinal, par ses variations de composition et/ou d'activité métabolique, était capable de moduler la prise alimentaire lors du passage d'un régime standard à un WD chez le rongeur et (ii) si oui, par quels mécanismes.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont mis en évidence que le microbiote était impacté fortement et de façon très précoce, à la fois en termes de composition (dès 1 jour) et en termes d'activité métabolique (dès 2h), par l'introduction d'un WD. L'alternance de plusieurs cycles de WD altérait la composition du microbiote même après retour à un régime standard. Ces variations précoces étaient similaires entre les expériences malgré les variations de conditions d'expérimentation et indiquaient une évolution vers un profil de microbiote enrichi en bactéries retrouvées dans des contextes de maladies pro-inflammatoires et appauvri en bactéries bénéfiques pour l'hôte. Le microbiote modifié, notamment par plusieurs expositions au WD, était capable d'induire une augmentation de la motivation à manger durant la première heure de consommation de WD, suggérant un rôle du microbiote dans la régulation hédonique de la prise alimentaire à très court terme lors de la consommation d'aliments palatables. En parallèle, nous n'avons pas mesuré d'impact du microbiote sur les adaptations du comportement alimentaire après la phase d'hyperphagie. Le rôle du microbiote intestinal sur la physiologie et le comportement alimentaire est donc différent lors d'exposition à très court terme, au moment de l'introduction d'un aliment palatable, ou dans le contexte d'une consommation chronique de l'aliment.

Nous avons également montré que la composition initiale du microbiote intestinal semble prédictive du comportement alimentaire lors du changement de régime. Quelques biomarqueurs bactériens ont été mis à jour suite à la séparation des animaux selon leur ingéré alimentaire lors de la phase d'hyperphagie mais ces travaux demandent à être approfondis. Un rôle du microbiote sur la régulation transcriptionnelle des EECs, spécifique du caecum a également été montré, suggérant que des modifications de la régulation de la satiété par le microbiote sont également possibles, même si des travaux complémentaires doivent être menés pour évaluer les conséquences en termes de comportement alimentaire de ces résultats.

Les travaux de ma thèse ont ainsi permis de déterminer que le microbiote, dont la composition et l'activité sont rapidement modifiés, est impliqué dans la régulation hédonique de la prise alimentaire lors des premières heures d'introduction du WD. Les variations du microbiote pourraient également être impliquées dans l'induction précoce de l'inflammation hypothalamique par l'intermédiaire du stress oxydant. Cette découverte, en association avec son rôle dans la motivation à manger après plusieurs expositions au WD et sa composition qui peut être prédictive de la prise alimentaire lors des premières heures de changement de régime, ouvrent la voie vers de nouvelles pistes

de prévention de l'obésité, en particulier dans un environnement ou les aliments palatables sont sur-représentés et disponibles à outrance. Une perspective intéressante serait d'évaluer au sein d'une cohorte humaine, en séparant les individus normo-pondérés des individus en surpoids, si la motivation à manger un WD dépend des paramètres de leur microbiote (composition ou activité par la mesure des AGCCs par exemple), afin de vérifier si les résultats obtenus chez le rongeur sont transposables chez l'Homme.

Bibliographie

1. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Obesity and Overweight Prevalence 1980-2015. 2017.

2. Diouf I, Charles MA, Ducimetière P, Basdevant A, Eschwege E, Heude B. Evolution of Obesity Prevalence in France: An Age-Period-Cohort Analysis. Epidemiology. 2010;21:360–5.

3. Charles M-A, Eschwege E, Basdevant A. Épidémiologie de l'obésité de l'adulte en France Les études Obépi 1997–2006. Obes. 2008;3:258–63.

4. Rankin J, Matthews L, Cobley S, Han A, Sanders R, Wiltshire HD, et al. Psychological consequences of childhood obesity: psychiatric comorbidity and prevention. AHMT. 2016;Volume 7:125–46.

5. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. J Clin Invest. 2011;121:2111–7.

6. Singh GM, Danaei G, Farzadfar F, Stevens GA, Woodward M, Wormser D, et al. The Age-Specific Quantitative Effects of Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Diabetes: A Pooled Analysis. PLoS ONE. 2013;8:e65174.

7. Czernichow S, Kengne A-P, Stamatakis E, Hamer M, Batty GD. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk? Evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies: Adiposity & mortality. Obesity Reviews. 2011;12:680–7.

8. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med. 2016;375:794–8.

9. Anandacoomarasamy A, Caterson I, Sambrook P, Fransen M, March L. The impact of obesity on the musculoskeletal system. Int J Obes. 2008;32:211–22.

10. Markowitz S, Friedman MA, Arent SM. Understanding the Relation Between Obesity and Depression: Causal Mechanisms and Implications for Treatment. Clin Psychol Sci & Pract. 2008;15:1–20.

11. Faith MS, Matz PE, Jorge MA. Obesity–depression associations in the population. Journal of Psychosomatic Research. 2002;53:935–42.

12. Milaneschi Y, Lamers F, Bot M, Drent ML, Penninx BWJH. Leptin Dysregulation Is Specifically Associated With Major Depression With Atypical Features: Evidence for a Mechanism Connecting Obesity and Depression. Biological Psychiatry. 2017;81:807–14.

13. Schachter J, Martel J, Lin C-S, Chang C-J, Wu T-R, Lu C-C, et al. Effects of obesity on depression: A role for inflammation and the gut microbiota. Brain, Behavior, and Immunity. 2018;69:1–8.

14. Ministère de l'Economie et des Finances. Obésité : quelles conséquences pour l'économie et comment les limiter ? Trésor Eco. 2016;179.

15. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. PharmacoEconomics. 2015;33:673–89.

16. Bellisari A. Evolutionary origins of obesity. Obesity Reviews. 2008;9:165–80.

17. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. Obesity. 2006;14:529–644.

18. Feinleib M, Garrison RJ, Fabsitz R, Christian JC, Hrubec Z, Borhani NO, et al. THE NHLBI TWIN STUDY OF CARDIOVASCULAR DISEASE RISK FACTORS: METHODOLOGY AND SUMMARY OF RESULTS. American Journal of Epidemiology. 1977;106:284–95.

19. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. The American Journal of Clinical Nutrition. 2008;87:398–404.

20. Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S, et al. Heterozygosity for a *POMC* -Null Mutation and Increased Obesity Risk in Humans. Diabetes. 2006;55:2549–53.

21. Thaker VV. GENETIC AND EPIGENETIC CAUSES OF OBESITY. 2018;:26.

22. Brownell KD, Kersh R, Ludwig DS, Post RC, Puhl RM, Schwartz MB, et al. Personal Responsibility And Obesity: A Constructive Approach To A Controversial Issue. Health Affairs. 2010;29:379–87.

23. Cifani C, Polidori C, Melotto S, Ciccocioppo R, Massi M. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and midazolam. Psychopharmacology. 2009;204:113–25.

24. Cifani C, Di Bonaventura MVM, Ciccocioppo R, Massi M. Binge Eating in Female Rats Induced by Yo-Yo Dieting and Stress. In: Avena NM, editor. Animal Models of Eating Disorders. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 27–49. doi:10.1007/978-1-62703-104-2_3.

25. Quinn DM, Puhl RM, Reinka MA. Trying again (and again): Weight cycling and depressive symptoms in U.S. adults. PLoS ONE. 2020;15:e0239004.

26. Koplan JP. Caloric Imbalance and Public Health Policy. JAMA. 1999;282:1579.

27. Castetbon K, Vernay M, Malon A, Salanave B, Deschamps V, Roudier C, et al. Dietary intake, physical activity and nutritional status in adults: the French nutrition and health survey (ENNS, 2006–2007). British Journal of Nutrition. 2009;102:733–43.

28. Zins MZ. The Constances cohort. European Journal of Public Health. 2019;29 Supplement_4:ckz185.548.

29. Sarwer DB, Dilks RJ, West-Smith L. Dietary intake and eating behavior after bariatric surgery: threats to weight loss maintenance and strategies for success. Surgery for Obesity and Related Diseases. 2011;7:644–51.

30. Sandoval DA. Mechanisms for the metabolic success of bariatric surgery. J Neuroendocrinol. 2019;31:e12708.

31. Woods SC. Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis. Science. 1998;280:1378–83.

32. Berthoud H-R, Münzberg H, Morrison CD. Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. Gastroenterology. 2017;152:1728–38.

33. Ferrario CR, Labouèbe G, Liu S, Nieh EH, Routh VH, Xu S, et al. Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. J Neurosci. 2016;36:11469–81.

34. Contreras-Rodríguez O, Vilar-López R, Andrews ZB, Navas JF, Soriano-Mas C, Verdejo-García A. Altered cross-talk between the hypothalamus and non-homeostatic regions linked to obesity and difficulty to lose weight. Sci Rep. 2017;7:9951.

35. Sørensen LB, Møller P, Flint A, Martens M, Raben A. Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. Int J Obes. 2003;27:1152–66.

36. Wang G-J, Volkow ND, Telang F, Jayne M, Ma J, Rao M, et al. Exposure to appetitive food stimuli markedly activates the human brain. NeuroImage. 2004;21:1790–7.

37. Morris JS, Dolan RJ. Involvement of Human Amygdala and Orbitofrontal Cortex in Hunger-Enhanced Memory for Food Stimuli. The Journal of Neuroscience. 2001;21:5304–10.

38. Stice E, Yokum S, Bohon C, Marti N, Smolen A. Reward circuitry responsivity to food predicts future increases in body mass: Moderating effects of DRD2 and DRD4. NeuroImage. 2010;50:1618–25.

39. Stice E, Yokum S, Burger KS, Epstein LH, Small DM. Youth at Risk for Obesity Show Greater Activation of Striatal and Somatosensory Regions to Food. Journal of Neuroscience. 2011;31:4360–6.

40. Stice E, Yokum S. Neural vulnerability factors that increase risk for future weight gain. Psychological Bulletin. 2016;142:447–71.

41. Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C. Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. Neuroscience. 2005;133:293–303.

42. Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C. A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. European Journal of Neuroscience. 2005;22:2855–62.

43. Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M, Perello M. Acute High Fat Diet Consumption Activates the Mesolimbic Circuit and Requires Orexin Signaling in a Mouse Model. PLOS ONE. 2014;9:e87478.

44. Benani A, Hryhorczuk C, Gouaze A, Fioramonti X, Brenachot X, Guissard C, et al. Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice. Journal of Neuroscience. 2012;32:11970–9.

45. Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. Nat Neurosci. 2001;4:605–11.

46. Williams LM, Campbell FM, Drew JE, Koch C, Hoggard N, Rees WD, et al. The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases. PLoS ONE. 2014;9:e106159.

47. Dourmashkin JT, Chang G-Q, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague–Dawley rats. Physiology & Behavior. 2006;87:666–78.

48. Vaanholt LM, Sinclair RE, Mitchell SE, Speakman JR. Factors influencing individual variability in high fat diet-induced weight gain in out-bred MF1 mice. Physiology & Behavior. 2015;144:146–55.

49. Ahima RS, Antwi DA. Brain Regulation of Appetite and Satiety. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2008;37:811–23.

50. Eliasson B, Rawshani A, Axelsen M, Hammarstedt A, Smith U. Cephalic phase of insulin secretion in response to a meal is unrelated to family history of type 2 diabetes. PLoS ONE. 2017;12:e0173654.

51. Wilkinson M, Imran SA. Clinical Neuroendocrinology: An Introduction. 1st edition. Cambridge University Press; 2018. doi:10.1017/9781108149938.

52. Wang Q-P, Guan J-L, Pan W, Kastin AJ, Shioda S. A Diffusion Barrier Between the Area Postrema and Nucleus Tractus Solitarius. Neurochem Res. 2008;33:2035–43.

53. Horvath TL, Sarman B, Garcia-Caceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107:14875–80.

54. Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, et al. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. Nat Neurosci. 2014;17:908–10.

55. MacDonald AJ, Holmes FE, Beall C, Pickering AE, Ellacott KLJ. Regulation of food intake by astrocytes in the brainstem dorsal vagal complex. Glia. 2020;68:1241–54.

56. NamKoong C, Song WJ, Kim CY, Chun DH, Shin S, Sohn J-W, et al. Chemogenetic manipulation of parasympathetic neurons (DMV) regulates feeding behavior and energy metabolism. Neuroscience Letters. 2019;712:134356.

