



HAL
open science

Impact de la consommation de fructose sur la microglie et la santé cérébrale

Adeline Coursan

► **To cite this version:**

Adeline Coursan. Impact de la consommation de fructose sur la microglie et la santé cérébrale. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0131 . tel-04677916

HAL Id: tel-04677916

<https://theses.hal.science/tel-04677916v1>

Submitted on 26 Aug 2024

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE
BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Adeline COURSAN

**Impact de la consommation de fructose
sur la microglie et la santé cérébrale**

Sous la direction de : Xavier FIORAMONTI

Soutenue le 03/07/2024

Membres du jury :

Dr Xavier FIORAMONTI, Directeur de recherche INRAE, Université de Bordeaux
Dr Katia BEFORT, Chargée de recherche CNRS, Université de Strasbourg
Dr Carole ROVERE, Chargée de recherche INSERM, Université de Côte d'Azur
Pr Christophe MAGNAN, Professeur CNRS, Université Paris-Diderot
Pr André MARETTE, Professeur, Université de Laval
Dr Véronique DOUARD, Chargée de recherche INRAE, Institut Micalis
Dr Charlotte MADORE, Chargée de recherche INRAE, Université de Bordeaux

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité
Invité

REMERCIEMENTS :

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers les membres du jury de ma thèse pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit, pour l'attention qu'ils ont porté à ce mémoire et pour leurs commentaires pertinents qui ont contribué à sa qualité. Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr **Katia Befort** d'avoir accepté d'être rapporteure de cette thèse. Nous nous sommes rencontrés au début de mes études et c'est un immense honneur de vous présenter aujourd'hui mon évolution professionnelle qui sans vous, aurait assurément été bien différente. Je tiens également à remercier le Dr **Carole Rovère** pour avoir accepté d'être rapporteure de ce manuscrit. Mes remerciements s'adressent également au Pr **Christophe Magnan** et au Pr **André Marette** d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Je remercie vivement le Dr **Véronique Douard** pour avoir accepté d'être membre invité de ce jury de thèse mais surtout pour son expertise et son implication dans la réalisation de mes travaux. Je souhaite également exprimer ma gratitude envers le Dr **Charlotte Madore-Delpech** pour avoir accepté d'être membre invité de ce jury, mais avant tout pour sa patience, sa disponibilité, son soutien sans faille et nos nombreux échanges fructueux qui ont enrichi mon travail.

Je remercie du fond du cœur **Xavier Fioramonti** pour m'avoir fait confiance et m'avoir accordé l'opportunité de réaliser cette thèse incroyable. Son encadrement attentif, son soutien constant et sa disponibilité ont été pour moi des piliers essentiels sur lesquels je me suis appuyé tout au long de ces années de recherche. Ses conseils éclairés et son expertise ont été des atouts précieux dans la réalisation de cette thèse. Au-delà du côté académique, je lui suis particulièrement reconnaissante pour sa bienveillance constante qui m'a permis d'affronter tous les défis, aussi bien professionnels que personnels, avec sérénité et de m'épanouir durant ces quatre années de thèse. Sa capacité à encourager le dialogue et à favoriser une atmosphère de travail collaborative a grandement contribué à créer un

environnement sain et épanouissant au sein du laboratoire. Pour faire court (et avant de verser une petite larme), j'ai énormément appris et grandi à ton contact, MERCI !

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers **Sophie Layé** sans qui je ne serais jamais entré à NutriNeuro. Tu es la première personne à m'avoir fait confiance et cet entretien en visio en plein confinement a été le premier pas vers une expérience enrichissante et stimulante au sein du laboratoire, une opportunité précieuse que je te suis reconnaissante d'avoir rendue possible. Je tiens également à te remercier tout particulièrement pour ta disponibilité et ta bienveillance. Que ce soit au détour d'un couloir ou au cours de réunions scientifiques, tu as toujours pris le temps de discuter, d'écouter mes idées et de me guider dans mes réflexions.

Je remercie vivement les équipes de recherche qui ont collaboré sur mon projet de thèse, notamment celle du Dr **Thierry Alquier** de l'Université de Montréal et celle du Dr **Richard Bazinet** de l'Université de Toronto. À ce titre, je renouvelle également mes remerciements à l'équipe du Dr **Véronique Douard**. Leur engagement, leur expertise et leur collaboration ont été des éléments essentiels de ce projet. Leurs compétences complémentaires ont enrichi la diversité des approches méthodologiques utilisées dans cette thèse et ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire Nutrineuro pour votre accueil, votre gentillesse et votre bienveillance. Merci à **Charlotte** et **JC** pour leur accompagnement et leur formation tout au long de mon parcours. Leur disponibilité et leur soutien infaillible ont été une précieuse source de conseils, répondant avec patience à toutes mes questions, aussi nombreuses soient-elles. Merci à **David**, **Corinne** et **Anne-Laure** pour leurs retours constructifs et leurs conseils avisés, toujours présents lorsque j'avais besoin d'eux. Merci à

Agnès et **Moira** de qui j'ai énormément appris, ça a toujours été un plaisir de manipuler avec vous deux. Merci à **Céline** pour ta gentillesse, tes conseils et ton aide pour les manips, mais également pour m'avoir gentiment hébergé à Toulouse quand nous avons eu des soucis d'hôtel aux JFN. Merci à **Alexandra** pour ton implication depuis le début dans le projet et pour toutes les manips réalisées. Je remercie également grandement **Mathieu** pour ton aide précieuse à ce moment où j'étais perdue dans les analyses, ta disponibilité et ton expertise m'ont été d'un immense soutien. Merci à toute l'équipe du secrétariat, **Marie**, **Isabelle**, **Charlotte** et **Florence** pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide qui m'ont grandement facilité le quotidien. Je te remercie aussi Isabelle pour ton enthousiasme pour mon introduction ! Merci également à toute l'équipe animalerie, **Greg**, **Hugo**, **Grégoire** et **Claudine** pour avoir pris soin de mes petites souris, merci pour votre vigilance, vos conseils et pour toujours avoir été arrangeants.

A **Milan** et **Marjorie**, merci pour votre amitié, de m'avoir toujours soutenu et écouté, même pendant ma rédaction où je n'étais pas la plus agréable. Partager ce bureau avec vous et Marie a été une source de joie et de complicité au quotidien. Nos discussions, nos délires de redécoration (Team Poufsouffle), nos gossips et nos coups de gueules, ont rendu ces moments de travail bien plus légers et agréables. Merci d'avoir rendu cette expérience aussi enrichissante et mémorable.

A **Marie**, ma binôme de thèse, avec qui tout a commencé et sans qui je n'aurais pas pu continuer. On s'était promis de faire notre thèse ensemble mais ton soutien à toute épreuve a largement dépassé nos engagements. Ta gentillesse, ton soutien et ton amitié sincère ont été des rayons de soleil qui ont illuminé mes journées et ont enrichi mes moments de bonheur. Je ne peux pas « juste » te remercier pour ces quatre années, mais je peux juste te promettre que notre belle amitié se poursuivra au-delà de cette thèse.

Merci, **Flore**, pour être cette amie extraordinaire, toujours là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Ta capacité à écouter, comprendre et apporter du réconfort est une qualité précieuse que je chéris profondément. Nos éclats de rire, nos

conversations profondes et nos soirées partagées avec **John** resteront gravés dans ma mémoire comme autant de souvenirs précieux. Et peu importe le temps qu'on met à se répondre mutuellement à nos messages, je sais qu'on se retrouvera très bientôt pour de nouvelles aventures !

A la team microglies (Flore Marie Pauline Sarah Milan), que j'ai trainé plus ou moins de force à m'aider dans mes extractions, je vous dois toujours un verre (même plusieurs) !

Enfin merci (ou pas) pour cette journée de galère passée ensemble dans cette voiture pour rentrer du Portugal (les concernés se reconnaîtront) qui reflète parfaitement pour moi l'ambiance conviviale et l'esprit d'équipe qui caractérisent le laboratoire.

A tous, votre présence et votre implication ont rendu mon expérience au sein du labo des plus enrichissantes.

Merci à mes amies du Master, le cookie gang, sans qui je n'aurais certainement pas été si loin. Merci à **Célia, Cassandre, Romane, Charlène** et **Jade** (oui j'ai choisi de ne pas afficher publiquement nos surnoms douteux) pour tous nos délires, pour les coronapéros et pour les parties de loup-garou tous les midis ! Vous êtes des amies incroyables. Merci de voir la vie en rose avec moi et d'être mes demoiselles d'honneur.

A mon bébé d'amour, **Maelys**, ma meilleure amie depuis plus de 10 ans (aïe, la 30aine approche !) et ma témoin. Malgré les années et la distance, notre lien est toujours plus fort. Merci pour tous les moments qu'on a vécus et tous ceux qu'on vivra encore (bientôt la Crête !!). Je ne saurais même plus me rappeler de tous nos délires mais une chose est sûre, tu as fait de moi la femme que je suis.

Je tiens également à remercier **Nico, Claire, Bastien, Marine, Louis, Corentin** et **Farah**, qui simplement par quelques mots, m'ont encouragé, soutenu et apporté une précieuse dose de motivation.

Un énorme merci à mes **parents** pour le soutien inconditionnel et l'amour infini que vous m'avez prodigué tout au long de ma vie et particulièrement durant ces années de thèse. Je suis consciente que tout ce que j'ai accompli jusqu'à présent est le fruit de vos efforts et de votre amour. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour les valeurs que vous m'avez inculquées. Aujourd'hui, je célèbre non seulement ma réussite, mais aussi la vôtre, car elle est le reflet de votre soutien indéfectible.

Merci à ma **sœur**, à mes **frères**, pour la famille soudée que l'on forme. On ne se le dit pas assez dans la famille mais j'vous aime !

Merci également à ma **belle-famille** pour votre accueil chaleureux. Je suis reconnaissante de faire partie de votre famille et d'avoir la chance de vous avoir comme belle-famille. Votre gentillesse, votre générosité et votre ouverture d'esprit ont enrichi ma vie d'une manière indescriptible. Je suis également reconnaissante pour l'exemple que vous incarnez **Georges**, et j'espère un jour, pouvoir marcher dans vos pas.

Et the last but not least, mon **Namour** ! Comment te remercier simplement en quelques lignes ? Merci tout simplement d'être toi, d'être sincère, honnête, aimant, drôle, intelligent ... Merci pour ton soutien inconditionnel, tes conseils qui m'aident à être la meilleure version de moi (but final), et ta joie de vivre, personne ne me fait autant rire que toi. Je t'aime tout simplement et j'ai hâte de d'épouser dans quelques mois. #Daijobu #DosFuegos #RideOrDieTilTheEnd

RESUME :

Le fructose, un monosaccharide naturellement présent dans les fruits et le miel, a vu sa consommation décupler ses dernières décennies, avec aujourd'hui une consommation quotidienne se situant autour des 55g. Bien qu'un grand nombre d'études ont démontré l'effet délétère d'une consommation de fructose sur les troubles métaboliques, les effets de ce sucre sur la santé cérébrale ont été négligés. Le cerveau est entièrement équipé pour absorber et métaboliser le fructose. En effet, le transporteur spécifique du fructose, GLUT5, est exprimé presque exclusivement dans la microglie. Des défauts du contrôle de la neuroinflammation, un processus contrôlé par ces cellules, sont associés à des troubles du comportements émotionnels et mnésiques. D'autre part, une consommation de fructose conduit à une dysbiose intestinale. Cette dysbiose peut également induire des troubles de l'humeur et de la mémoire. Ainsi, l'hypothèse de ce projet est qu'une consommation de fructose peut perturber la santé cérébrale directement via des altérations de la microglie, et/ou indirectement via une dysbiose du microbiote intestinal. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé plusieurs approches complémentaires. Nos résultats *in vitro* révèlent que le fructose perturbe la réponse inflammatoire des microglies. *In vivo*, nos résultats montrent qu'une alimentation enrichie en fructose induit des comportements de type anxiodépressifs, ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale. Ils révèlent aussi l'implication clef des cellules microgliales dans l'établissement de ces troubles. Parallèlement, nos résultats *in vivo* et notre étude clinique mettent en lumière l'implication du microbiote intestinal dans l'établissement de comportement pseudo-dépressifs ou de traits anxieux, induits par la malabsorption du fructose. Ces données pourront contribuer à améliorer les recommandations alimentaires actuelles.

Mots clés : fructose ; microglie ; microbiote intestinal ; neuroinflammation ; santé cérébrale ; troubles de l'humeur

ABSTRACT:

Fructose, a monosaccharide naturally occurring in fruits and honey, has seen its consumption increase tenfold in recent decades, with today a daily intake around 55g. While numerous studies have demonstrated the deleterious effects of fructose consumption on metabolic disorders, the effects of this sugar on brain health have been neglected. The brain is fully equipped to absorb and metabolize fructose. Indeed, the fructose-specific transporter, GLUT5, is expressed almost exclusively in microglia. Defects in the control of neuroinflammation, a process controlled by these cells, are associated with emotional and memory disorders. Moreover, fructose consumption leads to intestinal dysbiosis. This dysbiosis can also induce mood and memory disorders. Thus, the hypothesis of this project is that fructose consumption can disrupt brain health directly through alterations in microglia and/or indirectly through dysbiosis of the intestinal microbiota. To address this hypothesis, we used several complementary approaches. Our *in vitro* results reveal that fructose disrupts the inflammatory response of microglia. *In vivo*, our results show that a fructose-enriched diet induces anxiodepressive-like behaviors, as well as spatial memory impairment. They also reveal the key role of microglial cells in the establishment of these disorders. In parallel, our *in vivo* results and clinical study highlight the involvement of the intestinal microbiota in the establishment of pseudo-depressive behaviors or anxious traits induced by fructose malabsorption. This data could contribute to improving current dietary recommendations.

Keywords: fructose; microglia; gut microbiota; neuroinflammation; brain health; mood disorders

SOMMAIRE :

PREAMBULE :	1
INTRODUCTION	7
1. Nutrition	9
1.1 Les glucides.....	9
1.2 La digestion des glucides.....	12
1.2.1 <i>La dégradation des glucides</i>	12
1.2.2 <i>L'absorption des sucres</i>	12
1.2.3 <i>Rôle du microbiote intestinal</i>	13
2. Les sucres	14
2.1 Le saccharose	14
2.2 Le Glucose	14
2.3 Le Fructose.....	15
2.4 Le caramel.....	15
2.5 Le sucre inverti	16
2.6 Les sirops de fructose.....	16
2.7 Le sirop d'Agave	17
3. Les sucres dans l'alimentation	18
3.1 Recommandations alimentaires.....	18
3.2 Consommation de sucre.....	19
3.3 Consommation de fructose	22
4. Le fructose	24
4.1 Absorption du fructose.....	25
4.2 Métabolisme du fructose.....	27
4.3 Effets du fructose sur le métabolisme	31
4.3.1 Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)	31
4.3.2 Diabète de type 2	32
4.3.3 Obésité.....	33
4.3.4 Maladies du rein	33
4.3.5 Maladies cardiovasculaires.....	34
4.3.6 Maladies inflammatoires intestinales	35
4.3.7 Cancer.....	36
4.4 Fructose et microbiote	38
4.4.1 Composition du microbiote	38

4.4.2	Malabsorption du fructose	39
4.4.3	Effets du fructose sur le microbiote intestinal	40
4.5	Fructose et cerveau	42
5.	La microglie	46
5.1	Origines des cellules microgliales	47
5.2	Les fonctions microgliales.....	48
5.3	La réponse inflammatoire de la microglie.....	51
5.3.1	Les cytokines pro-inflammatoires.....	52
5.2.1.1	<i>IL-1β</i>	52
5.2.1.2	<i>IL-6</i>	53
5.2.1.3	<i>TNF-α</i>	54
5.3.2	Les cytokines anti-inflammatoires.....	54
5.2.2.2	<i>TGF-β</i>	55
5.4	La signature homéostatique de la microglie	58
5.4.1	P2RY12 / P2Y12R.....	59
5.4.2	GLUT5.....	60
5.4.3	Tmem119	62
5.4.4	TGFBR2	62
5.4.5	CX3CR1	63
6.	Fructose et microglie	63
6.1	Fructose et neuroinflammation <i>in vivo</i>	63
6.2	Fructose et microglie <i>in vitro</i>	65
7.	Le fructose et la santé cérébrale	67
7.1	L'inflammation et la santé cérébrale	69
7.2	Le microbiote et la santé cérébrale	70
8.	Hypothèse et objectifs de la thèse	73
	Partie 1 : Définir les effets directs du fructose sur la microglie <i>in vitro</i>	74
	Partie 2 : Révéler l'impact du fructose alimentaire sur la microglie et la santé cérébrale	74
	Partie 3 : Evaluer l'implication du microbiote dans la santé cérébrale	75
MATERIELS ET METHODES		77
1.	Autorisation à expérimenter	79
2.	Animaux	79
2.1	Hébergement.....	79
2.2	Régimes alimentaires	80
2.3	Souris sauvages	81
2.4	Modèles transgéniques.....	81

2.5.1. Lignée Glut5-KO whole body.....	81
2.5.2. Lignée Glut5-KO sélectivement dans la microglie ou Glut5-KD.....	81
3. Traitements pharmacologiques	83
4. Tests comportementaux et métaboliques	83
4.1 Tests mesurant le comportement pseudo-anxieux.....	84
4.1.1 Test du champ ouvert (Open Field ; OF)	84
4.1.2 Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze ; EPM).....	84
4.1.3 Alimentation supprimée par néophobie (Novelty Suppressed Feeding test ; NSF).....	85
4.2 Tests mesurant le comportement pseudo-dépressif.....	86
4.2.1 Test d'éclaboussure (Splash Test ; ST).....	86
4.2.2 Test de nage forcée (Forced Swim Test ; FST).....	87
4.3 Tests mesurant la cognition	87
4.3.1 Piscine de Morris (Morris Water Maze ; MWM)	87
4.3.2 Test de mémorisation de localisation d'objet (Object Location memory ; OLM).....	89
4.4 Tests métaboliques.....	90
4.4.1 Test de tolérance au glucose.....	90
4.4.2 Test de résistance à l'insuline	90
4.4.3 EchoMRI.....	90
5. Procédure de mises à mort	91
6. Extraction de microglies.....	91
7. Culture primaire de microglies.....	92
8. Biologie moléculaire	94
8.1 Extraction d'ARN	94
8.2 Transcription inverse	94
8.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)	95
9. Statistiques.....	95
9.1 Distribution Gaussienne.....	95
9.2 Tests statistiques	96
9.3 Analyse Post-Hoc	96
RESULTATS.....	97
Partie 1 : Définir les effets directs du fructose sur la microglie <i>in vitro</i>.....	99
1.1 Mise au point de la culture primaire de microglies adultes	99
1.2 Effets du fructose sur la physiopathologie des microglies	102
1.2.1 Impact de la déficience du transporteur Glut5 sur la physiologie des microglies	102
1.2.2 Effets du fructose sur la signature homéostatique	104

1.2.3 Effets du fructose sur l'expression basale de cytokines inflammatoires ...	105
1.2.4 Effets du fructose sur la réponse inflammatoire.....	107
1.3 Impact de la durée d'exposition et de la concentration en fructose	110
1.3.1 Effets à court terme du fructose	110
1.3.2 Effets-dose du fructose	112
1.5 Discussion des résultats	115
1.6 Conclusion.....	123
Partie 2 : Etude des effets d'une consommation de fructose sur la microglie et ses conséquences sur la santé cérébrale.....	125
2.1 Distribution cérébrale du fructose périphérique.....	125
2.2 Impact d'une consommation de fructose sur la santé cérébrale et le métabolisme.....	127
2.2.1 Sur le métabolisme	127
2.2.2 Sur la santé cérébrale	130
2.3 Impact d'une consommation de fructose sur la microglie.....	133
2.4 Implication de la microglie dans les effets délétères du fructose sur la santé cérébrale	135
2.4.1 Validation du modèle double transgénique Glut5-KD	135
2.4.2 Etude du métabolisme.....	137
2.4.3 Etude de la santé cérébrale	139
2.4.4 Etude de la microglie.....	141
2.5 Discussion des résultats	143
2.6 Conclusion.....	153
Partie 3 : Implication du microbiote dans la santé cérébrale.....	155
DISCUSSION GENERALE	197
CONCLUSION	205
REFERENCES.....	207
SITES.....	250

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Expression tissulaire et Km des transporteurs du fructose. (Adapté de Manolescu et al., 2007 ; Patel et al., 2015 ; Thorens & Mueckler, 2013).	27
Tableau 2 : Composition des régimes alimentaires utilisés pour nos expérimentations.	80
Tableau 3 : Comparaison de la composition des milieux de culture.	93
Tableau 4 : Résumé des effets métaboliques et comportementaux d'un régime enrichi en fructose.	152
Tableau 5 : Tableau comparatif des nomenclatures taxonomiques des bactéries du microbiote intestinal.	156

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Première représentation préhistorique de cueillette de miel retrouvée en Espagne, datée de la fin du paléolithique.	2
Figure 2 : Frise chronologique des grandes étapes de l'histoire de la consommation des sucres.	6
Figure 3 : Classification biochimique des oses.	10
Figure 4 : Structures moléculaires de l'amylose (A) et de l'amylopectine (B).	11
Figure 5 : Image d'une bouteille de sirop d'agave présente dans les supermarchés. ..	17
Figure 6 : Représentation de la taille d'un paquet de sucre de 1kg et de la chaîne de sucre que représente l'équivalent de la consommation mondiale de sucre en 2024.	19
Figure 7 : Diagramme de la consommation de sucre par classe d'âge, ainsi que des recommandations alimentaires établies par l'ANSES en fonction de l'âge. (ANSES, INCA 3).	22
Figure 8 : Photo d'étiquettes de produits industriels révélant les différents types de sucre utilisés. (Photos issues d'archives personnelles).	23
Figure 9 : Formule chimique d'une molécule de Glucose (A) et d'une molécule de Fructose (B).	25
Figure 10 : Les principaux transporteurs impliqués dans l'absorption du fructose. (Adapté de Biesiekierski, 2014).	26
Figure 11 : Métabolisme du fructose. (Adapté de Hannou et al., 2018).	30
Figure 12 : Effets d'une consommation de fructose sur le métabolisme.	37
Figure 13 : Classifications bactérienne (A) et composition du microbiote d'une population en bonne santé (B). (Adapté de Arora & Bäckhed, 2016).	38
Figure 14 : Relation entre la dose de fructose (en grammes) et le pourcentage de cas positifs de malabsorption au test d'hydrogène respiratoire au fructose chez les adultes en bonne santé. (Adapté de Jones et al., 2011).	39
Figure 15 : Effets d'une malabsorption de fructose sur l'homéostasie intestinale. (Adapté de Jung et al., 2022).	41

Figure 16 : Expression des ARN des gènes GLUT5 (A) et KHK (B) par les cellules cérébrales chez l'Homme. (Adapté de Zhang et al., 2016)	45
Figure 17 : Métabolisme du fructose dans les cellules microgliales.	46
Figure 18 : Représentations des fonctions assurées par la microglie. (Adapté de Paolicelli et al., 2022).	49
Figure 19 : Voies de transduction du signal et réponses biologiques majeures des principales cytokines modulatrices de l'inflammation. (Adapté de Lin & Karin, 2007).	56
Figure 20 : Profils d'expression des cytokines inflammatoires au cours d'une infection. (Adapté de Steeland et al., 2018).	57
Figure 21 : Expressions de GLUT5 dans différentes conditions physiopathologiques. (Extrait de jeux de données transcriptomiques - Krasemann et al., 2017)	61
Figure 22 : Expression de GLUT5 dans différents modèles de culture primaire de microglies. (Adapté de Butovsky et al., 2014).	66
Figure 23 : Construction génétique du modèle GLUT5-KD.	82
Figure 24 : Principe d'induction de la délétion du gène GLUT5 par l'administration de tamoxifène. (Adapté de Kim et al., 2018).	82
Figure 25 : Le champ ouvert.	84
Figure 26 : Le labyrinthe en croix surélevé.	85
Figure 27 : Alimentation supprimée par néophobie.	86
Figure 28 : Test d'éclaboussure.	86
Figure 29 : La nage forcée.	87
Figure 30 : La piscine de Morris.	88
Figure 31 : Mémorisation de localisation d'objet.	89
Figure 32 : Validation de l'équivalence des milieux F12 et SILAC sur la physiopathologie des cultures primaires de microglies adultes.	101
Figure 33 : Etude de la physiologie des microglies du modèle GLUT5-KO.	103
Figure 34 : Etude de la signature homéostatique de microglies WT et KO exposées au fructose.	104

Figure 35 : Etude de l'expression basale de gènes de cytokines inflammatoires de microglies WT et KO exposées au fructose.	106
Figure 36 : Etude de la cinétique de la réponse inflammatoire au LPS de microglies WT exposées au fructose.	108
Figure 37 : Etude de la réponse inflammatoire au LPS de microglies GLUT5-KO exposées au fructose.	109
Figure 38 : Etude de la physiopathologie des microglies après une exposition de 24h au fructose.	111
Figure 39 : Etude des effets de la dose du fructose sur la physiopathologie des microglies.	114
Figure 40 : Distribution cérébrale de ¹⁴C-glucose et ¹⁴C-fructose.	126
Figure 41 : La consommation d'un régime enrichi en fructose induit des troubles métaboliques.	128
Figure 42 : La consommation d'un régime enrichi en fructose induit des comportements de types anxiodépressifs et des troubles de la mémoire.	131
Figure 43 : Etude des effets d'une consommation d'un régime enrichi en fructose sur la physiologie des microglies de l'hippocampe.	134
Figure 44 : Validation de la délétion spécifique de GLUT5 dans les cellules microgliales.	136
Figure 45 : Etude du métabolisme des souris WT et GLUT5-KD sous régime contrôle ou enrichi en fructose.	138
Figure 46 : Etudes des comportements émotionnels et mnésique des souris WT et GLUT5-KD sous régime contrôle ou enrichi en fructose.	140
Figure 47 : Etude des effets d'une consommation d'un régime enrichi en fructose sur la physiologie des microglies de l'hippocampe issues de souris WT et GLUT5-KD.	142
Figure 48 : Construction génétique d'un nouveau modèle de délétion du gène GLUT5 sous le promoteur CX3CR1.	148
Figure 49 : Recommandations alimentaires du PNNS. (Adapté du PNNS 4).	204
Figure 50 : Bilan des effets d'une consommation de fructose sur la santé cérébrale.	206

LISTE DES ABREVIATIONS

Acétyl-CoA : Acétylcoenzyme A	DAM : Disease-Associated Microglia
ACLY : ATP citrate lyase	DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
ACSS2 : Acétyl-CoA synthétase 2	DNL : De Novo Lipogenesis
ADNc : ADN complémentaire	EPM : Elevated Plus Maze
ADP : Adénosine diphosphate	FST : Forced Swim Test
AET : Apport énergétique totale	g : grammes
AG : Acides gras	G3P : Glycérol-3-phosphate
AGCC : Acides gras à chaîne courte	GA : Glyceraldéhyde
AldoB : Aldolase B	GA3P : Glyceraldéhyde-3-phosphate
AMPD : AMP désaminase	GF : Germ-free
AMPK : AMP-activated protein kinase	Glut5-KD : Glut5 knock down
AR : Aldose réductase	Glut5-KO : Glut5 knock out
ATP : Adénosine triphosphate	HFCS : High Fructose Corn Syrup
AU : Acide urique	HPC : Hippocampe
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor	ICE : Interleukin-1 β converting enzyme
BHE : Barrière hémato-encéphalique	ICV : Intra-cérébroventriculaire
CES : Conseil d'État Scientifique	IL-1β : Interleukine 1 β
COX-2 : Cyclooxygénase-2	IL-6 : Interleukine 6
CRP : Protéine C-réactive	iNOS : Inducible nitric oxide synthase
Ct : Cycle threshold	IP : Intrapéritonéal

iPSC : Induced pluripotent stem cells

IRM : Imagerie par résonance magnétique

JAK-STAT : Janus Kinase-Signal
transducer and activator of transcription

Kcal : kilocalories

KHK : Kétohexokinase

LDAM : Lipid-droplet-accumulating
microglia

LPS : Lipopolysaccharide

LTP : Long-term potentiation

MAPK : MAPkinases

MCV : Maladies cardiovasculaires

MetS : Syndrome métabolique

MGnD : microglia in neurodegeneration

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques
de l'Intestin

Mt : Millions de tonnes

MWM : Morris Water Maze

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NFκB : Nuclear Factor-Kappa B

NO : Monoxyde d'azote

NSF : Novelty Suppressed Feeding

OF : Open Field

OLM : Object Location memory

PNNS : Programme National Nutrition
Santé

qPCR : Réaction de polymérisation en
chaîne quantitative

SD : Sorbitol déshydrogénase

SEM : Erreur standard de la moyenne

SEP : Sclérose en plaques

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SNC : Système nerveux central

ST : Splash Test

STD : Régime alimentaire standard

TAG : Triglycérides

TEP : Tomographie par émission de
positron

TGFBR2 : Récepteur au facteur de
croissance transformant bêta de type 2

TGF-β : Facteur de croissance
transformant bêta

TNF-α : Facteur de nécrose tumorale α

UE : Union Européenne

WT : Wild type

ΔCt : Différence de Ct

PREAMBULE :

L'histoire de la consommation des sucres

Avant tout, il est crucial de comprendre que notre consommation de sucre a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, principalement en raison de la disponibilité accrue d'aliments transformés et de boissons sucrées (Semnani-Azad et al., 2020). Prendre en compte l'histoire des sucres est nécessaire pour contextualiser cette augmentation de consommation. En effet, cette histoire est riche et complexe, s'étendant sur des millénaires et est marquée par des évolutions tant sur le plan de la production que de la consommation. Voici les points clés de l'évolution de l'utilisation du sucre à travers l'histoire :

Attrait inné pour le sucre : L'Homme a toujours eu une affinité pour les aliments sucrés en raison de leur goût agréable et de leur capacité à fournir de l'énergie rapidement. Dès la naissance, les nouveau-nés ont une préférence naturelle pour le goût sucré par rapport aux autres saveurs telles que le salé, l'amer, l'acide et l'umami (Ventura & Mennella, 2011).

Origines anciennes : Au paléolithique, les premiers Hommes ont expérimenté le goût sucré en consommant des fruits, du miel et d'autres produits naturellement sucrés. Une figuration préhistorique a été retrouvée en Valence en Espagne, représentant une récolte de miel (Figure 1). Le miel et les fruits étaient une source de sucre importante dans l'alimentation des chasseurs-cueilleurs, leur fournissant à la fois des glucides pour l'énergie ainsi que des vitamines et minéraux essentiels (Andrews & Johnson, 2020).

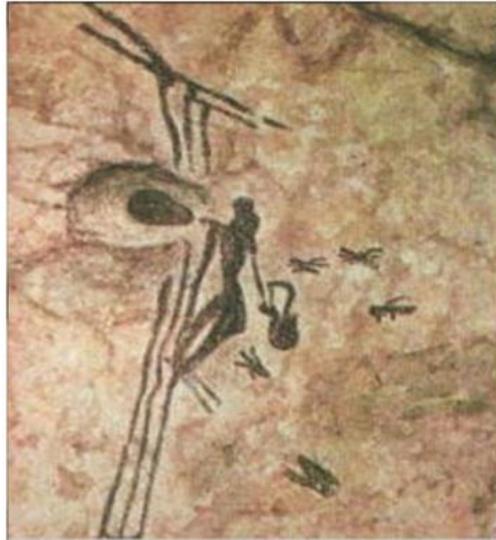


Figure 1 : Première représentation préhistorique de cueillette de miel retrouvée en Espagne, datée de la fin du paléolithique.

L'ère de la canne à sucre : La canne à sucre, originaire de la Nouvelle-Guinée, a été cultivée pour la première fois dès le IXe siècle avant JC en Océanie, dans les îles du Pacifique, et s'est progressivement répandue jusqu'en Inde et en Chine. Vers le VIe siècle avant JC, les Indiens ont été les premiers à en extraire un jus sucré qui cristallise naturellement, appelé "sarkara" (Dinesh Babu et al., 2022). Aux alentours de -510 avant JC, lors de leurs conquêtes, les Perses ont découvert la canne à sucre, ont développé sa culture et ont fabriqué les premiers pains de sucre vers 600 après JC. La culture de la canne à sucre s'est ensuite propagée jusqu'en Égypte.

L'expansion Mondiale du Sucre : Au VIIe siècle, les Arabes ont envahi la Perse, étendant la culture de la canne à sucre à travers le monde musulman. Son utilisation s'est répandue dans le monde entier grâce aux échanges commerciaux et aux voyages maritimes. Entre le XIe et le XIIe siècles, les croisades ont permis aux Occidentaux de découvrir le sucre de canne, et son importation a débuté via le port de Venise, devenant un produit de luxe et médicinal. Son prix exorbitant, équivalant à 25,4 kg de fromage pour 1 kg de sucre, a limité son accès à la royauté, contribuant à l'obésité de nombreux monarques, dont Guillaume le Conquérant, qui fut même accusé d'être enceinte en raison de son poids (Johnson et al.,

2017). En 1453, après la prise de Constantinople (aujourd'hui Istanbul) et la fermeture de la mer Noire par les Turcs, les voies commerciales orientales ont été interrompues. Les Européens ont dû alors rechercher de nouvelles voies pour s'approvisionner en sucre.

Colonisation et esclavage : Au XVI^e siècle, la découverte du Nouveau Monde a entraîné l'introduction de la culture de la canne à sucre dans les colonies européennes, en particulier aux Antilles. Cette culture, basée sur l'emploi massif d'esclaves, a constitué le pilier de l'économie du commerce triangulaire, marquant une période sombre de l'histoire. Les Européens ont réduit les coûts de production et stimulé la demande de sucre. L'Angleterre a dominé le marché en stockant initialement le sucre, ce qui a conduit à une augmentation spectaculaire de la consommation par rapport à d'autres pays comme la France. L'Angleterre a été confrontée aux premiers problèmes de santé liés à la surconsommation de sucre, tels que l'obésité, le diabète, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Johnson et al., 2017).

La betterave sucrière : Au XVII^e siècle, l'agronome français Olivier de Serres a été le premier à identifier un composé similaire au sucre de canne dans la betterave, une plante cultivée en Europe depuis le Moyen Âge. Au XVIII^e siècle, le sucre est devenu plus accessible à une plus grande population et est de plus en plus utilisé en cuisine. En 1747, le chimiste allemand Andreas S. Marggraf découvre que la betterave contient « du sucre véritable, parfaitement identique » à celui de la canne à sucre (Lentze, 2018). Franz K. Achard, a poursuivi les recherches de Marggraf et a construit en 1802 la première usine de sucre de betterave. En 1806, pendant les guerres napoléoniennes, le blocus continental décrété par Napoléon I^{er} contre l'Angleterre a entraîné une recherche de sources alternatives de sucre en Europe (Lentze, 2018). Benjamin Delessert a réussi à extraire le sucre de la betterave en grande quantité en 1812, recevant la Légion d'honneur de Napoléon et lançant ainsi l'industrialisation française de la culture du sucre de betterave. Enfin, en 1843, le confiseur tchèque Jacob Kristof Rad a été le premier à produire des morceaux de sucre à partir de la betterave.

Révolution industrielle et raffinage : Au XIXe siècle, la révolution industrielle a apporté des avancées dans le raffinage du sucre, conduisant à la production de sucre blanc cristallisé. Cela a rendu le sucre plus abordable. Le sucre est devenu un ingrédient omniprésent dans l'alimentation transformée et les boissons, contribuant à la consommation croissante de sucre dans de nombreux pays. Actuellement, 20 % du sucre mondial provient de la betterave, et en France, plus de 90 % du sucre consommé est issu de cette plante.

High Fructose Corn Syrup (HFCS) : En 1967, aux États-Unis, des industriels ont mis au point un sirop riche en fructose à partir du maïs (Parker et al., 2010). Ce sirop est produit par une série de réactions enzymatiques : tout d'abord, l'amidon de maïs est hydrolysé en glucose, puis le glucose est transformé en fructose. Ce monosaccharide, naturellement présent dans les fruits et le miel, possède un pouvoir sucrant supérieur au glucose. Par conséquent, l'utilisation du HFCS permet de : i) obtenir un goût sucré avec moins de sucre, ii) réduire les coûts de production des produits sucrés, iii) diversifier les méthodes de production, et iv) produire du sucre dans des régions tempérées. Les nombreux avantages économiques et organoleptiques de ce sirop ont conduit à sa généralisation, notamment à partir de 1975, avec le soutien des subventions gouvernementales aux producteurs de maïs.

Développements modernes et préoccupations pour la santé : Aujourd'hui, la demande et la production de sucre connaissent une croissance exponentielle. La production de sucre est passée de 11 millions de tonnes en 1900 à près de 190 millions en 2023 (France Agrimer). Quant à la demande, elle est passée de 1,8 kilo par personne par an en 1700 (moins de 5 g par jour par personne) à 60 kilos en 2012. Cette consommation excessive de sucre a été associée à divers problèmes de santé, notamment l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiaques (Jung et al., 2022 ; Parker et al., 2010 ; Stanhope, 2016). Cela a conduit à une prise de conscience croissante des effets néfastes du sucre sur la santé, et de nombreuses initiatives ont été lancées pour encourager une réduction de la consommation de sucre et promouvoir des alternatives plus saines.

Ainsi, l'histoire des sucres est une saga fascinante qui reflète l'évolution de l'agriculture, du commerce, de la technologie alimentaire et des tendances de consommation à travers les âges. Aujourd'hui, l'histoire du sucre est étroitement liée à des questions de santé publique. En effet, cette augmentation de la consommation de sucre, en particulier de fructose, est associée à un certain nombre de problèmes de santé, notamment l'obésité, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, et maintenant, de plus en plus de recherches suggèrent qu'elle peut également avoir des implications sur la santé cérébrale. C'est dans ce contexte, au cœur des préoccupations actuelles, que s'inscrit mon sujet de thèse : **Impact de la consommation de fructose sur la microglie et la santé cérébrale**. L'enjeu majeur de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension des effets du fructose sur le cerveau pour mieux informer les recommandations en matière d'alimentation et de prévention des troubles cérébraux.

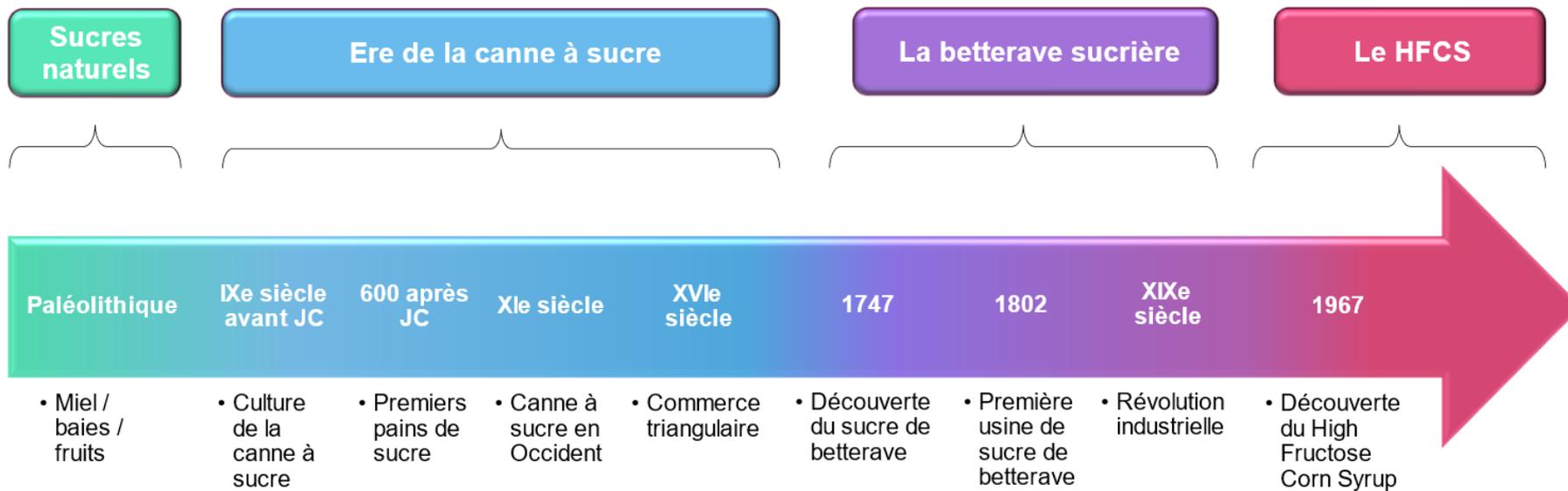


Figure 2 : Frise chronologique des grandes étapes de l'histoire de la consommation des sucres.