57. Ilnytska O, Argyropoulos G. The Role of the Agouti-Related Protein in Energy Balance Regulation. Cell Mol Life Sci. 2008;65:2721–31.

58. Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2002;16:623–37.

59. Schwartz GJ. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. Phil Trans R Soc B. 2006;361:1275–80.

60. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nat Neurosci. 2005;8:571–8.

61. Thorens B. Sensing of Glucose in the Brain. In: Joost H-G, editor. Appetite Control. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 277–94. doi:10.1007/978-3-642-24716-3_12.

62. Dallaporta M, Himmi T, Perrin J, Orsini J-C. Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level: NeuroReport. 1999;10:2657–60.

63. Blouet C, Schwartz GJ. Brainstem Nutrient Sensing in the Nucleus of the Solitary Tract Inhibits Feeding. Cell Metabolism. 2012;16:579–87.

64. Jordi J, Herzog B, Camargo SMR, Boyle CN, Lutz TA, Verrey F. Specific amino acids inhibit food intake via the area postrema or vagal afferents: Most anorectic amino acids. The Journal of Physiology. 2013;591:5611–21.

65. Berthoud H-R. The vagus nerve, food intake and obesity. Regulatory Peptides. 2008;149:15–25.

66. Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG. Evidence That the Caudal Brainstem Is a Target for the Inhibitory Effect of Leptin on Food Intake. Endocrinology. 2002;143:239–46.

67. Hisadome K, Reimann F, Gribble FM, Trapp S. Leptin Directly Depolarizes Preproglucagon Neurons in the Nucleus Tractus Solitarius: Electrical Properties of Glucagon-Like Peptide 1 Neurons. Diabetes. 2010;59:1890–8.

68. Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptors in the brain: controlling food intake and body weight. Journal of Clinical Investigation. 2014;124:4223–6.

69. Blevins JE, Eakin TJ, Murphy JA, Schwartz MW, Baskin DG. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. Brain Research. 2003;993:30–41.

70. Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. Nutrition & Metabolism. 2007;4:18.

71. Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB, Elmquist JK. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. J Comp Neurol. 2003;457:213–35.

72. Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang J -e., Lin S, Bao J, et al. Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively. Journal of Neuroscience. 2013;33:3624–32.

73. Jean A. Le noyau du faisceau solitaire: Aspects neuroanatomiques, neurochimiques et fonctionnels. Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique. 1991;99:A3–52.

74. Chowen JA, Argente-Arizón P, Freire-Regatillo A, Frago LM, Horvath TL, Argente J. The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. Progress in Neurobiology. 2016;144:68–87.

75. Garduño J, Hernández-López S, Rolón DC, de la Cruz L, Hernández-Vázquez F, Reyes-Vaca A, et al. Electrophysiological characterization of glucose sensing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of male rats. Neuroscience Letters. 2019;703:168–76.

76. Elizondo-Vega RJ, Recabal A, Oyarce K. Nutrient Sensing by Hypothalamic Tanycytes. Front Endocrinol. 2019;10:244.

77. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central Administration of Oleic Acid Inhibits Glucose Production and Food Intake. Diabetes. 2002;51:271–5.

78. Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH. Effects of Oleic Acid on Distinct Populations of Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Are Dependent on Extracellular Glucose Levels. Journal of Neurophysiology. 2006;95:1491–8.

79. Le Foll C, Dunn-Meynell A, Musatov S, Magnan C, Levin BE. FAT/CD36: A Major Regulator of Neuronal Fatty Acid Sensing and Energy Homeostasis in Rats and Mice. Diabetes. 2013;62:2709–16.

80. Jo Y-H, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Chua S. Oleic Acid Directly Regulates POMC Neuron Excitability in the Hypothalamus. Journal of Neurophysiology. 2009;101:2305–16.

81. Duerrschmid C, He Y, Wang C, Li C, Bournat JC, Romere C, et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. Nat Med. 2017;23:1444–53.

82. Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG, Cole CR, Ziegler TR. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. Nutrition. 2011;27:269–75.

83. Blevins JE, Baskin DG. Hypothalamic-Brainstem Circuits Controlling Eating. In: Langhans W, Geary N, editors. Forum of Nutrition. Basel: KARGER; 2009. p. 133–40. doi:10.1159/000264401.

84. Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. NEUROPEPTIDE Y AND HUMAN PANCREATIC POLYPEPTIDE STIMULATE FEEDING BEHAVIOR IN RATS. Endocrinology. 1984;115:427–9.

85. Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1985;82:3940–3.

86. Morley JE. Neuropeptide Regulation of Appetite and Weight*. Endocrine Reviews. 1987;8:256–87.

87. Corp ES, Melville LD, Greenberg D, Gibbs J, Smith GP. Effect of fourth ventricular neuropeptide Y and peptide YY on ingestive and other behaviors. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1990;259:R317–23.

88. Lynch M, Milligan BG. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology. 1994;3:91–9.

89. Stricker-Krongrad A, Max JP, Musse N, Nicolas JP, Burlet C, Beck B. Increased threshold concentrations of neuropeptide Y for a stimulatory effect on food intake in obese Zucker rats — changes in the microstructure of the feeding behavior. Brain Research. 1994;660:162–6.

90. Morselli LL, Claflin KE, Cui H, Grobe JL. Control of Energy Expenditure by AgRP Neurons of the Arcuate Nucleus: Neurocircuitry, Signaling Pathways, and Angiotensin. Curr Hypertens Rep. 2018;20:25.

91. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature. 2001;411:480–4.

92. Krashes MJ, Lowell BB, Garfield AS. Melanocortin-4 receptor–regulated energy homeostasis. Nat Neurosci. 2016;19:206–19.

93. Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. Physiology & Behavior. 1981;27:1031–40.

94. Foster MT, Song CK, Bartness TJ. Hypothalamic Paraventricular Nucleus Lesion Involvement in the Sympathetic Control of Lipid Mobilization. Obesity. 2010;18:682–9.

95. Shimizu N, Oomura Y, Plata-Salamán CR, Morimoto M. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. Brain Research. 1987;416:153–6.

96. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. Nat Neurosci. 2003;6:736–42.

97. Stuber GD, Wise RA. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. Nature Neuroscience. 2016;19:198–205.

98. Schneeberger M, Parolari L, Das Banerjee T, Bhave V, Wang P, Patel B, et al. Regulation of Energy Expenditure by Brainstem GABA Neurons. Cell. 2019;178:672-685.e12.

99. Kong D, Tong Q, Ye C, Koda S, Fuller PM, Krashes MJ, et al. GABAergic RIP-Cre Neurons in the Arcuate Nucleus Selectively Regulate Energy Expenditure. Cell. 2012;151:645–57.

100. Pandit R, Beerens S, Adan RAH. Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2017;312:R938–47.

101. Teske JA, Mavanji V. Energy Expenditure. In: Vitamins & Hormones. Elsevier; 2012. p. 91–109. doi:10.1016/B978-0-12-394623-2.00006-8.

102. Shi Y-C, Lau J, Lin Z, Zhang H, Zhai L, Sperk G, et al. Arcuate NPY Controls Sympathetic Output and BAT Function via a Relay of Tyrosine Hydroxylase Neurons in the PVN. Cell Metabolism. 2013;17:236–48.

103. Berthoud H-R. Neural control of appetite: cross-talk between homeostatic and non-homeostatic systems. Appetite. 2004;43:315–7.

104. Kelley AE, Schiltz CA, Landry CF. Neural systems recruited by drug- and food-related cues: Studies of gene activation in corticolimbic regions. Physiology & Behavior. 2005;86:11–4.

105. Peciña S, Smith KS, Berridge KC. Hedonic Hot Spots in the Brain. Neuroscientist. 2006;12:500–11.

106. Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JCG. CNS regulation of appetite. Neuropharmacology. 2012;63:3–17.

107. Squire LR. Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. Psychological Reviews. 1992;99:195–231.

108. Neylan TC, Scoville WB, Milner B. Memory and the Medial Temporal Lobe: Patient H. M. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2000;:11.

109. Lathe R. Hormones and the hippocampus. Journal of Endocrinology. 2001;169:205–31.

110. Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS, Alaynick WA, Marck BT, Matsumoto AM, et al. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. PNAS. 1999;96:12138–43.

111. Palmiter RD. Dopamine Signaling in the Dorsal Striatum Is Essential for Motivated Behaviors. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008;:35–46.

112. Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. Nat Neurosci. 2010;13:635–41.

113. Mitchell MR, Berridge KC, Mahler SV. Endocannabinoid-Enhanced "Liking" in Nucleus Accumbens Shell Hedonic Hotspot Requires Endogenous Opioid Signals. Cannabis and Cannabinoid Research. 2018;3:166–70.

114. Kirkham TC. Cannabinoids and appetite: Food craving and food pleasure. International Review of Psychiatry. 2009;21:163–71.

115. Nummenmaa L, Saanijoki T, Tuominen L, Hirvonen J, Tuulari JJ, Nuutila P, et al. μ-opioid receptor system mediates reward processing in humans. Nat Commun. 2018;9:1500.

116. Holtzman SG. Tolerance to the stimulant effects of morphine and pentazocine on avoidance responding in the rat. Psychopharmacologia. 1974;39:23–37.

117. Gonzalez-Nunez V, González AJ, Barreto-Valer K, Rodríguez RE. In Vivo Regulation of the μ Opioid Receptor: Role of the Endogenous Opioid Agents. Mol Med. 2013;19:7–17.

118. Pickel VM, Sumal KK, Beckley SC, Miller RJ, Reis DJ. Immunocytochemical localization of enkephalin in the neostriatum of rat brain: A light and electron microscopic study. J Comp Neurol. 1980;189:721–40.

119. Mansour A, Khachaturien H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain: The Journal of Neuroscience. 1987;7:2445–64.

120. Verty ANA, McFarlane JR, McGregor IS, Mallet PE. Evidence for an Interaction between CB1 Cannabinoid and Melanocortin MCR-4 Receptors in Regulating Food Intake. Endocrinology. 2004;145:3224–31.

121. Lutter M, Nestler EJ. Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. The Journal of Nutrition. 2009;139:629–32.

122. Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu Z-W, Gao X-B, et al. Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. Neuron. 2006;51:801–10.

123. Skibicka KP. The central GLP-1: implications for food and drug reward. Front Neurosci. 2013;7. doi:10.3389/fnins.2013.00181.

124. Perello M, Dickson SL. Ghrelin Signalling on Food Reward: A Salient Link Between the Gut and the Mesolimbic System. J Neuroendocrinol. 2015;27:424–34.

125. Han W, Tellez LA, Perkins MH, Perez IO, Qu T, Ferreira J, et al. A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. Cell. 2018;175:665-678.e23.

126. Pelchat ML. Of human bondage: Food craving, obsession, compulsion, and addiction. 2002;:6.

127. de Araujo IE, Ren X, Ferreira JG. Metabolic Sensing in Brain Dopamine Systems. In: Meyerhof W, Beisiegel U, Joost H-G, editors. Sensory and Metabolic Control of Energy Balance. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 69–86. doi:10.1007/978-3-642-14426-4_7.

128. Spence C, Okajima K, Cheok AD, Petit O, Michel C. Eating with our eyes: From visual hunger to digital satiation. Brain and Cognition. 2016;110:53–63.

129. Kawamura Y, Yamamoto T. Studies on neural mechanisms of the gustatory-salivary reflex in rabbits. The Journal of Physiology. 1978;285:35–47.

130. Oliveira-Maia AJ, Roberts CD, Simon SA, Nicolelis MAL. Gustatory and reward brain circuits in the control of food intake. In: Pickard JD, Akalan N, Benes V, Di Rocco C, Dolenc VV, Antunes JL, et al., editors. Advances and Technical Standards in Neurosurgery. Vienna: Springer Vienna; 2011. p. 31–59. doi:10.1007/978-3-7091-0179-7_3.

131. de Araujo IE, Oliveira-Maia AJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MAL, et al. Food Reward in the Absence of Taste Receptor Signaling. Neuron. 2008;57:930–41.

132. Kleberg K, Jacobsen AK, Ferreira JG, Windeløv JA, Rehfeld JF, Holst JJ, et al. Sensing of triacylglycerol in the gut: different mechanisms for fatty acids and 2-monoacylglycerol: Sensing of triacylglycerol in the gut. The Journal of Physiology. 2015;593:2097–109.