INTRODUCTION

1. Nutrition

La nutrition, du latin *nutrire* : nourrir, est le processus par lequel les êtres vivants transforment les aliments en nutriments pour assurer leur fonctionnement. Ces derniers sont divisés en macronutriments et micronutriments.

Les micronutriments sont des substances vitales, nécessaires en petites quantités pour maintenir un bon fonctionnement du corps humain. Ils comprennent les vitamines et les minéraux (Shenkin, 2006). Les vitamines sont des substances organiques devant être apportées par l'alimentation. Elles se divisent en vitamines liposolubles (A, D, E, K) et hydrosolubles (C et vitamines du groupe B). Les minéraux sont les constituants restants après la calcination des tissus organiques et sont classés en macro-éléments (nécessitant des apports supérieurs à 100 mg par jour) et oligo-éléments (présents en traces).

Les macronutriments fournissent l'énergie nécessaire à l'organisme et se divisent en trois catégories : lipides, glucides et protéines. Certains de ces macronutriments, comme des acides aminés dits essentiels, et des lipides comme les oméga-3, doivent être apportés par l'alimentation car l'organisme ne peut pas les produire directement. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur les glucides.

1.1 Les glucides

Les glucides sont la principale source d'énergie pour le corps et jouent un rôle crucial dans divers aspects de la nutrition. Dans un régime alimentaire équilibré, ils représentent 30 à 70% de la ration alimentaire (OMS, 2023). Les glucides remplissent des fonctions telles que fournir de l'énergie, faciliter l'assimilation des lipides, apporter des fibres alimentaires et susciter l'appétence grâce à leur saveur sucrée. Le terme "glucide" englobe une vaste famille de composés, allant des molécules simples appelées oses aux molécules complexes résultant

de l'assemblage d'oses. Les glucides peuvent ainsi être catégorisés en fonction de leur niveau de polymérisation d'un point de vue chimique, ou selon leur métabolisme digestif d'un point de vue physiologique.

La classification basée sur la structure chimique divise les glucides en fonction du nombre d'unités osidiques présentes dans la molécule (Figure 3). On distingue donc les oses simples ou sucres simples (comme le glucose, le fructose et le galactose), les diosides ou disaccharides (comme le saccharose et le lactose) et les polyosides ou sucres complexes (avec plus de 10 unités osidiques, tels que l'amidon, le glycogène et la cellulose). Les oses simples et les diosides sont souvent désignés sous le terme de « sucres », tandis que les polyosides sont généralement appelés « glucides ». Certains polyosides, comme la cellulose, ne sont pas digestibles mais jouent un rôle important en tant que fibres alimentaires, favorisant le transit intestinal.

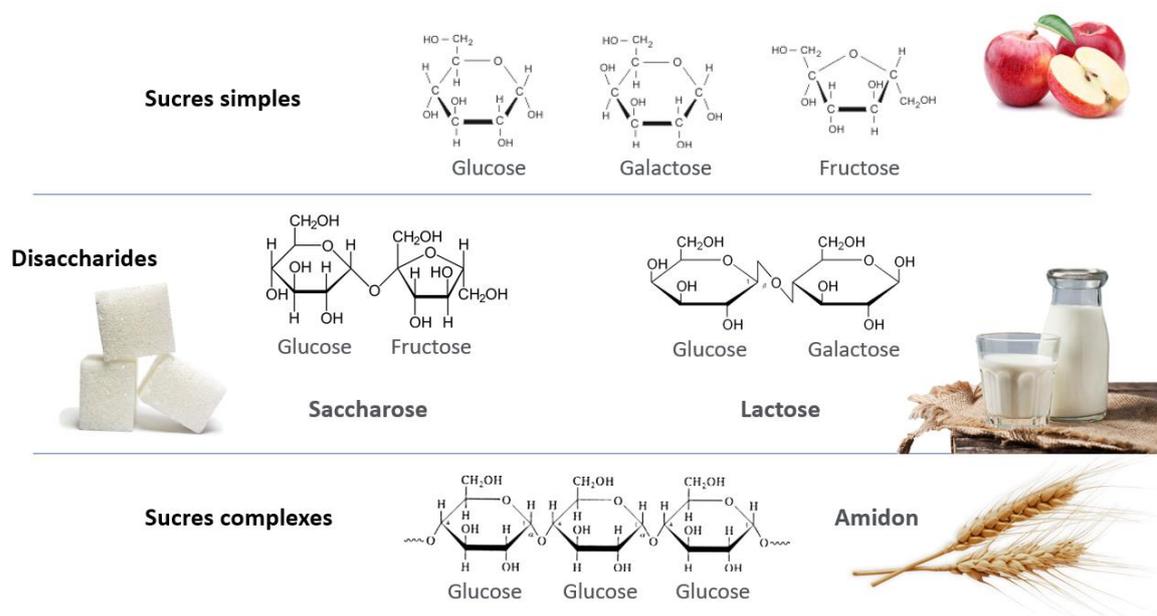


Figure 3 : Classification biochimique des oses.

D'un point de vue physiologique, les glucides sont classés en fonction de leur indice glycémique, qui mesure leur impact sur la glycémie (taux de glucose sanguin) après leur ingestion. Les « sucres » ont un indice glycémique élevé (supérieur à 70 sur 100, 100 étant l'effet de l'ingestion de glucose pur), entraînant une augmentation rapide de la glycémie, tandis que les « glucides » ont un indice glycémique faible (inférieur à 55) (Brand-Miller et al., 2008). Les fibres alimentaires, souvent des polymères glucidiques indigestibles, n'ont pas d'impact direct sur la glycémie.

Néanmoins, il est important de comprendre que l'indice glycémique et l'indice de polymérisation des glucides ne sont pas des concepts strictement liés. Par exemple, l'amidon, un polymère de glucose, peut exister sous deux formes principales : l'amylose, qui a une structure linéaire, et l'amylopectine, qui est hautement ramifiée (Figure 4). L'amylopectine, en raison de sa structure ramifiée, est plus rapidement décomposée par l'organisme, ce qui entraîne une augmentation rapide de la glycémie. En revanche, l'amylose, avec sa structure linéaire, est digérée plus lentement, entraînant une élévation moins importante de la glycémie.

Il convient également de noter que la préparation des aliments peut influencer leur indice glycémique. Des facteurs tels que le temps de cuisson, la température et le traitement, comme la réduction en purée ou en jus, peuvent augmenter l'indice glycémique en rendant les aliments plus faciles à digérer et à absorber. De même, la composition globale du repas peut affecter l'assimilation des glucides. Un repas complexe, riche en fibres, prolonge la digestion et ralentit la libération des sucres dans le sang.

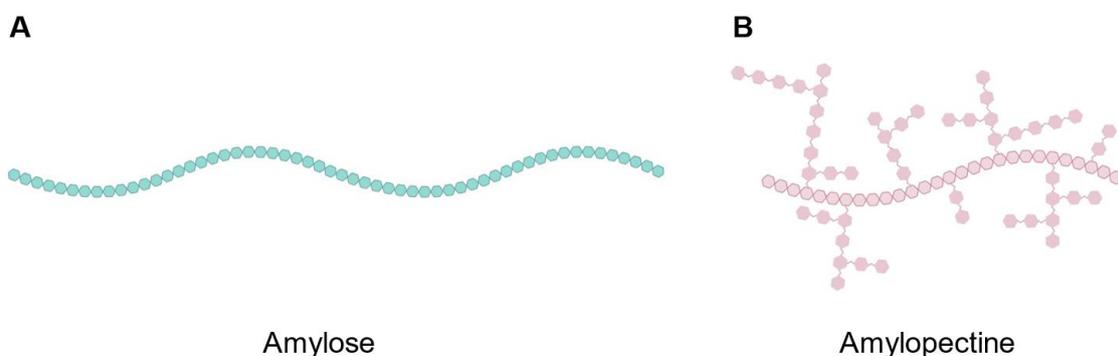


Figure 4 : Structures moléculaires de l'amylose (A) et de l'amylopectine (B).

1.2 La digestion des glucides

La digestion des sucres est un processus permettant la décomposition des glucides alimentaires en composants plus simples pouvant être absorbés et utilisés par l'organisme. Ce processus complexe est orchestré par différentes enzymes et se déroule dans le tube digestif, impliquant également le microbiote intestinal.

1.2.1 La dégradation des glucides

Lors de la digestion, les aliments sont broyés par la mastication et une première dégradation enzymatique se produit par la salive grâce à l'amylase salivaire (Levin, 1994). Dans l'estomac, les glucides sont exposés à l'acide chlorhydrique et à des enzymes digestives. Cet acide contribue à décomposer les liaisons chimiques des aliments et à tuer les bactéries potentiellement nocives présentes dans les aliments. Cependant, l'acidité de cet environnement limite fortement l'action de l'amylase, la digestion des glucides y est donc minime (Levin, 1994). Lorsque les aliments partiellement digérés atteignent l'intestin grêle, cela stimule la libération de sucs pancréatiques qui contiennent des enzymes digestives actives dans un pH alcalin optimal pour la digestion des glucides. Les principales enzymes impliquées dans cette digestion sont l'amylase pancréatique et les enzymes de dégradation des disaccharides (maltase, sucrase, lactase). L'amylase pancréatique décompose les polysaccharides tels que l'amidon et le glycogène en maltose, un disaccharide glucose-glucose (Levin, 1994). Les enzymes spécifiques de dégradation des disaccharides décomposent ensuite le maltose, le saccharose (glucose + fructose) et le lactose (glucose + galactose) en monosaccharides simples.

1.2.2 L'absorption des sucres

Les monosaccharides, tels que le glucose, le fructose et le galactose, sont absorbés à travers la paroi intestinale grâce à des transporteurs spécifiques comme SGL1, GLUT2 et

GLUT5 (Levin, 1994). Une fois dans la circulation sanguine, les monosaccharides sont transportés vers les tissus du corps, y compris le foie, les muscles et les tissus adipeux, où ils sont utilisés comme source d'énergie ou stockés sous forme de glycogène (dans le foie et les muscles) ou de graisses (dans le tissu adipeux). Le taux de glucose dans le sang est étroitement régulé par des hormones telles que l'insuline (qui abaisse la glycémie en favorisant l'absorption du glucose par les cellules) et le glucagon (qui augmente la glycémie en stimulant la libération de glucose par le foie) (Tirone & Brunicardi, 2001). Ce processus complexe garantit que les glucides consommés soient décomposés en molécules utilisables et distribués de manière appropriée dans tout le corps pour fournir de l'énergie et soutenir les fonctions métaboliques essentielles.

1.2.3 Rôle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, composé d'une myriade de micro-organismes, joue un rôle essentiel dans la digestion des glucides. En effet, les bactéries du microbiote intestinal sont capables de fermenter les fibres alimentaires non digestibles, telles que les fibres solubles, en acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate entre autres (Canfora et al., 2015). Ces AGCC sont ensuite absorbés par les cellules de la muqueuse intestinale et utilisés pour maintenir la santé et le fonctionnement de la muqueuse intestinale. D'autres part, certains sucres tels que le lactose chez les personnes intolérantes au lactose, ne sont pas entièrement absorbés dans l'intestin grêle en raison de l'absence ou de l'insuffisance de l'enzyme lactase. Les bactéries du microbiote intestinal peuvent alors fermenter le lactose non digéré, produisant des gaz et des métabolites pouvant entraîner des symptômes digestifs (Janssen-Duijghuijsen et al., 2024). De la même façon, la malabsorption du fructose est une condition dans laquelle l'intestin grêle est incapable d'absorber efficacement le fructose. Cela peut être dû à une déficience en transporteurs de fructose dans la muqueuse intestinale ou à une prise trop importante de fructose, ce qui entraîne une accumulation de fructose dans le côlon. Le fructose est alors fermenté par les bactéries du

microbiote intestinal, provoquant des symptômes digestifs tels que des ballonnements, des gaz, et des diarrhées. De plus, cette fermentation du fructose par les bactéries du colon entraîne une dysbiose du microbiote, c'est-à-dire un déséquilibre de la composition et/ou de la diversité du microbiote intestinal. Cet aspect sera développé plus tard dans ce manuscrit, dans la section « Fructose et microbiote », page 38.

2. Les sucres

2.1 Le saccharose

Le saccharose, également appelé sucre de table, sucre de canne ou cassonade, est un disaccharide composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. Il est principalement extrait de la canne à sucre ou de la betterave à sucre, bien qu'il soit présent en petites quantités dans divers fruits et légumes. Bien que le saccharose soit le sucre le plus largement utilisé dans le monde, il existe une variété d'autres produits sucrants utilisés dans l'alimentation pour fournir de la douceur, de la saveur et de la texture aux aliments et aux boissons. Ces alternatives sucrées, souvent dérivées du saccharose, comprennent des produits tels que le caramel, le sucre inverti et les sirops de glucose-fructose.

2.2 Le Glucose

Le glucose, également connu sous le nom de dextrose, est un sucre simple dont la formule chimique est $C_6H_{12}O_6$. Il peut être obtenu à partir de la digestion des glucides complexes, comme nous l'avons vu plus tôt. La réponse glycémique au glucose (50 g) est utilisée comme référence (100) dans les mesures de l'indice glycémique (Brand-Miller et al., 2009). La glycémie, ou taux de glucose dans le sang, est étroitement régulée par le corps

grâce à deux hormones pancréatiques : l'insuline et le glucagon (Tirone & Brunicardi, 2001). Lorsque l'apport en glucose excède les besoins immédiats de l'organisme, l'excès de glucose est converti en glycogène et stocké dans le foie et dans les muscles. Quand les réserves de glycogène sont saturées, le glucose supplémentaire peut également être utilisé comme substrat pour la synthèse de lipides. Ces réserves de glycogène et de lipides peuvent ensuite être mobilisées par l'organisme en cas de besoin d'énergie entre les repas ou lors d'une activité physique.

2.3 Le Fructose

Le fructose se trouve naturellement présent dans de nombreux fruits, tels que les pommes, les poires, les raisins et les agrumes, ainsi que dans le miel et les produits dérivés du sucre de canne et de betterave. En raison de son pouvoir sucrant élevé, le fructose est utilisé comme édulcorant dans de nombreux produits alimentaires transformés, tels que les boissons gazeuses, les jus de fruits, les confiseries et les produits de boulangerie (Khorshidian et al., 2021).

2.4 Le caramel

Le caramel est obtenu par la cuisson de saccharose jusqu'à ce qu'il fonde et se transforme en un liquide de couleur dorée à brune. Pendant la cuisson, le saccharose se décompose en glucose et en fructose, qui réagissent ensuite pour former des composés caramélisés appelés caramélanes et caramélines, qui donnent au caramel sa couleur et son arôme distinctifs (Sengar & Sharma, 2014). Le caramel est largement utilisé comme ingrédient dans de nombreux desserts et confiseries, ainsi que comme arôme et colorant dans divers produits alimentaires et boissons.

2.5 Le sucre inverti

Le sucre inverti est produit par hydrolyse du saccharose, conduisant à un mélange équimoléculaire de D-glucose et de D-fructose lorsque l'hydrolyse est totale. Lors d'une inversion partielle aux deux tiers, le sucre inverti contient des quantités équimoléculaires de saccharose, glucose et fructose. Il est commercialisé sous forme de sirop car le glucose cristallise à des teneurs supérieures à 66 % de matière sèche. Il peut également être utilisé en pâtisserie et en confiserie sous forme partiellement cristallisé, appelé alors la trimoline. Le sucre inverti, ayant un pouvoir sucrant élevé, ne dessèche pas et réduit le temps de cuisson. Il est couramment utilisé dans la fabrication de sorbets et de glaces pour stabiliser ces préparations. Il conserve les mêmes caractéristiques nutritionnelles que celles du saccharose.

2.6 Les sirops de fructose

Les sirops de fructose, également appelés isoglucose, sirops de maïs à haute teneur en fructose, ou sirops de glucose-fructose sont connus en anglais sous le nom de high fructose corn syrup (HFCS). Ils sont produits en hydrolysant l'amidon de maïs en glucose, puis en isomérisant une partie de ce glucose en fructose à l'aide d'enzymes spécifiques (Parker et al., 2010). Ils se déclinent en deux classes selon leur teneur en fructose et en glucose. Les HFCS-55 contiennent 55 % de fructose (et 45 % de glucose), tandis que les HFCS-42 en contiennent 42 %. Le HFCS 55 est légèrement plus sucrant que le saccharose, tandis que le HFCS 42 l'est presque autant. Ces sirops sont appréciés par l'industrie alimentaire pour leur capacité à sucrer, à conserver l'humidité, à stabiliser les produits et à prolonger leur durée de conservation. De plus, leur coût relativement bas et de leur facilité d'utilisation dans les processus de fabrication alimentaire industrielle en font un produit de choix de plus en plus utilisé. Ils sont donc retrouvés dans une large gamme de produits, tels que les boissons gazeuses, les jus de fruits, les confiseries, les produits de boulangerie, les sauces et les condiments.

2.7 Le sirop d'Agave

Le sirop d'agave est produit à partir de la sève de l'agave, une plante originaire principalement du Mexique. Cette sève est extraite des feuilles de l'agave, principalement de l'espèce *Agave tequilana*, également connue sous le nom d'agave bleu. La sève est filtrée pour éliminer les impuretés et concentrée par chauffage, ce qui donne un liquide sucré, semblable au miel en termes de texture et de couleur. Le sirop d'agave est principalement composé de fructose (environ 80% des sucres présents). Le fructose possède un fort pouvoir sucrant et un indice glycémique plus bas que le glucose, ce qui signifie qu'il entraîne une élévation moins rapide de la glycémie après sa consommation. Certains fabricants commercialisent le sirop d'agave comme un édulcorant plus sain que le sucre blanc raffiné en raison de son indice glycémique plus bas et de sa composition naturelle. Cependant, il convient de noter que le sirop d'agave est toujours riche en calories et en sucres, et sa consommation excessive peut contribuer à des problèmes de santé tels que le surpoids, l'obésité et les problèmes de santé liés à la consommation excessive de fructose.



Figure 5 : Image d'une bouteille de sirop d'agave présente dans les supermarchés.

3. Les sucres dans l'alimentation

3.1 Recommandations alimentaires

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) s'accordent sur leurs recommandations de restreindre l'apport en « sucres libres » à moins de 10 % de l'apport énergétique totale (AET). Entendez par ce terme de sucres libres tous les sucres ajoutés pendant la fabrication ou la consommation (comme le sucre de table), ainsi que toutes les boissons sucrées, y compris les jus de fruits. Ces sucres sont distingués des sucres « intrinsèques », naturellement présents dans les aliments tels que les fruits, les légumes et le lait. Pour une personne ayant un apport énergétique moyen de 2000 kilocalories (kcal) par jour, 10% de l'AET équivalent à environ 50 grammes (g) de sucres par jour (1 g de sucre = 4 kcal).

Cependant, le Conseil d'État Scientifique (CES) de l'ANSES estime qu'il n'est pas justifié de recommander de limiter uniquement les sucres libres, car les effets sur la santé des sucres naturellement présents dans les aliments ne peuvent être distingués de ceux des sucres ajoutés. Le CES a donc établi une limite maximale à l'apport total de sucres en se basant sur les données les plus fiables de la littérature, principalement obtenues avec le fructose. Cette limite de 50 g de fructose par jour, concerne les sucres contenant du fructose, tels que le saccharose, les sirops de glucose-fructose, le miel, le sirop d'agave ainsi que le fructose pur (Saisine n°2012-SA-0186). Les sucres naturellement présents dans le lait et les produits laitiers ne sont pas inclus dans cette recommandation car ne contenant naturellement pas de fructose. Le CES propose donc de fixer une limite maximale de 100 g/jour à la consommation totale de sucres, excluant le lactose et le galactose, pour la population adulte en bonne santé.

3.2 Consommation de sucre

La consommation de sucre dans le monde varie considérablement en fonction des habitudes alimentaires, des traditions culturelles, du niveau de développement économique et de l'accès aux ressources alimentaires. Cependant, de manière générale, la consommation de sucre a augmenté de manière significative au cours des dernières décennies. Cela en grande partie en raison de l'augmentation de la disponibilité des aliments transformés et des boissons sucrées, ainsi que des changements dans les modes de vie et les habitudes alimentaires. La consommation moyenne de sucre est difficile à estimer en raison de ses diverses utilisations dans les aliments. Néanmoins, deux approches peuvent être utilisées.

La première méthode d'estimation consiste à étudier les données de disponibilité alimentaire du sucre, calculées notamment à partir des volumes de production. L'inconvénient de cette méthode est que les données ne prennent pas en compte les pertes et les gaspillages. Néanmoins, les rapports de France Agrimer révèlent que la production mondiale de sucre en 2023 était de 189,5 millions de tonnes (Mt) et qu'elle atteindra 194,8 Mt cette année. De plus, ils estiment que la consommation mondiale de sucre devrait continuer de progresser de 2,0 Mt pour atteindre 189,1 Mt en 2024 (France Agrimer, Janvier 2024). Pour se donner une idée de l'ampleur de ces quantités, nous pouvons imaginer mettre bout à bout 189 Mt de paquets de sucre de 1 kg. Une telle chaîne de sucre s'étendrait sur 33 millions de km (Figure 6). Il faudrait alors presque 40 ans pour qu'une voiture roulant à une vitesse moyenne de 100 km/h couvre la distance que représente une seule année de consommation de sucre.



Figure 6 : Représentation de la taille d'un paquet de sucre de 1kg et de la chaîne de sucre que représente l'équivalent de la consommation mondiale de sucre en 2024.

La seconde méthode d'estimation se base sur les enquêtes de consommation. Elle étudie alors plutôt la consommation des sucres ajoutés. Ainsi, selon les rapports du CREDOC, les apports en sucres libres pour la population générale en France sont en moyenne de 11,1% de l'AET, soit de 58 g par jour (CREDOC 2019). De plus, selon les données de l'ANSES, la consommation de sucre total en France est d'environ 100 g par jour pour les adultes (95,1 g/j \pm 46,2 ; ANSES INCA 3). A titre de comparaison, en 2007 cette estimation était de 73.8 \pm 35,4 g par jour (ANSES INCA 2).

En somme, l'étude de la consommation de sucres souligne premièrement que nous ne cessons d'augmenter notre consommation. Elle révèle également le fait que nos apports en sucres sont supérieurs ou à la limite des recommandations établies. Les rapports de l'ANSES révèlent aussi une situation alarmante : une grande majorité des enfants en bas âge dépassent les seuils recommandés pour la consommation de sucre, avec des pourcentages diminuant avec l'âge : 75% pour les 4-7 ans, 60% pour les 8-12 ans et 25% pour les 13-17 ans (Figure 7). Chez les adultes, l'ANSES estime que 20% des français dépassent toujours les recommandations, ce qui représente près de 6,5 millions de personnes (ANSES INCA 2). Cependant, des différences liées à l'âge se manifestent entre les jeunes adultes (18 à 44 ans) et les personnes âgées (65 à 79 ans), reflétant probablement des influences générationnelles. En comparaison avec les jeunes adultes, les individus âgés de 65 à 79 ans adoptent des habitudes alimentaires plus régulières, privilégient les aliments faits maison ou autoproduits, et réduisent leur consommation de certains aliments transformés tels que les céréales pour le petit-déjeuner et les produits sucrés (ANSES INCA 3). Par ailleurs, ces influences générationnelles se confirment avec un récent sondage mené en février 2024 sur plus de 1000 français où les jeunes de 15 à 24 ans déclarent consommer moins de fruits et de légumes frais mais davantage de plats transformés que la population générale (Harris Interactive, 2024). De plus, le constat que 20% des jeunes ne reconnaissent pas une courgette et que 16% de la population générale n'identifie pas un pamplemousse met en évidence un manque d'éducation

alimentaire, ce qui peut compromettre les choix alimentaires à long terme et impacter la santé. Il est crucial d'intensifier les efforts pour sensibiliser la population à une alimentation équilibrée et leur fournir les connaissances nécessaires pour choisir et préparer ces aliments de manière appropriée. Selon le même sondage, cette nécessité est soutenue par une forte majorité de Français (88%) qui estime que l'éducation alimentaire devrait être renforcée dès l'école primaire, une opinion partagée par les jeunes générations. Par ailleurs, s'ajoute également avec l'âge, une diminution de l'appétit des séniors dont les origines peuvent être multifactorielles (ex : perte de goût, démence, prise de médicaments, isolement, pauvreté) mais dont les mécanismes restent inconnus (Wysokiński et al., 2015). Cependant, leurs besoins nutritionnels restent similaires à ceux des jeunes adultes, voire augmentent en raison de l'absorption réduite des nutriments et de la perte musculaire liée à l'âge. Cette disparité peut entraîner un risque de dénutrition, avec des conséquences graves sur la santé. Il est donc essentiel de sensibiliser les personnes âgées et leurs soignants à l'importance d'une alimentation équilibrée et nutritive. Néanmoins, il n'existe pas de recommandations spécifiques concernant la consommation de sucre pour cette population. De même, l'ANSES et l'OMS n'ont pas émis de recommandations de consommation de sucre pour les enfants de moins de 4 ans, bien que l'OMS ait dénoncé que les aliments pour bébés et jeunes enfants contenaient trop de sucre (WHO/EURO:2022-4885-44648-63367). Ces lacunes soulignent la nécessité de développer des recommandations nutritionnelles plus précises et adaptées aux besoins de toute la population.

Consommation moyenne de sucre en France

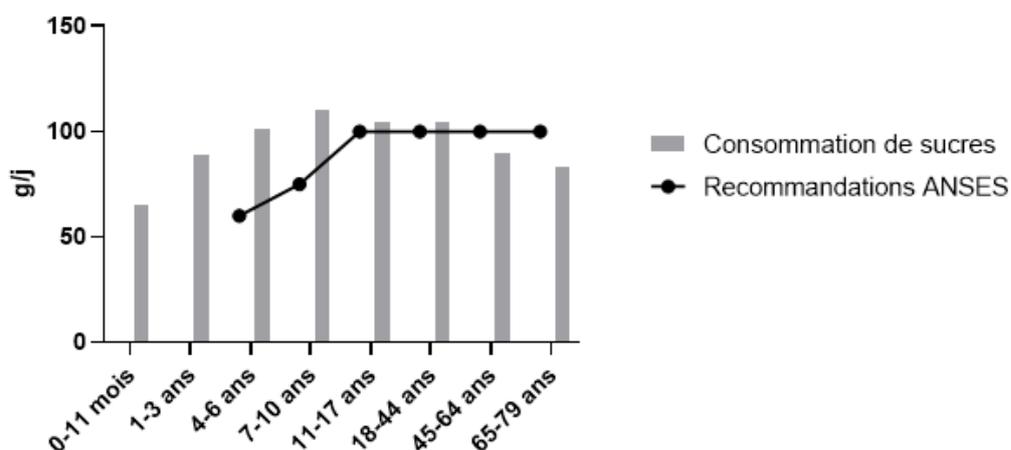


Figure 7 : Diagramme de la consommation de sucre par classe d'âge, ainsi que des recommandations alimentaires établies par l'ANSES en fonction de l'âge. (ANSES, INCA 3).

3.3 Consommation de fructose

On comprend au vu des recommandations de l'ANSES que notre consommation en fructose est d'avantage déterminante que notre consommation des autres sucres comme le glucose, le galactose ou le lactose. Or, estimer précisément cette consommation de fructose est complexe. Tout d'abord, il est parfois difficile d'identifier les sources de fructose sur les étiquettes alimentaires. En effet, le fructose peut se dissimuler sous différentes dénominations comme saccharose, sucre, sirop d'agave, cassonade, caramel, isoglucose et sucre inverti (Figure 8). De plus, il n'existe pas de réglementation sur la transparence de la composition des sirops de glucose-fructose. Il est donc impossible pour le consommateur d'estimer la teneur en fructose des produits industriels. Par ailleurs, les étiquettes alimentaires comprennent un tableau des valeurs énergétiques et nutritionnelles, où il est indiqué la quantité de sucres pour 100 g de produit. En fonction de l'analyse de la liste des ingrédients, on peut estimer qu'au moins la moitié des sucres présents sont du fructose, sans réelle valeur fiable. Néanmoins, à partir des données de la consommation de sucre, nous pouvons

considérer que la consommation quotidienne de fructose se situe autour de 50-55 g/jour (ANSES INCA 3).



Figure 8 : Photo d'étiquettes de produits industriels révélant les différents types de sucre utilisés. (Photos issues d'archives personnelles).

Un travail auprès des industriels alimentaires et des pouvoirs publics est nécessaire afin d'obtenir plus de transparence sur la quantité de fructose présent dans les produits agro-alimentaires. Ceci est d'autant plus pertinent en raison de la hausse notable de la consommation d'aliments transformés chez les jeunes, comme l'indique le récent sondage (Harris Interactive), mais cette augmentation est également confirmée de manière générale dans la population française par l'ANSES (ANSES INCA 3). De surcroît, la méconnaissance du fructose conduit à un manque de méfiance à son égard. En l'absence de conscience des

risques potentiels associés à sa consommation, les personnes ne sont pas en mesure de prendre des mesures appropriées pour limiter leur exposition à ce sucre. Ainsi, un effort de sensibilisation est nécessaire pour informer le public sur les effets néfastes du fructose sur la santé et encourager des choix alimentaires plus éclairés.

C'est dans cette lignée de sensibilisation et de transparence que l'ANSES a émis plusieurs recommandations aux consommateurs, aux industriels et aux pouvoirs publics. Cependant, les recommandations alimentaires actuelles se concentrent uniquement sur les effets métaboliques des sucres sur l'organisme, mais ignorent leurs effets sur le cerveau et la santé cérébrale. Comprendre ces effets cérébraux pourrait permettre d'améliorer les recommandations alimentaires en tenant compte de l'impact des sucres sur la fonction cognitive, l'humeur et le risque de maladies neurologiques. Ainsi, l'ANSES recommande à la recherche de mener de nouvelles études pour mieux évaluer la relation entre la consommation de sucres et les pathologies associées, et en particulier d'explorer de nouveaux domaines comme la psychologie cognitive et la neurophysiologie pour mieux comprendre les effets des sucres sur le comportement alimentaire et la santé (Saisine n°2012-SA-0186). Mon sujet de thèse, axé sur l'étude des effets du fructose sur la santé cérébrale, s'aligne parfaitement avec les recommandations de l'ANSES en faveur de nouvelles recherches dans le domaine des neurosciences.

4. Le fructose

Le fructose possède la même formule brute que le glucose, $C_6H_{12}O_6$. Cependant, leur structure diffère : le fructose possède un groupement cétone sur son carbone 2, tandis que le glucose présente un groupement aldéhyde sur son carbone 1 (Figure 9). En raison de cette différence de structure, l'absorption et le métabolisme du fructose lui sont spécifiques.

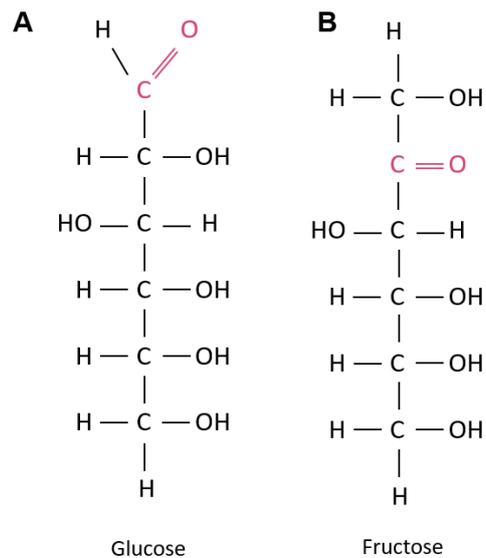


Figure 9 : Formule chimique d'une molécule de Glucose (A) et d'une molécule de Fructose (B).

4.1 Absorption du fructose

Lors de la digestion des glucides, le fructose comme tous les monosaccharides, est absorbé par les cellules de la paroi intestinale, les entérocytes (Figure 10). Le fructose est préférentiellement absorbé dans la partie proximale de l'intestin grêle (duodénum et jéjunum) grâce à un mécanisme de transport facilité par le transporteur spécifique du fructose GLUT5 (Patel et al., 2015). Contrairement au glucose, ce processus ne nécessite pas d'hydrolyse d'ATP et est indépendant de l'absorption du sodium. GLUT5, dont le gène est *slc2a5*, est un transporteur de forte affinité mais de faible capacité. Il est donc rapidement saturable. C'est pourquoi l'absorption du fructose est également facilitée par d'autres transporteurs non spécifiques, notamment par GLUT2 (Tableau 1). A l'inverse de GLUT5, GLUT2, est un transporteur de faible affinité mais à grande capacité (Benardout et al., 2022). D'autres transporteurs comme GLUT8, également exprimé dans l'intestin, peuvent être impliqués dans l'absorption du fructose (DeBosch et al., 2012 ; Doege et al., 2000). Bien que GLUT7 présente une forte affinité pour le fructose et est exprimé au niveau intestinal, il n'est pas démontré qu'il

joue un rôle dans son absorption (Patel et al., 2015). Par ailleurs, certains facteurs peuvent également influencer l'absorption de ce sucre. Premièrement, le fructose lui-même joue un rôle dans sa propre absorption en stimulant l'expression de son transporteur, GLUT5 (Douard & Ferraris, 2008 ; Zhang et al., 2019). De plus, le glucose et le fructose, en favorisant l'expression de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes, facilitent son absorption (Tobin et al., 2008). En revanche le sorbitol et l'érythritol, deux polyols utilisés comme édulcorants, la diminuent (Kim et al., 2011 ; Rumessen & Gudmand-Hoyer, 1986). Les mécanismes impliqués dans les régulations de ces polyols ne sont pas encore connus. Néanmoins, malgré l'existence de facteurs influençant l'absorption du fructose, cette fonction est principalement assurée par GLUT5, comme le confirme des études précliniques dans lesquelles les souris déficientes en GLUT5 ($Glut5^{-/-}$) présentent une réduction de 99% du transport de fructose dans le duodénum (Patel et al., 2015).

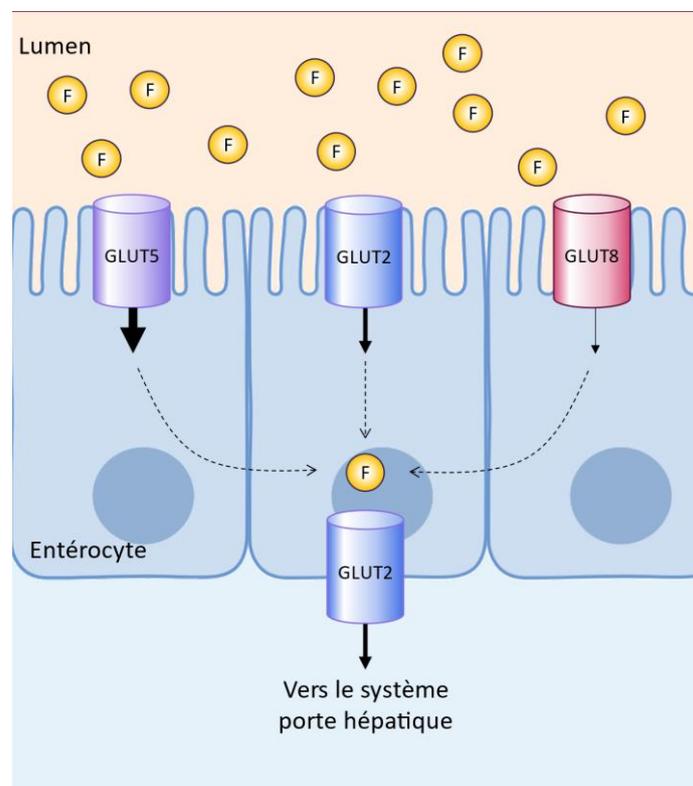


Figure 10 : Les principaux transporteurs impliqués dans l'absorption du fructose. (Adapté de Biesiekierski, 2014).

Tableau 1 : Expression tissulaire et Km des transporteurs du fructose. (Adapté de Manolescu et al., 2007 ; Patel et al., 2015 ; Thorens & Mueckler, 2013).

Nom du gène	Nom de la protéine	Km	Substrats	Expression tissulaire
slc2a2	GLUT2	76 mM	Glucose, Galactose, Mannose, Fructose, Glucosamine	Intestin, Foie, Cerveau, Pancréas, Rein
slc2a5	GLUT5	6-14 mM.	Fructose	Intestin, Muscle, Rein, Testicules, Tissu adipeux, Cerveau
slc2a7	GLUT7	0,3 mM	Glucose, Fructose	Intestin
slc2a8	GLUT8	2,4 mM	Glucose, Fructose, Galactose	Cerveau, Rate, Foie, Tissu adipeux, Testicules, Muscles, Intestin
slc2a9	GLUT9	0,3 mM	Glucose, Fructose	Rein
slc2a11	GLUT11	0,2 mM	Glucose, Fructose	Cœur, Muscle, Rein, Tissu adipeux, Pancréas
slc2a12	GLUT12	4-5mM	Glucose, Galactose, Fructose	Tissus sensibles à l'insuline

4.2 Métabolisme du fructose

Le foie a longtemps été considéré comme le principal organe de métabolisation du fructose (Tappy & Le, 2010). Cependant, il a récemment été montré que lors d'ingestion de faibles doses de fructose, il était majoritairement éliminé par l'intestin (Jang et al., 2018). En effet, la métabolisation du fructose débute dès son absorption dans l'entérocyte de l'intestin grêle. Une partie de ce fructose est immédiatement transformée en glucose (42%), en lactate (20%) et en acides organiques comme le glycérate, des intermédiaires du cycle de Krebs

(13%). Le fructose intact est ensuite libéré dans la circulation sanguine porte hépatique où il est rapidement absorbé par GLUT2 (Jang et al., 2018 ; Tappy & Le, 2010 ; Theytaz et al., 2014). En revanche, les doses élevées de fructose (≥ 1 g/kg) dépassent les capacités d'absorption et de clairance intestinales, permettant ainsi à une plus grande proportion de fructose d'atteindre le foie (Jang et al., 2018). De cette façon, l'intestin agit comme un bouclier protecteur, limitant le foie à une exposition de fructose.