133. Cansell C, Castel J, Denis RGP, Rouch C, Delbes A-S, Martinez S, et al. Dietary triglycerides act on mesolimbic structures to regulate the rewarding and motivational aspects of feeding. Mol Psychiatry. 2014;19:1095–105.

134. Berland C, Montalban E, Perrin E, Di Miceli M, Nakamura Y, Martinat M, et al. Circulating Triglycerides Gate Dopamine-Associated Behaviors through DRD2-Expressing Neurons. Cell Metabolism. 2020;31:773-790.e11.

135. Monteiro R, Azevedo I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. Mediators of Inflammation. 2010;2010:1–10.

136. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. Endocrinology. 2005;146:4192–9.

137. Carson MJ, Cameron Thrash J, Walter B. The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. Clinical Neuroscience Research. 2006;6:237–45.

138. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest. 2012;122:153–62.

139. Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. Cell Reports. 2014;9:2124–38.

140. Douglass JD, Dorfman MD, Fasnacht R, Shaffer LD, Thaler JP. Astrocyte IKKβ/NF-κB signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. Molecular Metabolism. 2017;6:366–73.

141. Kim JD, Yoon NA, Jin S, Diano S. Microglial UCP2 Mediates Inflammation and Obesity Induced by High-Fat Feeding. Cell Metabolism. 2019;30:952-962.e5.

142. Valdearcos M, Douglass JD, Robblee MM, Dorfman MD, Stifler DR, Bennett ML, et al. Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. Cell Metabolism. 2017;26:185-197.e3.

143. Lee D, Thaler JP, Berkseth KE, Melhorn SJ, Schwartz MW, Schur EA. Longer T_2 relaxation time is a marker of hypothalamic gliosis in mice with diet-induced obesity. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2013;304:E1245–50.

144. Cazettes F, Cohen JI, Yau PL, Talbot H, Convit A. Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake. Brain Research. 2011;1373:101–9.

145. Schur EA, Melhorn SJ, Oh S-K, Lacy JM, Berkseth KE, Guyenet SJ, et al. Radiologic evidence that hypothalamic gliosis is associated with obesity and insulin resistance in humans: Hypothalamic Gliosis in Humans. Obesity. 2015;23:2142–8.

146. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 Anti-Inflammatory Activity Links Exercise to Hypothalamic Insulin and Leptin Sensitivity through IKKβ and ER Stress Inhibition. PLoS Biol. 2010;8:e1000465.

147. van de Sande-Lee S, Pereira FRS, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, et al. Partial Reversibility of Hypothalamic Dysfunction and Changes in Brain Activity After Body Mass Reduction in Obese Subjects. Diabetes. 2011;60:1699–704.

148. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2011;1813:878–88.

149. Kim JS, Kirkland RA, Lee SH, Cawthon CR, Rzepka KW, Minaya DM, et al. Gut microbiota composition modulates inflammation and structure of the vagal afferent pathway. Physiology & Behavior. 2020;225:113082.

150. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKβ/NF-κB and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. Cell. 2008;135:61–73.

151. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2009;296:E1003–12.

152. Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, et al. Inhibition of Hypothalamic Inflammation Reverses Diet-Induced Insulin Resistance in the Liver. 2012;:8.

153. André C, Guzman-Quevedo O, Rey C, Rémus-Borel J, Clark S, Castellanos-Jankiewicz A, et al. Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. Diabetes. 2017;66:908–19.

154. Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, Cai D. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108:2939–44.

155. Meng Q, Cai D. Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the IκB Kinase β (IKKβ)/NF-κB Pathway. J Biol Chem. 2011;286:32324–32.

156. Li J, Tang Y, Cai D. IKKβ/NF-κB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. Nat Cell Biol. 2012;14:999–1012.

157. Oh-I S, Thaler JP, Ogimoto K, Wisse BE, Morton GJ, Schwartz MW. Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2010;299:E47–53.

158. Tsaousidou E, Paeger L, Belgardt BF, Pal M, Wunderlich CM, Brönneke H, et al. Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. Cell Reports. 2014;9:1495–506.

159. Cansell C, Stobbe K, Sanchez C, Le Thuc O, Mosser C, Ben-Fradj S, et al. Dietary fat exacerbates postprandial hypothalamic inflammation involving glial fibrillary acidic protein-positive cells and microglia in male mice. Glia. 2020;69:42–60.

160. Waise TMZ, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, et al. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015;464:1157–62.

161. Balland E, Cowley MA. Short-term high-fat diet increases the presence of astrocytes in the hypothalamus of C57BL6 mice without altering leptin sensitivity. J Neuroendocrinol. 2017;29:e12504.

162. Buckman LB, Thompson MM, Lippert RN, Blackwell TS, Yull FE, Ellacott KLJ. Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. Molecular Metabolism. 2015;4:58–63.

163. Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, Han D-Y, Wellhauser L, Liu Y, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF-α on appetite-regulating NPY neurons. Int J Obes. 2017;41:149–58.

164. Terrien J, Seugnet I, Seffou B, Herrero MJ, Bowers J, Chamas L, et al. Reduced central and peripheral inflammatory responses and increased mitochondrial activity contribute to diet-induced obesity resistance in WSB/EiJ mice. Sci Rep. 2019;9:19696.

165. Morari J, Anhe GF, Nascimento LF, de Moura RF, Razolli D, Solon C, et al. Fractalkine (CX3CL1) Is Involved in the Early Activation of Hypothalamic Inflammation in Experimental Obesity. Diabetes. 2014;63:3770–84.

166. Moldawer LL, Andersson C, Gelin J, Lundholm KG. Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1988;254:G450–6.

167. Schöbitz B, Pezeshki G, Pohl T, Hemmann U, Heinrich PC, Holsboer F, et al. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. FASEB j. 1995;9:659–64.

168. Dwarkasing JT, Marks DL, Witkamp RF, van Norren K. Hypothalamic inflammation and food intake regulation during chronic illness. Peptides. 2016;77:60–6.

169. Olofsson LE, Unger EK, Cheung CC, Xu AW. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110:E697–706.

170. Picardi PK, Calegari VC, de Oliveira Prada P, Contin Moraes J, Araújo E, Gomes Marcondes MCC, et al. Reduction of Hypothalamic Protein Tyrosine Phosphatase Improves Insulin and Leptin Resistance in Diet-Induced Obese Rats. Endocrinology. 2008;149:3870–80.

171. Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R, Mori H, et al. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. Cell Metabolism. 2006;4:123–32.

172. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life And Death Decisions: Secondary Complexes and Lipid Rafts in TNF Receptor Family Signal Transduction. Immunity. 2004;21:461–5.

173. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, et al. High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons. PLoS ONE. 2009;4:e5045.

174. Skrzydelski D, Guyon A, Daugé V, Rovère C, Apartis E, Kitabgi P, et al. The chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 activates the nigrostriatal dopamine system. J Neurochem. 2007;102:1175–83.

175. Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon J-L, Blondeau N, Rovère C. Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. Frontiers in Endocrinology. 2017;8. doi:10.3389/fendo.2017.00197.

176. Le Thuc O, Blondeau N, Rouaud F, Poitou C, Clement K, Guyon A. Role of the chemokine RANTES/CCL5 in the establishment of high-fat diet- induced obesity in mice. 9th FENS Forum of Neuroscience Milan. 2014.

177. Kierdorf K, Prinz M. Microglia in steady state. Journal of Clinical Investigation. 2017;127:3201–9.

178. Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, García-Cáceres C, de la Fuente E, et al. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity: Hypothalamic Microglia in Obesity. Glia. 2014;62:17–25.

179. Lee CH, Shin SH, Kang GM, Kim S, Kim J, Yu R, et al. Cellular source of hypothalamic macrophage accumulation in diet-induced obesity. J Neuroinflammation. 2019;16:221.

180. Lee CH, Kim HJ, Lee Y-S, Kang GM, Lim HS, Lee S, et al. Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation. Cell Reports. 2018;25:934-946.e5.

181. Serrats J, Schiltz JC, García-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, Sawchenko PE. Dual Roles for Perivascular Macrophages in Immune-to-Brain Signaling. Neuron. 2010;65:94–106.

182. Kwon Y-H, Kim J, Kim C-S, Tu TH, Kim M-S, Suk K, et al. Hypothalamic lipid-laden astrocytes induce microglia migration and activation. FEBS Lett. 2017;591:1742–51.

183. Rahman MH, Kim M-S, Lee I-K, Yu R, Suk K. Interglial Crosstalk in Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation. Front Neurosci. 2018;12:939.

184. Takeuchi H, Suzumura A. Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. Front Cell Neurosci. 2014;8. doi:10.3389/fncel.2014.00189.

185. Sasaki T, Numano R, Yokota-Hashimoto H, Matsui S, Kimura N, Takeuchi H, et al. A central-acting connexin inhibitor, INI-0602, prevents high-fat diet-induced feeding pattern disturbances and obesity in mice. Mol Brain. 2018;11:28.

186. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. 2017;541:481–7.

187. Kim J, Kwon Y, Kim C, Tu TH, Kim B, Joe Y, et al. The involvement of 4-1BB/4-1BBL signaling in glial cell-mediated hypothalamic inflammation in obesity. FEBS Open Bio. 2018;8:843–53.

188. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. Int J Obes. 2011;35:1455–65.

189. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, et al. PTP1B Regulates Leptin Signal Transduction In Vivo. Developmental Cell. 2002;2:489–95.

190. Tsunekawa T, Banno R, Mizoguchi A, Sugiyama M, Tominaga T, Onoue T, et al. Deficiency of PTP1B Attenuates Hypothalamic Inflammation via Activation of the JAK2-STAT3 Pathway in Microglia. EBioMedicine. 2017;16:172–83.

191. Amaral ME, Barbuio R, Milanski M, Romanatto T, Barbosa HC, Nadruz W, et al. Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. Journal of Neurochemistry. 2006;98:203–12.

192. Cavaliere G, Viggiano E, Trinchese G, De Filippo C, Messina A, Monda V, et al. Long Feeding High-Fat Diet Induces Hypothalamic Oxidative Stress and Inflammation, and Prolonged Hypothalamic AMPK Activation in Rat Animal Model. Front Physiol. 2018;9:818.

193. McLean FH, Campbell FM, Langston RF, Sergi D, Resch C, Grant C, et al. A high-fat diet induces rapid changes in the mouse hypothalamic proteome. Nutr Metab (Lond). 2019;16:26.

194. Kleinridders A, Schenten D, Könner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, et al. MyD88 Signaling in the CNS Is Required for Development of Fatty Acid-Induced Leptin Resistance and Diet-Induced Obesity. Cell Metabolism. 2009;10:249–59.

195. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. Journal of Neuroscience. 2009;29:359–70.

196. Benomar Y, Taouis M. Molecular Mechanisms Underlying Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation and Insulin Resistance: Pivotal Role of Resistin/TLR4 Pathways. Front Endocrinol. 2019;10:140.

197. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. Immunity. 1999;11:115–22.

198. L. Roth C, D'Ambrosio G, Elfers C. Activation of nuclear factor Kappa B pathway and reduction of hypothalamic oxytocin following hypothalamic lesions. J Integr Syst Neurosci. 2016;2:79–84.

199. Ehlting C, Lai WS, Schaper F, Brenndörfer ED, Matthes R-J, Heinrich PC, et al. Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) mRNA Stability by TNF-α Involves Activation of the MKK6/p38 ^{MAPK} /MK2 Cascade. J Immunol. 2007;178:2813–26.

200. Wunderlich CM, Hövelmeyer N, Wunderlich FT. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. JAK-STAT. 2013;2:e23878.

201. Basu R, Whitley SK, Bhaumik S, Zindl CL, Schoeb TR, Benveniste EN, et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell–iTreg cell balance. Nat Immunol. 2015;16:286–95.

202. He Y, Sun S, Sha H, Liu Z, Yang L, Xue Z, et al. Emerging Roles for XBP1, a sUPeR Transcription Factor. gene expr. 2010;15:13–25.

203. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. Cell Metabolism. 2009;9:35–51.

204. Williams KW, Liu T, Kong X, Fukuda M, Berglund ED, Deng Z, et al. Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis. 2015;:25.

205. Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu S-W, Kim E-K. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. Autophagy. 2016;12:2009–25.

206. Murphy EJ. The blood-brain barrier and protein-mediated fatty acid uptake: role of the blood-brain barrier as a metabolic barrier: An Editorial Comment for 'The blood-brain barrier fatty acid transport protein 1 (FATP1/SLC27A1) supplies docosahexaenoic acid to the brain, and insul. J Neurochem. 2017;141:324–9.

207. Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu W, Koliwad SK. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. 2015;:30.

208. Li J-M, Ge C-X, Xu M-X, Wang W, Yu R, Fan C-Y, et al. Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. Mol Nutr Food Res. 2015;59:189–202.

209. Gao Y, Bielohuby M, Fleming T, Grabner GF, Foppen E, Bernhard W, et al. Dietary sugars, not lipids, drive hypothalamic inflammation. Molecular Metabolism. 2017;6:897–908.

210. Campolim CM, Weissmann L, Ferreira CK de O, Zordão OP, Dornellas APS, de Castro G, et al. Short-term exposure to air pollution (PM2.5) induces hypothalamic inflammation, and long-term leads to leptin resistance and obesity via Tlr4/Ikbke in mice. Sci Rep. 2020;10:10160.

211. Kreutzer C, Peters S, Schulte DM, Fangmann D, Türk K, Wolff S, et al. Hypothalamic Inflammation in Human Obesity Is Mediated by Environmental and Genetic Factors. Diabetes. 2017;66:2407–15.

212. Cawthon CR, de La Serre CB. Gut bacteria interaction with vagal afferents. Brain Research. 2018;1693:134–9.

213. de La Serre CB, de Lartigue G, Raybould HE. Chronic exposure to Low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons. Physiology & Behavior. 2015;139:188–94.

214. Rapuano KM, Laurent JS, Hagler DJ, Hatton SN, Thompson WK, Jernigan TL, et al. Nucleus accumbens cytoarchitecture predicts weight gain in children. Proc Natl Acad Sci USA. 2020;117:26977–84.

215. Ho PP, Steinman L. Obeticholic acid, a synthetic bile acid agonist of the farnesoid X receptor, attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113:1600–5.

216. Ducastel S, Touche V, Trabelsi M-S, Boulinguiez A, Butruille L, Nawrot M, et al. The nuclear receptor FXR inhibits Glucagon-Like Peptide-1 secretion in response to microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids. Sci Rep. 2020;10:174.

217. Hucke S, Herold M, Liebmann M, Freise N, Lindner M, Fleck A-K, et al. The farnesoid-X-receptor in myeloid cells controls CNS autoimmunity in an IL-10-dependent fashion. Acta Neuropathol. 2016;132:413–31.

218. Nogueira G, Solon C, Carraro RS, Engel DF, Ramalho AF, Sidarta-Oliveira D, et al. Interleukin-17 acts in the hypothalamus reducing food intake. Brain, Behavior, and Immunity. 2020;87:272–85.

219. Li J-M, Yu R, Zhang L-P, Wen S-Y, Wang S-J, Zhang X-Y, et al. Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: a benefit of short-chain fatty acids. Microbiome. 2019;7:98.

220. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. Physiol Rev. 2010;90:46.

221. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol. 2016;14:e1002533.

222. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;464:59–65.

223. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. Genome Research. 2011;21:1616–25.

224. Beller L, Matthijnssens J. What is (not) known about the dynamics of the human gut virome in health and disease. Current Opinion in Virology. 2019;37:52–7.

225. Rasmussen TS, Mentzel CMJ, Kot W, Castro-Mejía JL, Zuffa S, Swann JR, et al. Faecal virome transplantation decreases symptoms of type 2 diabetes and obesity in a murine model. Gut. 2020;:gutjnl-2019-320005.

226. Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. Pre- and probiotic overview. Current Opinion in Pharmacology. 2018;43:87–92.

227. Shkoporov AN, Hill C. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. Cell Host & Microbe. 2019;25:195–209.

228. Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006;103:10011–6.

229. Tang J, Iliev ID, Brown J, Underhill DM, Funari VA. Mycobiome: Approaches to analysis of intestinal fungi. Journal of Immunological Methods. 2015;421:112–21.

230. Heisel T, Montassier E, Johnson A, Al-Ghalith G, Lin Y-W, Wei L-N, et al. High-Fat Diet Changes Fungal Microbiomes and Interkingdom Relationships in the Murine Gut. mSphere. 2017;2:mSphere.00351-17, e00351-17.

231. Rodríguez MM, Pérez D, Chaves FJ, Esteve E, Marin-Garcia P, Xifra G, et al. Obesity changes the human gut mycobiome. Scientific Reports. 2015;5:15.

232. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. Science. 2012;336:1314–7.

233. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature. 2009;457:480–4.

234. Lahti L, Salojärvi J, Salonen A, Scheffer M, de Vos WM. Tipping elements in the human intestinal ecosystem. Nat Commun. 2014;5:4344.

235. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature. 2011;473:174–80.

236. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. Science. 2011;334:105–8.

237. Knights D, Ward TL, McKinlay CE, Miller H, Gonzalez A, McDonald D, et al. Rethinking “Enterotypes.” Cell Host & Microbe. 2014;16:433–7.

238. Cheng M. Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2019;:9.

239. Reitmeier S, Kiessling S, Clavel T, List M, Almeida EL, Ghosh TS, et al. Arrhythmic Gut Microbiome Signatures Predict Risk of Type 2 Diabetes. Cell Host & Microbe. 2020;28:258-272.e6.

240. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489:220–30.

241. van de Guchte M, Blottière HM, Doré J. Humans as holobionts: implications for prevention and therapy. Microbiome. 2018;6:81.

242. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr. 2018;57:1–24.

243. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. Tissue Barriers. 2017;5:e1373208.

244. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. Science. 2012;336:1262–7.

245. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. Science. 2012;336:1268–73.

246. Thaiss CA, Itav S, Rothschild D, Meijer MT, Levy M, Moresi C, et al. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. Nature. 2016;540:544–51.

247. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444:1027–31.

248. Nieuwdorp M, Gilijamse PW, Pai N, Kaplan LM. Role of the Microbiome in Energy Regulation and Metabolism. Gastroenterology. 2014;146:1525–33.

249. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104:979–84.

250. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, et al. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. PLoS ONE. 2010;5:e12191.

251. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. The FASEB Journal. 2010;24:4948–59.

252. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101:15718–23.

253. Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006;444:1022–3.

254. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102:11070–5.

255. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature. 2013;500:541–6.

256. Sze MA, Schloss PD. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. mBio. 2016;7:e01018-16, /mbio/7/4/e01018-16.atom.

257. Yun Y. Comparative analysis of gut microbiota associated with body mass index in a large Korean cohort. 2017;:9.

258. Beaumont M, Goodrich JK, Jackson MA, Yet I, Davenport ER, Vieira-Silva S, et al. Heritable components of the human fecal microbiome are associated with visceral fat. Genome Biol. 2016;17:189.

259. Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. 2013;21:9.

260. Dominianni C, Sinha R, Goedert JJ, Pei Z, Yang L, Hayes RB, et al. Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome. PLoS ONE. 2015;10:e0124599.

261. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. Int J Obes. 2008;32:1720–4.

262. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. FEBS Letters. 2014;588:4223–33.

263. Finucane MM, Sharpton TJ, Laurent TJ, Pollard KS. A Taxonomic Signature of Obesity in the Microbiome? Getting to the Guts of the Matter. PLoS ONE. 2014;9:e84689.

264. Peters BA, Shapiro JA, Church TR, Miller G, Trinh-Shevrin C, Yuen E, et al. A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. Sci Rep. 2018;8:9749.

265. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? Nutrients. 2020;12:1474.

266. Zeng Q, Li D, He Y, Li Y, Yang Z, Zhao X, et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. Sci Rep. 2019;9:13424.

267. Amos GCA, Logan A, Anwar S, Fritzsche M, Mate R, Bleazard T, et al. Developing standards for the microbiome field. Microbiome. 2020;8:98.

268. Saglam F. Standardization of gut microbiota analysis: Variability in samples taken at different times from single case and the effect of the freezing the sample. International Journal of Infectious Diseases. 2018;:170.

269. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo J-P, Laiho A, et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. J Biomol Tech. 2017;28:19–30.

270. Parks BW, Nam E, Org E, Kostem E, Norheim F, Hui ST, et al. Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice. Cell Metabolism. 2013;17:141–52.

271. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, et al. Blautia genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. npj Biofilms Microbiomes. 2019;5:28.

272. Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. The ISME Journal. 2013;7:880–4.

273. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. Sci Transl Med. 2009;1:6ra14.

274. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. Cell Host & Microbe. 2015;17:72–84.

275. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature. 2014;505:559–63.

276. Leone V, Gibbons SM, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM, et al. Effects of Diurnal Variation of Gut Microbes and High-Fat Feeding on Host Circadian Clock Function and Metabolism. Cell Host & Microbe. 2015;17:681–9.

277. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, et al. Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. Cell. 2014;159:514–29.

278. Zarrinpar A, Chaix A, Yooseph S, Panda S. Diet and Feeding Pattern Affect the Diurnal Dynamics of the Gut Microbiome. Cell Metabolism. 2014;20:1006–17.

279. Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. Nature Reviews Endocrinology. 2017;13:11–25.

280. Breton J, Tennoune N, Lucas N, Francois M, Legrand R, Jacquemot J, et al. Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. Cell Metabolism. 2016;23:324–34.

281. Niimi K, Takahashi E. New system to examine the activity and water and food intake of germ-free mice in a sealed positive-pressure cage. Heliyon. 2019;5:e02176.

282. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. Gut. 2011;60:1214–23.

283. Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery-Induced Weight Loss: Links With Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. Diabetes. 2010;59:3049–57.

284. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106:2365–70.

285. Liou AP, Paziuk M, Luevano J-M, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved Shifts in the Gut Microbiota Due to Gastric Bypass Reduce Host Weight and Adiposity. Science Translational Medicine. 2013;5:178ra41-178ra41.

286. Fouladi F, Brooks AE, Fodor AA, Carroll IM, Bulik-Sullivan EC, Tsilimigras MCB, et al. The Role of the Gut Microbiota in Sustained Weight Loss Following Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. OBES SURG. 2019;29:1259–67.

287. Legrand R, Lucas N, Dominique M, Azhar S, Deroissart C, Le Solliec M-A, et al. Commensal Hafnia alvei strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management. Int J Obes. 2020;44:1041–51.

288. Kazemi A, Noorbala AA, Djafarian K. Effect of probiotic and prebiotic versus placebo on appetite in patients with major depressive disorder: *post hoc* analysis of a randomised clinical trial. J Hum Nutr Diet. 2020;33:56–65.

289. Falcinelli S, Rodiles A, Unniappan S, Picchietti S, Gioacchini G, Merrifield DL, et al. Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. Sci Rep. 2016;6:18061.

290. Bagarolli RA, Tobar N, Oliveira AG, Araújo TG, Carvalho BM, Rocha GZ, et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2017;50:16–25.

291. Archer BJ, Johnson SK, Devereux HM, Baxter AL. Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. Br J Nutr. 2004;91:591–9.

292. Cani PD, Joly E, Horsmans Y, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. Eur J Clin Nutr. 2006;60:567–72.

293. Hull S, Re R, Tiihonen K, Viscione L, Wickham M. Consuming polydextrose in a mid-morning snack increases acute satiety measurements and reduces subsequent energy intake at lunch in healthy human subjects. Appetite. 2012;59:706–12.

294. Astbury NM, Taylor MA, Macdonald IA. Polydextrose results in a dose-dependent reduction in *ad libitum* energy intake at a subsequent test meal. Br J Nutr. 2013;110:934–42.

295. King NA, Craig SAS, Pepper T, Blundell JE. Evaluation of the independent and combined effects of xylitol and polydextrose consumed as a snack on hunger and energy intake over 10 d. Br J Nutr. 2005;93:911–5.

296. Swartz TD, Sakar Y, Duca FA, Covasa M. Preserved adiposity in the Fischer 344 rat devoid of gut microbiota. FASEB j. 2013;27:1701–10.

297. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. Br J Nutr. 2010;104:919–29.

298. Lebrun B, Bariohay B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: A minireview. Autonomic Neuroscience. 2006;:9.

299. Schéle E, Grahnemo L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O. The Gut Microbiota Reduces Leptin Sensitivity and the Expression of the Obesity-Suppressing Neuropeptides Proglucagon (*Gcg*) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (*Bdnf*) in the Central Nervous System. Endocrinology. 2013;154:3643–51.

300. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108:3047–52.

301. Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DML, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. Diabetologia. 2012;55:2823–34.