Néanmoins, il semblerait que les voies métaboliques utilisées par le fructose soient identiques, quel que soit le type cellulaire (Figure 11). En effet, les cellules intestinales et les cellules hépatiques expriment les enzymes clés du métabolisme du fructose (Patel et al., 2015). Ainsi, le fructose est d'abord phosphorylé en fructose-1-phosphate par la kétohexokinase (KHK), aussi appelée fructokinase, une enzyme hautement spécifique du fructose. Cette réaction est irréversible et nécessite une molécule d'ATP (adénosine triphosphate), la principale molécule énergétique nécessaire aux processus cellulaires. Le fructose-1-phosphate est ensuite clivé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et en glyceraldéhyde (GA) par l'aldolase B (AldoB) (Tappy & Le, 2010). Ces produits sont des métabolites intermédiaires de la glycolyse, un processus de conversion du glucose en énergie. Le GA est phosphorylé en glyceraldéhyde-3-phosphate (GA3P) et le DHAP est isomérisé en GA3P. Une partie du GA3P est convertie en glucose, tandis qu'une autre partie est convertie en pyruvate. Le pyruvate peut ensuite être transformé en acétylcoenzyme A (Acétyl-CoA), puis en acides gras (AG) par la voie du citrate du cycle de Krebs. En combinaison avec le glycérol-3-phosphate (G3P), ces AG forment des triglycérides (TAG) et sont ensuite excrétés par le foie sous forme de VLDL pour être stocké dans les tissus périphériques (Tappy & Le, 2010). Il existe également une voie de production endogène du fructose appelée la voie des polyols. Dans cette voie, le glucose est converti en sorbitol par l'aldose réductase (AR), puis le sorbitol est converti en fructose par l'enzyme sorbitol déshydrogénase (SD) (Gabbay, 1973). Cette voie est activée en condition hyperglycémiques (Hwang et al., 2017).

La métabolisation du fructose peut être différenciée de celle du glucose en raison de l'utilisation d'enzymes spécifiques. En outre, tandis que la conversion du glucose en pyruvate est régulée par l'insuline et l'état énergétique de la cellule, la métabolisation du fructose se fait indépendamment de l'insuline. Ce processus est rapide en raison de la forte affinité de la KHK pour le fructose et de l'absence de rétroaction négative par l'ATP ou le citrate. Cela entraîne une déplétion des niveaux de phosphate et d'ATP dans les cellules en réponse au fructose (Tappy & Le, 2010). Cette déplétion active l'enzyme AMPK (AMP-activated protein kinase) et stimule la production d'acide urique (AU) par l'enzyme AMP désaminase (AMPD), pouvant conduire à une augmentation de l'uricémie lors de la métabolisation de grandes quantités de fructose (Cha et al., 2008 ; Lubawy & Formanowicz, 2023 ; Zhang et al., 2020). Bien que l'acide urique soit principalement synthétisé dans le foie, l'intestin est également capable d'en produire (Yin et al., 2022).

Les niveaux de fructose dans le plasma périphérique, habituellement autour de 0,04 mM, peuvent augmenter transitoirement jusqu'à dix fois après l'ingestion de fructose (Hannou et al., 2018 ; Hwang et al., 2015). Selon les études menées par Theytaz et al., environ les deux tiers du fructose ingéré sont stockés dans l'organisme, probablement sous forme de glycogène et de lipides. Ils révèlent également que la co-ingestion de glucose avec du fructose diminue la gluconéogenèse et augmente le stockage lipidique à partir du fructose (Theytaz et al., 2014). En effet, le fructose, par rapport au glucose, est un puissant inducteur de la lipogenèse hépatique de novo (DNL). Les carbones dérivés du fructose alimentent ce processus en produisant du citrate, nécessaire à la formation d'acétyl-CoA pour la DNL, grâce à l'enzyme ATP citrate lyase (ACLY) (Pan & Kong, 2018). En cas de forte consommation de fructose, une voie alternative de la DNL a récemment été mise en évidence. Le fructose non absorbé est converti en acétate par le microbiote intestinal, puis transporté au foie pour former de l'acétyl-CoA grâce à l'enzyme l'acétyl-CoA synthétase 2 (ACSS2) (Zhao et al., 2020). Le fructose active également la transcription des gènes impliqués dans la production de lipides, principalement via les facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c (Jung et al., 2022). En

résumé, le fructose non seulement fournit les substrats pour la formation de graisses dans le foie, mais il active également les processus qui renforcent cette production.

Ainsi, les hépatocytes et les entérocytes utilisent les mêmes enzymes clés pour métaboliser le fructose. Néanmoins, il semble que les métabolites finaux obtenus après la dégradation du fructose soient différents. Les cellules intestinales produisent principalement du glucose et du lactate à partir du fructose (Jang et al., 2018). Tandis que les cellules hépatiques convertissent d'avantage le fructose en lipides (Theytaz et al., 2014). Ce constat suggère qu'il existe des processus de régulation des voies métaboliques du fructose, dépendants du type cellulaire, qui demeurent actuellement inexplorés. Cela soulève également des interrogations quant à la métabolisation du fructose dans d'autres tissus sensibles à ce sucre comme le cerveau.

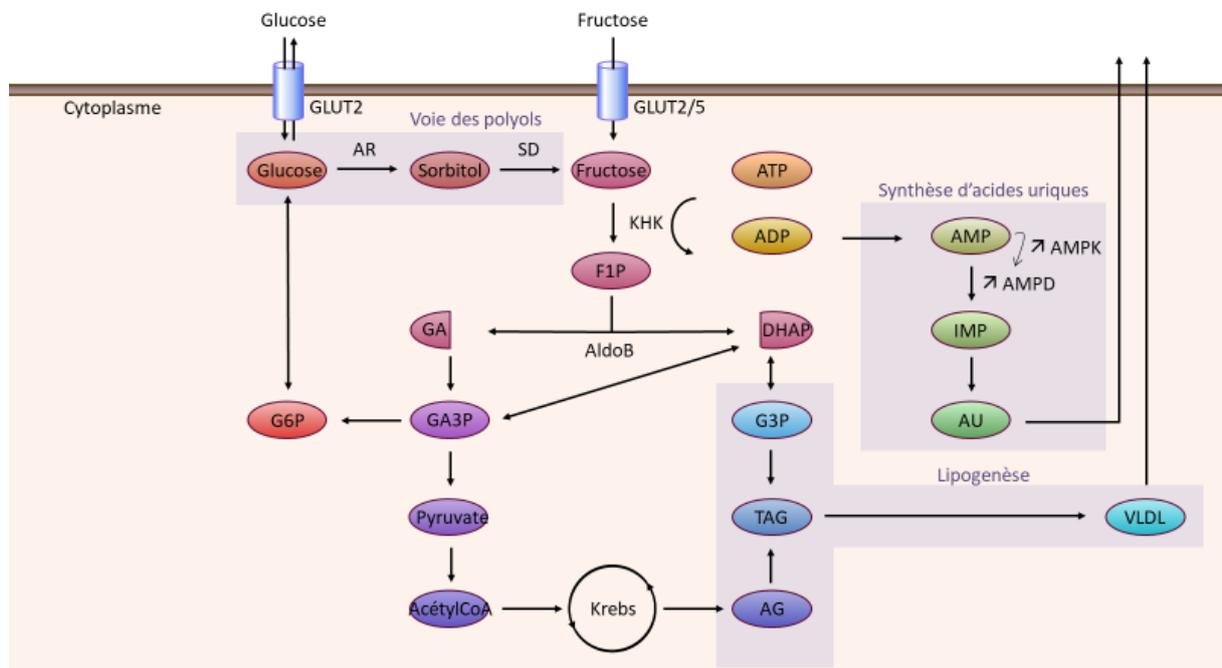


Figure 11 : Métabolisme du fructose. (Adapté de Hannou et al., 2018).

4.3 Effets du fructose sur le métabolisme

Le fructose a été identifié comme un facteur significatif dans le développement du syndrome métabolique (MetS) au cours des dernières décennies. Le MetS est caractérisé par la présence simultanée de plusieurs facteurs de risque métaboliques, notamment la résistance à l'insuline, l'obésité, la dyslipidémie, l'hypertension et l'hyperuricémie (Pan & Kong, 2018). En outre, le MetS est associé à un risque accru de développer plusieurs affections graves telles que le diabète de type 2, la stéatose hépatique non alcoolique (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD), les maladies cardiovasculaires (MCV), les maladies rénales, les maladies inflammatoires intestinales ainsi que certains cancers (Jung et al., 2022).

4.3.1 Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)

La NAFLD est devenue la maladie la plus courante associée à la consommation chronique de fructose. La NAFLD se caractérise par une accumulation lipidique dans les hépatocytes sans signes d'infection, de troubles métaboliques ou de consommation d'alcool. Elle peut progresser vers une stéatohépatite non alcoolique, puis éventuellement vers une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. La consommation de fructose est corrélée de manière dose-dépendante avec le développement et la progression de la NAFLD (Ouyang et al., 2008 ; Zhao et al., 2020).

L'apport en fructose a un effet significatif sur le foie en induisant une DNL. Chez les patients atteints de NAFLD, la DNL est environ trois fois plus élevée que chez les individus en bonne santé. Bien que le fructose lui-même fournit aux hépatocytes un excès de carbone nécessaire à la lipogénèse, une étude récente a montré que des souris génétiquement modifiées, incapables d'utiliser le citrate cytosolique pour la lipogénèse, ont néanmoins développé une NAFLD avec un régime riche en fructose. Des analyses ont révélé que de grandes quantités de fructose alimentent la lipogénèse hépatique via l'acétate dérivé du microbiote intestinal, contournant ainsi la voie métabolique traditionnelle. Le traitement

antibiotique ou la suppression spécifique de l'enzyme ACSS2, essentielle au catabolisme de l'acétate, ont réduit la lipogenèse hépatique induite par le fructose (Zhao et al., 2020).

4.3.2 Diabète de type 2

L'incidence croissante du diabète de type 2 est étroitement liée aux changements alimentaires et au mode de vie sédentaire. Les pays avec une plus grande disponibilité de HFCS présentent une prévalence de diabète de type 2 20 % plus élevée, indépendamment de la prévalence de l'obésité (Goran et al., 2013).

Le diabète de type 2 est caractérisé par une altération de la réponse insulique et éventuellement une défaillance de la sécrétion d'insuline, souvent associées à un dysfonctionnement des cellules β du pancréas ou à leur diminution en masse. Des études indiquent que le traitement au fructose seul ne stimule pas la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques, mais une exposition prolongée augmente leur réactivité au glucose (Bartley et al., 2019). Chez les rats diabétiques de type 2, la consommation de fructose accélère le dysfonctionnement des îlots pancréatiques en induisant une inflammation et un stress oxydatif (Cummings et al., 2010). Des recherches indiquent que l'accumulation de graisse hépatique induite par le fructose contribue à la résistance à l'insuline et à la lipotoxicité hépatique. De plus, la production excessive d'acide urique entraîne une inhibition directe de la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes, comme démontré par des études *in vitro* (Pan & Kong, 2018). De plus, chez les souris présentant une hyperuricémie induite par l'oxonate de potassium, cette surproduction d'acide urique conduit à une résistance à l'insuline (Pan & Kong, 2018). Chez l'Homme, une diminution de la sensibilité hépatique à l'insuline a été observée lors d'une consommation élevée de fructose, environ 80 g par jour (ANSES, Saisine n°2012-SA-0186).

4.3.3 Obésité

L'obésité est un problème de santé publique mondial majeur, avec des conséquences graves pour la santé individuelle et la société. Dans l'ensemble, la majorité des études ont démontré une association positive entre une consommation accrue de boissons sucrées et une prise de poids (Helsley et al., 2020). Cependant, une méta-analyse de trente-huit études sur des régimes enrichis en fructose pendant sept jours ou plus a conclu que la consommation de fructose est liée à un gain de poids uniquement lorsqu'il y a un excès d'apport énergétique, mais pas lorsque l'apport énergétique correspond aux besoins (Sievenpiper et al., 2012). Ainsi, le fructose alimentaire n'est pas associé à un gain de poids en l'absence d'un excès d'apport énergétique. Ces résultats sont cohérents avec les données précliniques où un régime sous fructose ne conduit pas à une augmentation de la prise calorique et n'induit pas d'augmentation de poids (Cummings et al., 2010 ; Zhang et al., 2019).

4.3.4 Maladies du rein

L'apport en fructose peut contribuer au développement de l'insuffisance rénale chronique. Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de deux boissons sucrées ou plus par jour est associée à un risque accru d'albuminurie, un marqueur d'insuffisance rénale (Shoham et al., 2008). De plus, une corrélation entre le fructose alimentaire et un risque accru de récurrence de calculs rénaux a été établie, avec une diminution de 10 % du risque chez les personnes consommant moins d'une canette de sodas par semaine (Shuster et al., 1992).

Des études expérimentales mettent en évidence le rôle du fructose dans les maladies rénales chroniques, telles que l'hypertension glomérulaire, l'inflammation rénale et les lésions tubulo-interstitielles. Contrairement au glucose, le fructose accélère la progression de l'insuffisance rénale chronique en aggravant la protéinurie, le dysfonctionnement rénal et la glomérulosclérose (Gersch et al., 2007). Le métabolisme du fructose par le KHK est crucial

dans ces maladies, comme l'ont montré des études sur des souris KHK-KO. Il a ainsi été montré que le fructose augmente l'activité de l'échangeur sodium-hydrogène dans les cellules tubulaires proximales, entraînant une réabsorption accrue de sodium et une augmentation de la pression artérielle (Hayasaki et al., 2019). De plus, la consommation de fructose chez le rat induit une hypertension glomérulaire et une réduction du flux sanguin rénal, contribuant au développement de maladies vasculaires rénales (Fan et al., 2020). Les lésions rénales dues au fructose ressemblent à celles observées chez les personnes ayant des taux élevés d'acide urique dans le sang. Les souris déficientes en KHK sont protégées contre ces lésions, ce qui suggère que le catabolisme du fructose pourrait être une source potentielle d'acide urique dans les reins (Andres-Hernando et al., 2017).

4.3.5 Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MCV), principales causes de décès dans le monde, englobent divers troubles cardiaques et vasculaires. Des recherches croissantes indiquent que la consommation accrue de fructose est associée à une augmentation du risque de ces maladies, favorisant le développement de l'hypertension, de la dyslipidémie, de l'inflammation et des maladies coronariennes (Mellor et al., 2010). En effet, une augmentation de la consommation de fructose, qu'il soit pur ou sous forme de sirops ou de saccharose, dans un contexte de régime hypercalorique, entraîne une élévation des niveaux de triglycérides sanguins à jeun et/ou après les repas. Cette augmentation est due à une augmentation de la production de graisse dans le foie et à une diminution de l'élimination des lipoprotéines riches en triglycérides hors du foie. Les effets observés semblent dépendre de la dose, avec chez l'Homme une augmentation de la triglycéridémie constatée pour des doses dépassant 50 g/jour (ANSES). De plus, le risque de maladies cardiovasculaires augmente de 26 % avec une forte consommation de boissons sucrées au fructose (Malik et al., 2010). Enfin, il est intéressant de noter qu'il existe un modèle animal d'hypertension impliquant de jeunes rats alimentés avec des doses élevées de fructose. Ces rats présentent une augmentation de

l'expression intestinale de GLUT5 et développent ultérieurement une intolérance au glucose ainsi qu'une hypertension artérielle (Tran et al., 2009).

Bien que l'obésité ou l'insulinorésistance induites par le fructose puissent partiellement contribuer à cette augmentation du risque, une relation directe entre l'apport en fructose et les maladies cardiovasculaires est également possible. Les cardiomyocytes expriment les transporteurs GLUT5 et l'enzyme KHK, suggérant un métabolisme direct du fructose dans le cœur (Mellor et al., 2011). Une accumulation de fructose peut ainsi entraîner une déplétion en ATP dans le cœur. De plus, le fructose peut affecter la structure et la fonction des protéines cardiaques *via* des modifications post-traductionnelles telles que la glycation et la O-GlcNAcylation, ce qui pourrait contribuer aux maladies cardiovasculaires (McLarty et al., 2013).

4.3.6 Maladies inflammatoires intestinales

L'intestin étant le premier organe exposé à des niveaux élevés de fructose alimentaire, il n'est pas étonnant qu'une consommation excessive de fructose soit associée à des troubles intestinaux tels que les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) et la colite. Cette association est devenue plus préoccupante avec une augmentation récente de l'incidence mondiale des MICI. Les études sur des modèles animaux ont montré que les régimes riches en fructose peuvent induire des inflammations intestinales (Khan et al., 2020). Cependant, les études épidémiologiques humaines n'ont pas toujours trouvé de corrélation directe entre la consommation de sucre raffiné et les maladies inflammatoires intestinales (Helwig et al., 2021). Il est intéressant de noter que l'augmentation du risque de maladies inflammatoires intestinales associée à une alimentation riche en HFCS semble dépendre de la faible consommation de fibres alimentaires (Hall et al., 2019).

De plus, la consommation de fructose a été associée à une aggravation de l'inflammation du côlon, avec des effets sur le microbiome intestinal en modifiant sa

composition et son métabolisme dans le côlon (Montrose et al., 2021). Les effets néfastes d'un régime riche en fructose sur la gravité de la colite ont été inversés lors du retour à un régime sans fructose (Nishiguchi et al., 2021).

4.3.7 Cancer

L'expression de GLUT5 dans plusieurs types de tumeurs a conduit à l'idée que les cellules tumorales pourraient utiliser directement le fructose. Par exemple, l'expression de GLUT5 a été détectée dans l'adénocarcinome colorectal épithélial humain et les cellules tumorales pancréatiques (Liu et al., 2010). Des études ont également montré que la consommation de fructose est le facteur de risque le plus important de tumeurs pancréatiques chez les sujets obèses et peu actifs physiquement (Michaud et al., 2002), ainsi que chez les femmes (Schernhammer et al., 2005). De plus, une concentration sérique élevée de fructose a été observée chez les patients atteints de cancer du pancréas par rapport aux individus normaux (Hui et al., 2009). Outre les tumeurs pancréatiques, GLUT5 est surexprimé dans les cancers du cerveau, du foie, du sein et des poumons (Charrez et al., 2015 ; Douard & Ferraris, 2008). De plus, une consommation accrue de fructose est associée à la formation, la progression et aux métastases de plusieurs types de tumeurs. Par exemple, dans l'adénocarcinome du poumon, la déplétion en GLUT5 a réduit la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, tandis que sa surexpression a augmenté ces processus (Weng et al., 2018). Dans d'autres types de cancer tels que la leucémie myéloïde aiguë, le cancer de la prostate, le cancer du sein et le cancer intestinal, l'absorption de fructose a été associée à une augmentation de la prolifération cellulaire, de la croissance tumorale, de la migration et de l'invasion des cellules tumorales (Chen et al., 2016).

En résumé, les effets du fructose sur le métabolisme sont largement étudiés et documentés (Figure 12). Ils sont principalement liés à son métabolisme spécifique dans l'organisme, entraînant une déplétion en ATP et la formation de lipides. Ces conséquences négatives sont souvent exacerbées par la production accrue d'acides uriques et parfois par des altérations du microbiote intestinal. En effet, bien que les mécanismes exacts restent encore à élucider, il est de plus en plus évident que la santé du microbiote intestinal joue un rôle crucial dans le développement et la progression du syndrome métabolique.

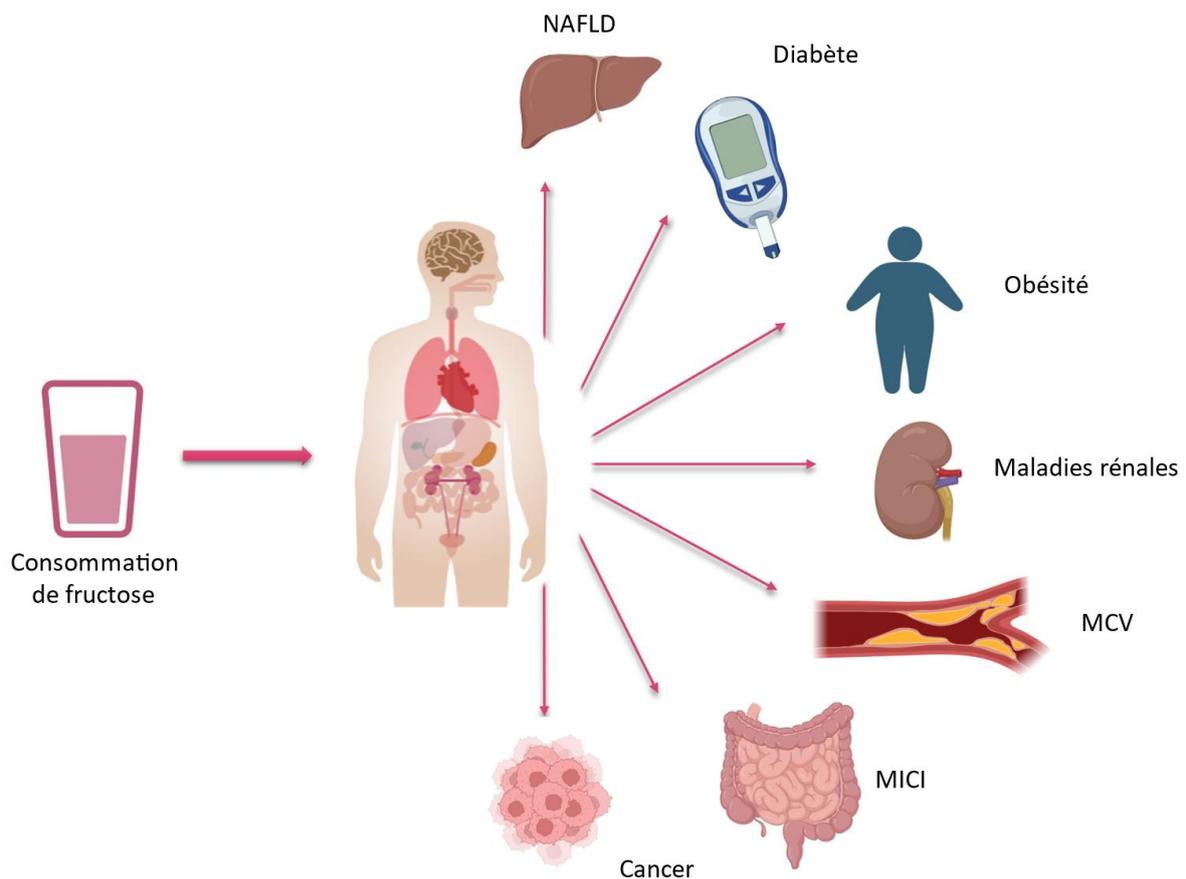


Figure 12 : Effets d'une consommation de fructose sur le métabolisme.

4.4 Fructose et microbiote

4.4.1 Composition du microbiote

Le microbiote intestinal humain est composé d'environ 10^{14} micro-organismes, principalement des bactéries, répartis en cinq phyla majeurs : les *Firmicutes*, les *Bactéroidetes*, les *Actinobacteria*, les *Verrucomicrobia* et les *Proteobacteria* (Arora & Bäckhed, 2016) (Figure 13). Les *Firmicutes* et les *Bactéroidetes* représentent ensemble environ 90% de la flore symbiotique (Cheng et al., 2013). Les genres dominants trouvés chez l'humain adulte en bonne santé sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Qin et al., 2010). La métagénomique a révélé environ 1150 espèces bactériennes différentes dans les échantillons fécaux humains, dont 160 espèces sont dominantes et largement partagées entre les individus (Qin et al., 2010). La colonisation bactérienne du tube digestif débute dès la naissance et est influencée par des facteurs tels que le mode d'accouchement, le type d'allaitement, l'environnement, l'âge maternel, l'alimentation, le microbiote vaginal et la prise de médicaments (Albenberg & Wu, 2014 ; Arrieta et al., 2014). Dans le colon, où le pH est neutre, la concentration bactérienne est la plus élevée.

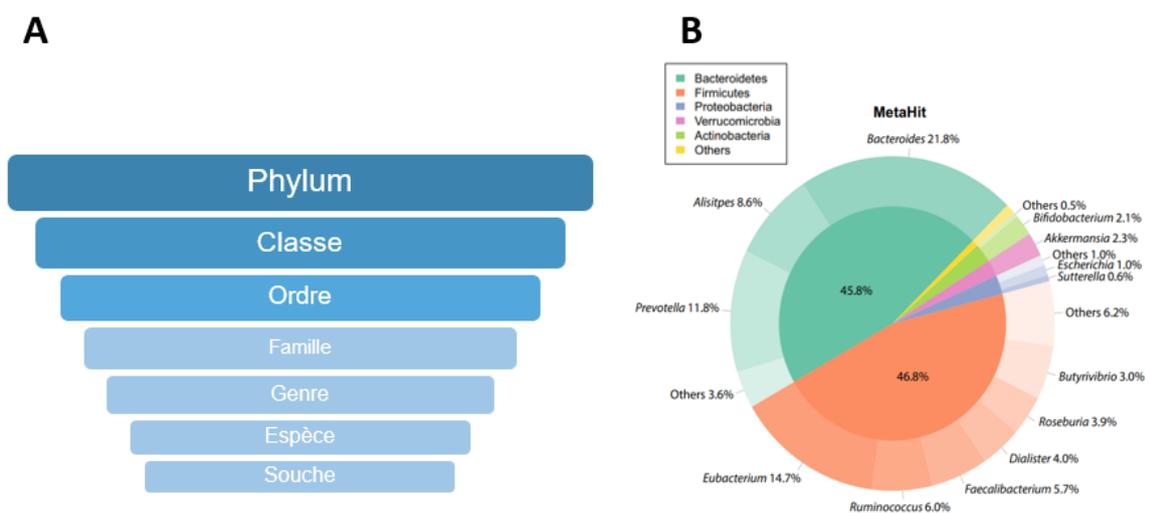


Figure 13 : Classifications bactérienne (A) et composition du microbiote d'une population en bonne santé (B). (Adapté de Arora & Bäckhed, 2016).

4.4.2 Malabsorption du fructose

Comme nous l'avons vu, le fructose est principalement absorbé au niveau intestinal grâce à son transporteur spécifique, GLUT5. Cependant, ce transporteur est rapidement saturable, et lorsque de fortes doses sont ingérées, les capacités de clearance du fructose sont dépassées. Le fructose atteint alors les parties distales de l'intestin où il pourra être métabolisé par le microbiote du colon, conduisant à la production d'hydrogène (Jang et al., 2018). Ainsi, le diagnostic de la malabsorption du fructose est généralement établi à l'aide de tests respiratoires à l'hydrogène, qui mesurent la quantité d'hydrogène expirée après la consommation d'une solution de fructose. Chez les volontaires sains, il est démontré qu'il existe une relation directe entre la quantité de fructose consommée et la malabsorption, révélant que la moitié de la population adulte n'est pas capable d'absorber totalement une dose de 30g de fructose (Figure 14) (Jones et al., 2011). Cette dose peut rapidement être atteinte, par exemple, elle correspond à un grand verre de jus de raisin (40 cl) (foodintolerances.org) ou à un grand verre de soda (50 cl) (coca-cola.com).

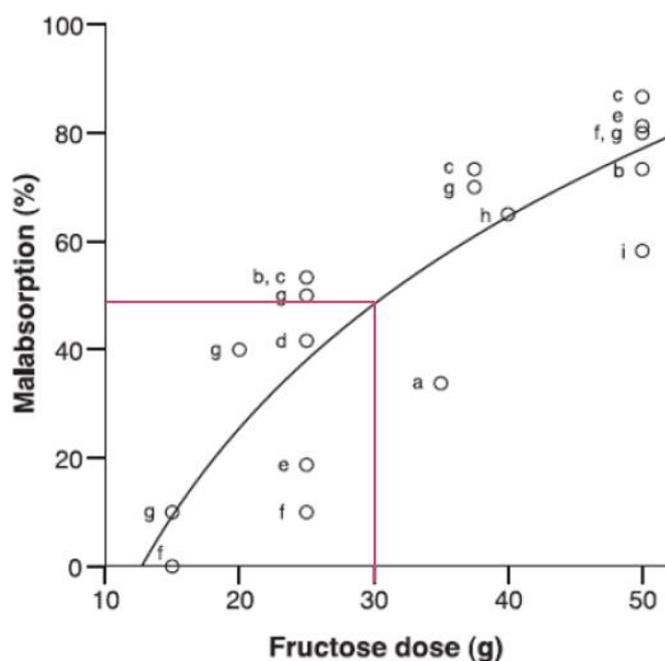


Figure 14 : Relation entre la dose de fructose (en grammes) et le pourcentage de cas positifs de malabsorption au test d'hydrogène respiratoire au fructose chez les adultes en bonne santé. (Adapté de Jones et al., 2011).

4.4.3 Effets du fructose sur le microbiote intestinal

Le fructose, lorsqu'il atteint le colon, est métabolisé par le microbiote. Comme nous l'avons vu, il peut notamment être converti en acétate et donc fournir de l'acétyl-CoA lipogénique au foie (Zhao et al., 2020). De plus, de récentes études ont révélées que le fructose était majoritairement converti en glucose par le microbiote, dont les *Bacteroides*, les *Parabacteroides*, les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* semblent être les acteurs clés dans cette conversion (Sellami et al., 2023). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si toutes les espèces bactériennes ont la capacité de métaboliser le fructose de quelque manière que ce soit, ou si certaines espèces en sont incapables.

Les niveaux de fructose alimentaire ont un impact significatif sur le microbiote intestinal et peuvent également provoquer des modifications dans sa composition. Chez l'Homme adulte en bonne santé, une alimentation riche en fructose a été associée à une diminution de l'abondance des bactéries du phylum *Firmicutes* et du genre *Ruminococcus*, qui produisent du butyrate, ainsi qu'une augmentation de l'abondance du phylum *Bacteroidetes* (Beisner et al., 2020). Le butyrate est un AGCC produit par les bactéries intestinales du phylum *Firmicutes* lors de la fermentation des fibres alimentaires (Liu et al., 2018). Il joue un rôle essentiel en tant que source d'énergie pour les cellules intestinales, favorise l'intégrité de la barrière intestinale et exerce des effets anti-inflammatoires et métaboliques bénéfiques pour l'homéostasie intestinale et le métabolisme énergétique (Liu et al., 2018). De même, chez les rats nourris avec du HFCS, une réduction de l'abondance des familles de bactéries *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae* (phylum *Firmicutes*), connues comme étant productrices de butyrate, a été observée (Jung et al., 2022). En soutien de cette observation, il a également été montré que des rats nourris avec un régime riche en fructose présentaient des niveaux sériques de AGCC réduits (Wang et al., 2020). En parallèle, une alimentation contenant 10% de fructose a entraîné une augmentation significative du nombre de *Bactéroïdes* et de *Proteobacteria* dans le microbiome fécal murin (Jung et al., 2022). Les phylum *Proteobacteria* et *Actinobacteria*

étaient également augmenté chez les rats consommant des boissons contenant 11% de sucres (Noble et al., 2017). La diversité microbienne est réduite après une semaine de régime riche en fructose (Do et al., 2018 ; Song et al., 2023). Enfin, un apport élevé en fructose augmente la perméabilité intestinale en raison d'altérations des protéines des jonctions serrées, induites par une dysbiose microbienne intestinal, ce qui conduit à la translocation du lipopolysaccharide (LPS) vers la veine porte (Jung et al., 2022).

En résumé, la consommation de fructose altère la perméabilité de l'intestin, augmente l'inflammation intestinale et systémique, et modifie la composition du microbiote (Figure 15).

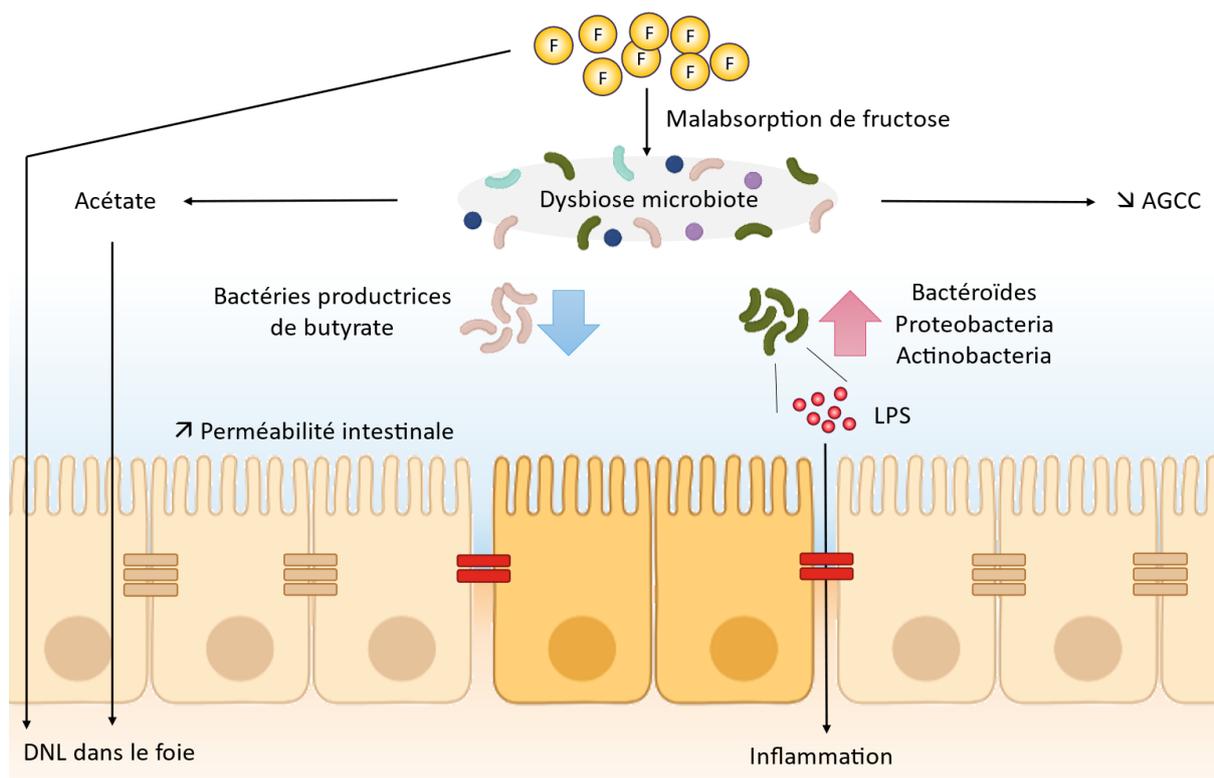


Figure 15 : Effets d'une malabsorption de fructose sur l'homéostasie intestinale.

(Adapté de Jung et al., 2022).

Ainsi, les recherches ont largement documenté les effets du fructose sur le métabolisme et le microbiote intestinal, mettant en évidence ses implications dans divers troubles métaboliques et digestifs. Cependant, alors que nous comprenons de mieux en mieux comment le fructose influence le métabolisme et la santé intestinale, ses effets sur le cerveau restent encore largement méconnus. Il est donc essentiel de continuer à explorer les effets du fructose sur la santé globale, y compris son impact potentiel sur la cognition, le comportement et le développement de troubles neurologiques. Cette recherche approfondie est nécessaire pour améliorer et affiner les recommandations alimentaires. C'est dans ce contexte que mon sujet de thèse s'intéresse aux effets du fructose sur le cerveau et ses conséquences sur la santé cérébrale.

4.5 Fructose et cerveau

Peu d'informations sont disponibles sur les effets directs de la consommation de fructose sur le cerveau. Cependant, des études ont montré que l'ingestion de fructose entraîne une augmentation de la concentration sanguine de fructose chez les humains et les rongeurs (Hannou et al., 2018 ; Hui et al., 2009 ; Page et al., 2013). De plus, des études sur des rats ont révélé que les niveaux extracellulaires de fructose dans la zone hypothalamique du cerveau étaient comparables aux niveaux sériques et réagissaient aux variations de ces derniers (Page et al., 2013). L'hypothalamus, situé à la base du cerveau, est une région essentielle à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques vitales, dont la prise alimentaire, contribuant ainsi à maintenir l'équilibre homéostatique de l'organisme. Ainsi, l'un des premiers effets directs du fructose sur le cerveau à avoir été décrit est son impact sur la régulation de la prise alimentaire.

Plusieurs études ont montré que la consommation de fructose peut influencer les signaux de satiété et de faim dans le cerveau. Ces études ont révélé que la consommation de repas contenant du fructose entraînait une augmentation moins importante des signaux de

satiété, tels que la glycémie, l'insulinémie, la leptinémie, ainsi que des concentrations de GLP-1 et de PYY, par rapport à ceux contenant du glucose (Akhavan & Anderson, 2007 ; Stanhope et al., 2009 ; Teff et al., 2004). De plus, la consommation de fructose conduisait à une diminution moins marquée des signaux de faim, comme les concentrations de ghréline, par rapport à la consommation de glucose. Ces différences ont été observées chez des individus de poids normal ainsi que chez des patients obèses, suggérant que la consommation de fructose pourrait augmenter l'appétit. Ces résultats sont cohérents avec les études réalisées chez le rongeur où une administration au niveau central de fructose stimule la prise alimentaire (Cha et al., 2008). En outre, le fructose peut également avoir des effets sur les circuits cérébraux de récompense et de motivation, ce qui peut entraîner une augmentation de la recherche et de la consommation de nourriture (Luo et al., 2015 ; Page et al., 2013). De plus, contrairement à une boisson de glucose, l'ingestion d'une boisson de fructose d'induit pas une diminution de la sensation de faim, suggérant que l'effet satiétogène du fructose est moins puissant que celui du glucose (Page et al., 2013). Ces effets peuvent contribuer à des comportements alimentaires déséquilibrés et à une prise de poids excessive, ce qui peut avoir des implications pour la santé métabolique et le risque de développer des troubles métaboliques tels que l'obésité et le diabète de type 2.

Cependant, la partie ventrale du noyau arqué de l'hypothalamus, où se trouvent les neurones qui contrôlent la prise alimentaire, est caractérisé par la présence de capillaires fenestrés qui facilitent les échanges de molécules entre le sang et le tissu cérébral. En revanche, cette perméabilité spécifique ne s'applique pas au reste du cerveau qui est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE), une barrière physiologique qui limite le passage de substances du sang vers le cerveau afin de maintenir un environnement neuronal stable et fonctionnel. Ainsi, bien que le fructose puisse atteindre l'hypothalamus, nous ne disposons pas de preuves que le fructose puisse passer cette barrière et entrer dans le cerveau. En effet, GLUT5 est très faiblement exprimé par les cellules endothéliales de la BHE (Figure 16A), de même que les autres transporteurs du fructose GLUT2, GLUT8 et GLUT11 (Zhang et al., 2014

; Zhang et al., 2016). Il reste donc à déterminer si le fructose provenant de la circulation périphérique peut franchir cette barrière et avoir un impact sur les cellules cérébrales. Cette question constitue un maillon crucial dans la compréhension des effets du fructose sur le cerveau.

Malgré cela, le transporteur spécifique du fructose GLUT5, est exprimé dans tout le cerveau. En particulier, il est quasi exclusivement exprimé par les cellules microgliales (Figure 16A) (Zhang et al., 2016). De plus, les microglies expriment l'enzyme clé de son métabolisme, la KHK (Figure 16B) (Zhang et al., 2016), ainsi que toutes les enzymes nécessaires aux différentes voies métaboliques pouvant être impliquées dans le devenir métabolique du fructose (Figure 17). Ces cellules sont donc pleinement équipées pour détecter, capter et métaboliser le fructose. Il est alors raisonnable de considérer la microglie comme la principale médiatrice des effets du fructose sur le cerveau. Néanmoins, le devenir métabolique du fructose dans les microglies est encore inconnu et nous ignorons comment ces voies métaboliques sont régulées à l'intérieur de ces cellules. Cela souligne l'importance de poursuivre la recherche pour comprendre les mécanismes sous-jacents de l'interaction entre le fructose et les cellules microgliales dans le cerveau. Cette compréhension est essentielle pour mieux appréhender les effets du fructose sur la santé cérébrale.