302. Liu D. Antibiotics-induced perturbations in gut microbial diversity influence metabolic phenotypes in a murine model of high-fat diet-induced obesity. Appl Microbiol Biotechnol. 2019;:15.

303. Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, Liebisch G, Farzi A, Zenz G, et al. Anhedonia induced by high-fat diet in mice depends on gut microbiota and leptin. Nutritional Neuroscience. 2020;:1–14.

304. Fujisaka S, Ussar S, Clish C, Devkota S, Dreyfuss JM, Sakaguchi M, et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. Journal of Clinical Investigation. 2016;126:4430–43.

305. Economopoulos KP, Ward NL, Phillips CD, Teshager A, Patel P, Mohamed MM, et al. Prevention of antibiotic-associated metabolic syndrome in mice by intestinal alkaline phosphatase. Diabetes Obes Metab. 2016;18:519–27.

306. Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. Journal of Hepatology. 2008;49:821–30.

307. Dosoky NS, Chen Z, Guo Y, McMillan C, Flynn CR, Davies SS. Two-week administration of engineered Escherichia coli establishes persistent resistance to diet-induced obesity even without antibiotic pre-treatment. Appl Microbiol Biotechnol. 2019;103:6711–23.

308. Ye H, Li Q, Zhang Z, Sun M, Zhao C, Zhang T. Effect of a novel potential probiotic *Lactobacillus paracasei* Jlus66 isolated from fermented milk on nonalcoholic fatty liver in rats. Food Funct. 2017;8:4539–46.

309. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. Gastroenterology. 2012;143:913-916.e7.

310. Rehfeld JF. The New Biology of Gastrointestinal Hormones. Phys Rev. 1998;78:22.

311. Engelstoft MS, Egerod KL, Lund ML, Schwartz TW. Enteroendocrine cell types revisited. Current Opinion in Pharmacology. 2013;13:912–21.

312. Gupta A, Osadchiy V, Mayer EA. Brain–gut–microbiome interactions in obesity and food addiction. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020. doi:10.1038/s41575-020-0341-5.

313. Grunddal KV, Ratner CF, Svendsen B, Sommer F, Engelstoft MS, Madsen AN, et al. Neurotensin Is Coexpressed, Coreleased, and Acts Together With GLP-1 and PYY in Enteroendocrine Control of Metabolism. Endocrinology. 2016;157:176–94.

314. Brubaker PL. A Beautiful Cell (or Two or Three?). Endocrinology. 2012;153:2945–8.

315. Egerod KL, Engelstoft MS, Grunddal KV, Nøhr MK, Secher A, Sakata I, et al. A Major Lineage of Enteroendocrine Cells Coexpress CCK, Secretin, GIP, GLP-1, PYY, and Neurotensin but Not Somatostatin. Endocrinology. 2012;153:5782–95.

316. Lindqvist A, Shcherbina L, Fischer A-HT, Wierup N. Ghrelin Is a Regulator of Glucagon-Like Peptide 1 Secretion and Transcription in Mice. Frontiers in Endocrinology. 2017;8. doi:10.3389/fendo.2017.00135.

317. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. Annu Rev Physiol. 2016;78:277–99.

318. Moran TH, Kinzig KP. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2004;286:G183–8.

319. Bi S, Chen J, Behles RR, Hyun J, Kopin AS. Differential body weight and feeding responses to high fat diet in rats and mice lacking cholecystokinin 1 receptors. 2008;:18.

320. Lo C-M, Samuelson LC, Chambers JB, King A, Heiman J, Jandacek RJ, et al. Characterization of mice lacking the gene for cholecystokinin. 2008;294:8.

321. Lo C, King A, Samuelson LC, Kindel TL, Rider T, Jandacek RJ, et al. Cholecystokinin Knockout Mice Are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity. Gastroenterology. 2010;138:1997–2005.

322. Larsson LI, Rehfeld JF. Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract: Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity. Histochemistry. 1978;58:23–31.

323. McLaughlin JT, Lomax RB, Hall L, Dockray GJ, Thompson DG, Warhurst G. Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca^{2+}-dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. The Journal of Physiology. 1998;513:11–8.

324. Choi S, Lee M, Shiu AL, Yo SJ, Halldén G, Aponte GW. GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2007;292:G1366–75.

325. Blevins JE, Stanley BG, Reidelberger RD. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. Brain Research. 2000;860:1–10.

326. Sileikiene V, Mosenthin R, Bauer E, Piepho H-P, Tafaj M, Kruszewska D, et al. Effect of Ileal Infusion of Short-Chain Fatty Acids on Pancreatic Prandial Secretion and Gastrointestinal Hormones in Pigs: Pancreas. 2008;37:196–202.

327. Zhang X, Grosfeld A, Williams E, Vasiliauskas D, Barretto S, Smith L, et al. Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. FASEB j. 2019;33:7126–42.

328. Palazzo M, Balsari A, Rossini A, Selleri S, Calcaterra C, Gariboldi S, et al. Activation of Enteroendocrine Cells via TLRs Induces Hormone, Chemokine, and Defensin Secretion. J Immunol. 2007;178:4296–303.

329. McDermott JR, Leslie FC, D'Amato M, Thompson DG, Grencis RK, McLaughlin JT. Immune control of food intake: enteroendocrine cells are regulated by CD4+ T lymphocytes during small intestinal inflammation. Gut. 2006;55:492–7.

330. Fakhry J. Distribution and characterisation of CCK containing enteroendocrine cells of the mouse small and large intestine. Cell Tissue Res. 2017;369:245–53.

331. Brubaker PL. Minireview: Update on Incretin Biology: Focus on Glucagon-Like Peptide-1. Endocrinology. 2010;151:1984–9.

332. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, et al. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2. Diabetes. 2012;61:364–71.

333. Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? Proc Nutr Soc. 2015;74:328–36.

334. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. Gut. 2015;64:1744–54.

335. Chimerel C, Emery E, Summers DK, Keyser U, Gribble FM, Reimann F. Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells. Cell Reports. 2014;9:1202–8.

336. Harada K, Sada S, Sakaguchi H, Takizawa M, Ishida R, Tsuboi T. Bacterial metabolite S-equol modulates glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L cell line GLUTag cells via actin polymerization. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018;501:1009–15.

337. Lebrun LJ, Lenaerts K, Kiers D, Pais de Barros J-P, Le Guern N, Plesnik J, et al. Enteroendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1 Secretion. Cell Reports. 2017;21:1160–8.

338. Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R. Improvement of Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Sensitivity by Oligofructose Requires a Functional Glucagon-Like Peptide 1 Receptor. Diabetes. 2006;55:1484–90.

339. MacDonald PE, El-kholy W, Riedel MJ, Salapatek AMF, Light PE, Wheeler MB. The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. Diabetes. 2002;51 Supplement 3:S434–42.

340. Plamboeck A, Veedfald S, Deacon CF, Hartmann B, Wettergren A, Svendsen LB, et al. The effect of exogenous GLP-1 on food intake is lost in male truncally vagotomized subjects with pyloroplasty. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2013;304:G1117–27.

341. Krieger J-P, Arnold M, Pettersen KG, Lossel P, Langhans W, Lee SJ. Knockdown of GLP-1 receptors in vagal afferents affects normal food intake and glycemia. Diabetes. 2015;:db150973.

342. Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S. The Influence of GLP-1 on Glucose-Stimulated Insulin Secretion: Effects on -Cell Sensitivity in Type 2 and Nondiabetic Subjects. Diabetes. 2003;52:380–6.

343. Loh K, Zhang L, Brandon A, Wang Q, Begg D, Qi Y, et al. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. Molecular Metabolism. 2017;6:574–84.

344. Wichmann A, Allahyar A, Greiner TU, Plovier H, Lundén GÖ, Larsson T, et al. Microbial Modulation of Energy Availability in the Colon Regulates Intestinal Transit. Cell Host & Microbe. 2013;14:582–90.

345. Arora T, Akrami R, Pais R, Bergqvist L, Johansson BR, Schwartz TW, et al. Microbial regulation of the L cell transcriptome. Sci Rep. 2018;8:1207.

346. Trabelsi M-S, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. Nat Commun. 2015;6:7629.

347. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. Cell Metabolism. 2009;10:167–77.

348. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;329:386–90.

349. Calderon G, McRae A, Rievaj J, Davis J, Zandvakili I, Linker-Nord S, et al. Ileo-colonic delivery of conjugated bile acids improves glucose homeostasis via colonic GLP-1-producing enteroendocrine cells in human obesity and diabetes. EBioMedicine. 2020;55:102759.

350. Yang N, Dong Y-Q, Jia G-X, Fan S-M, Li S-Z, Yang S-S, et al. ASBT(SLC10A2): A promising target for treatment of diseases and drug discovery. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;132:110835.

351. Pols TWH, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J. The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. 2013;:22.

352. Svendsen B, Pedersen J, Albrechtsen NJW, Hartmann B, Toräng S, Rehfeld JF, et al. An Analysis of Cosecretion and Coexpression of Gut Hormones From Male Rat Proximal and Distal Small Intestine. 2015;:11.

353. Barchetta I, Cimini F, Capoccia D, Bertoccini L, Ceccarelli V, Chiappetta C, et al. Neurotensin Is a Lipid-Induced Gastrointestinal Peptide Associated with Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity. Nutrients. 2018;10:526.

354. Kalafatakis K, Triantafyllou K. Contribution of neurotensin in the immune and neuroendocrine modulation of normal and abnormal enteric function. Regulatory Peptides. 2011;170:7–17.

355. Stuhrman K, Roseberry AG. Neurotensin inhibits both dopamine- and GABA-mediated inhibition of ventral tegmental area dopamine neurons. Journal of Neurophysiology. 2015;114:1734–45.

356. Ratner C, Skov LJ, Raida Z, Bächler T, Bellmann-Sickert K, Le Foll C, et al. Effects of Peripheral Neurotensin on Appetite Regulation and Its Role in Gastric Bypass Surgery. Endocrinology. 2016;157:3482–92.

357. Li J, Song J, Zaytseva YY, Liu Y, Rychahou P, Jiang K, et al. An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity. Nature. 2016;533:411–5.

358. Mumphrey MB, Patterson LM, Zheng H, Berthoud H-R. Roux-en-Y gastric bypass surgery increases number but not density of CCK-, GLP-1-, 5-HT-, and neurotensin-expressing enteroendocrine cells in rats: RYGB increases enteroendocrine cell numbers. Neurogastroenterology & Motility. 2013;25:e70–9.

359. Gehart H, van Es JH, Hamer K, Beumer J, Kretzschmar K, Dekkers JF, et al. Identification of Enteroendocrine Regulators by Real-Time Single-Cell Differentiation Mapping. Cell. 2019;176:1158-1173.e16.

360. Aranias T, Grosfeld A, Poitou C, Omar AA, Le Gall M, Miquel S, et al. Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation. J nutr sci. 2015;4:e22.

361. Guo Z, Ohlstein B. Bidirectional Notch signaling regulates Drosophila intestinal stem cell multipotency. Science. 2015;350:aab0988–aab0988.

362. Azevedo J-L, Neves K, Azevedo J, Bernardes L, Azevedo O, Yamaguchi G, et al. Isolated ileal interposition in enteroendocrine L cells differentiation. Nature Precedings. 2011. doi:10.1038/npre.2011.6614.

363. Bohórquez DV, Liddle RA. Axon-Like Basal Processes in Enteroendocrine Cells: Characteristics and Potential Targets. Clinical and Translational Science. 2011;4:387–91.

364. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. Nat Commun. 2014;5:3611.

365. Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. Dig Dis. 2015;33:327–31.

366. Ryan KK, Kohli R, Gutierrez-Aguilar R, Gaitonde SG, Woods SC, Seeley RJ. Fibroblast Growth Factor-19 Action in the Brain Reduces Food Intake and Body Weight and Improves Glucose Tolerance in Male Rats. Endocrinology. 2013;154:9–15.

367. Marcelin G, Jo Y-H, Li X, Schwartz GJ, Zhang Y, Dun NJ, et al. Central action of FGF19 reduces hypothalamic AGRP/NPY neuron activity and improves glucose metabolism. Molecular Metabolism. 2014;3:19–28.

368. El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A, Sumara G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. FEBS Letters. 2015;589:1728–34.

369. Tennoune N, Chan P, Breton J, Legrand R, Chabane YN, Akkermann K, et al. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α-MSH, at the origin of eating disorders. Transl Psychiatry. 2014;4:e458.

370. Borner T, Pinkernell S, Lutz TA, Riediger T. Lipopolysaccharide inhibits ghrelin-excited neurons of the arcuate nucleus and reduces food intake via central nitric oxide signaling. Brain, Behavior, and Immunity. 2012;26:867–79.

371. Langhans W. Signals generating anorexia during acute illness. Proceedings of the Nutrition Society. 2007;66:321–30.

372. Laye, Sophie, Bluthe, Rose-Marie, Kent, Stephen, Combe, Chantal, Médina, Chantal, Parnet, Patricia, et al. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. 1995;:5.

373. Bogunovic M, Davé SH, Tilstra JS, Chang DTW, Harpaz N, Xiong H, et al. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2007;292:G1770–83.

374. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, 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. 2015;308:G840–51.

375. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. F1000Res. 2020;9:69.

376. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, Volynets V, Rings A, Basrai M, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. Am J Clin Nutr. 2017;105:127–35.

377. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. Diabetes. 2007;56:1761–72.

378. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard E, Taylor CM, Welsh DA, et al. Obese-type Gut Microbiota Induce Neurobehavioral Changes in the Absence of Obesity. Biological Psychiatry. 2015;77:607–15.

379. Brenachot X, Nédélec E, Ben Fradj S, Boudry G, Douard V, Laderrière A, et al. Lack of Hypothalamus Polysialylation Inducibility Correlates With Maladaptive Eating Behaviors and Predisposition to Obesity. Frontiers in Nutrition. 2018;5:6.

380. Pagliassotti MJ, Knobel SM, Shahrokhi KA, Manzo AM, Hill JO. Time course of adaptation to a high-fat diet in obesity-resistant and obesity-prone rats. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1994;267:R659–64.

381. Darling JN, Ross AP, Bartness TJ, Parent MB. Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. Obesity. 2013;21:910–7.

382. Arora T, Sharma R, Frost G. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? Appetite. 2011;56:511–5.

383. Spielman LJ, Gibson DL, Klegeris A. Unhealthy gut, unhealthy brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases. Neurochemistry International. 2018;120:149–63.

384. Pearson-Leary J, Zhao C, Bittinger K, Eacret D, Luz S, Vigderman AS, et al. The gut microbiome regulates the increases in depressive-type behaviors and in inflammatory processes in the ventral hippocampus of stress vulnerable rats. Mol Psychiatry. 2020;25:1068–79.

385. Moore CF, Schlain GS, Mancino S, Sabino V, Cottone P. A behavioral and pharmacological characterization of palatable diet alternation in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2017;163:1–8.

386. Simonds SE, Pryor JT, Cowley MA. Repeated weight cycling in obese mice causes increased appetite and glucose intolerance. Physiology & Behavior. 2018;194:184–90.

387. Zou J, Lai B, Zheng M, Chen Q, Jiang S, Song A, et al. CD4+ T cells memorize obesity and promote weight regain. Cell Mol Immunol. 2018;15:630–9.

388. Sun M, Zheng S, Gao X, Lin Z. The role of immune cells in obesogenic memory. Cell Mol Immunol. 2020;17:884–6.

389. Giacomoni F, Le Corguille G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Petera M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics. 2015;31:1493–5.

390. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. Anal Chem. 2006;78:779–87.

391. Migné C, Durand S, Pujos-Guillot E. Exploratory GC/MS-Based Metabolomics of Body Fluids. In: Giera M, editor. Clinical Metabolomics. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 239–46. doi:10.1007/978-1-4939-7592-1_16.

392. ANSES. Évaluation des risques liés aux pratiques alimentaires d'amaigrissement. 2010.

393. Speretta GF, Ruchaya PJ, Delbin MA, Melo MR, Li H, Menani JV, et al. Importance of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of the solitary tract in cardiovascular responses induced by a high-fat diet. Hypertens Res. 2019;42:439–49.

394. Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, Issa-Garcia V, Barker PA, Arbour N, et al. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. Molecular Metabolism. 2018;10:1–13.

395. Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science. 2005;308:1635–8.

396. Nagpal R, Wang S, Solberg Woods LC, Seshie O, Chung ST, Shively CA, et al. Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. Front Microbiol. 2018;9:2897.

397. Rausch P, Basic M, Batra A, Bischoff SC, Blaut M, Clavel T, et al. Analysis of factors contributing to variation in the C57BL/6J fecal microbiota across German animal facilities. International Journal of Medical Microbiology. 2016;306:343–55.

398. Pang W, Vogensen FK, Nielsen DS, Hansen AK. Faecal and caecal microbiota profiles of mice do not cluster in the same way. Lab Anim. 2012;46:231–6.

399. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012;486:207–14.

400. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. DNA Research. 2007;14:169–81.

401. Stanley D, Geier MS, Chen H, Hughes RJ, Moore RJ. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. BMC Microbiol. 2015;15:51.

402. Cabral DJ, Wurster JI, Korry BJ, Penumutchu S, Belenky P. Consumption of a Western-Style Diet Modulates the Response of the Murine Gut Microbiome to Ciprofloxacin. 2020;5:19.

403. Kriss M, Hazleton KZ, Nusbacher NM, Martin CG, Lozupone CA. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. Current Opinion in Microbiology. 2018;44:34–40.

404. Wang B, Kong Q, Li X, Zhao J, Zhang H, Chen W, et al. A High-Fat Diet Increases Gut Microbiota Biodiversity and Energy Expenditure Due to Nutrient Difference. Nutrients. 2020;12:3197.

405. Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends in Biotechnology. 2015;33:496–503.

406. Figliuolo VR, dos Santos LM, Abalo A, Nanini H, Santos A, Brittes NM, et al. Sulfate-reducing bacteria stimulate gut immune responses and contribute to inflammation in experimental colitis. Life Sciences. 2017;189:29–38.

407. Zhang-Sun W, Augusto LA, Zhao L, Caroff M. *Desulfovibrio desulfuricans* isolates from the gut of a single individual: Structural and biological lipid A characterization. FEBS Letters. 2015;589:165–71.

408. O. Sheridan P, Martin JC, Lawley TD, Browne HP, Harris HMB, Bernalier-Donadille A, et al. Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. Microbial Genomics. 2016;2. doi:10.1099/mgen.0.000043.

409. Wolin MJ, Miller TL, Collins MD, Lawson PA. Formate-Dependent Growth and Homoacetogenic Fermentation by a Bacterium from Human Feces: Description of Bryantella formatexigens gen. nov., sp. nov. AEM. 2003;69:6321–6.

410. O'Keefe SJD, Li JV, Lahti L, Ou J, Carbonero F, Mohammed K, et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. Nat Commun. 2015;6:6342.

411. Kettle H, Louis P, Holtrop G, Duncan SH, Flint HJ. Modelling the emergent dynamics and major metabolites of the human colonic microbiota: Emergent microbial dynamics in the colon. Environ Microbiol. 2015;17:1615–30.

412. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. Environ Microbiol. 2017;19:29–41.

413. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. FEMS Microbiology Letters. 2009;294:1–8.

414. Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, et al. Roseburia spp.: a marker of health? Future Microbiol. 2017;:14.

415. Méndez-Salazar EO, Ortiz-López MG, Granados-Silvestre M de los Á, Palacios-González B, Menjivar M. Altered Gut Microbiota and Compositional Changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican Undernourished and Obese Children. Front Microbiol. 2018;9:2494.

416. Lippert K, Kedenko L, Antonielli L, Kedenko I, Gemeier C, Leitner M, et al. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. Beneficial Microbes. 2017;8:545–56.

417. Kameyama K, Itoh K. Intestinal Colonization by a Lachnospiraceae Bacterium Contributes to the Development of Diabetes in Obese Mice. Microb Environ. 2014;29:427–30.

418. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. Microorganisms. 2020;8:573.

419. Napolitano A, Costabile A, Martin-Pelaez S, Vitaglione P, Klinder A, Gibson GR, et al. Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2009;19:283–90.

420. Marotti I, Bregola V, Aloisio I, Di Gioia D, Bosi S, Di Silvestro R, et al. Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on Lactobacillus and Bifidobacterium strains. J Sci Food Agric. 2012;92:2133–40.

421. Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, et al. Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. BMC Microbiol. 2010;10:316.

422. Miyauchi E, Morita H, Tanabe S. Lactobacillus rhamnosus alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. 2009;92:9.

423. Park K-Y, Kim B, Hyun C-K. Lactobacillus rhamnosus GG Reverses Insulin Resistance but Does Not Block Its Onset in Diet-Induced Obese Mice. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015;25:753–7.

424. Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, et al. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. PLoS ONE. 2015;10:e0126931.

425. Ojo BA, O'Hara C, Wu L, El-Rassi GD, Ritchey JW, Chowanadisai W, et al. Wheat Germ Supplementation Increases Lactobacillaceae and Promotes an Anti-inflammatory Gut Milieu in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat, High-Sucrose Diet. The Journal of Nutrition. 2019;:nxz061.

426. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. PLoS ONE. 2009;4:e7125.

427. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii. Int J Obes. 2012;36:817–25.

428. Arora T, Singh S, Sharma RK. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. Nutrition. 2013;29:591–6.

429. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals. Microbial Pathogenesis. 2012;53:100–8.

430. Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H, Kim D-H. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. PLoS ONE. 2012;7:e47713.

431. Cani PD. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. Briefings in Functional Genomics. 2013;12:381–7.

432. Shang Q, Shan X, Cai C, Hao J, Li G, Yu G. Dietary fucoidan modulates the gut microbiota in mice by increasing the abundance of *Lactobacillus* and *Ruminococcaceae*. Food Funct. 2016;7:3224–32.

433. Hussain M, Bonilla-Rosso G, Kwong Chung CKC, Bäriswyl L, Rodriguez MP, Kim BS, et al. High dietary fat intake induces a microbiota signature that promotes food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2019;144:157-170.e8.

434. Borton MA, Sabag-Daigle A, Wu J, Solden LM, O'Banion BS, Daly RA, et al. Chemical and pathogen-induced inflammation disrupt the murine intestinal microbiome. Microbiome. 2017;5:47.

435. Liang W, Zhou K, Jian P, Chang Z, Zhang Q, Liu Y, et al. Ginsenosides Improve Nonalcoholic Fatty Liver Disease via Integrated Regulation of Gut Microbiota, Inflammation and Energy Homeostasis. Front Pharmacol. 2021;12:622841.

436. Tong M, Li X, Wegener Parfrey L, Roth B, Ippoliti A, Wei B, et al. A Modular Organization of the Human Intestinal Mucosal Microbiota and Its Association with Inflammatory Bowel Disease. PLoS ONE. 2013;8:e80702.

437. Vernocchi P, Gili T, Conte F, Del Chierico F, Conta G, Miccheli A, et al. Network Analysis of Gut Microbiome and Metabolome to Discover Microbiota-Linked Biomarkers in Patients Affected by Non-Small Cell Lung Cancer. IJMS. 2020;21:8730.

438. Johanson DM, Goertz JE, Marin IA, Costello J, Overall CC, Gaultier A. Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract. Sci Rep. 2020;10:15183.

439. François A, Grebert D, Rhimi M, Mariadassou M, Naudon L, Rabot S, et al. Olfactory epithelium changes in germfree mice. Scientific Reports. 2016;6. doi:10.1038/srep24687.

440. Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS. Reward Circuitry in Addiction. Neurotherapeutics. 2017;14:687–97.

441. Wang S-C, Chen Y-C, Chen S-J, Lee C-H, Cheng C-M. Alcohol Addiction, Gut Microbiota, and Alcoholism Treatment: A Review. Int J Mol Sci. 2020;:11.

442. Bajaj JS, Gavis EA, Fagan A, Wade JB, Thacker LR, Fuchs M, et al. A Randomized Clinical Trial of Fecal Microbiota Transplant for Alcohol Use Disorder. Hepatology. 2020;:hep.31496.

443. Leclercq S, Roy TL, Furgiuele S, Coste V, Bindels LB, Leyrolle Q, et al. Gut Microbiota-Induced Changes in b-Hydroxybutyrate Metabolism Are Linked to Altered Sociability and Depression in Alcohol Use Disorder. OPEN ACCESS. :24.

444. Peng B, Xu Q, Liu J, Guo S, Borgland SL, Liu S. Corticosterone Attenuates Reward-Seeking Behavior and Increases Anxiety via D2 Receptor Signaling in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. The Journal of Neuroscience. 2021;41:1566–81.