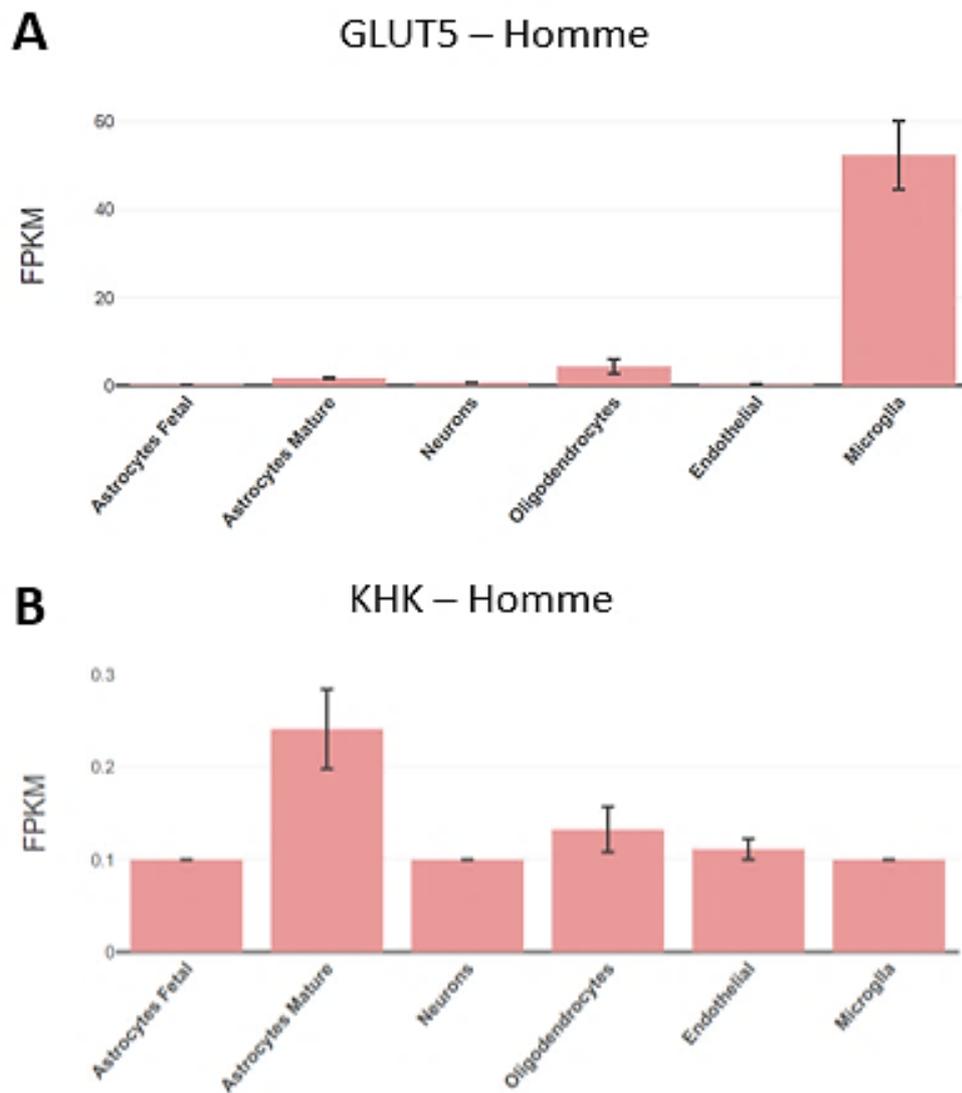


Figure 16 : Expression des ARN des gènes GLUT5 (A) et KHK (B) par les cellules cérébrales chez l'Homme. (Adapté de Zhang et al., 2016)

5.1 Origines des cellules microgliales

Aujourd'hui, un consensus sur l'origine des microglies semble émerger, bien que cette question ait été longuement débattue (Ginhoux & Prinz, 2015). En effet, grâce à des études de « fate-mapping » utilisant un marquage génétique des précurseurs microgliaux chez la souris, il a été démontré que les microglies proviennent de précurseurs myéloïdes issus du sac vitellin (Ginhoux et al., 2010 ; Gomez Perdiguero et al., 2015). Au cours du développement embryonnaire précoce, les progéniteurs erythromyéloïdes génèrent des cellules qui migrent dans le cerveau en formation au jour embryonnaire E9,5 grâce au système vasculaire, avant la fermeture de la BHE (Ginhoux & Prinz, 2015 ; Ginhoux et al., 2010). Une fois dans le cerveau et selon les régions cérébrales, les microglies ont une morphologie non ramifiée et amiboïde jusqu'au début de la période postnatale. Puis, elles adoptent un phénotype dit mature avec une morphologie ramifiée vers la fin de la deuxième semaine postnatale (Lenz & Nelson, 2018). Ces cellules persistent tout au long de la vie de l'organisme et s'auto-renouvellent très peu dans le cerveau sain (Tay et al., 2017). Des macrophages périphériques peuvent néanmoins infiltrer le SNC lors d'une inflammation, acquérir une morphologie ramifiée, exprimer une signature transcriptomique proche de celle des microglies, et ainsi devenir des cellules dites « microglie-like ». Cependant, ces cellules conservent une identité transcriptomique et des réponses fonctionnelles distinctes de celles des microglies (Shemer et al., 2018).

5.2 Les fonctions microgliales

Les microglies participent à l'homéostasie du SNC grâce à leurs fonctions critiques notamment, à leur motilité, la libération de facteurs solubles et leur capacité de phagocytose, jouant ainsi un rôle crucial dans la santé et les fonctions physiologiques du cerveau (Figure 18) (Colonna & Butovsky, 2017). En effet, la microglie joue un rôle actif dans plusieurs processus neurologiques essentiels. Elle participe à la neurogenèse en influençant la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neurales (Cunningham et al., 2013). De plus, elle contribue au remodelage synaptique en modulant la formation, l'élimination et la plasticité des synapses, ce qui revêt une importance capitale pour le neurodéveloppement et l'apprentissage (Colonna & Butovsky, 2017). En outre, la microglie joue un rôle crucial dans la régulation de la myélinisation des axones (Hagemeyer et al., 2017) et la neuromodulation, en affectant l'excitabilité neuronale via la modulation de nombreux canaux et récepteurs voltage-dépendants (Vezzani & Viviani, 2015). Par ailleurs, la microglie possède une capacité unique à sonder son environnement et à réagir aux signaux moléculaires complexes, ce qui lui confère un statut privilégié dans la défense immunitaire du cerveau pour détecter tout signe de dommage, d'infection ou de perturbation. Lorsqu'elle détecte une anomalie, que ce soit une blessure, une infection ou tout autre état pathologique, la microglie migre vers la zone affectée. Elle peut alors effectuer différentes actions pour protéger le cerveau, notamment la phagocytose des débris cellulaires ou de l'agent pathogène, et la libération de médiateurs inflammatoires comme les cytokines, pour signaler la présence de danger et recruter d'autres cellules du système immunitaire. Ce recrutement est facilité par une augmentation de la perméabilité de la BHE, laquelle est modulée par la libération de cytokines (Kang et al., 2020). Elle joue également un rôle crucial dans la réparation tissulaire en favorisant la cicatrisation des lésions cérébrales, en éliminant les débris cellulaires, et en régulant la vascularisation cérébrale en stimulant l'angiogenèse (Zhao et al., 2018).

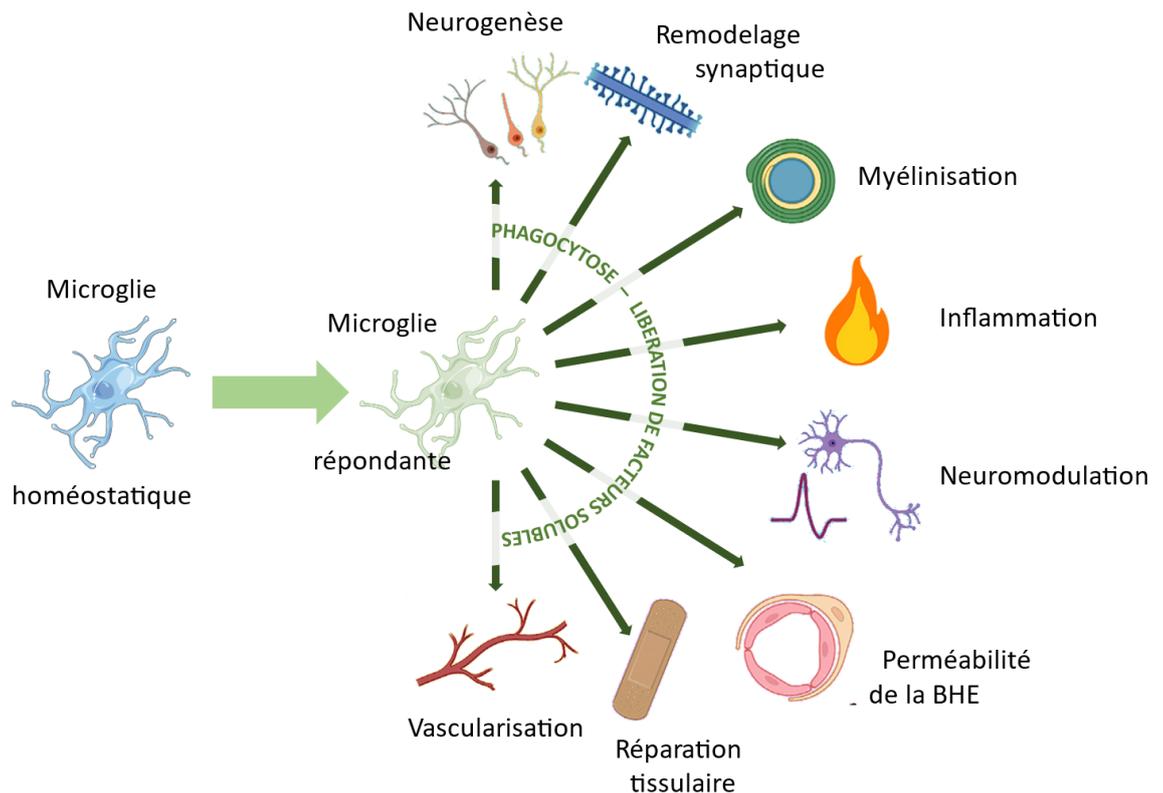


Figure 18 : Représentations des fonctions assurées par la microglie. (Adapté de Paolicelli et al., 2022).

La microglie, en soutenant ses nombreuses fonctions, démontre une remarquable plasticité pour s'adapter aux conditions physiopathologiques du cerveau. Cette capacité lui permet d'adopter différents états fonctionnels en réponse à son environnement, chacun étant associé à des signatures transcriptionnelles et protéiques spécifiques (Butovsky & Weiner, 2018). Le terme de microglie « homéostatique » est utilisé pour désigner les microglies dans des conditions physiologiques. Aussi, il est préférable d'utiliser la désignation de microglie « homéostatique » au lieu de « au repos », compte tenu de leur constante activité et leur perpétuelle adaptation aux changements de leur microenvironnement (Paolicelli et al., 2022). Ainsi, les signatures microgliales sont associées à des phénotypes moléculaires et fonctionnels de la microglie. Elles sont donc dépendantes des conditions environnementales

et doivent être décrites en précisant le contexte développemental, du vieillissement ou physiopathologique. De plus, jusqu'à il y a une dizaine d'années, la classification des microglies selon les sous-types M1 et M2 était la plus utilisée. Elle caractérisait les M1 comme pro-inflammatoires et les M2 comme anti-inflammatoires. Cependant, cette classification est devenue de plus en plus controversée car elle est jugée trop simpliste et ne reflète pas la complexité réelle des fonctions et des réponses microgliales (Ransohoff, 2016). Ainsi, de nombreux états microgliaux sont maintenant décrits en tenant compte du contexte, comme par exemples et de manière non exhaustive, les microglies associées aux pathologies (disease-associated microglia, DAM ou MGnD pour microglia in neurodegeneration) ; et les microglies accumulatrices de gouttelettes lipidiques (lipid droplet associated microglia LDAM) (Paolicelli et al., 2022). Ainsi, il est recommandé d'utiliser le terme de microglie « réactive » plutôt que « activée » afin de ne pas créer d'opposition entre ces états microgliaux et les microglies homéostatiques (Paolicelli et al., 2022).

Dans ce manuscrit, notre attention s'est concentrée sur la réponse inflammatoire de la microglie. La littérature suggère que le fructose pourrait influencer cette réponse inflammatoire, bien que de nombreuses zones d'ombre subsistent dans ce domaine (voir chapitre 6. Fructose et microglie, page 63). En outre, pour mieux comprendre les effets du fructose sur la microglie dans des conditions basales, nous nous sommes particulièrement intéressés à la signature transcriptomique du phénotype homéostatique des microglies adultes. Ainsi, dans la suite de ce chapitre, nous examinerons plus en détails la réponse inflammatoire ainsi que la signature homéostatique de la microglie.

5.3 La réponse inflammatoire de la microglie

La neuroinflammation peut être définie comme la réaction inflammatoire qui se développe dans le SNC (O'Callaghan et al., 2008). La microglie, en tant que principale cellule immunitaire du SNC, occupe un rôle central dans ce processus inflammatoire. Cependant, toutes les cellules du SNC sont impactées et participent à la neuroinflammation, y compris les astrocytes, les oligodendrocytes et même les neurones (Renaud et al., 2015). En effet, les astrocytes participent à l'inflammation en étant, avec les microglies, à la fois sources et cibles des facteurs inflammatoires (Miller, 2005). Les astrocytes contribuent ainsi à réguler la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines et en influençant la perméabilité de la BHE. Les oligodendrocytes et les neurones peuvent contribuer à réguler l'inflammation, en sécrétant notamment des cytokines anti-inflammatoires, limitant la propagation de l'inflammation et favorisant sa résolution (Renaud et al., 2015). Une neuroinflammation contrôlée est donc essentielle pour maintenir l'intégrité du SNC et pour favoriser la récupération post-lésionnelle. Des dysfonctionnements de cette neuroinflammation peuvent endommager les cellules cérébrales et contribuer à la progression de maladies neurologiques. En effet, tant une augmentation qu'une diminution de la neuroinflammation peuvent avoir des conséquences néfastes, soulignant l'importance cruciale de préserver une régulation fine de la neuroinflammation pour maintenir l'homéostasie du cerveau (DiSabato et al., 2016). Ainsi, une dérégulation de la neuroinflammation est souvent associée à un certain nombre de maladies neurologiques, notamment les troubles de l'humeur et de la cognition (Cf chapitre 6.1, page 63).

Les cytokines, occupent une place centrale parmi les médiateurs de l'inflammation, jouant un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire de la microglie. Elles sont des protéines de signalisation cellulaire et exercent leurs effets en tant que médiateurs autocrines (agissant sur la cellule productrice) et/ou paracrines (influençant les cellules voisines). Leur action biologique se produit à des concentrations très faibles (picomolaire à nanomolaire) en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques (Smith et al., 2012). Elles ont pour rôle d'induire,

de contrôler ou d'inhiber l'intensité et la durée de la réponse immunitaire. Sont distinguées les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires.

5.3.1 Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires sont des polypeptides produits par les cellules du système immunitaire en réponse à des stimuli inflammatoires. Leur rôle principal est de déclencher et de coordonner la réponse immunitaire, en activant les cellules phagocytaires pour éliminer les agents pathogènes, et en stimulant la production d'autres médiateurs inflammatoires. En effet, les cytokines peuvent avoir divers effets sur les cellules du cerveau. Elles peuvent stimuler les microglies et les astrocytes à libérer davantage de cytokines, entraînant ainsi une amplification de la réponse inflammatoire (Miller, 2005). De plus, les cytokines peuvent altérer la fonction des cellules endothéliales de la BHE, favorisant ainsi la perméabilité de cette barrière et permettant le passage de substances inflammatoires et de cellules immunitaires périphériques dans le cerveau (Kang et al., 2020). Les cytokines peuvent également induire des réponses apoptotiques (mort cellulaire programmée) des cellules cérébrales, contribuant ainsi aux dommages neuronaux observés dans diverses conditions neurologiques inflammatoires (Smith et al., 2012). Les principales cytokines pro-inflammatoires sont l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α).

5.2.1.1 IL-1 β

Dans les années 1940, l'IL-1 a été découvert comme un facteur soluble libéré par les granulocytes. La famille de l'IL-1 comprend principalement trois cytokines : IL-1 α , IL-1 β (agonistes) et IL-1ra (antagoniste naturel) (Dinarello, 1996). L'IL-1 β est synthétisée sous forme de précurseur inactif de 31 kDa et doit être clivée par une enzyme spécifique, l'enzyme de conversion de l'IL-1 β (ICE), pour devenir active. Son activité biologique est médiée par son

récepteur membranaire l'IL-1RI, induisant l'activation des voies de signalisation NFκB (Nuclear Factor-KappaB) et MAPK (MAPkinases) (Smith et al., 2012). Lorsque cette voie de signalisation est activée, elle déclenche la transcription de gènes codant pour de nombreuses protéines impliquées dans l'immunité innée (Glezer et al., 2007). Ces protéines comprennent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α, ainsi que des chemokines comme la CCL2 et l'IL-8. De plus, elle favorise l'expression d'enzymes telles que la cyclooxygénase-2 (COX-2), qui produit des prostaglandines, ainsi que l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), qui génère du monoxyde d'azote (NO). L'IL-1β est considérée comme le régulateur principal de la synthèse des cytokines périphériques et cérébrales, reproduisant les effets physiologiques et comportementaux induits par le LPS (Bluthé et al., 1992). De plus, il a été montré que l'administration au niveau central de l'antagoniste IL-1ra bloque la synthèse des autres cytokines inflammatoires (Layé et al., 2000).

5.2.1.2 IL-6

L'IL-6, a initialement été identifiée comme un facteur de différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps (Hirano T et al., 1986). Elle a également été désignée par plus de 30 termes différents, soulignant ainsi la diversité de ses actions pléiotropes (Assier et al., 2010). La terminologie définitive de cette cytokine a été adoptée lors d'une conférence qui s'est tenue à New York en décembre 1988. L'IL-6 est une glycoprotéine sécrétée de 26 kDa. Elle se lie à son récepteur, l'IL-6R, formant un complexe avec la gp130, une glycoprotéine transmembranaire. La voie principale d'activation est la voie JAK-STAT (Janus Kinase-Signal transducer and activator of transcription) (Duhé & Farrar, 1998). Les ARNm de l'IL-6R et de la gp130 sont exprimés par les neurones et les cellules gliales dans diverses régions cérébrales telles que l'hippocampe, l'hypothalamus et du cortex (Vallières & Rivest, 1997).

5.2.1.3 TNF- α

Le TNF- α est une cytokine avec des effets apoptotiques, nécrotiques, pro-inflammatoires, prolifératifs et hématopoïétiques (McCoy & Tansey, 2008). Il est synthétisé sous forme de précurseur inactif, une protéine transmembranaire de 26 kDa, pouvant être clivé en un peptide actif de 17 kDa par la métalloprotéase (TACE ou ADAM17) (Smith et al., 2012). Dans le SNC, il est produit par la microglie, les astrocytes et les neurones, avec une expression retrouvée dans diverses régions cérébrales comme le cortex, le striatum, le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cervelet et du tronc cérébral (McCoy & Tansey, 2008 ; Vitkovic et al., 2000). Deux récepteurs membranaires, TNFR1 et TNFR2, sont impliqués dans la médiation des effets du TNF- α , jouant un rôle crucial dans la défense contre les pathogènes et l'apoptose (Smith et al., 2012). La liaison du TNF- α à ses récepteurs active les voies de signalisation NF κ B et MAPK, induisant l'expression de molécules pro-inflammatoires, ainsi que les caspases impliquées dans l'apoptose (Dempsey et al., 2003).

5.3.2 Les cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires sont des protéines qui modulent la réponse immunitaire en limitant ou atténuant l'inflammation. Elles agissent en opposition aux cytokines pro-inflammatoires et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre immunitaire et la prévention de réponses inflammatoires excessives. Ces cytokines anti-inflammatoires sont essentielles pour réguler l'activation du système immunitaire et prévenir les dommages aux tissus. Ici, nous allons développer spécifiquement le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β).

5.2.2.2 TGF- β

Découvert en 1981, le TGF- β appartient à une superfamille de 25 membres (Massagué et al., 1994). Il a été identifié comme un immunosuppresseur essentiel, régulant le développement, la différenciation, l'activation et l'homéostasie des cellules immunitaires (Spittau et al., 2020). Sa signalisation est initiée par sa liaison et l'activation des récepteurs TGFBR1 et TGFBR2, qui régulent la transcription des gènes cibles du TGF- β 1 par phosphorylation (Zöller et al., 2018). De plus, le TGF- β 1 module également la voie MAPK, renforçant son impact sur la régulation de l'inflammation (Spittau et al., 2020).

Par ailleurs, contrairement aux autres cytokines, le TGF- β 1 s'est révélé être crucial pour l'homéostasie microgliale et la survie neuronale. En effet, des études sur des souris déficientes en TGF- β 1 ont montré une dégénérescence neuronale (Brionne et al., 2003). De plus, il a été observé que le TGF- β 1 est indispensable à la signature moléculaire homéostatique des microglies (Butovsky et al., 2014). En outre, les souris déficientes en TGF- β 1 présentent un développement embryonnaire normal mais souffrent de réactions inflammatoires systémiques postnatales excessives dans plusieurs organes, accompagnées d'infiltrations massives de cellules immunitaires, de nécrose tissulaire et de défaillance d'organes, provoquant finalement la mort prématurée des souris 20 jours après leur naissance (Shull et al., 1992). Enfin, une perte de ramification microgliale et une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires ont été observées chez les souris adultes dépourvues du récepteur TGFBR2 (Zöller et al., 2018). Ainsi, ces études soulignent le rôle crucial de la signalisation de TGF- β 1 microglial dans le maintien de l'homéostasie microgliale et la régulation de l'inflammation.

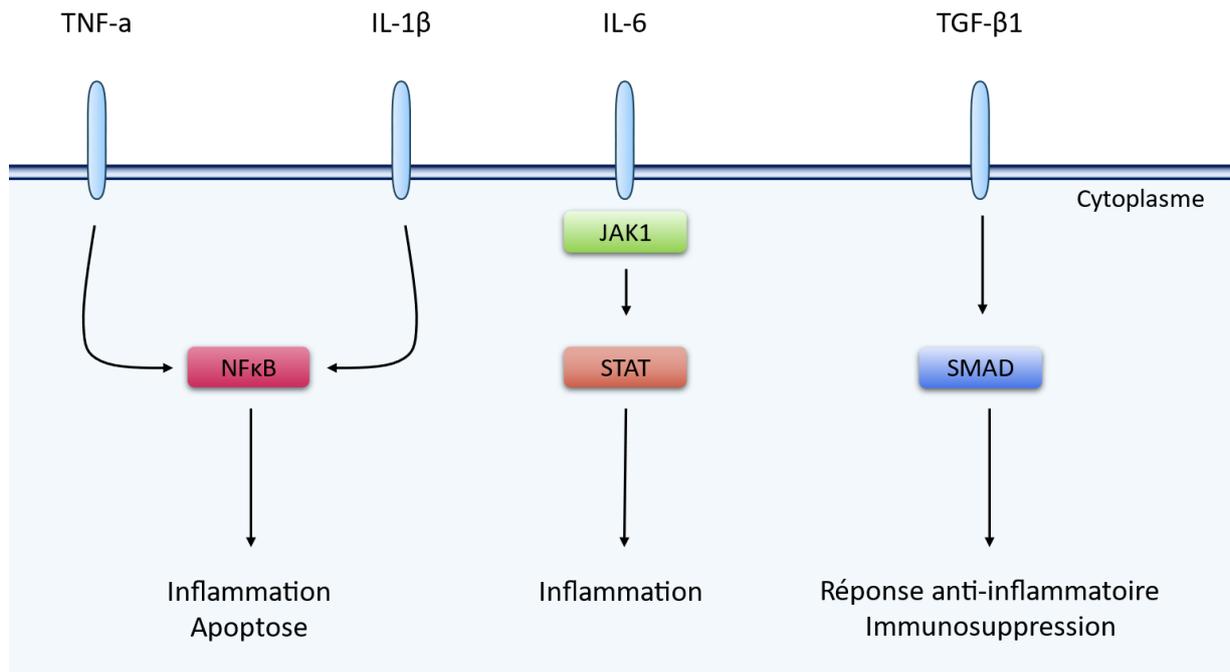


Figure 19 : Voies de transduction du signal et réponses biologiques majeures des principales cytokines modulatrices de l'inflammation. (Adapté de Lin & Karin, 2007).

En résumé, les cytokines anti-inflammatoires et pro-inflammatoires agissent en tandem pour assurer une réponse immunitaire efficace et maintenir l'homéostasie cérébrale (Figure 19). De plus, un timing précis dans la libération de ces cytokines est crucial pour assurer une réponse inflammatoire appropriée et efficace tout en minimisant les dommages collatéraux au tissu cérébral sain. En effet, en réponse à un signal inflammatoire, les cellules microgliales libèrent rapidement les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et le TNF-α (Figure 20) (Layé et al., 1994 ; Turrin et al., 2001). Ces cytokines jouent un rôle essentiel dans le recrutement des cellules immunitaires supplémentaires et dans l'activation des mécanismes de défense. Cependant, une fois l'infection ou le stimulus inflammatoire initial maîtrisé, la production de cytokines pro-inflammatoires diminue, tandis que la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF-β augmente (Qi et al., 2016 ; Turrin et al., 2001). Ces cytokines anti-inflammatoires aident à réduire l'inflammation, rétablissant ainsi l'homéostasie

et favorisant la résolution de la réponse immunitaire. Ainsi, des perturbations dans cette régulation temporelle peuvent être dommageables en entraînant une réponse inadéquate, prolongée ou excessive du système immunitaire. Une réponse insuffisante peut prolonger le temps pendant lequel l'organisme est vulnérable à une infection ou à d'autres stimuli inflammatoires, tandis qu'une inflammation prolongée ou excessive peut causer des dommages tissulaires et contribuer au développement de maladies chroniques. Par conséquent, un timing précis dans la régulation de l'inflammation est essentiel pour maintenir la santé cérébrale et prévenir les complications.

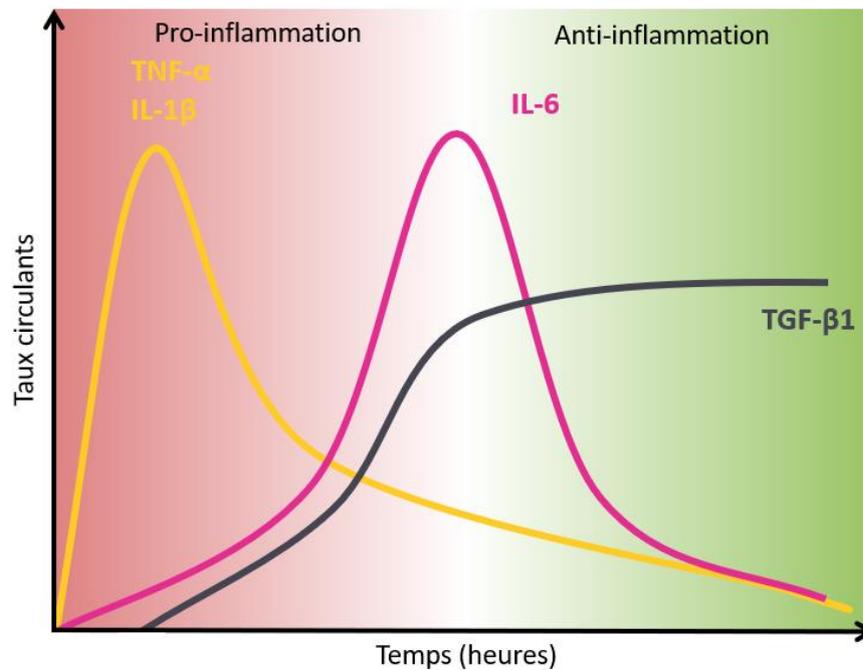


Figure 20 : Profils d'expression des cytokines inflammatoires au cours d'une infection. (Adapté de Steeland et al., 2018).

5.4 La signature homéostatique de la microglie

L'homéostasie peut être décrite comme le processus par lequel les organismes maintiennent un équilibre interne stable malgré les variations externes, assurant ainsi leur fonctionnement optimal de leurs fonctions physiologiques. Ainsi, une microglie homéostatique est décrite comme une microglie en équilibre physiologique avec son environnement. Sous l'influence de l'ancienne nomenclature, le phénotype homéostatique des microglies est également désigné comme M0 (Butovsky et al., 2014).

Les progrès technologiques récents de séquençage de l'ARN, de protéomique, d'épigénétique et de bioinformatique, ont permis d'identifier une signature transcriptionnelle distincte pour les microglies homéostatiques chez la souris adulte et chez la microglie humaine (Butovsky et al., 2014). Cette signature comprend l'expression de gènes tels que le récepteur purinergique P2Y12 (P2RY12 ou P2Y12R) et la protéine transmembranaire 119 (TMEM119), qui sont spécifiques aux microglies adultes et peu ou pas exprimés par les cellules myéloïdes périphériques (Butovsky & Weiner, 2018). De plus, une diminution de l'expression de ces deux marqueurs a été observée dans diverses conditions pathologiques, notamment le vieillissement, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, ainsi que dans plusieurs modèles de maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la sclérose en plaques (Butovsky et al., 2014 ; Jordão et al., 2019) ; renforçant ainsi leur caractère homéostatique.

Par ailleurs, plusieurs autres gènes, non spécifiques aux cellules microgliales, ont été identifiés comme homéostatiques en raison de leur expression similaire à celle de P2RY12 et TMEM119 dans les conditions physiopathologiques, contribuant ainsi à caractériser la signature homéostatique de la microglie. Parmi ces gènes, nous retrouvons le récepteur au facteur de croissance transformant bêta de type 2 (TGFBR2), le récepteur CX3CR1 et GLUT5 (Butovsky et al., 2014).

Néanmoins, bien que dans le cerveau adulte, les microglies homéostatiques présentent une signature stable en conditions basales, cette signature peut varier en fonction de l'âge ou du contexte physiopathologique. Ces variations dans la signature génique des microglies mettent en lumière l'aspect dynamique des microglies et soulignent l'importance de comprendre les différents états et contextes dans lesquels ces cellules opèrent. Il est important de toujours contextualiser la signature microgliale (Paolicelli et al., 2022). Ainsi dans cette thèse, nous définissons la microglie de souris adulte, en l'absence de stimulation inflammatoire, comme homéostatique. Afin de mieux définir cette signature, nous développerons succinctement les principaux gènes homéostatiques identifiés, à savoir P2RY12, GLUT5, TMEM119, TGFBR2 et CX3CR1.

5.4.1 P2RY12 / P2Y12R

Les microglies expriment plusieurs récepteurs purinergiques, une famille de récepteurs membranaires réagissant aux purines. Ces récepteurs se divisent en deux grandes catégories : les récepteurs P1, qui se lient à l'adénosine, et les récepteurs P2, qui se lient à l'ATP (adénosine triphosphate) et à l'ADP (adénosine diphosphate). Les récepteurs P1 sont couplés aux protéines G. Les récepteurs P2 sont également couplés aux protéines G et sont subdivisés en deux sous-types principaux : P2X et P2Y. Les récepteurs P2X sont des canaux ioniques ligand-dépendants qui s'ouvrent en réponse à la liaison d'ATP, permettant le passage de ions à travers la membrane cellulaire. Les récepteurs P2Y, en revanche, sont couplés aux protéines G et activent des cascades de signalisation intracellulaire en réponse à la liaison d'ATP ou d'ADP (Morillas et al., 2021).

Ainsi, le récepteur purinergique P2Y12, nommé selon les publications P2RY12 ou P2Y12R, est un récepteur membranaire couplé aux protéines G sensible à l'ADP extracellulaire. Lors d'une lésion ou d'une infection du SNC, les cellules endommagées libère

de l'ATP. Ce signal chimio-attractif est perçu par les récepteurs purinergiques de la microglie et P2RY12 régule la migration des cellules vers le site lésionnel, facilitant ainsi une réponse immunitaire appropriée (Haynes et al., 2006). Une fois sur site, les processus microgliaux se rétractent, les cellules microgliales adoptent une morphologie amiboïde et l'expression de P2RY12 diminue (Morillas et al., 2021). Ainsi, au sein du cerveau, l'expression de P2RY12 a principalement été identifiée sur les processus ramifiés des microglies (Haynes et al., 2006). Par conséquent, P2RY12 assure une surveillance dynamique de l'environnement cérébral et joue un rôle essentiel dans la capacité de la microglie à se déplacer de manière ciblée en réponse à une lésion du SNC.

5.4.2 GLUT5

De façon intéressante, GLUT5 est très fortement exprimé dans les cellules microgliales homéostatiques (Butovsky et al., 2014). Par ailleurs, il a été révélé que l'expression de GLUT5 est diminuée en condition non homéostatique, et notamment dans les DAM (Jordão et al., 2019 ; Krasemann et al., 2017 ; Keren-Shaul et al., 2017) et lors d'une exposition au LPS (Figure 21 A) (Bennett et al., 2016 ; Krasemann et al., 2017). Par exemple, dans un modèle murin transgénique de la maladie d'Alzheimer (APP-PS1 ; B6.Cg-Tg(Thy1-APP^{Sw},Thy1-PSEN1*^{L166P})21Jckr), l'expression de *Glut5* est diminuée dans les microglies DAM chez les souris APP-PS1 (Figure 21 B). De plus, la signature DAM/MGnD est contrôlée par les gènes TREM2 et APOE (Krasemann et al., 2017). Or, l'invalidation du gène *Trem2* dans un modèle transgénique (SOD1 ; B6SJL-Tg(SOD1*^{G93A})1Gur/J) de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), l'expression de *Glut5* est restaurée (Figure 21 C) (Krasemann et al., 2017). Enfin, l'expression de *Glut5* dans les microglies est diminuée en condition phagocytaire (Figure 21 D). En outre, ce transporteur est peu ou pas exprimé par les macrophages, soulignant un rôle spécifique de GLUT5 dans l'adaptation homéostatique des microglies (Sasaki et al., 2004 ; Tada et al., 2016). Ainsi, la découverte récente de GLUT5 comme gène homéostatique microglial soulève de nombreuses interrogations et sa contribution à l'homéostasie des

microglies demeure entièrement inexplorée. Néanmoins, en tant que transporteur spécifique du fructose, son expression suggère que ce sucre puisse participer au métabolisme énergétique et moduler l'homéostasie de ces cellules.

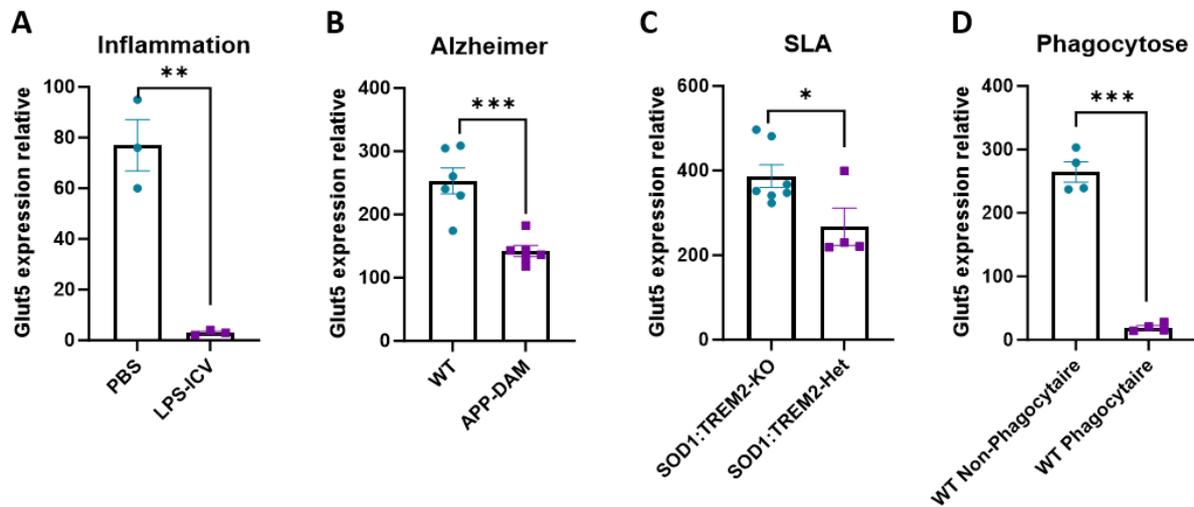


Figure 21 : Expressions de GLUT5 dans différentes conditions physiopathologiques. (Extrait de jeux de données transcriptomiques - Krasemann et al., 2017)

(A) Expression de *Glut5* dans des microglies isolées 24h après l'injection intracérébroventriculaire (ICV) de PBS ou de LPS. (B) Expression de *Glut5* dans des microglies issues de souris WT et APP-PS1. (C) Expression de *Glut5* dans des microglies issues de souris $SOD1^{G93A}$, modèle génétique de la SLA exprimant ou non *TREM2* ; counts normalisés. (D) Expression de *Glut5* dans des microglies isolées 16h après injection de neurones apoptotiques induisant un phénotype phagocytaire ; ncounts. (A) et (D) ont été mesurés par analyse transcriptomique – Nanostring. - (B) et (C) ont été mesurés par séquençage d'ARN - Smartseq2.

5.4.3 Tmem119

TMEM119 est une protéine transmembranaire spécifiquement exprimée par la microglie et absente des cellules myéloïdes périphériques, faisant d'elle un marqueur spécifique pour cette population cellulaire dans le cerveau (Butovsky & Weiner, 2018). Son utilisation généralisée comme marqueur permet d'identifier et de caractériser les cellules microgliales dans les études immunohistochimiques et de cytométrie en flux. Cette spécificité d'expression en fait un outil précieux pour explorer la dynamique et la fonction des cellules microgliales dans différents contextes physiologiques et pathologiques du SNC. Ainsi, TMEM119 a conduit au développement d'un nouveau modèle de souris transgénique, ciblant spécifiquement la microglie. Cependant, sa fonction dans la microglie n'est pas encore connue. Bien qu'exprimée en périphérie, cette protéine, également nommée sous le nom de facteur d'induction des ostéoblastes, est connue pour jouer un rôle dans la minéralisation osseuse (Mizubishi et al., 2015). De plus, elle participe également à la spermatogenèse (Mizubishi et al., 2015). Ceci est particulièrement intéressant, sachant que l'expression de GLUT5 dans les testicules est maximale lors du pic de la spermatogenèse (Roy & Krishna, 2013). La corrélation entre TMEM119 et GLUT5 dans leur implication dans la spermatogenèse, ainsi que leur colocalisation en tant que marqueurs homéostatiques de la microglie, suggère qu'il pourrait exister un lien significatif entre ces protéines.

5.4.4 TGFBR2

Le TGFBR2, récepteur 2 du TGF- β , est une protéine transmembranaire localisée à la surface des microglies participant à l'homéostasie microgliale (Butovsky et al., 2014). Lorsque le TGF- β se lie à TGFBR2, ce dernier phosphoryle le récepteur TGFBR1, initiant ainsi son activité kinase. Les médiateurs de signalisation sont alors phosphorylés, ce qui permet leur translocation vers le noyau pour réguler l'expression des gènes cibles du TGF- β (Zöller et al., 2018). Ainsi, la fonction principale de TGFBR2 est de médier les effets du TGF- β (voir page 55).