445. Liddicoat C, Sydnor H, Cando-Dumancela C, Dresken R, Liu J, Gellie NJC, et al. Naturally-diverse airborne environmental microbial exposures modulate the gut microbiome and may provide anxiolytic benefits in mice. Science of The Total Environment. 2020;701:134684.

446. Leigh S-J, Kaakoush NO, Bertoldo MJ, Westbrook RF, Morris MJ. Intermittent cafeteria diet identifies fecal microbiome changes as a predictor of spatial recognition memory impairment in female rats. Transl Psychiatry. 2020;10:36.

447. Lowe MR, Butryn ML. Hedonic hunger: A new dimension of appetite? Physiology & Behavior. 2007;91:432–9.

448. Nogueiras R, Romero-Picó A, Vazquez MJ, Novelle MG, López M, Diéguez C. The Opioid System and Food Intake: Homeostatic and Hedonic Mechanisms. Obes Facts. 2012;5:196–207.

449. Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Saderi N, Buijs RM, Escobar C. Food Intake during the Normal Activity Phase Prevents Obesity and Circadian Desynchrony in a Rat Model of Night Work. Endocrinology. 2010;151:1019–29.

450. Northeast RC, Huang Y, McKillop LE, Bechtold DA, Peirson SN, Piggins HD, et al. Sleep homeostasis during daytime food entrainment in mice. Sleep. 2019;42:zsz157.

451. Beli E, Prabakaran S, Krishnan P, Evans-Molina C, Grant MB. Loss of Diurnal Oscillatory Rhythms in Gut Microbiota Correlates with Changes in Circulating Metabolites in Type 2 Diabetic db/db Mice. Nutrients. 2019;11:2310.

452. Thaiss CA, Levy M, Korem T, Dohnalová L, Shapiro H, Jaitin DA, et al. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. Cell. 2016;167:1495-1510.e12.

453. Ayala JE, Bracy DP, James FD, Burmeister MA, Wasserman DH, Drucker DJ. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Knockout Mice Are Protected from High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. Endocrinology. 2010;151:4678–87.

454. Suárez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, Stevanović A, et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. Nat Med. 2015;21:1497–501.

455. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005;329:386–90.

456. Just S, Mondot S, Ecker J, Wegner K, Rath E, Gau L, et al. The gut microbiota drives the impact of bile acids and fat source in diet on mouse metabolism. Microbiome. 2018;6:134.

457. DeCastro M, Nankova BB, Shah P, Patel P, Mally PV, Mishra R, et al. Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. Molecular Brain Research. 2005;142:28–38.

458. Shah P, Nankova BB, Parab S, La Gamma EF. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. Brain Research. 2006;1107:13–23.

459. Nankova BB, Chua J, Mishra R, Kobasiuk CD. Nicotinic Induction of Preproenkephalin and Tyrosine Hydroxylase Gene Expression in Butyrate-Differentiated Rat PC12 Cells: A Model for Adaptation to Gut-Derived Environmental Signals. Pediatric Research. 2003;53:113–8.

460. Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld J, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, et al. PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. preprint. Bioinformatics; 2019. doi:10.1101/672295.

461. Iwai S, Weinmaier T, Schmidt BL, Albertson DG, Poloso NJ, Dabbagh K, et al. Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. PLOS ONE. 2016;11:e0166104.

462. McLaren MR, Willis AD, Callahan BJ. Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments. eLife. 2019;8:e46923.

463. Kennedy K, Hall MW, Lynch MDJ, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD. Evaluating Bias of Illumina-Based Bacterial 16S rRNA Gene Profiles. Appl Environ Microbiol. 2014;80:5717–22.

464. Becskei C, Riediger T, Hernadfalvy N, Arsenijevic D, Lutz TA, Langhans W. Inhibitory effects of lipopolysaccharide on hypothalamic nuclei implicated in the control of food intake. Brain, Behavior, and Immunity. 2008;22:56–64.

465. Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon J-L, Blondeau N, Rovère C. Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. Front Endocrinol. 2017;8:197.

466. Kim JD, Yoon NA, Jin S, Diano S. Microglial UCP2 Mediates Inflammation and Obesity Induced by High-Fat Feeding. Cell Metabolism. 2019;30:952-962.e5.

467. Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, Han D-Y, Wellhauser L, Liu Y, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate

and TNF-α on appetite-regulating NPY neurons. International Journal Of Obesity. 2016;41:149.

468. Chan SY, Probert F, Radford-Smith DE, Hebert JC, Claridge TDW, Anthony DC, et al. Post-inflammatory behavioural despair in male mice is associated with reduced cortical glutamate-glutamine ratios, and circulating lipid and energy metabolites. Sci Rep. 2020;10:16857.

469. Dumas M-E, Davidovic L. Metabolic Profiling and Phenotyping of Central Nervous System Diseases: Metabolites Bring Insights into Brain Dysfunctions. J Neuroimmune Pharmacol. 2015;10:402–24.

470. Liu H, Zhang L, Zhao B, Zhang Z, Qin L, Zhang Q, et al. Hypothalamus metabolomic profiling to elucidate the tissue-targeted biochemical basis of febrile response in yeast-induced pyrexia rats. Chemico-Biological Interactions. 2015;231:61–70.

471. Kjaergaard M, Nilsson C, Nielsen MO, Grove K, Raun K. Hypothalamic oxidative stress and inflammation, and peripheral glucose homeostasis in Sprague-Dawley rat offspring exposed to maternal and postnatal chocolate and soft drink. Nutr & Diabetes. 2018;8:44.

472. Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll M, Culver B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. Experimental Neurology. 2005;191:318–25.

473. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. Nat Neurosci. 2015;18:965–77.

474. Chatterjee S. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In: Oxidative Stress and Biomaterials. Elsevier; 2016. p. 35–58. doi:10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4.

475. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2010;298:G851–9.

476. Zhang C, Li S, Yang L, Huang P, Li W, Wang S, et al. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. Nat Commun. 2013;4:2163.

477. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. Endocrine Journal. 2010;57:359–72.

478. Berthoud H-R. Homeostatic and Non-homeostatic Pathways Involved in the Control of Food Intake and Energy Balance. Obesity. 2006;14:197S-200S.

479. Sofroniew MV. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. THE NEUROSCIENTIST. 2005;11:9.

480. Wang Y, Hsuchou H, He Y, Kastin AJ, Pan W. Role of Astrocytes in Leptin Signaling. J Mol Neurosci. 2015;56:829–39.

481. Kaur K, Gill JS, Bansal PK, Deshmukh R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. Journal of the Neurological Sciences. 2017;381:308–14.

482. Felger JC, Treadway MT. Inflammation Effects on Motivation and Motor Activity: Role of Dopamine. Neuropsychopharmacol. 2017;42:216–41.

483. Sandiego CM, Gallezot J-D, Pittman B, Nabulsi N, Lim K, Lin S-F, et al. Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. PNAS. 2015;112:12468–73.

484. Jadhav KS, Peterson VL, Halfon O, Ahern G, Fouhy F, Stanton C, et al. Gut microbiome correlates with altered striatal dopamine receptor expression in a model of compulsive alcohol seeking. Neuropharmacology. 2018;141:249–59.

485. Sen T, Cawthon CR, Ihde BT, Hajnal A, DiLorenzo PM, de La Serre CB, et al. Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. Physiology & Behavior. 2017;173:305–17.

486. C. Vaughn A, M. Cooper E, M. DiLorenzo P, J. O'Loughlin L, E. Konkel M, H. Peters J, et al. Energy-dense diet triggers changes in gut microbiota, reorganization of gut-brain vagal communication and increases body fat accumulation. Acta Neurobiologiae Experimentalis. 2017;77:18–30.

487. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105:16767–72.

488. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. J Immunol. 2005;174:4453–60.

489. Schéle E, Grahnemo L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O. The Gut Microbiota Reduces Leptin Sensitivity and the Expression of the Obesity-Suppressing Neuropeptides Proglucagon (Gcg) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) in the Central Nervous System. Endocrinology. 2013;154:3643–51.

490. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. Nature. 2002;418:650–4.

491. Izaguirre M, Catalán V, Frühbeck G. Elucidating the Role of Peripheral Neurotensin in Appetite Control. Endocrinology. 2016;157:3391–3.

492. Geary N. Endocrine controls of eating: CCK, leptin, and ghrelin. Physiology & Behavior. 2004;81:719–33.

493. Raybould HE. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. Current Opinion in Pharmacology. 2007;:5.

494. Raybould HE. Gut chemosensing: Interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. Autonomic Neuroscience. 2010;153:41–6.

495. Li Y, Hao Y, Zhu J, Owyang C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non–cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. Gastroenterology. 2000;118:1197–207.

496. Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G, Hyland NP. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. Front Cell Neurosci. 2015;9. doi:10.3389/fncel.2015.00392.

497. Lam YY, Ha CWY, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A, Oscarsson J, et al. Increased Gut Permeability and Microbiota Change Associate with Mesenteric Fat Inflammation and Metabolic Dysfunction in Diet-Induced Obese Mice. PLoS ONE. 2012;7:e34233.

498. Rainone V, Schneider L, Saulle I, Ricci C, Biasin M, Al-Daghri NM, et al. Upregulation of inflammasome activity and increased gut permeability are associated with obesity in children and adolescents. Int J Obes. 2016;40:1026–33.

499. Maffeis C, Martina A, Corradi M, Quarella S, Nori N, Torriani S, et al. Association between intestinal permeability and faecal microbiota composition in Italian children with beta cell autoimmunity at risk for type 1 diabetes: Gut Permeability and Microbiota in T1D. Diabetes Metab Res Rev. 2016;32:700–9.

500. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. Diabetes. 2008;57:1470–81.

501. Morales P, Fujio S, Navarrete P, Ugalde JA, Magne F, Carrasco-Pozo C, et al. Impact of Dietary Lipids on Colonic Function and Microbiota: An Experimental Approach Involving Orlistat-Induced Fat Malabsorption in Human Volunteers. Clinical and Translational Gastroenterology. 2016;7:e161.

502. Bowser SM, McMillan RP, Boutagy NE, Tarpey MD, Smithson AT, Osterberg KL, et al. Serum endotoxin, gut permeability and skeletal muscle metabolic adaptations following a short term high fat diet in humans. Metabolism Clinical and Experimental. 2020;:9.

503. Panaro BL, Yusta B, Matthews D, Koehler JA, Song Y, Sandoval DA, et al. Intestine-selective reduction of Gcg expression reveals the importance of the distal gut for GLP-1 secretion. Molecular Metabolism. 2020;37:100990.

504. Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract: Classification and functions of colorectal enteroendocrine cells. International Journal of Experimental Pathology. 2011;92:219–31.

505. Choi S, Lee M, Shiu AL, Yo SJ, Halldén G, Aponte GW. GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2007;292:G1366–75.

506. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. Front Neurosci. 2018;12:49.

507. Kim JS, Kirkland RA, Lee SH, Cawthon CR, Rzepka KW, Minaya DM, et al. Gut microbiota composition modulates inflammation and structure of the vagal afferent pathway. Physiology & Behavior. 2020;225:113082.

508. Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. J Clin Invest. 1990;86:696–702.

509. Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. Chasing a ghost? – Issues with the determination of circulating levels of endotoxin in human blood. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2016;53:197–215.

510. Peck BCE, Shanahan MT, Singh AP, Sethupathy P. Gut Microbial Influences on the Mammalian Intestinal Stem Cell Niche. Stem Cells International. 2017;2017:1–17.

511. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol. 2009;9:313–23.

512. Lu J, Synowiec S, Lu L, Yu Y, Bretherick T, Takada S, et al. Microbiota influence the development of the brain and behaviors in C57BL/6J mice. PLoS ONE. 2018;13:e0201829.

513. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. Science Translational Medicine. 2014;6:263ra158-263ra158.

514. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. PLoS ONE. 2011;6:e17996.

515. Hill DA, Hoffmann C, Abt MC, Du Y, Kobuley D, Kirn TJ, et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. Mucosal Immunol. 2010;3:148–58.

516. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. Immunity. 2012;37:158–70.

517. Emal D, Rampanelli E, Stroo I, Butter LM, Teske GJ, Claessen N, et al. Depletion of Gut Microbiota Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. JASN. 2017;28:1450–61.