5.4.5 CX3CR1

CX3CR1 est un récepteur de chimiokine exprimé par les cellules myéloïdes, notamment les monocytes, les macrophages et les microglies (Lee et al., 2010). Son ligand naturel, la fractalkine ou CX3CL1, est fortement exprimé dans les neurones (Harrison et al., 1998). La fractalkine peut interagir avec CX3CR1 sous forme membranaire ou en tant que ligand sécrété après clivage par les métalloprotéases ADAM10 ou ADAM17 (Bazan et al., 1997). Cette interaction entre la fractalkine et CX3CR1 est impliquée dans le recrutement des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation, ainsi que dans la régulation de l'activation et de la fonction phagocytaire des cellules immunitaires (Lee et al., 2010 ; Pawelec et al., 2020). Bien que Cx3Cr1 soit exprimé dans les macrophages, sa spécificité dans le cerveau pour les microglies (Cardona et al., 2006), ainsi que le court renouvellement des macrophages périphériques, ont justifié l'utilisation de ce gène pour développer des modèles de souris transgéniques capables de cibler spécifiquement les microglies (Sahasrabudde & Ghosh, 2022). Ainsi, le modèle murin Cx3cr1CreER, dont la Cre recombinase est exprimée de façon inductible sous le promoteur CX3CR1, est un outil génétique aujourd'hui largement utilisé (Bedolla et al., 2023 ; Faust et al., 2023).

6. Fructose et microglie

6.1 Fructose et neuroinflammation *in vivo*

Les effets du fructose sur les tissus périphériques ont été largement étudiés. Ces dernières années, l'attention s'est également portée sur la capacité de ce sucre à induire une neuroinflammation. Les études précliniques démontrent que les régimes prolongés riches en fructose induisent une neuroinflammation chez le rat adulte et adolescent au niveau hypothalamique, hippocampique et cortical (Cigliano et al., 2018 ; Djordjevic et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Yin et al., 2014). Cette neuroinflammation est caractérisée par une augmentation

de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , ainsi que des altérations dans les voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire, comme le TLR4 et le NF-kB. Néanmoins, aucune de ces études n'ont étudié la réponse inflammatoire des microglies et/ou des astrocytes spécifiquement dans cette neuroinflammation. Ainsi, l'implication de la microglie dans la neuroinflammation induite par le fructose demeure entièrement inexplorée. De plus, l'étude de cette neuroinflammation est particulièrement réduite en raison de l'exploration d'un nombre limité de gènes. Des recherches complémentaires de séquençage des ARNs totaux permettraient de mieux caractériser les effets du fructose sur la neuroinflammation.

À ce jour, la recherche sur les effets du fructose sur la réponse inflammatoire des microglies demeure relativement limitée. La plupart des études dans ce domaine ont été menées chez le rat, ce qui crée une lacune dans notre compréhension des effets du fructose sur la souris. Ces données sont pourtant essentielles pour exploiter les modèles murins transgéniques, qui présentent des capacités remarquables en termes de manipulation génétique et nous permettent de mener des études mécanistiques approfondies. Toutefois, des études récentes ont commencé à explorer cette question. En effet, des études ont montré qu'un régime riche en fructose débuté pendant l'adolescence augmente l'expression cérébrale de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α chez la souris (Li et al., 2019 ; Xu et al., 2016). Néanmoins, étudier les effets du fructose sur la neuroinflammation chez la souris adulte reste crucial pour comprendre les risques pour la santé à long terme et promouvoir des habitudes alimentaires saines dans la population générale. La recherche sur la souris offre des avantages pratiques et expérimentaux qui en font un modèle animal de choix pour étudier les mécanismes et les conséquences de l'exposition au fructose sur la neuroinflammation. De plus, les outils de manipulation génétique plus développés permettent de modifier spécifiquement l'expression de gènes liés au métabolisme du fructose et d'étudier leur rôle dans les réponses physiologiques et pathologiques.

6.2 Fructose et microglie *in vitro*

Pour étudier les effets directs du fructose sur la microglie, les modèles *in vitro* sont particulièrement pertinents. Ils offrent un contrôle précis des conditions expérimentales, ce qui facilite l'isolement spécifique des effets du fructose.

Ainsi, quelques études ont été menées sur des cellules microgliales BV-2 utilisant différentes concentrations de fructose (0 – 2,5 – 5 ou 10 mM pendant 24 h). Ces études ont constaté que l'exposition au fructose induisait une augmentation de la production de TNF- α (Cigliano et al., 2017) ainsi qu'une activation de TLR4/NF- κ B et une expression de gènes pro-inflammatoires, tels que l'Il-1 β , l'Il-6 et le Tnf- α (Xu et al., 2016). D'autre part, Mizuno et al. (2021) ont traité des cellules microgliales primaires néonatales et SIM-A9 (lignées cellulaires de microglies murines) avec une concentration élevée de fructose (7,5 mM pendant 24 h) mais n'ont pas révélé de modulation d'inflammation par le fructose.

Ces résultats contradictoires révèlent certaines limites de ces modèles d'étude. En effet, l'utilisation des cellules BV-2 et des cellules primaires néonatales pour étudier les effets du fructose sur la microglie est discutable en raison de leur faible expression de Glut5, le transporteur de fructose (Figure 22). Quant aux cellules SIM-A9, il n'existe pas de données de quantification de Glut5 dans ces cellules. De plus, ces études utilisent des concentrations de fructose extrêmement élevées qui ne correspondent pas à des niveaux physiologiques. En effet, la concentration de fructose dans le liquide cébrospinal peut varier entre 100 μ M et 500 μ M (Hwang et al., 2015 ; Hwang et al., 2017). Les concentrations excessives de fructose peuvent entraîner des réponses cellulaires artificiellement exagérées qui ne reflètent pas nécessairement ce qui se passe dans des conditions physiologiques normales. Par exemple, dans une étude menée par Wang et al. (2023), une concentration de 5 mM de fructose a entraîné une diminution de la phagocytose dans des cultures de microglies néonatales, alors qu'une concentration de 1 mM, bien que déjà supra-physiologique, n'a pas eu d'impact sur la

phagocytose. De même dans cette étude, sur des cultures de microglies dérivées de cellules souches pluripotentes humaines (hPSC), seule une concentration de 15 mM de fructose a été capable de réduire la phagocytose, tandis qu'une concentration de 5 mM n'a eu aucun effet. Enfin, il a été montré que les lignées cellulaires de microglies et les microglies primaires couramment utilisées en culture in vitro n'expriment pas la signature moléculaire des microglies adultes (Butovsky et al., 2014). Par conséquent, les conclusions tirées de ces études in vitro doivent être interprétées avec prudence et confirmées par des études utilisant des modèles plus représentatifs de la microglie in vivo et des doses de fructose plus proches de celles observées chez l'Homme. La partie 1 de ma thèse s'est attelé à comprendre les effets du fructose sur la physiologie des microglies en utilisant un modèle de culture de microglie adulte.

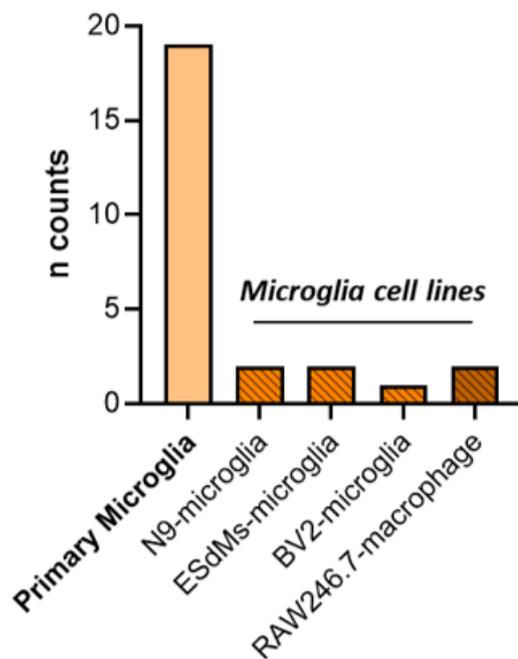


Figure 22 : Expression de GLUT5 dans différents modèles de culture primaire de microglies. (Extrait de jeux de données transcriptomiques ; counts normalisés - Butovsky et al., 2014).

7. Le fructose et la santé cérébrale

Certaines études sur le rongeur se sont intéressées aux effets de la consommation de fructose sur la santé cérébrale, plus précisément sur la mémoire, l'anxiété et la dépression. Les résultats suggèrent que la consommation de fructose peut avoir des effets variables selon les doses utilisées, la durée, et la méthode d'administration.

Chez la souris, une dose de 10% de fructose dans l'eau de boisson n'a révélée aucune altération significative de la mémoire, de l'anxiété ou de dépression (Cisternas et al., 2015 ; dos Santos et al., 2020). Cependant dans une autre étude, une consommation de 15% de fructose a conduit à une augmentation des niveaux de cholestérol et de triglycérides, une intolérance au glucose et des comportements pseudo-anxieux, avec des signes pseudo-dépressifs seulement observés chez les femelles, mais aucun effet sur la mémoire (De Souza et al., 2021). En revanche, une dose plus élevée de 30% de fructose a conduit, en plus des effets déjà décrits, à une prise de poids significative, une hyperglycémie, des déficits de mémoire spatiale, des comportements pseudo-anxieux plus marqués, ainsi que des comportements pseudo-dépressifs chez les deux sexes (De Souza et al., 2021). Ces études soulignent l'impact dose-dépendant du fructose sur la santé cérébrale.

De plus, des recherches menées sur des rats soulignent l'importance de la consommation chronique de fructose sur la santé cérébrale. Les rats exposés à un régime enrichi en fructose à 10% dans leur eau de boisson n'ont pas montré d'effets significatifs sur la reconnaissance d'objet nouveau après 2 semaines, mais ont présenté une réduction de l'index de discrimination dans cette tâche après 27 semaines de régime (Sangüesa et al., 2018). De même, Wu et al. (2015) ont observé qu'une consommation de 10% de fructose pendant 8 mois a entraîné une altération de la mémoire. Ces résultats soulignent les conséquences potentielles d'une exposition prolongée au fructose sur les fonctions cognitives.

Enfin, le mode d'administration du fructose joue également un rôle crucial dans ses effets sur la santé cérébrale. En effet, bien qu'une concentration de 10% de fructose dans l'eau de boisson était suffisante pour induire des problèmes de santé cérébrale, il semble qu'une concentration plus élevée de fructose dans la nourriture soit nécessaire pour produire des effets similaires. En effet, Ross et al. (2009) ont observé des problèmes de mémoire chez les rats alimentés avec un régime contenant 60% de fructose, tandis que Reddy et al. (2016) ont rapporté des comportements anxieux chez les rats nourris avec une alimentation contenant 65% de fructose. Par conséquent, ces résultats suggèrent que le fructose apporté par les boissons mérite une attention particulière car il peut être potentiellement plus dangereux pour la santé cérébrale que celui provenant d'autres sources alimentaires.

En résumé, les données disponibles mettent en évidence la nécessité de prendre en compte dans les effets du fructose sur la santé cérébrale non seulement la quantité de fructose consommée, mais également la durée de l'exposition et la manière dont il est consommé. Cependant, les mécanismes précis qui sous-tendent ces effets demeurent largement inconnus. Néanmoins, plusieurs processus physiopathologiques liés à la consommation de fructose, tels que les troubles métaboliques, la neuroinflammation et la dysbiose intestinale, pourraient contribuer aux problèmes de santé cérébrale observés. Une littérature abondante est disponible établissant que les perturbations métaboliques impactent la santé cérébrale (Castanon et al., 2015 ; Jones et al., 2021 ; Mansur et al., 2015 ; Portugal-Nunes et al., 2021). Cependant, dans ce projet de thèse, notre intérêt s'est davantage porté sur les mécanismes explorant les effets directs du fructose sur le cerveau à travers la neuroinflammation et/ou son incidence indirecte via la dysbiose intestinale. En effet, comme évoqué plus tôt, le cerveau et en particulier la microglie, est entièrement équipé pour métaboliser le fructose. Cependant, notre compréhension de ces processus reste limitée et peu explorée. D'autre part, une consommation excessive de fructose est associée à une dysbiose intestinale, ce qui en fait un élément crucial des conséquences de cette consommation sur la santé. Ainsi, la combinaison

de ces deux axes de recherche est essentielle pour tendre vers une compréhension holistique des effets du fructose sur la santé, et en particulier sur la santé du cerveau.

7.1 L'inflammation et la santé cérébrale

Il existe également une vaste littérature scientifique explorant le lien entre l'inflammation et les troubles de l'humeur, tels que la dépression et l'anxiété. Ces études ont établi que l'inflammation joue un rôle central dans la physiopathologie de ces troubles (Guo et al., 2023 ; Jones et al., 2020 ; Kofod et al., 2022 ; Larrieu & Layé, 2018 ; Sakrajda & Szczepankiewicz, 2021). En effet, une inflammation de bas grade a été décrite chez des sujets dépressifs. Des marqueurs inflammatoires, tels que la protéine C-réactive (CRP), l'IL-6 et le TNF- α , sont augmentés chez les patients souffrant de dépression par rapport aux témoins sains (Huet et al., 2021 ; Köhler et al., 2017 ; Osimo et al., 2020) et peuvent être corrélés à la réponse différentielle au traitement antidépresseur (Uher et al., 2014). De plus, les composés anti-inflammatoires révèlent des effets antidépresseurs (Köhler-Forsberg et al., 2019). Inversement, lors de l'utilisation de traitements antidépresseur à court terme, des méta-analyses ont révélé une diminution des marqueurs inflammatoires (Köhler et al., 2018 ; Więdołcha et al., 2018). Une inflammation périphérique accrue a également été rapportée dans le syndrome de stress post-traumatique et le trouble bipolaire (Larrieu & Layé, 2018).

D'autres part dans le SNC, des études utilisant la tomographie par émission de positons (TEP) avec des biomarqueurs des microglies ont révélé la présence de neuroinflammation dans diverses régions cérébrales chez les patients dépressifs (Gritti et al., 2021). Parallèlement, des recherches sur des modèles animaux ont également démontré une libération de facteurs pro-inflammatoires et une activation microgliale chez les animaux présentant des symptômes d'anxiété et de dépression (Munshi et al., 2020 ; Wang et al., 2018). Les mécanismes par lesquels l'inflammation peut influencer la dépression et l'anxiété ont été précédemment décrits (Capuron & Castanon, 2017 ; Miller et al., 2013).

7.2 Le microbiote et la santé cérébrale

L'axe intestin-cerveau est un système de communication bidirectionnelle reliant le système nerveux entérique du tube digestif au cerveau. L'importance de cet axe dans le maintien de l'homéostasie a été reconnue depuis longtemps. Cependant, au cours des dernières années, le microbiote est apparu comme l'un des principaux régulateurs de la fonction intestin-cerveau, soulignant ainsi l'importance d'un axe microbiote-intestin-cerveau (Cryan et al., 2019). Ce domaine d'étude est devenu une spécialisation à part entière. Cette discipline émergente attire de plus en plus de chercheurs et suscite un intérêt accru en raison de son potentiel pour comprendre et traiter un large éventail de troubles neurologiques, psychiatriques et métaboliques. Le but de ce manuscrit n'est pas de faire une littérature exhaustive mais de souligner l'importance du microbiote intestinal dans les troubles de la santé cérébrale.

Ainsi, de nombreuses études utilisant des animaux sans microbiote (Germ-Free ; GF) ou avec un microbiote intestinal diminué par des antibiotiques ont présentées de l'anxiété, de la dépression, ainsi que des déficits cognitifs et des déficits du comportement social (Cryan et al., 2019 ; Cussotto et al., 2018). De plus, des études utilisant des probiotiques comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, ont montrées des effets bénéfiques sur ces altérations. En parallèle, un traitement avec une souche de *Lactobacillus* chez des sujets âgés en bonne santé a entraîné une augmentation des performances aux tests cognitifs par rapport à un groupe placebo (Chung et al., 2014). Des améliorations dans les tâches de mémoire et des améliorations subjectives de l'humeur ont été observées chez des individus en bonne santé recevant un prébiotique d'inuline (Smith et al., 2015). Une étude sur des patients présentant des symptômes d'anxiété et de dépression a montré qu'une consommation de probiotiques réduisait les scores de dépression (Pinto-Sanchez et al., 2017). Les patients souffrant de troubles anxieux ou dépressifs présentent des variations dans la diversité bactérienne ou l'abondance relative par rapport aux sujets sains. De plus, la transplantation du microbiote

fécal de patients anxieux ou dépressifs chez des animaux GF a provoqué des comportements anxieux et dépressifs chez les animaux receveurs (De Palma et al., 2017 ; Zheng et al., 2016).

En conclusion, les données précliniques suggèrent qu'il est fort possible que le fructose ait un impact sur la santé cérébrale humaine. Cependant, les mécanismes sous-jacents de cet effet restent largement inconnus. Plusieurs pistes de recherche sont à explorer, notamment l'effet direct du fructose sur la microglie via une altération de la neuroinflammation, ainsi que son impact indirect via le microbiote intestinal. Il est important de souligner que ces mécanismes ne sont pas nécessairement indépendants, mais sont plutôt interconnectés. Par exemple, des recherches suggèrent que la neuroinflammation peut être influencée par des changements dans le microbiote intestinal, et vice versa (Cryan et al., 2019). Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre comment le fructose peut affecter la santé du cerveau humain et pour développer des stratégies de prévention et de communication efficaces.

8. Hypothèse et objectifs de la thèse

Bien qu'un grand nombre d'études ont démontré l'effet délétère d'une consommation de fructose sur les troubles métaboliques, les effets de ce sucre sur les fonctions cérébrales et la santé cérébrale ont été négligés. Des études récentes ont émergé, révélant un lien entre le fructose et la santé cérébrale, mais les mécanismes précis restent largement inexplorés. Pourtant, le cerveau est entièrement équipé pour absorber et métaboliser le fructose. En effet, le transporteur spécifique du fructose GLUT5 est exprimé presque exclusivement dans la microglie. Des défauts de la régulation de la neuroinflammation, un processus contrôlé par la microglie, sont associés à des troubles du comportements émotionnels et mnésiques. Par conséquent, la consommation de fructose pourrait moduler la physiologie de la microglie et la neuroinflammation pour altérer l'humeur et la mémoire. Par ailleurs, le fructose est peu absorbé par l'intestin grêle et 50% de la population ne peut pas absorber complètement une charge de 30g de fructose. Par conséquent, en plus d'augmenter le taux de fructose dans le sang, son ingestion conduit également à son déversement dans les parties distales de l'intestin où il interagit et altère la composition du microbiote intestinal. Une composition et un métabolisme du microbiote altérés ont été associés à une neuroinflammation accrue pouvant affecter la santé cérébrale. C'est pourquoi nous émettons l'hypothèse que :

Une consommation de fructose peut perturber la santé cérébrale directement *via* des altérations de la microglie, et/ou indirectement *via* une dysbiose du microbiote intestinal.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé plusieurs approches complémentaires, *in vitro* sur cultures primaires de microglies, et *in vivo* avec l'étude des conséquences d'un régime en fructose sur la neuroinflammation, le microbiote et les comportements émotionnels et mnésiques. Ces travaux ont été divisés en 3 grandes parties, chacune ayant un objectif spécifique.

Partie 1 : Définir les effets directs du fructose sur la microglie *in vitro*

Afin d'étudier l'effet direct du fructose sur les cellules microgliales, une nouvelle méthode de culture primaire à partir de microglies de souris adultes a été mise au point au laboratoire en conditions « physiologiques » de glucose et de fructose. Grâce à cette culture de microglies adultes nous avons pu déterminer la réponse homéostatique de la microglie au fructose. De la même façon, cette culture nous a permis d'étudier les effets du fructose sur la réponse inflammatoire de la microglie et l'implication de Glut5 dans cette inflammation.

Partie 2 : Révéler l'impact du fructose alimentaire sur la microglie et la santé cérébrale

Afin de déterminer les effets d'une consommation de fructose sur la microglie et de les relier à des altérations du comportement nous avons utilisé un modèle de régime enrichi en fructose dans l'eau de boisson. Grâce à ce modèle, nous avons validé que la consommation de fructose induit des troubles métaboliques, de la cognition et de l'humeur. En utilisant des techniques de PCR quantitative, nous avons pu mettre en évidence les altérations microgliales induites par le fructose alimentaire et les corrélérer aux altérations du comportement. Enfin, de manière à déterminer le rôle de l'absorption du fructose par la microglie dans les altérations du comportement, nous avons créé un modèle murin double transgénique présentant une invalidation spécifique du transporteur du fructose dans les microglies. Les souris Glut5-KD

(Glut5 knock down) ont été soumises au même protocole de régime enrichie au fructose dans l'eau de boisson et nous avons évalué les altérations microgliales et comportementales de ces animaux. Cet axe a permis de définir dans quelle mesure un défaut d'absorption du fructose dans les microglies protège des altérations microgliales ainsi que du comportement émotionnel et mnésique des souris.

Partie 3 : Evaluer l'implication du microbiote dans la santé cérébrale

Cette dernière partie a été réalisée en collaboration avec le Dr Véronique Douard (Laboratoire Micalis, Jouy-en-Josas) et le Dr Chloé Melchior (Hôpital Universitaire, Rouen). De manière à déterminer les effets indirects du fructose sur la santé cérébrale *via* une altération du microbiote, nous avons utilisé des animaux mal-absorbeurs pour le fructose, les souris Glut5-KO (Glut5 knock out) n'exprimant pas le gène Glut5 dans le corps entier. Des régimes enrichis à 5% de fructose nous ont permis de révéler l'impact du fructose sur la dysbiose intestinale et de la corrélérer à des altérations du comportement. Enfin, nous avons participé au pilotage d'une étude clinique visant à étudier les traits anxieux chez des personnes mal-absorbantes pour le fructose, en comparaison avec des personnes normo-absorbantes.

MATERIELS ET METHODES

Cette section décrit uniquement les techniques que j'ai moi-même utilisées au cours de ce projet de thèse.

1. Autorisation à expérimenter

L'ensemble des expérimentations animales réalisées au cours de ce projet a été conduit dans le strict respect de la législation en vigueur concernant le bien-être animal (directive 86/609 de l'UE). Ces expériences ont été réalisées avec l'accord du comité d'éthique de Bordeaux (CEEA-050), ayant évalué et validé l'ensemble des procédures sous l'aval du ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS #19870-2019031910299553 #33951-20211118173280).

2. Animaux

L'ensemble des expériences ont été réalisées sur des souris mâles adultes âgées de 8 à 22 semaines.

2.1 Hébergement

Les différentes lignées de souris utilisées au cours de ce projet de thèse ont été hébergées en cage collective ou cage individuelle lors de conditions particulières le nécessitant et en accord avec notre autorisation à expérimenter. Les conditions d'hébergement des animaux étaient maintenues à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, une humidité relative de 50 à 70% et un cycle lumière/obscurité de 12:12 avec accès à l'eau de boisson et à la nourriture *ad libitum*.

2.2 Régimes alimentaires

Différents régimes alimentaires ont été utilisés au cours de nos expériences. Ces régimes ont été administrés dans la nourriture ou l'eau de boisson.

Lors des régimes dans l'eau de boisson, les animaux âgés de 12 semaines ont eu accès soit à de l'eau seule, soit à de l'eau contenant 25% de fructose (v/w), tout en étant nourris avec un régime alimentaire standard (STD ; A04 ; Safe Diets, Augy, France) pendant de 8 semaines (adapté de De Souza et al., 2021). Ce régime a été maintenu pendant les expérimentations jusqu'à la mise à mort des animaux.

Lors des régimes dans la nourriture, les animaux âgés entre 8 et 12 semaines ont été nourri avec un régime STD ou bien à un régime à 0% de fructose ou 5% de fructose pendant 4 semaines (Tableau 2). Ces régimes ont été maintenu pendant les expérimentations jusqu'à la mise à mort des animaux.

Tableau 2 : Composition des régimes alimentaires utilisés pour nos expérimentations.

COMPOSITION REGIME	STD	0% FRUCTOSE	5% FRUCTOSE
PROTEINES (kcal%)	20	20	20
LIPIDES (kcal%)	10	16	16
GLUCIDES (kcal%)	70	64	64
Amidon de maïs (gm%)	550	329	329
Saccharose (gm%)	0	0	0
Dextrose (gm%)	0	200	150
Fructose (gm%)	0	0	50
Cellulose BW2000 (gm%)	50	50	50

2.3 Souris sauvages

Les souris sauvages (wild type ; WT) que nous avons utilisées sont des souris de la souche C57BL/6J obtenues auprès des laboratoires Janvier (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Ces souris ont été utilisées au cours des tests *in vitro* évaluant l'effet direct du fructose sur la physiopathologie de la microglie, ainsi que lors des tests *in vivo* évaluant l'effet d'une consommation de fructose sur la microglie, la santé cérébrale et le microbiote.

2.4 Modèles transgéniques

2.5.1. Lignée Glut5-KO whole body

Les souris Glut5-KO ont été acquise auprès du Dr Véronique Douard de l'institut Micalis. Ces souris présentent des sites lox, reconnus spécifiquement par l'enzyme cre-recombinase, flanqués de part et d'autre du gène Glut5. Les animaux utilisés dans ces expériences sont issus de l'élevage de cette lignée dans l'animalerie de notre laboratoire.

2.5.2. Lignée Glut5-KO sélectivement dans la microglie ou Glut5-KD

Les souris de cette lignée que nous avons créée sur fond C57BL/6N présentent une délétion génétique du gène Glut5 sélectivement dans les microglies. Cette lignée a été obtenue en croisant des souris Glut5-lox/lox avec des souris Tmem119-cre/ERT2 (Figure 23). La délétion n'est pas constitutive mais induite par l'administration de tamoxifène, grâce à l'utilisation d'une fusion protéique Cre-ERT2 (Figure 24). Cette fusion reste inactive dans le cytoplasme en l'absence de tamoxifène, mais migre vers le noyau en sa présence pour induire la recombinaison génétique (Kim et al., 2018). Le gène Tmem119, spécifique des microglies dans le cerveau (Butovsky & Weiner, 2018), permet une délétion ciblée de Glut5 uniquement dans ces cellules. Cette délétion conduit à un knock-down (KD) de Glut5, avec une réduction

d'environ 60% du gène après l'administration de tamoxifène, d'où l'appellation de ce modèle Glut5-KD. Ainsi, les souris Glut5-KD présentent le génotype suivant : fl/fl Cre/+. Les contrôles « WT » que nous avons utilisés au cours des expériences sur ce modèle sont leurs congénères exprimant ou bien la cre-recombinase (+/+ Cre/+) ou les séquences lox (fl/fl +/+).

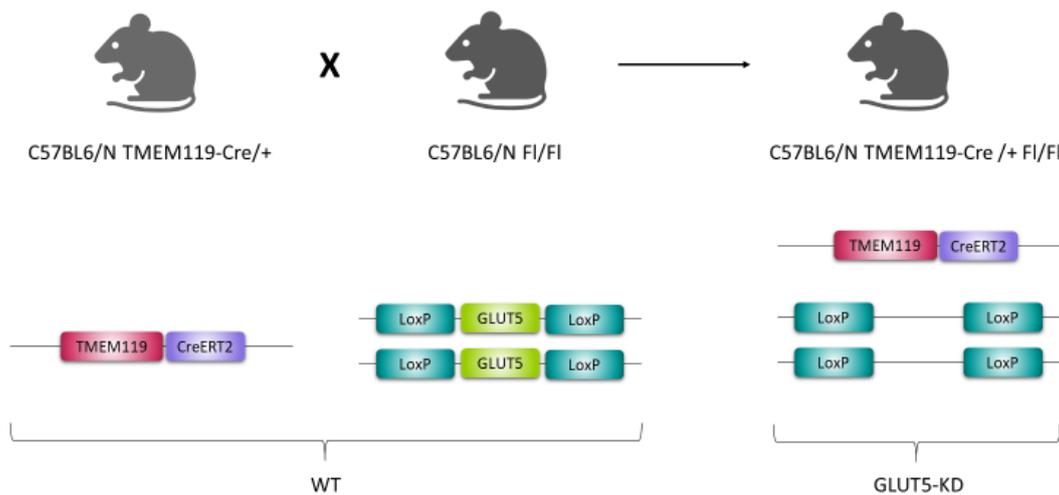


Figure 23 : Construction génétique du modèle GLUT5-KD.

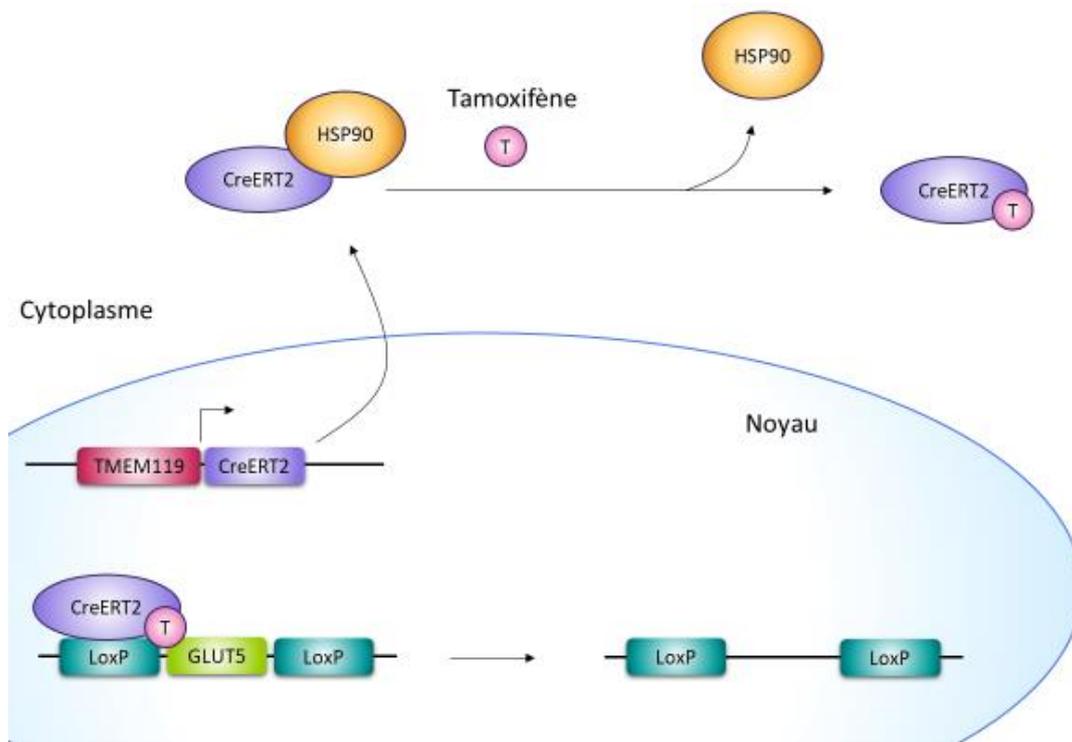


Figure 24 : Principe d'induction de la délétion du gène GLUT5 par l'administration de tamoxifène. (Adapté de Kim et al., 2018).

3. Traitements pharmacologiques

Toutes les injections *in vivo* sur les souris ont été effectuées à un volume d'injection de masse corporelle de 10µL/g, à l'exception des injections de tamoxifène qui ont été réalisées à 5µL/g en raison de sa viscosité.

Le tamoxifène a été dilué dans de l'huile de maïs avant d'être administré par voie intrapéritonéale (IP). L'injection d'une dose de 75mg/kg a été réalisée une fois par jour pendant 5 jours, et ce, 3 semaines avant le début des expérimentations ou des mises sous régime. Ce délai permet aux cellules périphériques pouvant exprimer *Tmem119* de se régénérer sans influence de la *Cre*. En revanche, les microglies se renouvelant peu (Tay et al., 2017) maintiennent la délétion.

4. Tests comportementaux et métaboliques

Les animaux ont été soumis à une batterie de tests comportementaux et métaboliques, réalisés du moins stressant au plus stressant. Nous avons respecté un intervalle minimum de deux jours entre chaque test comportemental. Les animaux ont été habitués à l'expérimentateur pendant trois jours de « handling » précédant les tests comportementaux.

4.1 Tests mesurant le comportement pseudo-anxieux

4.1.1 Test du champ ouvert (Open Field ; OF)

Le test de l'OF (Figure 25) repose sur l'observation du comportement éthologique des rongeurs face aux espaces ouverts non protégés, considérés comme potentiellement menaçants (Walsh & Cummins, 1976). Il consiste en une arène de 40 x 40 x 25 cm, éclairée dans nos conditions à 30 lux, dans laquelle les animaux sont libres d'explorer pendant 10 minutes. Leurs déplacements sont enregistrés par vidéotracking grâce au logiciel Smart (PanLab, Barcelone, Espagne). Ce dispositif permet notamment de mesurer le temps passé et la distance parcourue par les animaux au centre de l'arène, un indicateur de leur niveau d'anxiété, ainsi que leur activité locomotrice pendant le test.

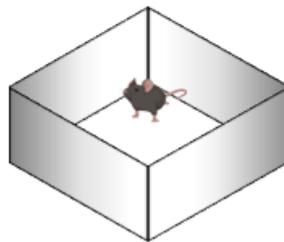


Figure 25 : Le champ ouvert.

4.1.2 Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze ; EPM)

L'EPM (Figure 26) est un test qui met en évidence le conflit entre l'instinct exploratoire de la souris et sa peur des espaces ouverts et du vide (Walf & Frye, 2007). Il comprend deux types de bras, l'un fermé et l'autre ouvert, à une hauteur de 120 cm. Un comportement de type anxieux se manifeste par un temps prolongé passé dans les bras fermés, considérés comme sécurisés, par rapport aux bras ouverts, perçus comme anxiogènes. La souris est observée pendant 5 minutes par vidéotracking pour évaluer son exploration, en enregistrant le temps

passé et la distance parcourue dans chaque type de bras. Le test est effectué sous un éclairage de 30 lux.

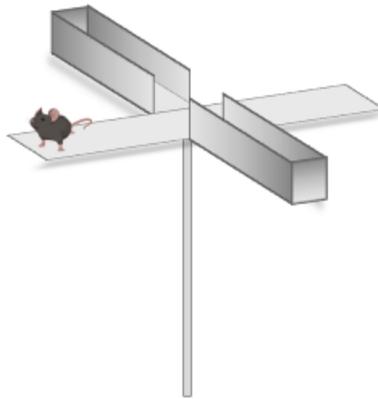


Figure 26 : Le labyrinthe en croix surélevé.

4.1.3 Alimentation supprimée par néophobie (Novelty Suppressed Feeding test ; NSF)

Le NSF (Figure 27) est un test qui évalue l'anxiété chez les animaux en mesurant le temps qu'ils mettent à se nourrir dans un nouvel environnement (Santarelli et al., 2001). Ce test crée un conflit environnemental en confrontant la motivation naturelle de l'animal à se nourrir après un jeûne prolongé avec son appréhension face à un nouvel environnement éclairé à 50 Lux. Après un jeûne de 24 heures, les animaux sont placés dans l'arène de l'OF où une croquette est disposée au centre. Le temps mis par l'animal pour commencer à se nourrir est chronométré, avec une limite de 10 minutes pour accomplir cette tâche. Le temps de latence est utilisé comme indicateur d'anxiété entre les différents groupes expérimentaux. Cette latence est ensuite exprimée en courbe de survie. À la fin du test, l'animal est renvoyé dans sa cage avec un accès *ad libitum* à la nourriture. La prise alimentaire est mesurée à 5min, 1h, 2h 3h et 4h après le test.

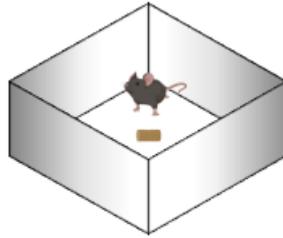


Figure 27 : Alimentation supprimée par néophobie.

4.2 Tests mesurant le comportement pseudo-dépressif

4.2.1 Test d'éclaboussure (Splash Test ; ST)

Le ST (Figure 28) est une méthode comportementale évaluant l'activité de toilettage des animaux induit par la pulvérisation de liquide sur le dos de l'animal. Le protocole, adapté d'Isingrini et al. (2010), consiste à pulvériser de l'eau sur le dos des souris placées dans une cage propre. La latence (temps entre la pulvérisation et le début du toilettage), la fréquence et la durée du toilettage ont été enregistrées pendant 5 minutes et codées manuellement grâce au logiciel The Observer (The Observer® XT 16.0) comme un indice de soins personnels. Un comportement de toilettage réduit est considéré comme un comportement de type dépressif associé à de l'anhédonie chez la souris (Bouguiyou et al., 2022).



Figure 28 : Test d'éclaboussure.

4.2.2 Test de nage forcée (Forced Swim Test ; FST)

Le FST (Figure 29) s'appuie sur l'observation selon laquelle un état dépressif peut être induit chez la souris en la plaçant dans un cylindre d'eau d'où elle ne peut s'échapper. Après une phase initiale d'activité intense, les souris adoptent une posture immobile caractéristique (Porsolt et al., 1977). Cette méthode suppose que les souris présentant des comportements dépressifs sont immobiles plus longtemps, reflétant un état de résignation ou de désespoir, tandis que celles qui ne sont pas dépressives ou qui répondent positivement aux traitements antidépresseurs manifestent davantage d'activité de nage. Pour ce test, les souris sont placées dans un cylindre (16cm de diamètre ; 30cm de hauteur) rempli d'eau (15cm de hauteur) à une température maintenue à $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 6 minutes. Le temps d'immobilité total par rapport aux périodes de nage, ainsi que la fréquence d'immobilité et la latence à la première immobilisation sont mesurés grâce au logiciel The Observer.

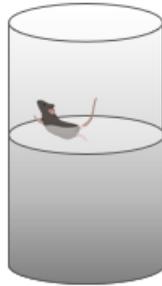


Figure 29 : La nage forcée.

4.3 Tests mesurant la cognition

4.3.1 Piscine de Morris (Morris Water Maze ; MWM)

Le MWM (Figure 30) est un test comportemental utilisé chez les rongeurs pour évaluer l'apprentissage dépendant de l'hippocampe, y compris l'acquisition de la mémoire spatiale et de la mémoire spatiale à long terme (Morris, 1981). Ce test se déroule dans une grande piscine

circulaire (150cm de diamètre) remplie d'eau opaque à $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ avec une plateforme (15cm de diamètre) submergée à un endroit spécifique. Les animaux doivent trouver la plateforme en utilisant des indices spatiaux comme des repères visuels autour de la piscine. Le test est divisé en plusieurs phases. Une première phase de familiarisation, réalisée dans une bassine de 65cm de diamètre avec une plateforme de 8cm de diamètre, consiste en 3 essais consécutifs de 1 min par souris sur deux jours. Ensuite, les souris sont placées dans la piscine avec un indice visuel indiquant l'emplacement de la plateforme. Elles disposent de 4 essais de 90 sec, espacés de 5 min, sur une journée pour atteindre la plateforme. Cette phase permet d'exclure les souris ayant une déficience visuelle. Puis, pendant la phase d'apprentissage, la plateforme est déplacée le 1^{er} jour par rapport à la phase précédente et les animaux sont entraînés à la trouver en effectuant 4 essais de 90 sec, espacés de 5 minutes, pendant 4 jours. L'apprentissage de l'emplacement de la plateforme est validé lorsque sur les 4 jours, la latence pour atteindre la plateforme diminue significativement. Enfin, lors de la phase de test de mémoire, la plateforme est retirée et les animaux sont placés dans la piscine pendant 60 sec pour évaluer leur capacité à se souvenir de l'emplacement de la plateforme après un délai de rétention de 72h. Le temps passé dans chaque quadrant de la piscine est mesuré, ainsi que d'autres paramètres tels que la vitesse de nage. La mémorisation de la plateforme est validée lorsque les souris explorent davantage, et donc passent plus de temps, dans le cadran cible où était la plateforme, que les autres cadrans. Par conséquent, le temps d'exploration du cadran cible doit être significativement supérieur au facteur de chance, soit 25%.

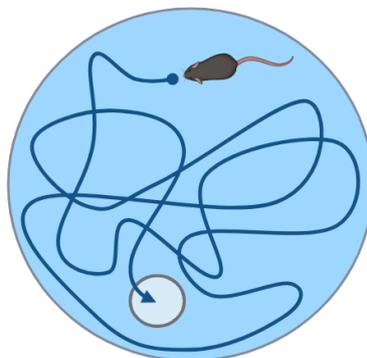


Figure 30 : La piscine de Morris.

4.3.2 Test de mémorisation de localisation d'objet (Object Location memory ; OLM)

Le test de l'OLM (Figure 31) évalue la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe. Il repose sur la préférence éthologique de la souris pour la nouveauté. Dans ce test, adapté de Denninger et al. (2018) les animaux sont acclimatés à une arène d'OF pendant 10 min 24h avant le test. Puis, le test se divise en deux phases. Premièrement pour la phase d'acquisition, les animaux sont placés dans l'arène contenant deux objets identiques qu'ils peuvent explorer librement pendant 8 minutes, en relation avec les signaux spatiaux environnementaux. Les souris sont ensuite retirées de l'arène et retournent dans leur cage pendant une heure. Pendant ce temps, l'un des objets est déplacé vers une nouvelle position dans l'arène. Ensuite débute la phase de rappel. Les souris sont réintroduites dans l'arène, elles sont autorisées à explorer librement pendant 5 minutes. Le temps d'exploration de chaque objet lors des deux phases sont scorés manuellement grâce au logiciel The Observer. La mémoire spatiale est évaluée en observant si les souris passent plus de temps à explorer l'objet déplacé que l'objet non déplacé, ce qui indiquerait qu'elles se souviennent de la position initiale des objets. Ainsi, l'indice de reconnaissance, exprimé en pourcentage, est calculé comme suit : $(\text{temps d'exploration de l'objet déplacé} / \text{temps d'exploration des deux objets}) * 100$.

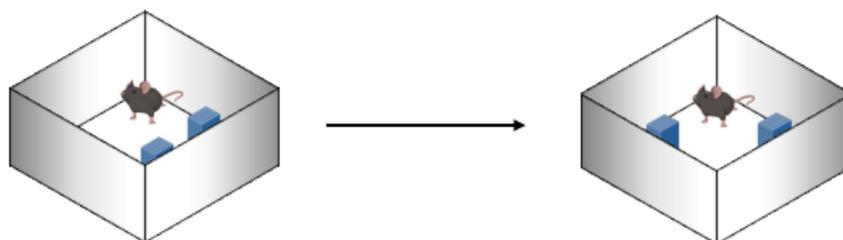


Figure 31 : Mémorisation de localisation d'objet.

4.4 Tests métaboliques

4.4.1 Test de tolérance au glucose

La tolérance au glucose des animaux a été évaluée en réponse à un bolus de glucose (2 g/kg), administré par voie IP. Le glucose a été dilué dans une solution de NaCl 0,9% à une concentration de 200 g/l. Les animaux ont été mis à jeun en cage individuelle dans une pièce calme et éclairée à 80 lux, pendant 4 heures. Suite à une incision à l'extrémité de la queue des animaux, la glycémie a été mesurée à l'aide d'un glycomètre (Accu-check, Roche, Bâle, Suisse) au temps t0 (juste avant l'injection du glucose), t15, t30, t45, t60, t90 et t120 minutes.

4.4.2 Test de résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline des animaux a été évaluée en réponse à une injection d'insuline (0,75 UI / kg), administrée par voie IP. L'insuline a été diluée dans une solution de NaCl 0,9%. Le déroulé du test est strictement identique à celui du test de tolérance au glucose avec une mise à jeun en cages individuelles des animaux pendant 4h suivi d'une mesure de glycémie pendant 2h.

4.4.3 EchoMRI

La masse grasse et la masse maigre des animaux ont été mesurés après les régimes par résonance magnétique à l'aide de l'appareil minispec LF90 II (Bruker, Wissembourg, 67166).

5. Procédure de mises à mort

Lors de la mise à mort, les animaux ont préalablement été injectés à la buprénorphine (Buprecare, Axience SAS, morphinique, 0,01 mg/kg) par voie sous-cutanée. Environ 30min après, ils ont été injectés à l'exagon (Pentobarbital, 300 mg/kg) par voie IP. Enfin, les animaux ont été mis à mort par perfusion intracardiaque à l'HBSS, une solution saline équilibrée de Hank (Fisher Scientifique 11540476 fabricant Gibco 14175129).

6. Extraction de microglies

Les microglies ont été isolées en suivant le protocole précédemment décrit (Herron et al., 2022). Des cerveaux entiers de souris WT âgées entre 8 et 20 semaines ont été récupérés et homogénéisés par broyage manuel dans un potter en verre (WHEATON 357542). L'homogénat a été centrifugé à 4°C pendant 7 min à 300g. Les cellules culotées ont été resuspendues dans du Percoll 70% (GE Healthcare 17-0891-02). Les cellules ont été séparées sur gradient de Percoll 70%-37%. Après une centrifugation à 22°C pendant 25min à 800g, les microglies ont été récoltées à l'interphase du gradient de Percoll et placées dans une solution HBSS à 0,2% de BSA. Après une dernière centrifugation à 4°C pendant 7 min à 300g, les culots de cellules peuvent être congelés à sec et stockés à -80°C, ou être utilisés en culture cellulaires.

7. Culture primaire de microglies

Deux milieux de culture ont été testés dans la mise au point du protocole de culture primaires de microglies : le milieu DMEM/F-12 GlutaMAX (Fisher Scientifique, 10565018) et le milieu A24943 SILAC Advanced DMEM/F-12 Flex (Fisher Scientifique, 15396278). La composition de ces deux milieux est décrite en détails dans le tableau X (Tableau 3). Après isolation, les microglies ont été filtrées etensemencées entre 90 000 et 100 000 cellules dans 500 μ L de milieu de culture à 10% de sérum de veau foetal (Sigma, F9665) et 1% de pénicilline et streptomycine (Sigma, P4333-100mL), sur des plaques 48 puits (Thermo Scientific Nunclon Delta Surface) coatées à la poly-DL-ornithine (Sigma, P8638_100mg). Le milieu SILAC a également été supplémenté avec 0,7mM de L-Arginine (Sigma, A5131-25G), 0,5mM de L-Lysine (Sigma, L5626-100G), 2,5mM de D-Glucose (Sigma, G8270) et 2,5Mm de supplément GlutaMax (Fisher, 11574466) (Tableau 3). Des cytokines ont été ajoutées au milieu de cultures afin d'obtenir des microglies de phénotype M0 (Butovsky et al., 2014), à savoir, 50ng/mL de TGF- β (MiltenyiBiotec, référence 130-095-066 25 μ g) et 10 ng/mL de M-CSF (R&D Systems, Biotechne, référence 416-ML-010/CF). Les cellules ont ensuite été incubées 5 jours dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂. Le 5ème jour, les milieux de cultures ont été remplacés par un milieu identique sans cytokines pendant 24h. Ensuite, les cellules ont été traitées et incubées 3h, 6h, 12h ou 24h avec du LPS à 100ng/mL (O127:B8, Sigma, L4516-1MG). Des traitements au fructose ont également été réalisés à différentes concentrations de fructose, de 50 à 500 μ M de fructose, mais aussi à différents temps, de 5 jours à 24h d'exposition. Enfin les cellules et les surnageants ont été récupérés et stockées au congélateur -80°C.

Tableau 3 : Comparaison de la composition des milieux de culture.

	DMEM/F-12, GlutaMAX (mM)	A24943 SILAC (mM)	SILAC supp. (mM)
Acides aminés			
Glycine	0.25	0.25	
L-Alanine	0.049999997	0.05	
L-Alanyl-L-Glutamine	2.497696		2.5
Chlorhydrate de L-Arginine	0.69905216		0.7
L-Asparagine-H2O	0.05	0.05	
Acide L-Aspartique	0.05	0.05	
Chlorhydrate de L-Cystéine-H2O	0.09977272	0.10	
L-Cystine 2HCl	0.09996805	0.10	
Acide L-Glutamique	0.05	0.05	
Chlorhydrate de L-Histidine-H2O	0.14990476	0.15	
L-Isoleucine	0.41580153	0.416	
L-Leucine	0.45076334	0.451	
Chlorhydrate de L-Lysine	0.4986339		0.5
L-Méthionine	0.11570469	0.116	
L-Phénylalanine	0.2150303	0.215	
L-Proline	0.15	0.15	
L-Sérine	0.25	0.25	
L-Thréonine	0.44915968	0.449	
L-Tryptophane	0.04421569	0.044	
Sel disodique dihydraté de L-Tyrosine	0.21375479	0.214	
L-Valine	0.4517094	0.452	
Vitamines			
Phosphate d'acide ascorbique		0.009	
Biotin	1.4344263E-5	0.000	
Chlorure de choline	0.06414285	0.064	
D-Pantothénate de calcium	0.0046960167	0.005	
Acide folique	0.0060090707	0.006	
Niacinamide	0.016557377	0.017	
Chlorhydrate de pyridoxine	0.009859223	0.010	
Riboflavine	5.824468E-4	0.001	
Chlorhydrate de thiamine	0.0064391694	0.006	
Vitamine B12	5.0184503E-4	0.001	
i-Inositol	0.07	0.070	
Sels Inorganiques			
Chlorure de calcium (CaCl ₂) (anhydre)	1.0504504	1.050	
Sulfate de cuivre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	5.2E-6	0.000	
Nitrate ferrique (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	1.2376238E-4	0.000	
Sulfate ferrique (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.0015	0.002	
Chlorure de magnésium (anhydre)	0.30147368	0.301	
Sulfate de magnésium (MgSO ₄) (an.)	0.407	0.407	
Chlorure de potassium (KCl)	4.1573334	4.157	
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	29.02381	29.024	
Chlorure de sodium (NaCl)	120.68104v	120.612	
Phosphate monobasique de sodium (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.45289856	0.453	
Phosphate dibasique de sodium (Na ₂ HPO ₄) (anhydre)	0.50014085	0.500	
Sulfate de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.0015	0.003	
Autres Composants			
Rouge de phénol	0.021519661		
D-Glucose (Dextrose)	17.505556		2.5
Hypoxanthine Na	0.015031448	0.015	
Acide linoléique	1.4999999E-4	0.000	
Acide lipoïque	5.097087E-4	0.001	
Putrescine 2HCl	5.031056E-4		
Pyruvate de sodium	0.5	1.000	
Thymidine	0.0015082645	0.002	

8. Biologie moléculaire

8.1 Extraction d'ARN

Les ARNs totaux de microglies isolées ou de cultures ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74106). L'ensemble de cette extraction a été réalisé à température ambiante. Les cellules ont été suspendues dans 350µL de tampon RTL puis transférées sur une colonne « dDNA Eliminator » dans un tube de 2mL. Après centrifugation (30sec, $\geq 8000g$), la colonne a été jetée et 350µL d'éthanol 70% ont été ajoutés au filtrat. L'échantillon a été transféré sur une colonne RNeasy Mini spin dans un tube de 2mL et centrifugé de nouveau (15sec, $\geq 8000g$). Le filtrat a été éliminé et 700µL de Buffer RW1 ont été ajoutés sur la colonne avant centrifugation de 15 sec à $>8000g$. Le filtrat a été éliminé et 500µL de Buffer RPE ont ensuite été ajoutés. Cette étape a été réalisée deux fois, avec des centrifugations de 15sec puis de 2 min ($\geq 8000g$). La colonne a été placée dans un nouveau tube de 1,5mL puis 35µL d'eau RNase-free ont été ajoutés avant une dernière centrifugation de 1min à $>8000g$. La concentration des ARNs extraits a été déterminée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (Nanodrop technologies). Les ARNs ont été congelés et stockés à $-80^{\circ}C$.

8.2 Transcription inverse

Les ARNs extraits ont été soumis à une transcription inverse pour produire des ADN complémentaires (ADNc). Pour ce faire, 4 µL de Superscript IV VILO Master Mix ont été ajoutés à 10 µL d'ARNs extraits, auxquels 6 µL d'eau Nuclease-free ont été ajoutés. Ce mix a ensuite été incubé pendant 10 minutes à $25^{\circ}C$, suivi de 10 minutes à $50^{\circ}C$, puis de 5 minutes à $80^{\circ}C$. Les ADNc ainsi obtenus ont été stockés à $-20^{\circ}C$ et peuvent maintenant être utilisés pour la qPCR.

8.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

Les ADNc ont été amplifiés en utilisant des sondes Taqman® FAM (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific), à savoir *il-1β* (Mm00434228_m1), *il-6* (Mm00446190_m1), *tgf-β1* (Mm01178820_m1), *tnf-α* (Mm00443258_m1), *glut5* (Mm00600311_m1), *p2ry12* (Mm00446026_m1), *tgfbr2* (Mm03024091_m1), *tmem119* (Mm00525305_m1) et *b2m* (Mm00437762_m1, utilisé comme gène de référence). La réaction de qPCR a été réalisée en duplicata en utilisant un instrument LightCycler® 480 II (Roche). Après une phase d'activation de 2 min à 90°C, 45 cycles d'amplification ont été réalisés. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation de 15s à 90°C, puis une phase d'hybridation des oligonucléotides et d'élongation du brin pendant 1min à 60°C. Les données ont été normalisées par rapport à B2m ($2^{(-\Delta Ct)}$).

9. Statistiques

L'ensemble des résultats statistiques de cette étude a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10.0 (GraphPAD Software, San Diego, USA). L'identification de valeurs aberrantes « outliers » a été réalisée avec le test de Rout ou de Grubb en fonction de l'hétérogénéité de la population d'individus étudiée. Des tests statistiques de t-test de Student, de two-way Anova, de one-way Anova, de one sample t test ou de Log-rank ont été utilisés en fonction des groupes expérimentaux. Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne (S.E.M.).

9.1 Distribution Gaussienne

Dans un premier temps, la distribution Gaussienne des échantillons des différentes populations d'individus a été déterminée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, en utilisant un

intervalle de confiance de 95%. Ce même intervalle de confiance a également été utilisé pour l'ensemble des tests statistiques réalisés.

9.2 Tests statistiques

Lors d'une comparaison entre deux populations dont la distribution des échantillons est Normale, nous avons utilisé le test paramétrique de Student (t-test). Lorsque ce n'était pas le cas, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney. Au cours d'expériences impliquant deux facteurs de variabilité et comprenant au moins deux populations d'individus, nous avons utilisé une analyse de variance à deux facteurs (two-way ANOVA), effectuée en mesures répétées si l'expérience le nécessitait. En ce qui concerne les expériences impliquant un seul facteur de variabilité et comparant au moins trois populations d'individus, nous avons utilisé une analyse de variance à un facteur (one-way ANOVA) en condition paramétrique et une analyse unidirectionnelle de la variance sur rang (test de Kruskal-Wallis) en condition non paramétrique. Dans le cas où nous comparons toutes les populations à une valeur seuil de référence, nous avons utilisé un One sample t test lorsque la distribution était gaussienne, et un Wilcoxon signed-rank test pour les distributions non paramétriques. Enfin, les courbes de survie ont été comparées grâce au test de Log-rank.

9.3 Analyse Post-Hoc

Les comparaisons entre populations d'individus ont été réalisées à l'aide de test post-hoc lorsque le test ANOVA était significativement statistique. Suite à une ANOVA, nous avons utilisé le test de Tuckey pour des comparaisons multiples entre toutes les populations d'individus. Le test de Sidack a quant à lui été utilisé lors de comparaisons au sein de populations ne partageant qu'un seul facteur de variabilité lors d'analyse de variance à deux facteurs de variabilité.

RESULTATS

Partie 1 : Définir les effets directs du fructose sur la microglie *in vitro*

Dans ce premier axe du projet, j'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées.

1.1 Mise au point de la culture primaire de microglies adultes

Pour étudier les effets potentiels du fructose sur les cellules microgliales, nous avons tout d'abord développé une culture primaire de microglies adultes exprimant une signature homéostatique. Pour ce faire, nous avons reproduit au laboratoire le protocole de Butovsky et al. (2014) en milieu DMEM/F12, nommé F12 dans les expérimentations, dans lequel des microglies homéostatiques sont obtenues après 5 jours de culture. Nous avons confirmé en RT-qPCR l'expression d'une signature homéostatique de microglies adultes, grâce à l'expression des gènes P2RY12, TGF- β 1, TGRBR2 et GLUT5 par ces microglies (Figure 32 A-D). Cependant, ce milieu contient une concentration supra-physiologique de glucose à savoir 17,5 mM de glucose. Nous avons donc adapté cette culture dans des conditions plus physiologiques de glucose, à 2,5 mM. Pour ce faire nous avons utilisé un second milieu nommé SILAC, presque identique au F12 (voir section 7 du matériels et méthodes, page 92), dont nous avons pu ajuster la concentration de glucose à 2,5 mM. Dans ce second milieu, nous avons confirmé en RT-qPCR l'expression des gènes de la signature homéostatique, sans différences significatives avec les microglies issues du milieu F12 (Figure 32 A-D). Ainsi, nous avons validé notre protocole de mise en culture de microglies homéostatiques, appelées M0, en milieu SILAC, en condition physiologique de glucose.

Dans un second temps, nous avons caractérisé la réponse inflammatoire de ces microglies M0 issues des milieux F12 et SILAC en réponse au LPS (100 ng/ml), un stimulateur de l'inflammation. Pour ce faire nous avons comparé les taux d'augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires dans la condition stimulée au LPS vis-à-vis de la condition homologue non stimulée au LPS. Ce taux d'augmentation est appelé « fold increased ». Nous avons ainsi pu confirmer que les microglies mises en culture en milieu F12 et en milieu SILAC, expriment des cytokines inflammatoires 3h après l'ajout de LPS, à savoir IL-1 β , IL-6, TNF- α et TGF- β 1 (Figure 32 E-H). Nous notons cependant, une expression significativement plus importante de la cytokines pro-inflammatoire TNF- α pour les microglies issues du milieu SILAC en comparaison des microglies issues du milieu F12. Ainsi, nous validons la réponse inflammatoire des microglies en milieu SILAC. Le modèle de culture primaire de microglie en milieu SILAC sera utilisé dans l'ensemble des prochaines expérimentations.

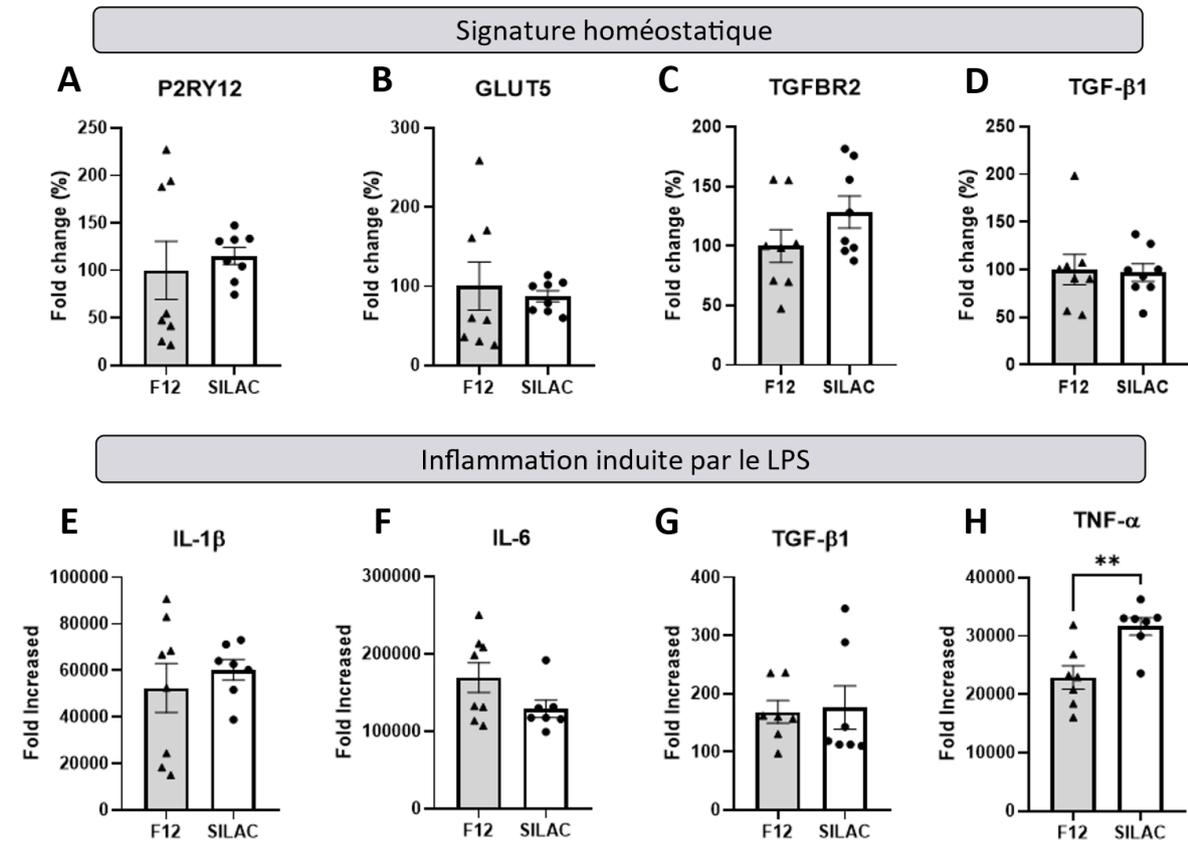


Figure 32 : Validation de l'équivalence des milieux F12 et SILAC sur la physiopathologie des cultures primaires de microglies adultes.

A-D Expression basale des gènes *P2RY12* (**A**), *GLUT5* (**B**), *TGFBR2* (**C**) et *TGF-β1* (**D**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu F12 ou SILAC pendant 5 jours. Les valeurs du groupe WT ont été fixées à 100 %. **E-H** Expression 3h post-traitement au LPS (100 ng/ml) des gènes *IL-1β* (**E**), *IL-6* (**F**), *TGF-β1* (**G**) et *TNF-α* (**H**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu F12 ou SILAC pendant 5 jours. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : ** $p < 0,01$. ($n = 8$ / groupe)

1.2 Effets du fructose sur la physiopathologie des microglies

1.2.1 Impact de la déficience du transporteur Glut5 sur la physiologie des microglies

Le transporteur GLUT5 a été décrit comme un gène homéostatique exprimé par les microglies adultes (Butovsky et al., 2014). Nous avons donc entrepris d'étudier comment la déficience de ce gène affecte la physiologie des microglies en basal, ainsi que leur réponse à une stimulation par le LPS. Pour ce faire nous avons étudié la signature homéostatique de microglies issues de souris WT et issues de souris GLUT5-KO en RT-qPCR, grâce à l'expression des gènes P2RY12, TGFBR2 et TGF- β 1. Nous n'avons pas révélé de différences dans l'expression de ces gènes (Figure 33 A, C, F). Par ailleurs, l'étude de l'expression de GLUT5 valide notre modèle de délétion génétique (Figure 33 B). De plus, nous avons comparé l'expression basale de gènes de cytokines inflammatoire, sans stimulation au LPS. Nous n'observons pas de différence d'expression des cytokines IL-6, TGF- β 1 et TNF- α en condition basale (Figure 33 E-G). En revanche nous notons une diminution de l'expression de l'IL-1 β par les microglies GLUT5-KO (Figure 33 D). Enfin, nous avons évalué la réponse inflammatoire après 3h d'exposition au LPS, un stimulateur de l'inflammation, à 100ng/mL. Dans ces conditions, nous observons une augmentation significative de l'expression de la cytokine IL-1 β , ainsi qu'une forte tendance à augmenter l'expression de l'IL-6 ($p = 0,0871$) et le TNF- α ($p = 0,0576$) par les cellules microgliales GLUT5-KO (Figure 33 H, I, K). Aucune différence dans l'expression du TGF- β 1 n'est observée (Figure 33 J). Ensemble, nos résultats révèlent que l'absence de GLUT5 ne semble pas impacter la signature homéostatique des cellules microgliales. En revanche, ils révèlent une réponse inflammatoire exacerbée.

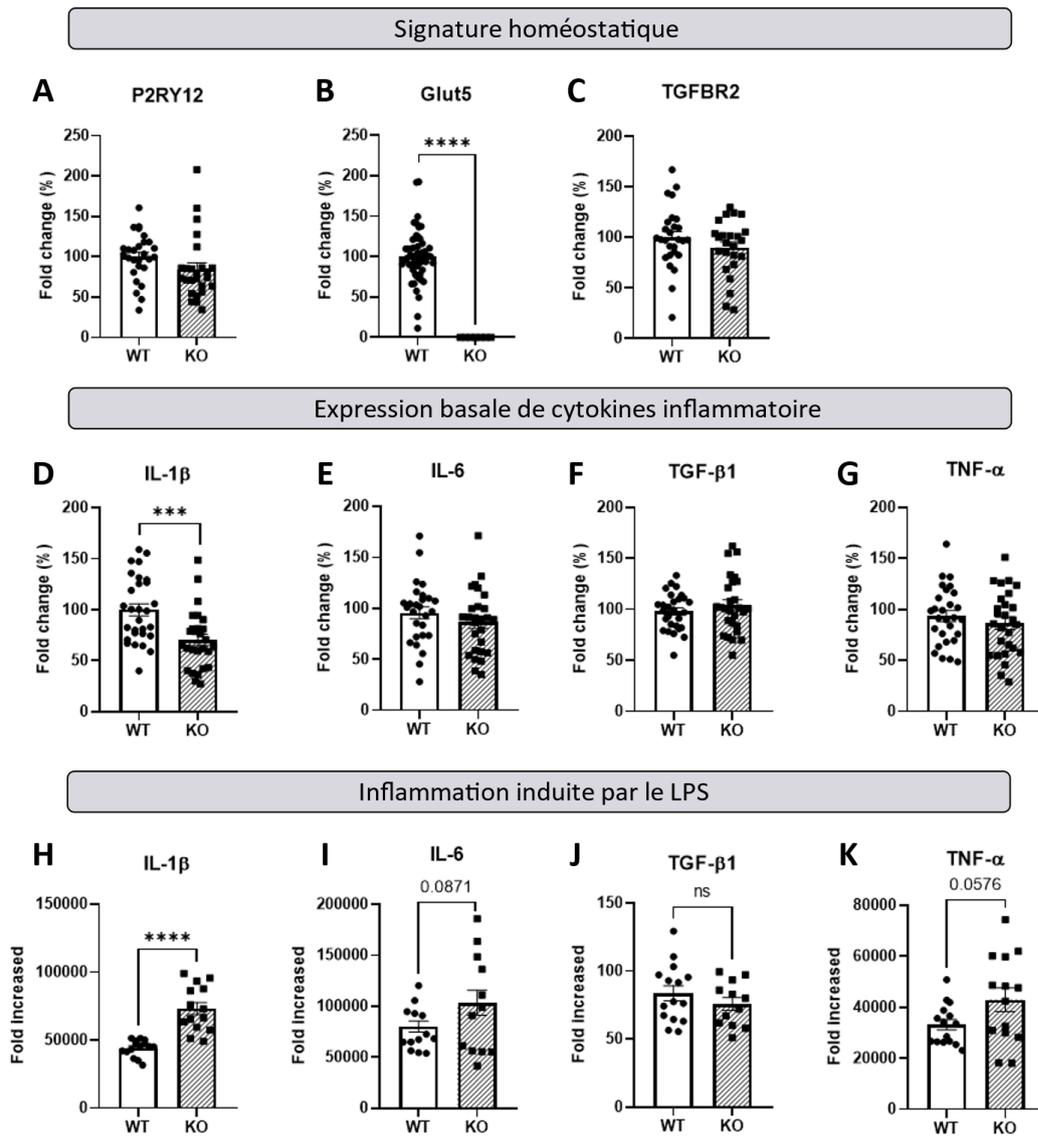


Figure 33 : Etude de la physiologie des microglies du modèle GLUT5-KO.

A-G Expression basale des gènes P2RY12 (**A**), GLUT5 (**B**), TGFBR2 (**C**), IL-1 β (**D**), IL-6 (**E**), TGF- β 1 (**F**) et TNF- α (**G**) de microglies issues de souris WT et GLUT5-KO mises en culture en milieu SILAC pendant 5 jours. Les valeurs du groupe WT ont été fixées à 100 %. **H-K** Expression 3h post-traitement au LPS (100 ng/ml) des gènes IL-1 β (**H**), IL-6 (**I**), TGF- β 1 (**J**) et TNF- α (**K**) de microglies issues de souris WT et GLUT5-KO mises en culture en milieu SILAC pendant 5 jours. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ **** $p < 0,001$. (n = 25 à 27 / groupe).

1.2.2 Effets du fructose sur la signature homéostatique

Afin d'étudier les effets du fructose sur les microglies, nous avons traité ces cellules dès la mise en culture, soit pendant 5 jours, avec une dose haute mais physiologique de fructose, à savoir 500 μ M. Pour rappel, dans le LCR, les concentrations de fructose varient de 100 μ M à 500 μ M (Hwang et al., 2017). Nous avons ainsi évalué l'effet de ce traitement sur l'expression de gènes de la signature homéostatique de cellules WT, à savoir P2RY12, GLUT5, TGFBR2 et TGF- β 1. Dans ces conditions, l'exposition au fructose n'impacte pas l'expression de ces gènes (Figure 34 A-D). L'expression des gènes P2RY12, TGFBR2 et TGF- β 1 n'est pas non plus altérée dans des microglies issues de souris Glut5-KO (Figure 34 E-G).

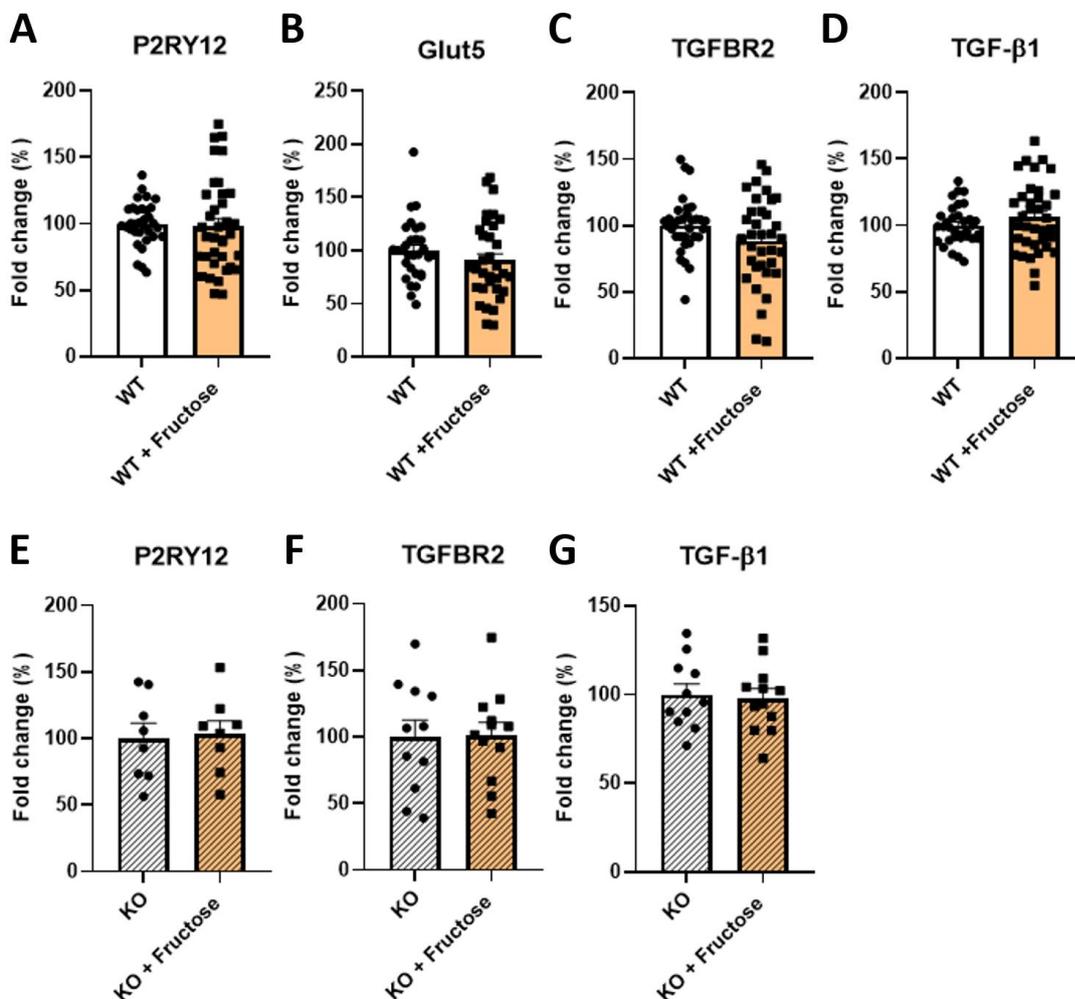


Figure 34 : Etude de la signature homéostatique de microglies WT et KO exposées au fructose.

A-D Expression basale des gènes *P2RY12* (**A**), *GLUT5* (**B**), *TGFBR2* (**C**) et *TGF-β1* (**D**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 500μM de fructose pendant 5 jours ($n = 8$ à 36 / groupe). **E-G** Expression basale des gènes *P2RY12* (**E**), *TGFBR2* (**F**) et *TGF-β1* (**G**) de microglies issues de souris *GLUT5-KO* mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 500μM de fructose pendant 5 jours ($n = 8$ à 12 / groupe). Les valeurs du groupe de référence (WT ou KO sans fructose) ont été fixées à 100 %. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : *t*-test de Statistique : *t*-test de Student : * $p < 0,05$.

1.2.3 Effets du fructose sur l'expression basale de cytokines inflammatoires

Pour poursuivre notre étude des effets du fructose sur la fonction microgliale, nous avons évalué l'expression basale de cytokines inflammatoires des microglies issues de souris WT. Un traitement de 5 jours au fructose augmente l'expression basale de la cytokine IL-6, sans impacter l'expression des autres cytokines IL-1β, TGF-β1 et TNF-α (Figure 35 A-D). De plus, l'expression d'IL-6 ou des autres cytokines n'est pas altérée dans des microglies issues de souris *Glut5-KO* suggérant que l'effet du fructose sur l'expression basale d'IL-6 est dépendante de l'entrée de ce sucre dans les microglies par le transporteur GLUT5 (Figure 35 E-H).

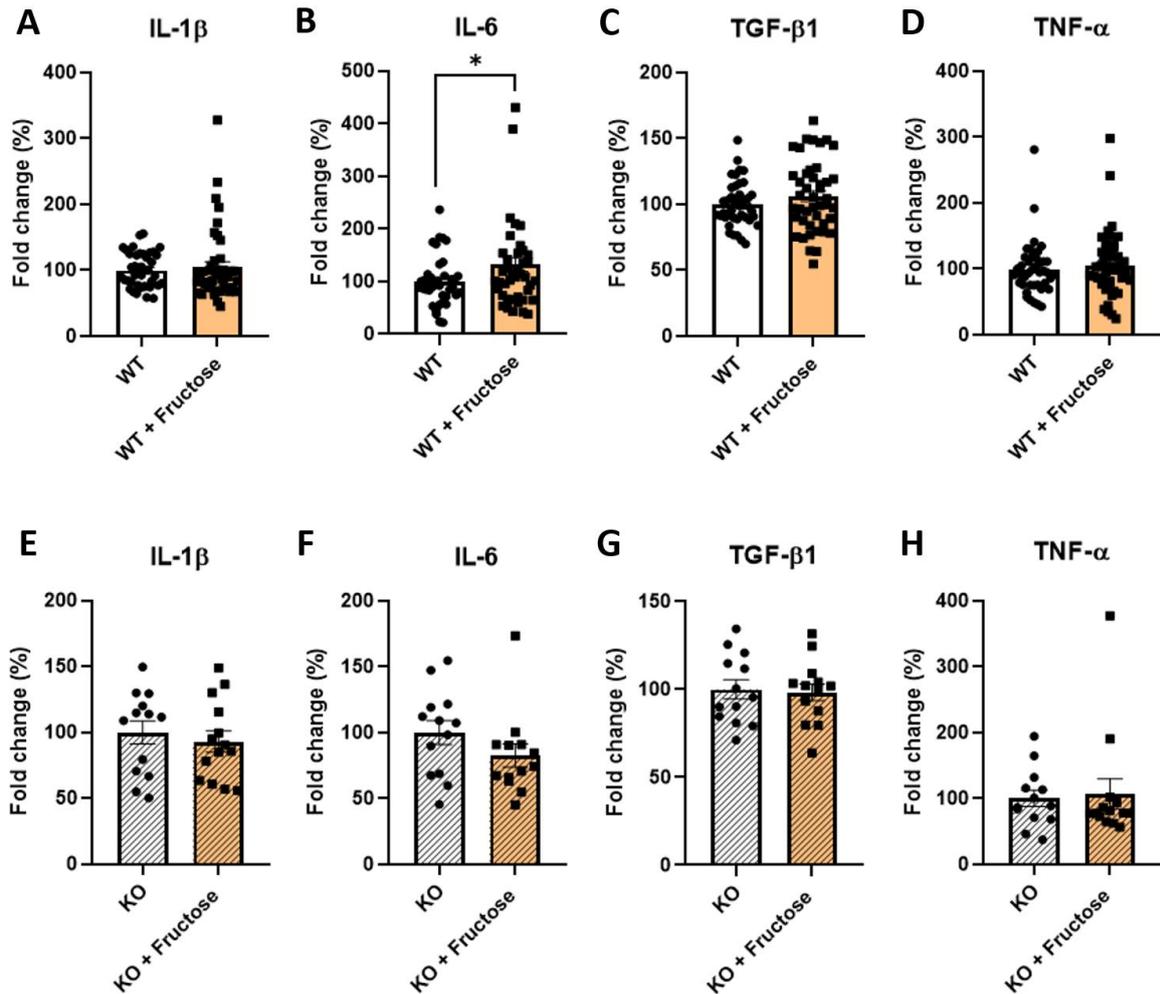


Figure 35 : Etude de l'expression basale de gènes de cytokines inflammatoires de microglies WT et KO exposées au fructose.

A-D Expression basale des gènes IL-1 β (**A**), IL-6 (**B**), TGF- β 1 (**C**) et TNF- α (**D**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 500 μ M de fructose pendant 5 jours ($n = 42$ à 44 / groupe). **E-H** Expression basale des gènes IL-1 β (**E**), IL-6 (**F**), TGF- β 1 (**G**) et TNF- α (**H**) de microglies issues de souris GLUT5-KO mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 500 μ M de fructose pendant 5 jours ($n = 13$ à 14 / groupe). Les valeurs du groupe de référence (WT ou KO sans fructose) ont été fixées à 100 %. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$.

1.2.4 Effets du fructose sur la réponse inflammatoire

Dans la continuité de notre étude, nous avons étudié la cinétique sur 24h de la réponse inflammatoire au LPS (100ng/mL) des microglies WT aux temps 3, 6, 12 et 24h post-traitement LPS. Après 3h de stimulation inflammatoire par le LPS, le traitement au fructose diminue l'expression de l'ensemble des cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 et TNF- α (Figure 36). De plus, la diminution de l'expression de l'IL-6 est également observée à 6h post-LPS pour les cellules traitées au fructose, sans changements significatifs dans l'expression des cytokines IL-1 β , TGF- β 1 et TNF- α . Après 12h et 24h de stimulation au LPS, nous n'observons pas de changement dans l'expression des cytokines inflammatoires par le fructose, à l'exception du TGF- β 1 dont l'expression est augmentée à 24h post-LPS par les cellules traitées au fructose.