518. Baldridge MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, et al. Commensal microbes and interferon- determine persistence of enteric murine norovirus infection. Science. 2015;347:266–9.

519. Rolls BJ. Effects of intense sweeteners on hunger, food intake, and body weight: a review. The American Journal of Clinical Nutrition. 1991;53:872–8.

520. Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. The American Journal of Clinical Nutrition. 2009;89:1–14.

521. Wrzosek L, Ciocan D, Borentain P, Spatz M, Puchois V, Hugot C, et al. Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. Sci Rep. 2018;8:6854.

522. Bukin YuS, Galachyants YuP, Morozov IV, Bukin SV, Zakharenko AS, Zemskaya TI. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. Sci Data. 2019;6:190007.

523. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods. 2016;13:581–3.

524. Barnes CJ, Rasmussen L, Asplund M, Knudsen SW, Clausen M-L, Agner T, et al. Comparing DADA2 and OTU clustering approaches in studying the bacterial communities of atopic dermatitis. Journal of Medical Microbiology. 2020;69:1293–302.

525. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME J. 2012;6:610–8.

526. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research. 2012;41:D590–6.

527. Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. Journal of Biotechnology. 2017;261:169–76.

528. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucl Acids Res. 2014;42:D633–42.

529. Federhen S. The NCBI Taxonomy database. Nucleic Acids Research. 2012;40:D136–43.

530. Balvočiūtė M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? BMC Genomics. 2017;18:114.

531. Chen L, Reeve J, Zhang L, Huang S, Wang X, Chen J. GMPR: A robust normalization method for zero-inflated count data with application to microbiome sequencing data. PeerJ. 2018;6:e4600.

532. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. Nat Methods. 2013;10:1200–2.

533. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology. 2014;15. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

534. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010;26:139–40.

535. The HC, Florez de Sessions P, Jie S, Pham Thanh D, Thompson CN, Nguyen Ngoc Minh C, et al. Assessing gut microbiota perturbations during the early phase of infectious diarrhea in Vietnamese children. Gut Microbes. 2018;9:38–54.

536. Aho VTE, Pereira PAB, Voutilainen S, Paulin L, Pekkonen E, Auvinen P, et al. Gut microbiota in Parkinson's disease: Temporal stability and relations to disease progression. EBioMedicine. 2019;44:691–707.

537. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. Genome Research. 2012;22:292–8.

538. Zhao N, Chen J, Carroll IM, Ringel-Kulka T, Epstein MP, Zhou H, et al. Testing in Microbiome-Profiling Studies with MiRKAT, the Microbiome Regression-Based Kernel Association Test. The American Journal of Human Genetics. 2015;96:797–807.

539. Chen J, King E, Deek R, Wei Z, Yu Y, Grill D, et al. An omnibus test for differential distribution analysis of microbiome sequencing data. Bioinformatics. 2018;34:643–51.

540. Zhang X, Mallick H, Yi N. ZERO-INFLATED NEGATIVE BINOMIAL REGRESSION FOR DIFFERENTIAL ABUNDANCE TESTING IN MICROBIOME STUDIES. JOURNAL OF BIOINFORMATICS AND GENOMICS. 2016;:No. 2 (2) (2016).

541. Banerjee K, Zhao N, Srinivasan A, Xue L, Hicks SD, Middleton FA, et al. An Adaptive Multivariate Two-Sample Test With Application to Microbiome Differential Abundance Analysis. Front Genet. 2019;10:350.

542. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics. 2008;9:559.

543. Zoppi J, Guillaume J-F, Neunlist M, Chaffron S. MiBiOmics: An interactive web application for multi-omics data exploration and integration. preprint. Bioinformatics; 2020. doi:10.1101/2020.04.24.031773.

544. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao K-A. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. PLOS Computational Biology. 2017;13:e1005752.

545. Min EJ, Long Q. Sparse multiple co-Inertia analysis with application to integrative analysis of multi -Omics data. BMC Bioinformatics. 2020;21:141.

546. Meng C, Kuster B, Culhane AC, Gholami A. A multivariate approach to the integration of multi-omics datasets. BMC Bioinformatics. 2014;15:162.

547. Singh A, Shannon CP, Gautier B, Rohart F, Vacher M, Tebbutt SJ, et al. DIABLO: an integrative approach for identifying key molecular drivers from multi-omics assays. Bioinformatics. 2019. doi:10.1093/bioinformatics/bty1054.

Résumé de la thèse

L'épidémie de surpoids et d'obésité en lien avec la disponibilité accrue d'aliments ultra-palatables, riches en lipides et en glucides (Western diet, WD) est un problème majeur de santé publique. Chez le rongeur, le profil de prise alimentaire à très court terme sous WD est très robuste et prédictif de la propension des animaux à devenir obèses. Cette régulation comprend une phase d'hyperphagie de 24h suivie d'un retour à l'homéostasie énergétique. Le but de cette thèse a été de déterminer si le microbiote intestinal, par des variations précoces de composition ou d'activité métabolique, jouait un rôle dans ce comportement alimentaire à très court terme lors de l'introduction d'un WD et si oui, par quel(s) mécanisme(s). L'introduction d'un WD induisait des modifications précoces de composition du microbiote qui tendaient vers un contexte pro-inflammatoire. L'utilisation de modèles sans microbiote (axénique) ou dont le microbiote a été déplété par traitement antibiotique a permis de déterminer que celui-ci joue un rôle lors des premières heures de consommation de WD avec une diminution de la prise alimentaire lors de la phase d'hyperphagie (modèle axénique) et une modification du rassasiement lors des premières heures de WD (modèle antibiotiques). Le microbiote de souris sous régime standard était modifié par plusieurs cycles de WD et induisait une augmentation de la motivation à manger dès l'introduction du WD. La composition initiale du microbiote semble également prédictive de la prise alimentaire lors de la phase d'hyperphagie, ce qui doit être affiné par de futures analyses. Parmi les mécanismes potentiellement impliqués, nous avons montré que le microbiote pourrait participer à la mise en place très précoce du stress oxydant et de l'inflammation hypothalamique et qu'il participe à la régulation transcriptionnelle des peptides anorexigènes dans les cellules entéroendocrines caecales. D'autres mécanismes d'interaction entre le microbiote et la régulation, notamment hédonique, de la prise alimentaire restent à élucider. L'ensemble de ces résultats suggère un lien entre les modifications précoces du microbiote intestinal et la régulation de la prise alimentaire, notamment hédonique lors des premières heures de consommation de WD. Ces découvertes ouvrent la voie vers de nouvelles pistes de prévention de l'obésité en lien avec la composition du microbiote intestinal.

The obesity and overweight pandemic is a major public health issue linked to the high availability of palatable, sugar and fat-rich (Western diet, WD) food. First week food intake response to WD introduction in rodent is very robust and predictive of its propensity to become obese on a long term. It is composed of a one-day hyperphagic phase followed by a return to a normal food intake. The goal of this thesis was to determine if the gut microbiota, through acute composition and/or metabolic activity modifications, play a role in early food intake regulation following WD introduction and if so through which mechanisms. Dietary change modified the gut microbiota composition towards a pro-inflammatory context. Animal models lacking a gut microbiota (germ-free) or with a depleted gut microbiota (antibiotics) demonstrate that intestinal microbiota is involved in energy intake regulation during the first hours of WD consumption, with a decrease in food intake during the 1-day hyperphagic phase in axenic rats and satiation modifications during the first hours after dietary change (antibiotics). Gut microbiota of mice under standard diet was modified after several WD cycles and induced an increase in eating motivation at WD introduction. Initial gut microbiota composition seems predictive of food intake during the hyperphagic phase but this has to be confirmed by further analyses. Among the potential mechanisms involved in this regulation, we showed that gut microbiota could participate to the early induction of hypothalamic oxidative stress and inflammation and that it is involved in gut anorexigenic peptides transcriptional regulation in caecal enteroendocrine cells. Other interaction mechanisms between gut microbiota and food intake regulation, notably the hedonic aspect, still have to be characterized. All these results suggest a link between early gut microbiota modifications and food intake regulation, in particular towards the hedonic aspect during the first hours after dietary change. These findings pave the way to the discovery of new ways of obesity and overweight prevention around gut microbiota composition.

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Titre : Etude de la relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire chez le rongeur soumis à un régime obésogène.

Mots clés : Microbiote intestinal ; Comportement alimentaire ; Rongeur ; Intégration de données ; Obésité

Résumé : L'épidémie de surpoids et d'obésité en lien avec la disponibilité accrue d'aliments ultra-palatables, riches en lipides et en glucides (Western diet, WD) est un problème majeur de santé publique. Chez le rongeur, le profil de prise alimentaire à très court terme sous WD est très robuste et prédictif de la propension des animaux à devenir obèses. Cette régulation comprend une phase d'hyperphagie de 24h suivie d'un retour à l'homéostasie énergétique. Le but de cette thèse a été de déterminer si le microbiote intestinal, par des variations précoces de composition ou d'activité métabolique, jouait un rôle dans ce comportement alimentaire à très court terme lors de l'introduction d'un WD et si oui, par quel(s) mécanisme(s). L'introduction d'un WD induisait des modifications précoces de composition du microbiote qui tendaient vers un contexte pro-inflammatoire. L'utilisation de modèles sans microbiote (axénique) ou dont le microbiote a été déplété par traitement antibiotique a permis de déterminer que celui-ci joue un rôle lors des premières heures de consommation de WD avec une diminution de la prise alimentaire lors de la phase d'hyperphagie (modèle axénique) et une modification du rassasiement lors des premières heures de WD (modèle antibiotiques).

Le microbiote de souris sous régime standard était modifié par plusieurs cycles de WD et induisait une augmentation de la motivation à manger dès l'introduction du WD. La composition initiale du microbiote semble également prédictive de la prise alimentaire lors de la phase d'hyperphagie, ce qui doit être affiné par de futures analyses. Parmi les mécanismes potentiellement impliqués, nous avons montré que le microbiote pourrait participer à la mise en place très précoce du stress oxydant et de l'inflammation hypothalamique et qu'il participe à la régulation transcriptionnelle des peptides anorexigènes dans les cellules entéroendocrines caecales. D'autres mécanismes d'interaction entre le microbiote et la régulation, notamment hédonique, de la prise alimentaire restent à élucider. L'ensemble de ces résultats suggère un lien entre les modifications précoces du microbiote intestinal et la régulation de la prise alimentaire, notamment hédonique lors des premières heures de consommation de WD. Ces découvertes ouvrent la voie vers de nouvelles pistes de prévention de l'obésité en lien avec la composition du microbiote intestinal.

Title : Relationship between gut microbiota and feeding behaviour in rodents under an obesogenic diet.

Keywords : Gut microbiota ; Feeding behaviour; Rodent; Data integration; Obesity

Abstract : The obesity and overweight pandemic is a major public health issue linked to the high availability of palatable, sugar and fat-rich (Western diet, WD) food. First week food intake response to WD introduction in rodent is very robust and predictive of its propensity to become obese on a long term. It is composed of a one-day hyperphagic phase followed by a return to a normal food intake. The goal of this thesis was to determine if the gut microbiota, through acute composition and/or metabolic activity modifications, play a role in early food intake regulation following WD introduction and if so through which mechanisms. Dietary change modified the gut microbiota composition towards a pro-inflammatory context. Animal models lacking a gut microbiota (germ-free) or with a depleted gut microbiota (antibiotics) demonstrate that intestinal microbiota is involved in energy intake regulation during the first hours of WD consumption, with a decrease in food intake during the 1-day hyperphagic phase in axenic rats and satiation modifications during the first hours after dietary change (antibiotics).

Gut microbiota of mice under standard diet was modified after several WD cycles and induced an increase in eating motivation at WD introduction. Initial gut microbiota composition seems predictive of food intake during the hyperphagic phase but this has to be confirmed by further analyses. Among the potential mechanisms involved in this regulation, we showed that gut microbiota could participate to the early induction of hypothalamic oxidative stress and inflammation and that it is involved in gut anorexigenic peptides transcriptional regulation in caecal enteroendocrine cells. Other interaction mechanisms between gut microbiota and food intake regulation, notably the hedonic aspect, still have to be characterized. All these results suggest a link between early gut microbiota modifications and food intake regulation, in particular towards the hedonic aspect during the first hours after dietary change. These findings pave the way to the discovery of new ways of obesity and overweight prevention around gut microbiota composition.