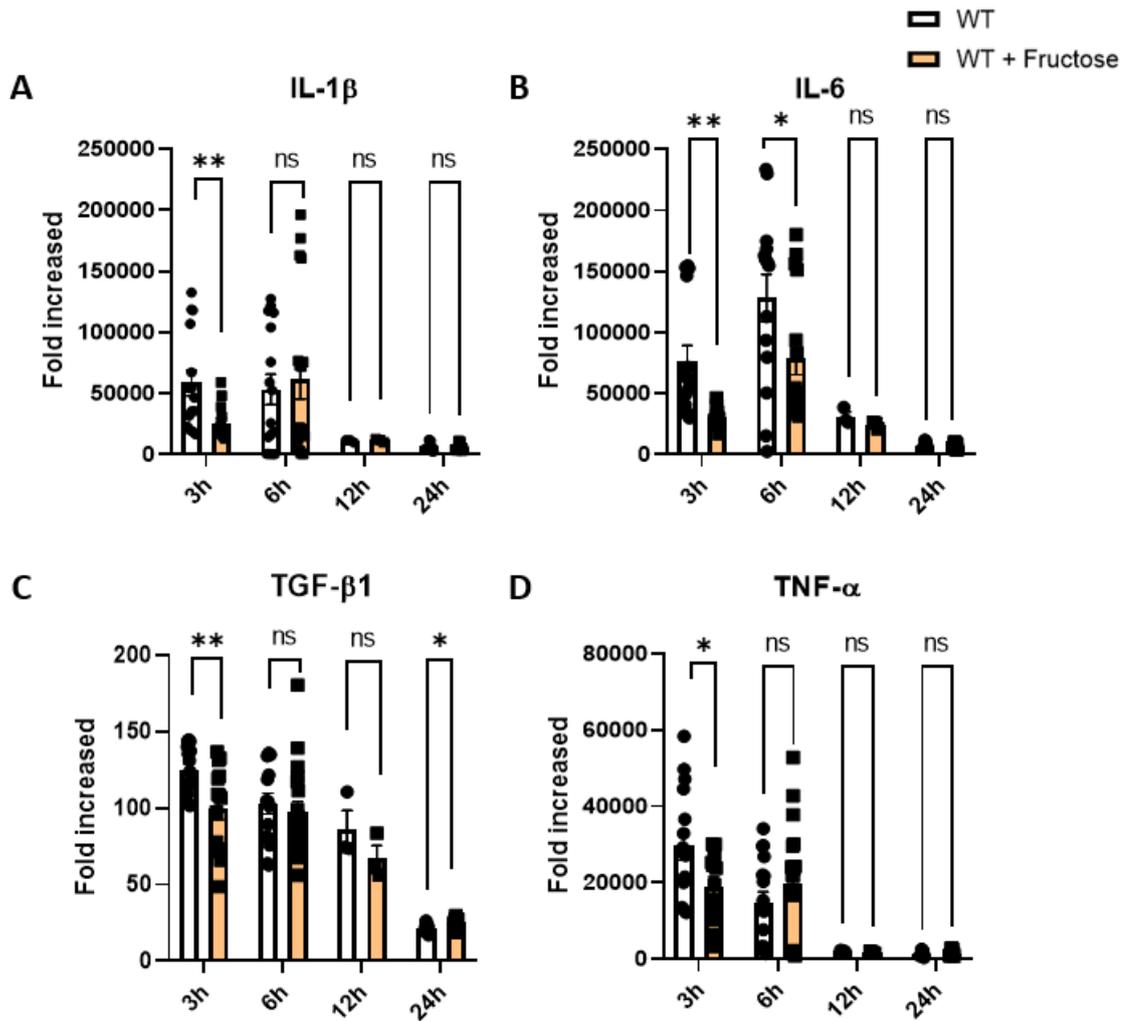


Figure 36 : Etude de la cinétique de la réponse inflammatoire au LPS de microglies WT exposées au fructose.

A-D Expression 3, 6, 12 et 24h post-traitement au LPS (100 ng/ml) des gènes IL-1 β (A), IL-6 (B), TGF- β 1 (C) et TNF- α (D) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 500 μ M de fructose pendant 5 jours. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * p <0,05. (n = 3 à 16 / groupe)

Par ailleurs, nous avons également étudié dans une étude préliminaire l'effet d'un traitement au fructose sur la réponse inflammatoire microgliale induite par le LPS sur des cellules issues de souris déficientes en GLUT5. Etant donné que les effets les plus importants ont été observés après 3h d'exposition au LPS, nous nous sommes concentrés sur ce point de la cinétique inflammatoire. Dans ces conditions, seule une diminution de l'expression du gène IL-1 β est observé dans les cellules déficientes pour GLUT5. L'expression des gènes des cytokines IL-6, TGF- β 1 et TNF- α n'est pas affecté par le fructose 3h post-LPS (Figure 37). Ces résultats suggèrent que les effets du fructose sur la réponse inflammation sont majoritairement médiés par le transporteur GLUT5.

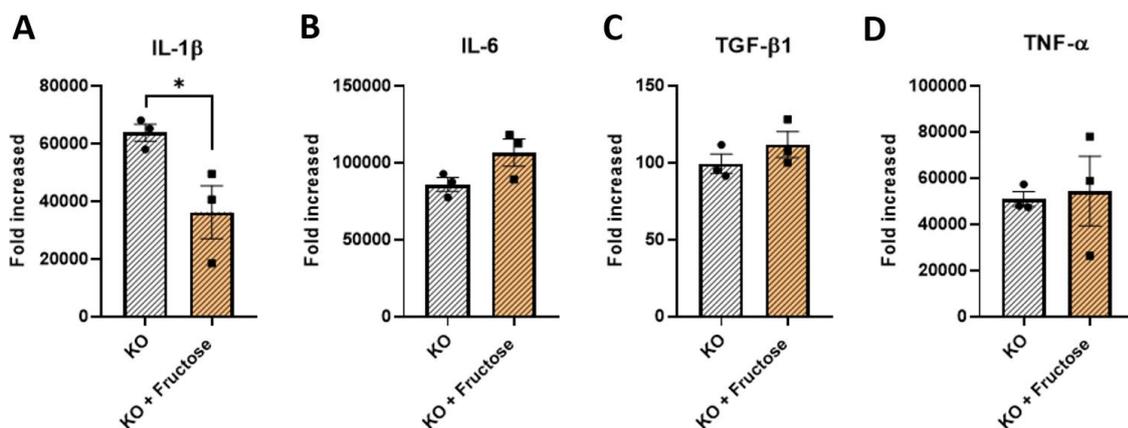


Figure 37 : Etude de la réponse inflammatoire au LPS de microglies GLUT5-KO exposées au fructose.

A-D Expression 3h post-traitement au LPS (100 ng/ml) des gènes IL-1 β (A), IL-6 (B), TGF- β 1 (C) et TNF- α (D) de microglies issues de souris GLUT5-KO mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 500 μ M de fructose pendant 5 jours. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$. (n = 3 / groupe)

En conclusion de cette caractérisation des effets d'une exposition de 5 jours au fructose sur les cellules microgliales, nous avons démontré que i) le fructose ne modifie pas la signature homéostatique des microglies mais ii) perturbe l'expression des cytokines inflammatoires en condition basale, ainsi que l'inflammation induite par le LPS, dont les effets sont majoritairement dépendants de GLUT5.

1.3 Impact de la durée d'exposition et de la concentration en fructose

Nos données montrent que l'incubation de microglies à une concentration de fructose de 500 μ M pendant 5 jours impacte leur physiologie et leur réponse au LPS. Dans cette partie, nous avons voulu déterminer si une incubation de 24h ou l'utilisation de doses inférieures de fructose étaient suffisantes pour induire ces perturbations.

1.3.1 Effets à court terme du fructose

Après une exposition de 24h à 500 μ M de fructose sur des microglies WT, nous observons une diminution de l'expression des gènes GLUT5, TGRBR2 et TGF- β 1 par les cellules exposées au fructose, sans modifications de l'expression du gène P2RY12 (Figure 38 A-C, F). Par ailleurs, le fructose ne modifie pas l'expression basale des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Figure 38 D, E, G). En revanche, cette exposition au fructose diminue l'expression de TGF- β 1 (Figure 38 F). Enfin, le traitement à 500 μ M de fructose pendant 24h n'altère pas l'augmentation de l'expression des gènes des cytokines IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 et TNF- α induite par le LPS (Figure 38 H-K).

Ces expériences nous permettent de conclure qu'un apport de fructose court, pendant 24h, perturbe l'homéostasie microgliale mais que la durée d'exposition n'est pas suffisante pour modifier l'inflammation en condition basale ou induite par le LPS.

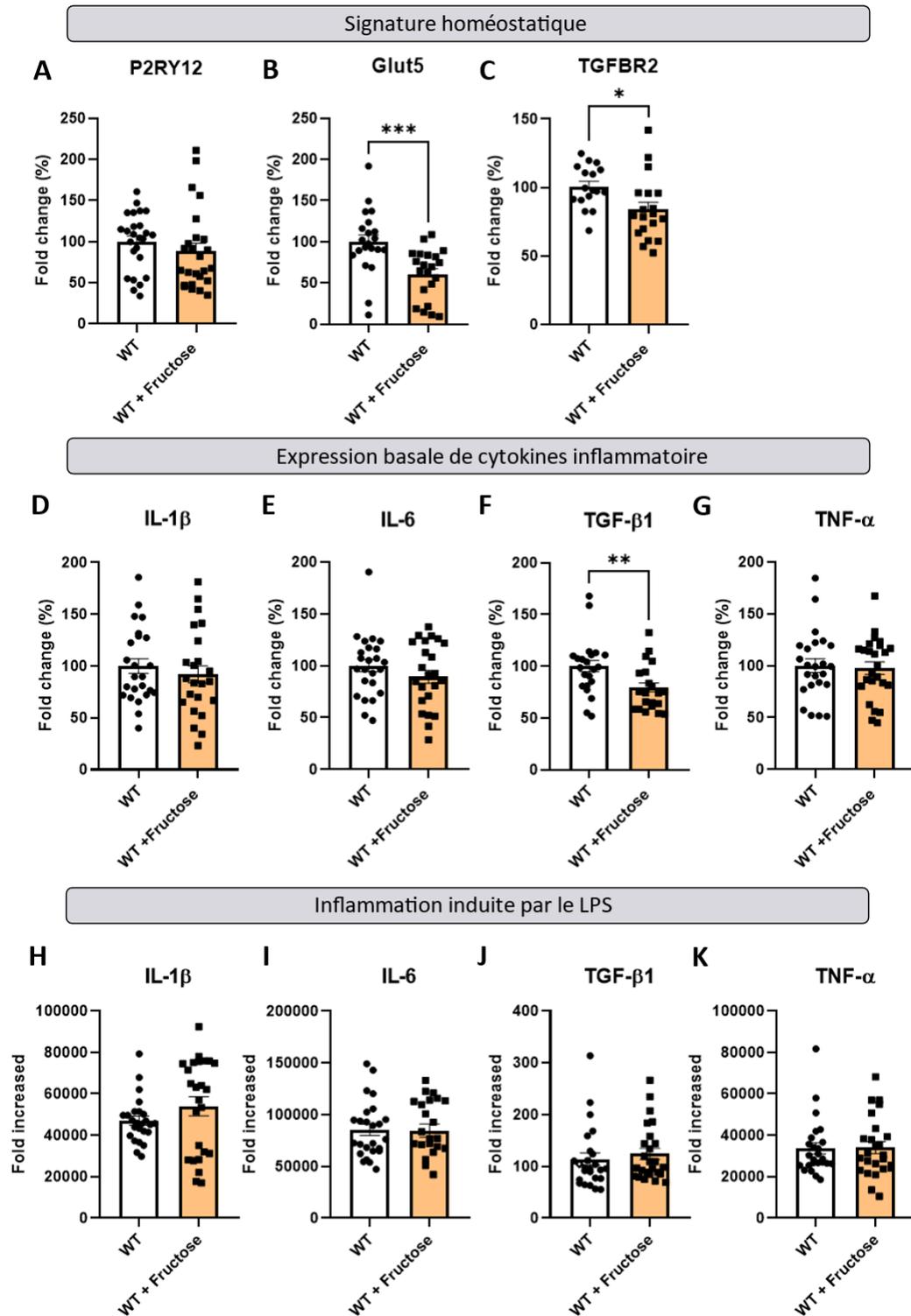


Figure 38 : Etude de la physiopathologie des microglies après une exposition de 24h au fructose.

A-G Expression basale des gènes P2RY12 (**A**), GLUT5 (**B**), TGFBR2 (**C**), IL-1 β (**D**), IL-6 (**E**), TGF- β 1 (**F**) et TNF- α (**G**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC pendant 5 jours et exposées à 500 μ M de fructose pendant 24h. Les valeurs du groupe WT sans fructose ont été fixées à 100 %. **H-K** Expression 3h post-traitement au LPS (100 ng/ml) des gènes IL-1 β (**H**), IL-6 (**I**), TGF- β 1 (**J**) et TNF- α (**K**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC pendant 5 jours et exposées à 500 μ M de fructose pendant 24h. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ **** $p < 0,001$. (n = 17 à 25 / groupe)

1.3.2 Effets-dose du fructose

Nous avons exposé les cellules microgliales issues de souris WT à différentes concentrations de fructose (50 μ M, 250 μ M et 500 μ M) pendant 5 jours, puis nous avons analysé la signature homéostatique de ces cellules et leur réponse au LPS. Nos données avaient montré que l'incubation de 5 jours avec une concentration de fructose de 500 μ M n'altérerait pas l'expression des gènes P2RY12, GLUT5, TGFBR2 et TGF- β 1 (Figure 34). L'incubation avec des concentrations plus faibles de fructose (50 ou 250 μ M) n'impacte pas non plus l'expression de ces gènes (Figure 39 A-C, F). En ce qui concerne l'expression basale de gène de cytokines inflammatoires, aucune des concentrations testées ne modifie l'expression des cytokines TGF- β 1 et TNF- α (Figure 39 F-G). En revanche, l'incubation avec une concentration de fructose de 50 ou 250 μ M augmente l'expression du gène IL-6 (Figure 39 E). Nous avons également révélé une augmentation de l'expression de cette cytokine à 500 μ M, significative en t-test ($p < 0,05$) mais cette augmentation est ici non significative en one-way anova ($p = 0,1645$). Par ailleurs, une exposition à 250 μ M de fructose diminue l'expression basale de la cytokine IL-1 β , sans que les autres concentrations ne modifient son

expression (Figure 39 D). Enfin, nos données montrent que seule la concentration de 500 μ M de fructose affecte l'expression des gènes des cytokines inflammatoires IL-1 β , TGF- β 1 et TNF- α après 3h d'exposition au LPS (Figure 39 H, J, K). En revanche, toutes les concentrations de fructose sont suffisantes pour diminuer l'expression induite par le LPS de l'IL-6 (Figure 39 I).

En somme, nos résultats révèlent que les microglies peuvent détecter et être impactées par des concentrations même très faible de fructose, notamment, l'expression microgliale du gène de l'IL-6 semble particulièrement sensible au fructose. Néanmoins, des doses hautes mais, somme toutes physiologiques, semblent nécessaires pour moduler plus largement la réponse inflammatoire des cellules microgliales.

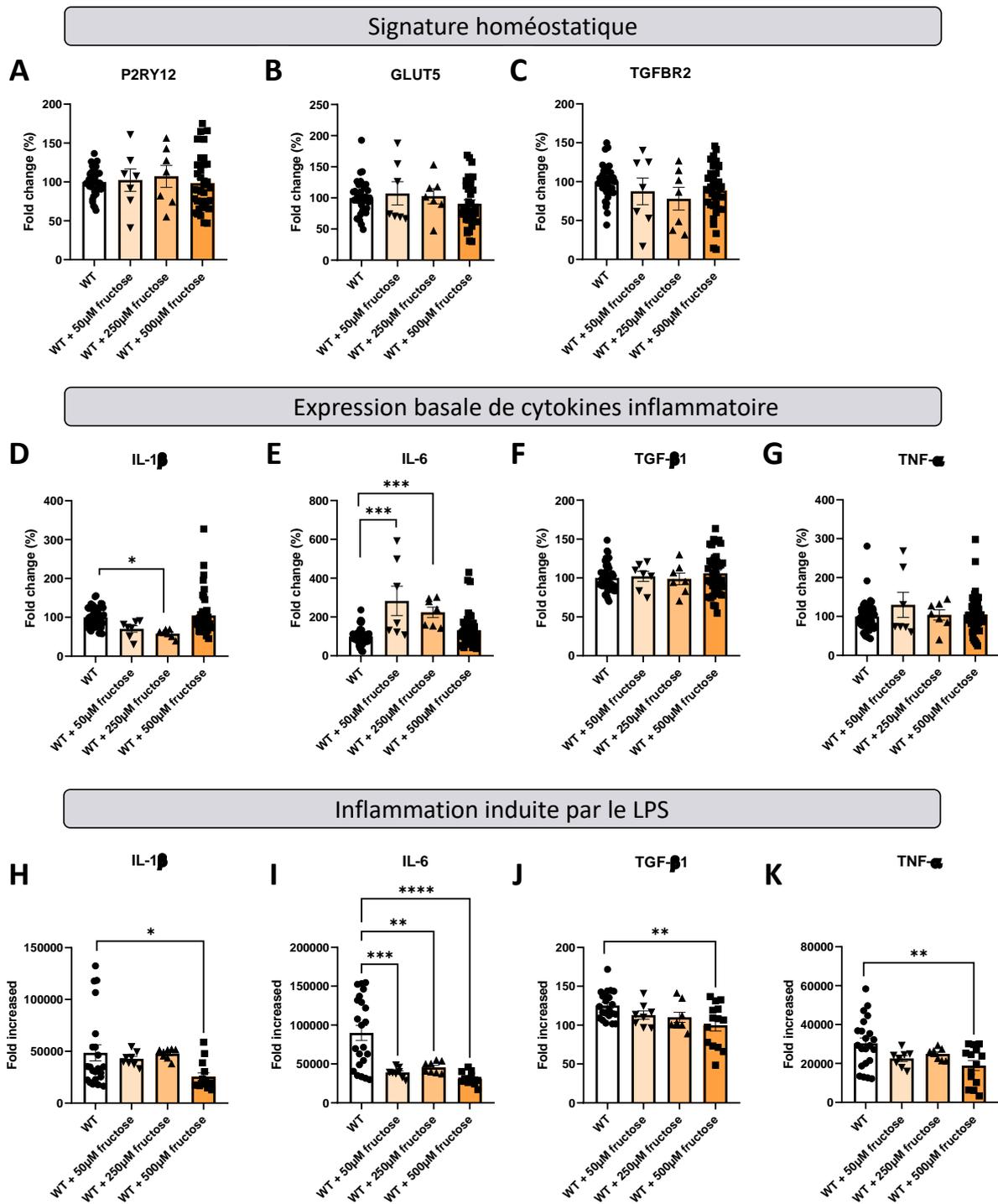


Figure 39 : Etude des effets de la dose du fructose sur la physiopathologie des microglies.

A-G Expression basale des gènes *P2RY12* (**A**), *GLUT5* (**B**), *TGFBR2* (**C**), *IL-1 β* (**D**), *IL-6* (**E**), *TGF- β 1* (**F**) et *TNF- α* (**G**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 50, 250 ou 500 μ M de fructose pendant 5 jours. Les valeurs du groupe WT sans fructose ont été fixées à 100 %. **H-K** Expression 3h post-traitement au LPS (100 ng/ml) des gènes *IL-1 β* (**H**), *IL-6* (**I**), *TGF- β 1* (**J**) et *TNF- α* (**K**) de microglies issues de souris WT mises en culture en milieu SILAC avec ou sans 50, 250 ou 500 μ M de fructose pendant 5 jours. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique One-way Anova : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ **** $p < 0,001$. ($n = 8$ à 22 / groupe).

1.5 Discussion des résultats

Dans cet axe de la thèse, nous nous sommes intéressés aux effets directs du fructose sur les cellules microgliales. Pour réaliser cette étude, nous avons validé un modèle de culture primaire de microglies adultes, exprimant une signature homéostatique, appelées M0, en condition physiologique de glucose. Cette signature correspond à l'expression de plusieurs gènes homéostatiques exprimés dans la microglie adulte (Butovsky et al., 2014 ; Butovsky & Weiner, 2018). Le but de cette mise au point est de garantir que les réponses cellulaires observées dans notre étude reflètent au mieux les interactions entre le fructose et les microglies, dans des conditions glucidiques aussi proches de la réalité biologique que possible. Les résultats issus de ce modèle offriront également une perspective physiologique pour compléter les recherches *in vitro* réalisées sur les effets du fructose (Cigliano et al., 2017 ; Mizuno et al., 2021 ; Wang et al., 2023 ; Xu et al., 2016). Cependant, il est important de noter que l'utilisation d'une monoculture ne rend pas compte de la complexité réelle du cerveau.

Pour mieux refléter cette complexité, il serait pertinent d'envisager des cocultures, notamment en incluant des astrocytes, qui sont également capables de déclencher des réponses inflammatoires, par exemple (Renaud et al., 2015). En parallèle, nous travaillons également sur le développement de cultures de microglies issues de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) afin de confirmer nos résultats sur des cellules humaines, ce qui permettrait une meilleure extrapolation de nos résultats à l'Homme.

Grâce à ce modèle, nous avons en particulier exploré l'effet du fructose sur la réponse inflammatoire des microglies. Nos données révèlent qu'une exposition prolongée au fructose conduit à une augmentation en condition basale de l'expression de l'IL-6, témoignant d'une activation inflammatoire stimulée par ce sucre. Bien que notre observation soit cohérente avec l'étude de Xu et al. (2016), nous remarquons une inflammation moins prononcée dans notre modèle, sans modification de l'expression de l'IL-1 β et du TNF- α . Cette disparité pourrait être attribuée à l'utilisation de quantités moindres de fructose, suggérant un effet exagéré lors de l'utilisation de fortes doses de fructose. Toutefois, il est important de noter que cette comparaison doit être interprétée avec prudence car le modèle cellulaire (BV-2) et le milieu de culture (DMEM) diffèrent. De plus, la concentration de glucose utilisée n'est pas précisée. Par ailleurs, plusieurs études précliniques chez le rat et la souris ont également révélé une augmentation de l'expression en condition basale de la cytokine IL-6 dans le cerveau d'animaux sous régime fructose (Djordjevic et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2016). Or, l'IL-6 est associée à la neuroinflammation de la sclérose en plaques (SEP), ainsi qu'à d'autres troubles neurologiques tels que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, et l'accident vasculaire cérébral ischémique, où une expression élevée et une sécrétion accrue d'IL-6 ont été rapportés (Kummer et al., 2021). D'autres part, des preuves provenant d'études animales et cliniques ont montré que l'élévation des niveaux de l'IL-6, en périphérie ou au niveau central, joue un rôle important dans la réaction au stress ainsi que dans le développement du trouble dépressif (Roohi et al., 2021 ; Ting et al., 2020). Ainsi, en

modifiant l'expression basale de cette cytokine, le fructose pourrait avoir des répercussions négatives sur la santé neurologique. Néanmoins, comme il sera montré dans la Partie 2 de cette thèse, nous ne retrouvons pas d'augmentation de l'expression basale de l'IL-6 par les microglies d'animaux nourris avec du fructose. Ce point sera discuté dans la Partie 2 (page 143).

Lorsque nous exposons des cellules sous fructose à un traitement au LPS, nous observons un retard dans l'induction de l'inflammation avec une moindre expression des cytokines inflammatoires à 3h post-traitement. Cette observation est importante car elle révèle un rôle direct du fructose sur la régulation de la réponse inflammatoire cérébrale. Elle est également novatrice car à ce jour, aucune étude *in vitro* n'a examiné les effets du fructose sur la réponse inflammatoire induite par le LPS des microglies. Par ailleurs, notre étude révèle une augmentation de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire TGF- β 1 par les cellules exposées au fructose, 24 heures après l'induction de l'inflammation par le LPS. Cette observation témoigne d'une dérégulation des systèmes de résolution de l'inflammation en réponse à une exposition chronique au fructose. Cependant, un état microglial moins réactif peut s'avérer moins efficace pour répondre aux dommages ou aux signaux pathologiques lors du vieillissement ou dans des maladies. Par exemple, un système inflammatoire efficace s'est révélé être crucial dans l'élimination des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (Chakrabarty et al., 2010 ; Cherry et al., 2015 ; Kummer et al., 2021). En outre, il a été rapporté que l'activation précoce des microglies suite à un traumatisme crânien contribue à la restauration de l'homéostasie dans le cerveau (Donat et al., 2017). D'autre part, les cellules microgliales sont les premières à être activées pour éliminer les débris cellulaires par phagocytose et contribuer à la résolution de l'inflammation lors d'un accident vasculaire cérébral ischémique (Wolf et al., 2017). Enfin, les microglies des souris adultes présentant un knockout de la protéine TREM2 ont été décrites comme étant "bloquées dans un état homéostatique", car elles sont moins réactives aux stimulations, tels que l'amyloïde, et n'adoptent pas de signature DAM transcriptionnelle dans des contextes de maladie, ce qui est

délétère pour la physiologie cérébrale (Carbajosa et al., 2018 ; Mazaheri et al., 2017 ; McQuade et al., 2020 ; Paolicelli et al., 2022). En somme, la perturbation de l'inflammation induite par le fructose pourrait avoir des implications importantes dans la pathogenèse des maladies neurologiques associées à une inflammation. Cette perturbation est d'autant plus pernicieuse que ses effets se manifestent lorsque le cerveau est confronté à des stress et est donc vulnérable, ce qui accroît le risque d'une réponse inadaptée pouvant conduire à des troubles neurologiques à long terme.

De manière intéressante, cette perturbation de l'état inflammatoire par le fructose est globalement absente chez les cellules microgliales déficientes en GLUT5. En effet, les microglies GLUT5-KO ne présentent pas d'altération de l'inflammation en condition basale suite à une exposition au fructose. Elles ne présentent pas non plus de modifications dans l'expression des cytokines IL-6, TGF- β 1 et TNF- α induites par le fructose après 3 heures de stimulation par le LPS. Ces résultats indiquent que GLUT5 est nécessaire pour perturber la réponse inflammatoire microgliale et pour médier les effets du fructose. Ces résultats sont en accord avec ceux de Wang et al., qui ont montré que les effets du fructose, notamment sur la phagocytose, étaient médiés par GLUT5 (Wang et al., 2023). Cependant, nos expériences ont également démontré une diminution de l'expression de la cytokine IL-1 β en présence de fructose après stimulation par le LPS, indépendamment de la présence ou de l'absence de GLUT5. Cette observation suggère que certains effets du fructose sur la réponse inflammatoire pourraient être médiés par des mécanismes indépendants de GLUT5, impliquant probablement des transporteurs non spécifiques du fructose. Par exemple, dans le cerveau, à la fois GLUT2 et GLUT8 sont exprimés (Thorens & Mueckler, 2013). Bien que GLUT2 soit relativement peu présent dans le cerveau, il est présent à la surface des cellules microgliales (Bennett et al., 2016). D'autre part, GLUT8 est plus abondant dans les cellules microgliales par rapport aux autres cellules cérébrales, bien que son niveau d'expression soit 85% inférieur à celui de GLUT5 (Bennett et al., 2016). Par conséquent, nous pouvons envisager une entrée de fructose dans les cellules via l'un ou l'autre de ces transporteurs, voire

les deux. Cependant, en raison de son expression plus élevée dans les microglies et de sa forte affinité pour le fructose ($K_m = 2,4 \text{ mM}$) (Manolescu et al., 2007), il est raisonnable de supposer que le fructose pourrait pénétrer dans les microglies préférentiellement via le transporteur GLUT8, surtout en l'absence de compétition par GLUT5.

D'autre part, nos résultats mettent en évidence les effets dose-dépendants du fructose sur l'inflammation des microglies, en utilisant des concentrations physiologiques de fructose. Pour rappel, dans le LCR, les concentrations de fructose varient de $100\mu\text{M}$ à $500\mu\text{M}$ (Hwang et al., 2015 ; Hwang et al., 2017). Bien qu'une dose de $500 \mu\text{M}$ de fructose n'ait pas d'impact sur l'expression basale des cytokines TGF- β 1 et TNF- α , de faibles concentrations de fructose sont capables de perturber l'expression basale de cytokines inflammatoire, caractérisée par une augmentation de l'expression de l'IL-6 dès $50 \mu\text{M}$ de fructose. Ce résultat révèle que de très faibles doses de fructose sont suffisantes pour perturber l'inflammation des microglies, ce qui justifie l'utilisation de concentrations physiologiques de fructose et remet en question les observations obtenues avec des concentrations trop élevées de fructose (Cigliano et al., 2017 ; Mizuno et al., 2021 ; Wang et al., 2023 ; Xu et al., 2016). De la même façon, il est intéressant de noter qu'une exposition à $250\mu\text{M}$ de fructose conduit à une diminution de l'expression de l'IL-1 β , tandis que les autres concentrations, notamment $500 \mu\text{M}$, ne montrent pas d'effets significatifs. Cela suggère que des doses trop importantes de fructose peuvent masquer certaines adaptations microgliales fines dans leur réponse à ce sucre. Ce résultat remet d'autant plus en question la validité des résultats de la littérature, sachant que les doses utilisées sont de 5 à 20 fois supérieures à la dose de $500 \mu\text{M}$ que nous avons utilisée (Cigliano et al., 2017 ; Mizuno et al., 2021 ; Wang et al., 2023 ; Xu et al., 2016). Enfin, nos résultats suggèrent que l'impact du fructose sur la réponse inflammatoire des microglies induite par le LPS est fortement dépendant de la dose d'exposition. Nous constatons qu'une exposition pendant 5 jours à une dose de $50 \mu\text{M}$ de fructose est suffisante pour induire des altérations dans la réponse inflammatoire microgliale, caractérisée par une diminution de l'expression de la cytokine IL-6. Cependant, pour moduler plus largement cette réponse inflammatoire, une

dose plus élevée à 500 μ M de fructose est nécessaire. Cette observation suggère une relation dose-dépendante dans les effets du fructose sur la modulation de la réponse inflammatoire des microglies, avec des effets plus prononcés à des doses plus élevées. Ces résultats rejoignent les données précliniques de la littérature qui soulignent l'importance de la dose de fructose consommée dans les troubles de l'humeur et de la cognition (Cisternas et al., 2015 ; De Souza et al., 2021 ; dos Santos et al., 2020).

Nos résultats mettent également en lumière l'importance de la durée d'exposition au fructose pour induire des modifications de la réponse inflammatoire microgliale. En effet, une exposition prolongée au fructose est nécessaire pour induire des perturbations de l'inflammation des microglies. Ce résultat est en lien avec les données précliniques de la littérature qui mettent en évidence l'importance de la consommation chronique de fructose dans les troubles de l'humeur et de la cognition (Sangüesa et al., 2018 ; Wu et al., 2015). Cela suggère potentiellement que les troubles à long terme associés au fructose pourraient être liés à une inflammation dérégulée induite par ce sucre. Nous développerons cette question dans la partie 2 des résultats de cette thèse.

Nous avons étudié la réponse inflammatoire des microglies issues de deux milieux de culture différents : les milieux F12 et SILAC. Nous avons noté une expression plus importante de la cytokine TNF- α en milieu SILAC, suggérant une sensibilité accrue de ces microglies dans leur réponse inflammatoire. Il est important de souligner que la principale différence entre ces deux milieux réside dans leur concentration de glucose. En effet, dans le milieu SILAC, nous avons adapté la concentration de glucose à 2,5 mM, tandis que le milieu F12 est à 17,5 mM de glucose. Or en condition hyperglycémique, il a été montré que le cerveau humain est capable de produire du fructose à partir du glucose (Hwang et al., 2017). Cette conversion est possible grâce à la voie des polyols et consiste en une conversion du glucose en fructose, en passant par le sorbitol comme intermédiaire (Figure 11, page 30). L'enzyme limitante de cette réaction, l'aldose réductase, est préférentiellement exprimée par les microglies dans le

cerveau chez l'homme et la souris (Zhang et al., 2014 ; Zhang et al., 2016). De plus, il a été montré que cette voie des polyols était active dans les cellules microgliales (Huang et al., 2022). Il est donc raisonnable de penser qu'en condition à haute concentration de glucose, les cellules microgliales peuvent produire du fructose. Ce fructose pourrait ainsi diminuer la réponse inflammatoire microgliale, comme nous l'avons observé lors d'une exposition au fructose. Des études complémentaires de séquençage transcriptomique ou de blocage pharmacologique de la voie des polyols, permettraient de mieux caractériser la réponse inflammatoire des microglies à différentes concentrations de glucose. Par ailleurs, il n'existe pas à ce jour de données de la littérature étudiant la physiologie des microglies adultes mises en culture dans 2,5 mM de glucose.

Pour terminer, nous avons également étudié l'impact de la délétion du transporteur GLUT5 sur l'inflammation des microglies. Nos résultats suggèrent que cette délétion conduit à une perturbation de leur statut inflammatoire. En effet, nous observons une diminution de l'expression de l'IL-1 β dans les microglies GLUT5-KO en condition basale. De plus, après une exposition au LPS, nous notons une augmentation significative de l'expression de l'IL-1 β , ainsi qu'une tendance à l'augmentation de l'IL-6 et du TNF- α . Cette réponse inflammatoire exacerbée chez les microglies GLUT5-KO pourrait refléter une sensibilité accrue aux stimuli inflammatoires en l'absence de GLUT5. Étant identifié comme un gène homéostatique (Butovsky et al., 2014), il n'est pas surprenant que GLUT5 puisse influencer la physiologie des microglies. En effet, dans la cellule, GLUT5 permet le transport passif du fructose selon le gradient de concentration. Lors d'une exposition au fructose, GLUT5 permet donc son entrée dans la cellule. En revanche, sans exposition au fructose, GLUT5 pourrait permettre au fructose endogène de sortir de la cellule. En effet, l'aldose réductase est fortement exprimée par les microglies (Zhang et al., 2014 ; Zhang et al., 2016), il est donc possible qu'une production constitutive de fructose ait lieu dans les microglies. Or, les microglies GLUT-KO sont incapables d'évacuer le fructose endogène, ce qui pourrait impacter la réponse inflammatoire de ces cellules. Pour aller plus loin, des analyses complémentaires de

séquençage des ARNs totaux de cellules microgliales issues de souris adultes WT et GLUT5-KO, isolées et triées au cytomètre en flux, sont en cours. Elles permettront de complètement caractériser ce modèle microglial GLUT5-KO et d'étudier ainsi l'influence de GLUT5 dans l'homéostasie et l'inflammation des microglies.

Pour résumé, nos données révèlent que le fructose perturbe directement la physiologie des microglies en impactant leur inflammation. Toutefois, nous ignorons les mécanismes biologiques impliqués. En tant que substrat métabolique, le fructose peut influencer le métabolisme des microglies. Or, de récentes avancées en immunométabolisme soulignent l'importance critique de la reprogrammation des voies métaboliques dans l'activation des cellules immunitaires et de leurs fonctions (Ting, 2024 ; Wang et al., 2022). Un statut pro-inflammatoire est associé préférentiellement à la glycolyse, tandis qu'un statut anti-inflammatoire est davantage associé à la phosphorylation oxydative des lipides (Orihuela et al., 2016). Le devenir métabolique du fructose dans les cellules microgliales est encore inconnu. Des études supplémentaires utilisant du fructose marqué au carbone 13 sont en cours. Elles permettront de révéler le devenir métabolique du fructose et d'apporter des éléments de réponse quant à l'immunométabolisme induit par ce sucre. Néanmoins, quel qu'il soit, le fructose est premièrement métabolisé en fructose-1-phosphate par la KHK. Cette métabolisation est consommatrice d'ATP et active par conséquent l'AMPK (Cha et al., 2008). Il a d'ailleurs été montré que le fructose pouvait stimuler l'activation de cette enzyme dans l'hypothalamus de souris (Cha et al., 2008). Or, plusieurs études ont montré que l'AMPK pouvait également être impliquée dans la régulation des réponses inflammatoires, en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire induite par le LPS et en atténuant l'activation du NF- κ B dans les cellules immunitaires (Galic et al., 2011 ; Giri et al., 2004 ; Saito et al., 2019 ; Zhao et al., 2008). Ainsi, il est possible que les effets observés du fructose sur l'inflammation soient attribuables à son métabolisme spécifique et à l'activation de l'AMPK. Des études de

séquençage permettraient d'étudier l'implication de cette voie dans les effets du fructose sur l'inflammation des microglies.

1.6 Conclusion

Nos données révèlent que le fructose module directement la physiologie des microglies et retarde leur réponse inflammatoire. Néanmoins, il est important de poursuivre les recherches et d'aller plus loin en utilisant des modèles de culture plus intégratifs, ou grâce à des modèles *in vivo*, afin d'étudier l'implication des perturbations microgliales induites par le fructose dans le contexte de l'homéostasie cérébrale. En effet, les différentes cellules du SNC peuvent exercer une influence modulatrice sur l'inflammation des microglies. Ainsi les résultats obtenus, bien qu'ils fournissent de précieuses informations quant aux effets directs du fructose sur les microglies, doivent être reproduits à plus grande échelle, et notamment à l'échelle de l'organisme. Ces résultats permettront de corrélérer l'inflammation dépendante des microglies aux troubles de la santé cérébrale. Ainsi, nous avons traité de la question des effets d'une consommation de fructose *in vivo* sur la microglie et la santé cérébrale dans la deuxième partie de nos résultats.

Partie 2 : Etude des effets d'une consommation de fructose sur la microglie et ses conséquences sur la santé cérébrale

Dans ce second axe du projet, j'ai réalisé l'ensemble des expérimentations in vivo et des analyses biomoléculaires. L'étude de distribution cérébrale du ¹⁴C-fructose et de ¹⁴C-glucose (Figure 40) a été effectuée par le Dr Richard Bazinet de l'Université de Toronto.

2.1 Distribution cérébrale du fructose périphérique

Nous avons exploré la capacité du fructose périphérique à pénétrer dans le cerveau. Pour ce faire, des rats ont reçu une injection 450µl d'une solution de fructose ou de glucose marqué au carbone 14 à une concentration de 300 mCi/mmol dans la veine jugulaire pendant 5 minutes. Ensuite, afin d'éliminer le marquage sanguin et de stopper des réactions enzymatiques, ces animaux ont été perfusés au PBS froid pendant 10 minutes. Enfin, différentes régions cérébrales telles que l'hypothalamus, l'hippocampe, le cervelet, le cortex frontal, le striatum dorsal, le noyau accumbens, le thalamus, l'amygdale, le cortex et le reste du cerveau, ont été récupérées et analysées (Figure 40 A). La radioactivité du 14C a été mesurée par comptage de scintillation liquide.

Le glucose marqué pénètre dans le tissu cérébral et se distribue dans toutes les régions du cerveau, avec une captation préférentielle du glucose dans le cortex frontal (Figure 40 B). Ce résultat confirme expérimentalement la validité du protocole. Le marquage du fructose se retrouve également dans le tissu cérébral et se distribue de façon relativement homogène dans toutes les régions cérébrales (Figure 40 C). Ces résultats de marquage au carbone 14 révèlent pour la première fois que le fructose périphérique peut pénétrer et se distribuer à l'ensemble du cerveau.

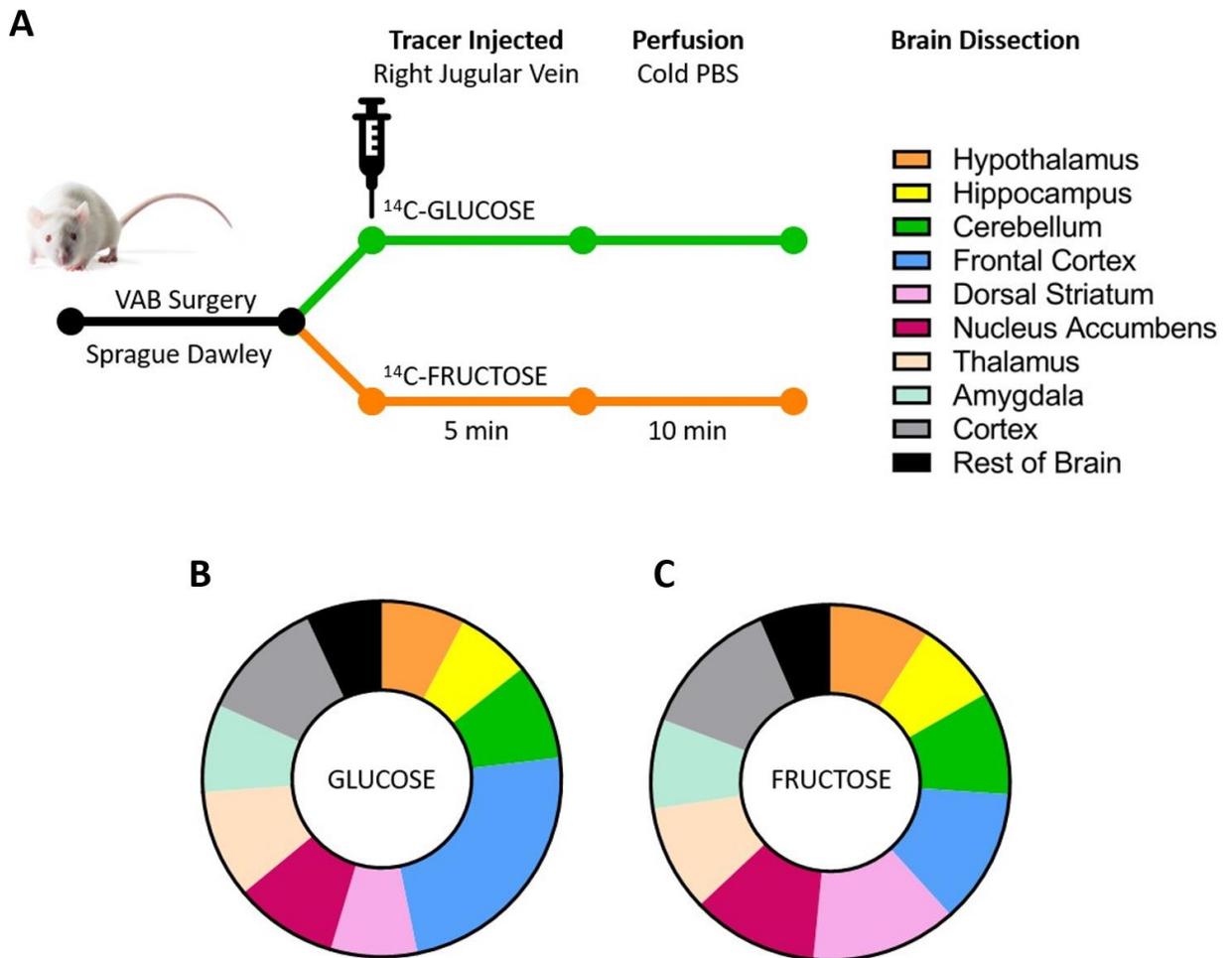


Figure 40 : Distribution cérébrale de ^{14}C -glucose et ^{14}C -fructose.

A Protocole d'injection des marqueurs au carbone 14. **B-C** Dosage intracérébral de ^{14}C -glucose (**A**) et de ^{14}C -fructose (**B**) après perfusion des rats Sprague Dawley pendant 5 min. ($n = 2$ / groupe)

2.2 Impact d'une consommation de fructose sur la santé cérébrale et le métabolisme

2.2.1 Sur le métabolisme

Afin d'étudier les effets d'une consommation à long terme d'un régime enrichi en fructose, nous avons mis au point au laboratoire un protocole adapté de la littérature (De Souza et al., 2021). Pour ce faire des souris C57BL6/J WT âgées de 12 semaines ont été divisées en deux groupes : un premier groupe placé sous 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 8 semaines et un second groupe contrôle avec un biberon d'eau. Plusieurs paramètres, dont des paramètres métaboliques ont été étudiés. Premièrement, nous observons une prise de poids significative entre les animaux nourris avec du fructose et les animaux nourris avec de l'eau à partir de la 8ème semaine de régime (Figure 41 A). Nos données révèlent une augmentation de la masse grasse (Figure 41 B) et une diminution de la masse maigre (Figure 41 C) de ces animaux, en comparaison avec les animaux sous eau. Nous notons également une hyperglycémie à jeun des animaux sous fructose (Figure 41 E). De plus, lors d'une injection IP d'une solution de glucose (20%), nous observons une augmentation de la glycémie plus importante pour les souris sous fructose que les souris contrôles (Figure 41 D, F), témoignant d'une intolérance au glucose. Également, lors d'une injection IP d'une solution d'insuline (1 UI), nous remarquons que la glycémie des souris nourries au fructose diminue significativement moins que les souris nourries à l'eau (Figure 41 G-H), révélant une résistance à l'insuline. Par conséquent, ces résultats confirment qu'une consommation chronique de fructose conduit à l'établissement de troubles métaboliques, dont un diabète de type 2.

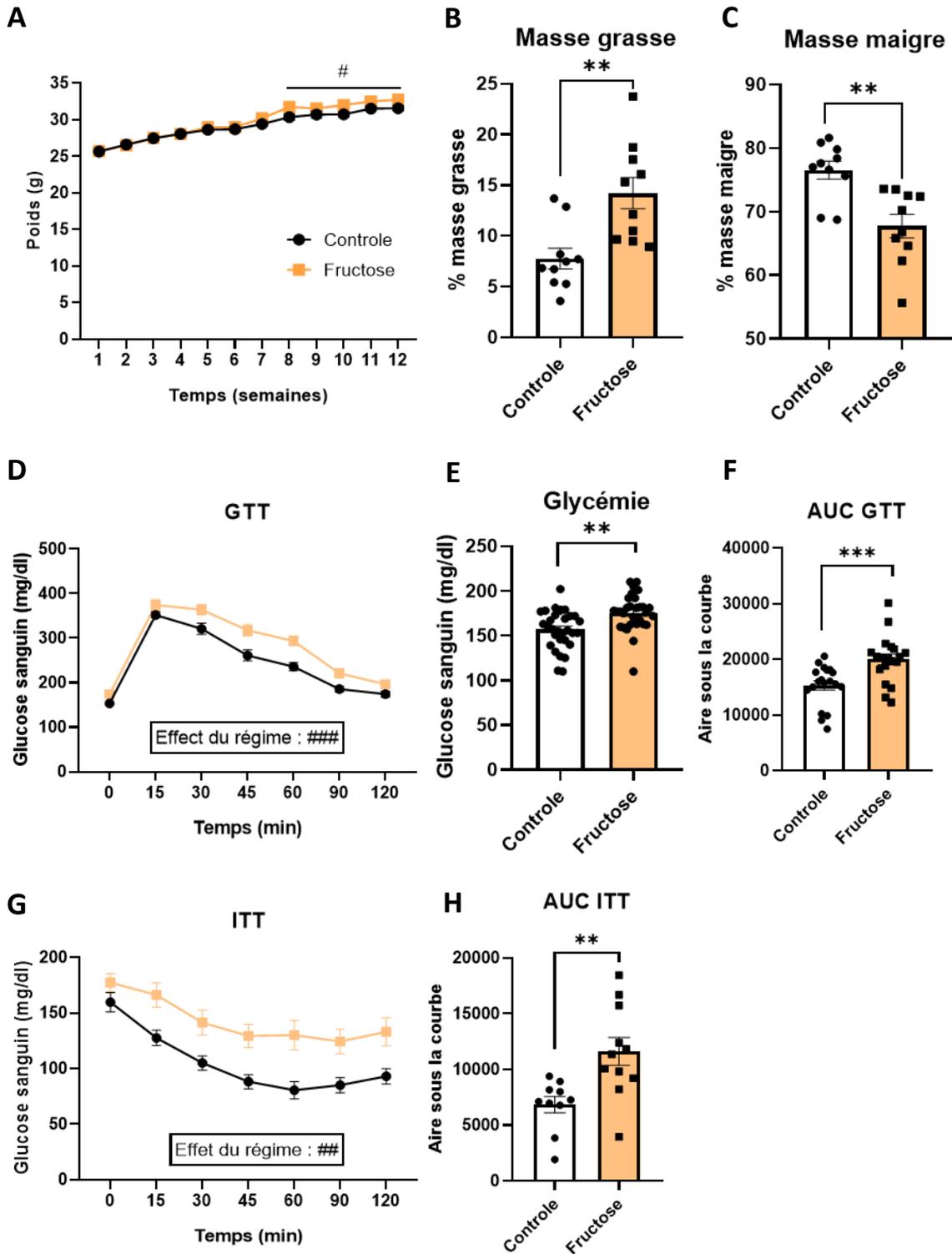


Figure 41 : La consommation d'un régime enrichi en fructose induit des troubles métaboliques.

A Suivi de la courbe de poids des animaux sous régime fructose et contrôle. **B-H** Tests métaboliques réalisés chez des animaux nourris avec un régime standard ou à 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 10 semaines. **B** Pourcentage de masse grasse. **C** Pourcentage de masse maigre. **D** Courbe de la glycémie après une injection IP d'une solution de glucose (20%). **E** Glycémie à jeun. **F** Aire sous la courbe des courbes de glycémie après injection IP de glucose. **G** Courbe de la glycémie après une injection IP d'une solution d'insuline (1 UI). **H** Aire sous la courbe des courbes de glycémie après injection IP d'insuline. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$. Two-way ANOVA : # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,005$. (n = 11 à 27 / groupe)

2.2.2 Sur la santé cérébrale

Nous avons étudié plusieurs paramètres pour évaluer la santé cérébrale des animaux. Tout d'abord, nous avons validé que les animaux sous fructose ne présentent pas d'altérations de la locomotion grâce au test du champ ouvert (OF) (Figure 42 A-B). Ensuite, les tests du labyrinthe en croix surélevé (EPM) et de l'alimentation supprimée par néophobie (NSF) nous permettent de révéler des comportements de types anxieux des souris sous fructose. En effet, les souris nourries au fructose présentent un temps réduit de l'exploration des bras ouverts (Figure 42 C), ainsi qu'une augmentation du temps de survie pour manger la croquette (Figure 42 E) en comparaison aux souris contrôles. En outre, les souris sous fructose montrent des comportements pseudo-dépressifs dans le test de la nage forcée (FST) avec une augmentation du temps d'immobilité, 24h après une injection de LPS (Figure 42 D) ; ainsi que dans le test d'éclaboussure (Splash Test), avec une diminution de la fréquence de toilettage (Figure 42 F). Enfin, dans le test de mémorisation de localisation d'objet (OLM), les souris sous fructose présentent une diminution de l'indice de reconnaissance de l'objet déplacé, comparé aux souris sous eau (Figure 42 G). Dans le test de la piscine de Morris (MWM), toutes les souris présentent des capacités d'apprentissage similaires, avec une diminution de la latence pour atteindre la plateforme (Figure 42 H). Néanmoins, lors de la phase de mémoire du MWM, les souris nourries au fructose présentent un déficit dans la reconnaissance du cadran cible, tandis que les souris nourries avec de l'eau ne présentent pas de déficit (Figure 42 I).

Par conséquent, ces résultats révèlent qu'un régime à long terme enrichi en fructose induit des comportements de types anxiodépressifs, ainsi que des troubles de la mémoire, sans altérations de la locomotion ou de l'apprentissage.

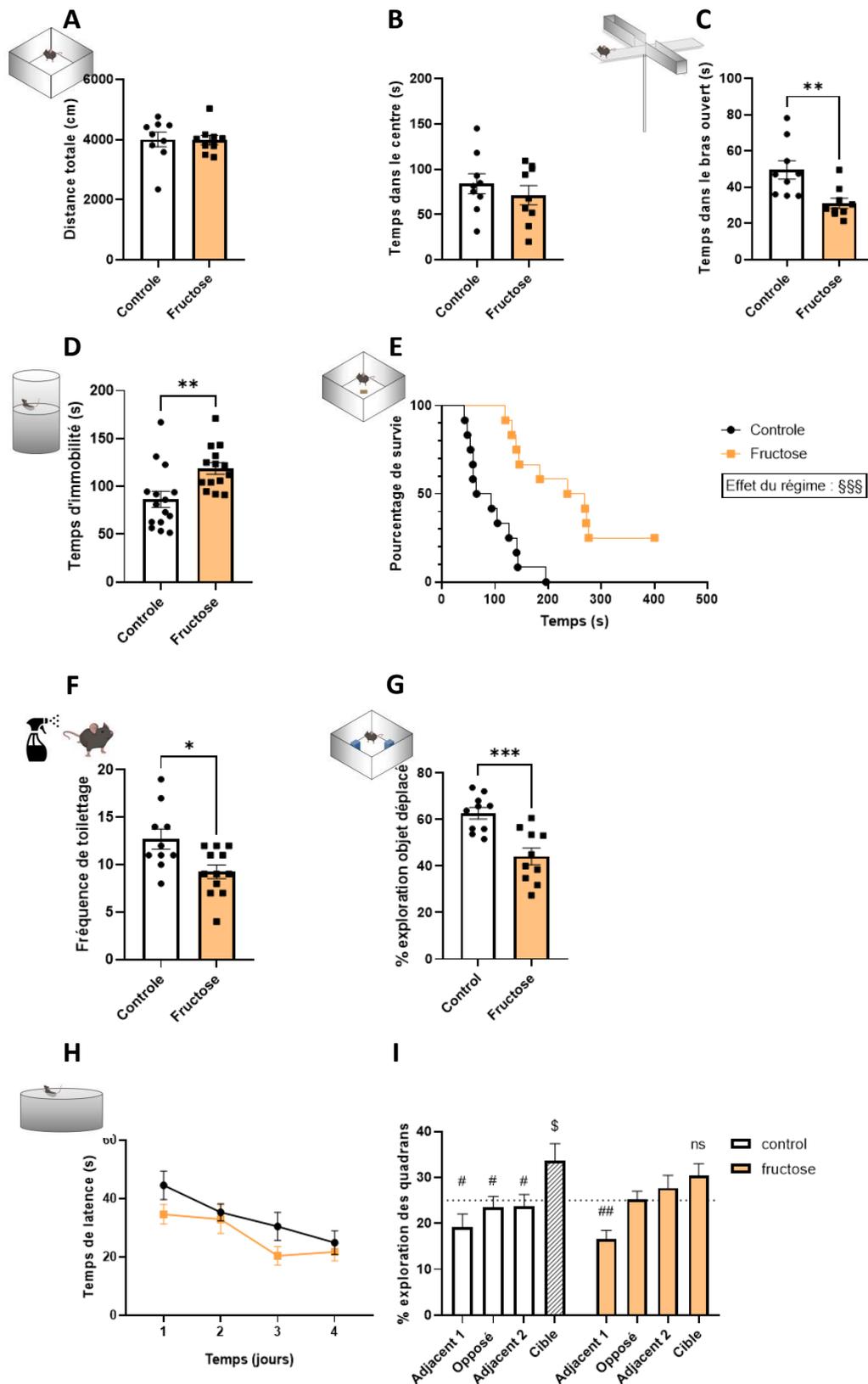


Figure 42 : La consommation d'un régime enrichi en fructose induit des comportements de types anxiodépressifs et des troubles de la mémoire.

Tests comportementaux réalisés chez des animaux nourris avec un régime standard ou à 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 8 semaines. **A** Mesure de la distance totale parcourue dans l'OF. **B** Mesure du temps passé dans le centre de l'OF. **C** Mesure du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM. **D** Mesure du temps d'immobilité dans le test du FST, 24h post injection de LPS. **E** Mesure du temps de survie pour manger la croquette. **F** Mesure de la fréquence de toilettage dans le test du Splash Test. **G** Mesure du pourcentage d'exploration en temps de l'objet nouveau dans le test de l'OLM. **H** Mesure du temps de latence pour rejoindre la plateforme lors de la phase d'apprentissage du MWM. **I** Mesure du pourcentage d'exploration en temps des cadrans lors de la phase de test de la mémoire du MWM. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ entre le régime contrôle et le régime fructose. Log-rank test : § $p < 0,05$ §§ $p < 0,01$ §§§ $p < 0,005$. Two-way ANOVA : # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ entre les cadrans du MWM et le cadran cible. One sample t test : \$ $p < 0,05$ entre le cadran cible et le facteur de change 25%. ($n = 9$ à 12 / groupe)

2.3 Impact d'une consommation de fructose sur la microglie

Par la suite, nous avons étudié la physiopathologie des microglies en RT-qPCR, sur des microglies isolées des hippocampes (HPC) des animaux sous régime fructose et contrôle. Nous avons choisi d'étudier en particulier l'HPC des souris car cette aire cérébrale est particulièrement impliquée dans la mémoire et les comportements émotionnels (Anacker & Hen, 2017 ; Eisch & Petrik, 2012 ; Toda et al., 2019). L'HPC est également une région très étudiée, ce qui nous permet de situer nos travaux dans la littérature actuelle (Cigliano et al., 2017 ; Djordjevic et al., 2015 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2016 ; Yin et al., 2014). Premièrement, nous n'observons aucun impact du régime fructose sur la signature homéostatique des gènes P2RY12, GLUT5, TGFBR2 et TMEM119 (Figure 43 A-D). Également, nous n'observons pas de différences significatives dans l'expression basale des gènes de l'IL-1 β , l'IL-6, le TGF- β 1 et le TNF- α entre les deux régimes (Figure 43 E-H). Enfin, nous avons étudié la réponse inflammatoire des microglies, 3h après une injection IP de LPS (250 μ g/kg). Tout d'abord, nous observons une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α par les microglies issues de souris nourries au fructose, en comparaison aux microglies issues de souris contrôles (Figure 43 I, L). En revanche, nous n'observons pas de modification significative dans l'expression des cytokines IL-6 et TGF- β 1 (Figure 43 J-K). Ensemble, ces résultats mettent en lumière qu'un régime chronique enrichi en fructose perturbe la réponse inflammatoire des microglies, sans altérations de l'inflammation en condition basale. De plus, les microglies ne semblent pas présenter de modifications dans l'expression des gènes de la signature homéostatique.

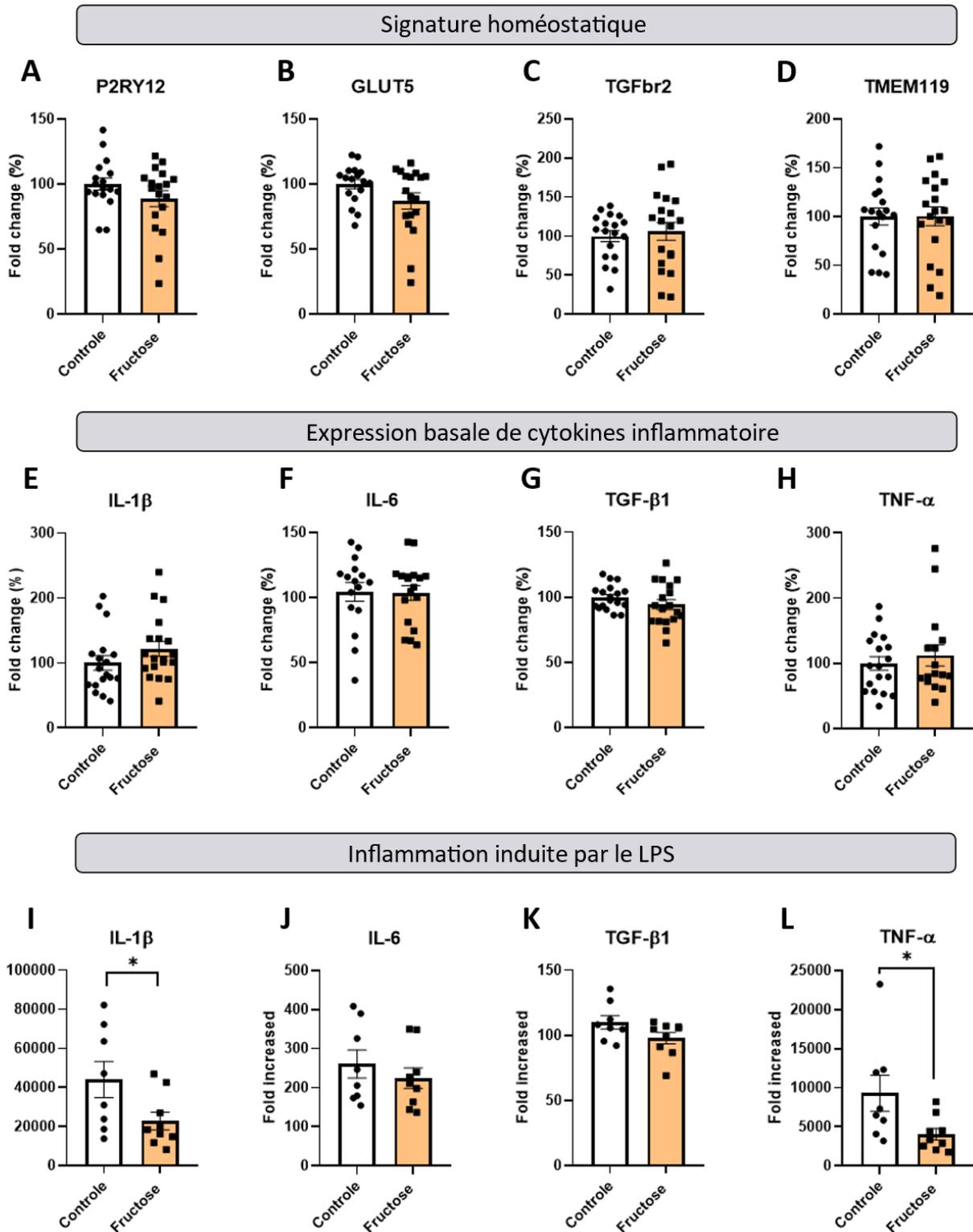


Figure 43 : Etude des effets d'une consommation d'un régime enrichi en fructose sur la physiologie des microglies de l'hippocampe.

*Analyses qPCR de microglies issues des HPC de souris nourries avec un régime standard ou à 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 12 semaines. **A-H** Expression basale des gènes P2RY12 (**A**), GLUT5 (**B**), TGFBR2 (**C**), TMEM119 (**D**), IL-1 β (**E**), IL-6 (**F**), TGF- β 1 (**G**) et TNF- α (**H**) de microglies issues d'hippocampe de souris WT soumise à un régime enrichi à 25% de fructose dans l'eau de boisson. Les valeurs du groupe WT ont été fixées à 100 %. **I-L** Expression 3h post-injection IP de LPS (250 μ g/kg) des gènes IL-1 β (**I**), IL-6 (**J**), TGF- β 1 (**K**) et TNF- α (**L**) de microglies issues d'hippocampe de souris WT soumise à un régime enrichi à 25% de fructose dans l'eau de boisson. Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par rapport à la condition sans LPS pour obtenir le fold increased. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$. (n = 8 à 19 / groupe).*

2.4 Implication de la microglie dans les effets délétères du fructose sur la santé cérébrale

2.4.1 Validation du modèle double transgénique Glut5-KD

Nous avons développé au laboratoire une nouvelle lignée de souris double transgénique, la lignée GLUT5-KD, dont l'expression du gène GLUT5 est délété spécifiquement dans les microglies (Figure 44 A). A la différence des expérimentations antérieures qui ont été effectuées sur des souris C57BL6/J, cette lignée a été générée sur un fond génétique C57BL6/N. Nous avons observé une délétion partielle, d'environ 60%, du gène GLUT5 dans les microglies isolées de souris de la lignée GLUT5-KD, en comparaison avec les microglies issues de souris WT (Figure 44 B). Nous avons également validé que cette délétion était spécifiquement retrouvée dans les microglies, et non dans d'autres tissus comme le duodénum (Figure 44 C). Ainsi, ce modèle nous permettra de déterminer si l'absence de ce transporteur dans les microglies protège des effets délétères du fructose.

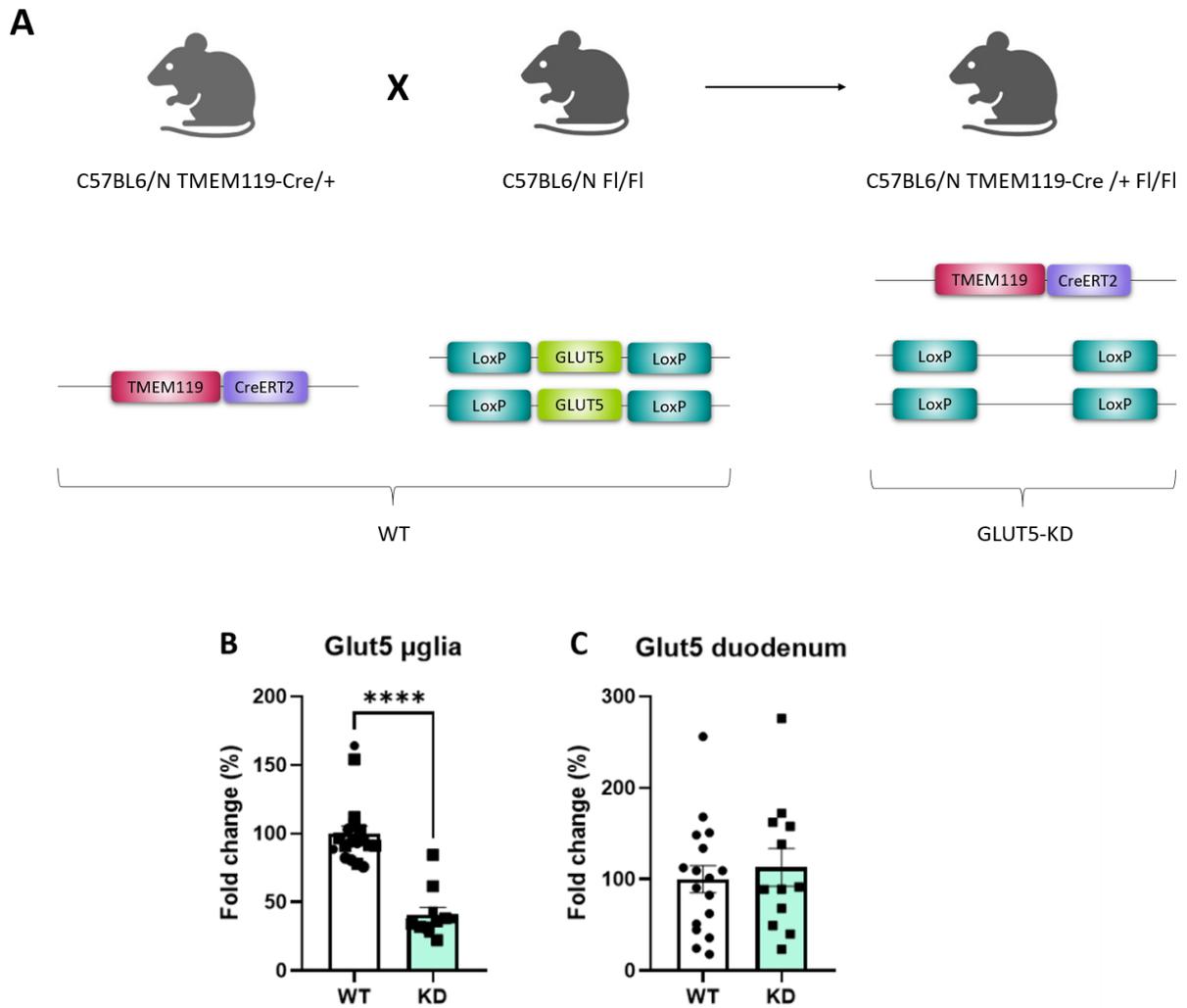


Figure 44 : Validation de la délétion spécifique de GLUT5 dans les cellules microgliales.

A Construction génétique du modèle GLUT5-KD. **B-C** Expression du gène GLUT5 dans les microglies (**B**) et dans le duodénum (**C**), de microglies issues de souris WT et GLUT5-KD. Les valeurs du groupe WT ont été fixées à 100 %. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ **** $p < 0,001$. (n = 11 à 18 / groupe).

2.4.2 Etude du métabolisme

Afin de caractériser notre nouveau modèle de souris GLUT5-KD, nous avons évalué l'impact d'un régime enrichi en fructose sur le métabolisme de ces souris. Nous avons utilisé le même modèle d'exposition, à savoir 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 8 semaines. Dans ces conditions, nous n'observons pas d'effets ni du régime fructose, ni du génotype, sur la prise de poids (Figure 45 A), ou sur le pourcentage de masse grasse et de masse maigre (Figure 45 B-C). Il est important de souligner que ces expérimentations ont été réalisées sur une souche murine différente. Nous ne pouvons donc pas les comparer aux précédents résultats. Ce point sera discuté dans la partie discussion de ces résultats page 143. Toutefois, ces résultats révèlent que le fructose induit une augmentation de la glycémie à jeun (Figure 45 E), ainsi qu'une intolérance au glucose (Figure 45 D, F) lorsque nous étudions l'effet du régime.

Par conséquent ces résultats révèlent premièrement que la délétion spécifique de GLUT5 dans les microglies n'induit pas de troubles métaboliques. Ils démontrent également que sur ces souris, le modèle d'exposition au fructose induit des perturbations du métabolisme moindres, marquées par une altération de l'homéostasie glucidique sans altérations du métabolisme lipidique ou de prise de poids.

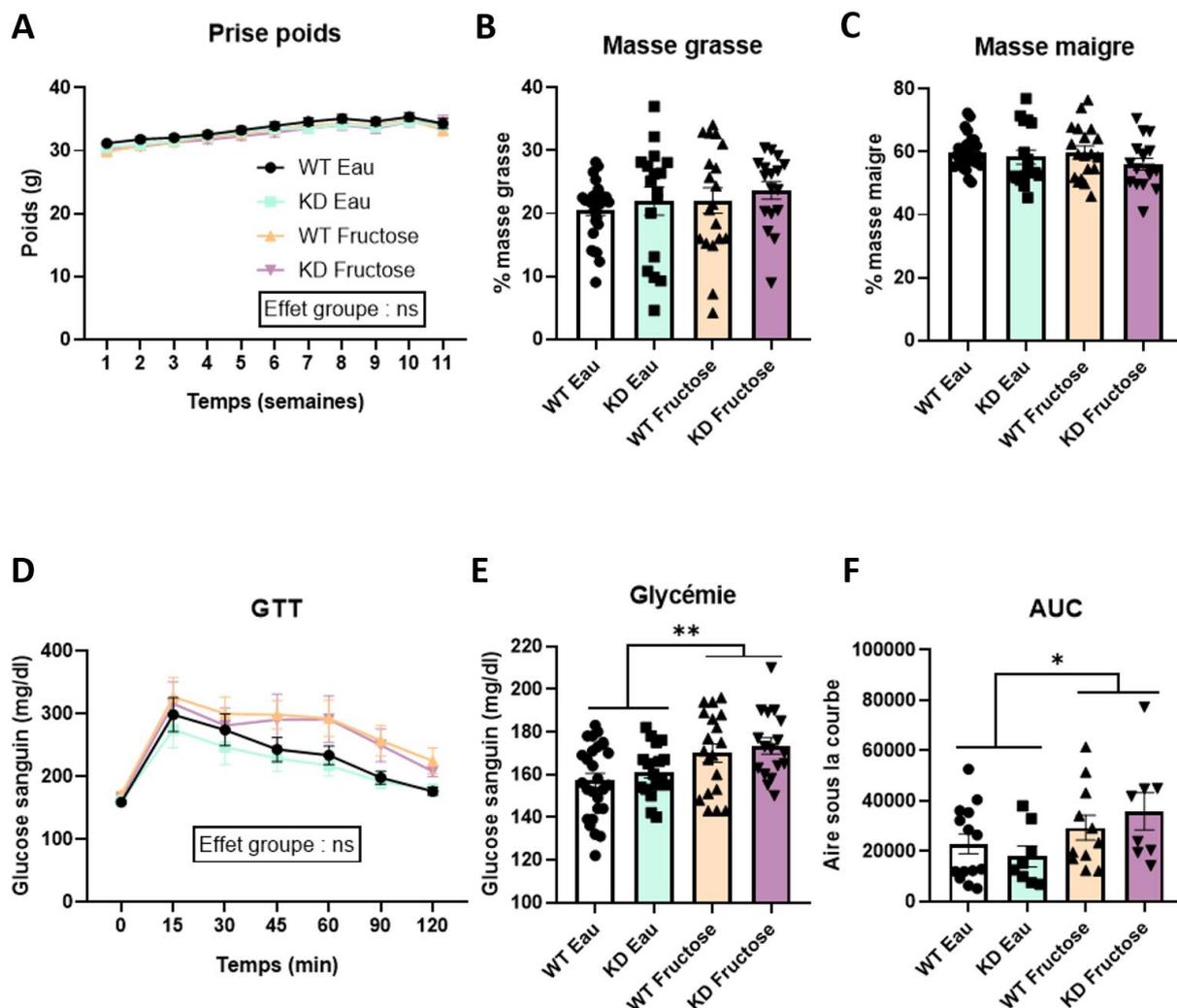


Figure 45 : Etude du métabolisme des souris WT et GLUT5-KD sous régime contrôle ou enrichi en fructose.

A Suivi de la courbe de poids des animaux. **B-F** Tests métaboliques réalisés chez des animaux nourris avec un régime standard ou à 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 10 semaines. **B** Pourcentage de masse grasse. **C** Pourcentage de masse maigre. **D** Courbe de la glycémie après une injection IP d'une solution de glucose (20%). **E** Glycémie à jeun. **F** Aire sous la courbe des courbes de glycémie après injection IP de glucose. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : Two way ANOVA : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. ($n = 8$ à 27 / groupe)

2.4.3 Etude de la santé cérébrale

Dans un second temps nous avons évalué les troubles de l'humeur et de la cognition des souris GLUT5-KD sous régime enrichi en fructose. Nous avons validé qu'il n'y ait pas d'altération de la locomotion induite par le génotype ou par le régime (Figure 46 A-B). Le régime fructose n'induit pas de diminution d'exploration des bras ouvert de l'EPM chez les souris WT C57BL6/N ou les souris GLUT5-KD (Figure 46 C), contrairement à ce qui avait été observé chez les souris WT C57BL6/J. De la même manière, la consommation de fructose ne modifie pas la fréquence de toilettage dans le Splash Test chez les souris WT C57BL6/N et les souris GLUT5-KD (Figure 46 E), à la différence des souris WT C57BL6/J. En revanche, dans le test du NSF, nous observons une augmentation du temps de survie pour aller manger la croquette des souris WT sous fructose en comparaison aux souris WT sous eau (Figure 46 D). Ce résultat témoigne d'un comportement pseudo-anxieux des souris WT-fructose et n'est pas retrouvé chez les souris GLUT5-KD quel que soit le régime (Figure 46 D). Également, lors du test de l'OLM, les souris WT-fructose présentent une diminution de l'indice de reconnaissance de l'objet déplacé en comparaison aux souris WT-eau, ce qui met en lumière une moindre performance de mémoire. En revanche, cette altération de la mémoire n'est pas retrouvée chez les animaux GLUT5-KD (Figure 46 F).

Les altérations des comportements anxieux ou mnésiques induites par un régime enrichi en fructose chez les souris WT n'est pas retrouvé chez les souris GLUT-KD ce qui suggère que ces altérations sont dépendantes de la métabolisation du fructose par la microglie via GLUT5.

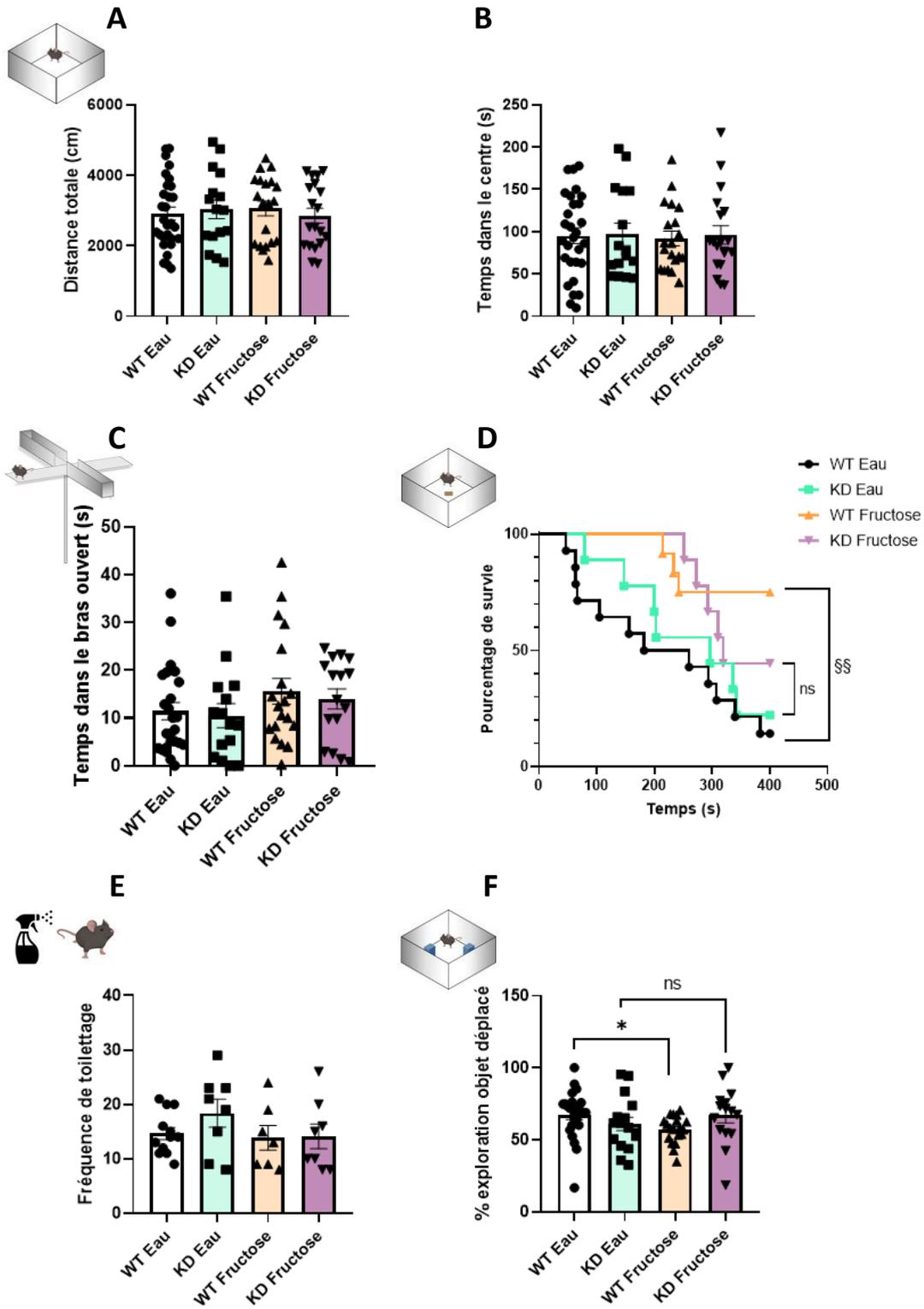


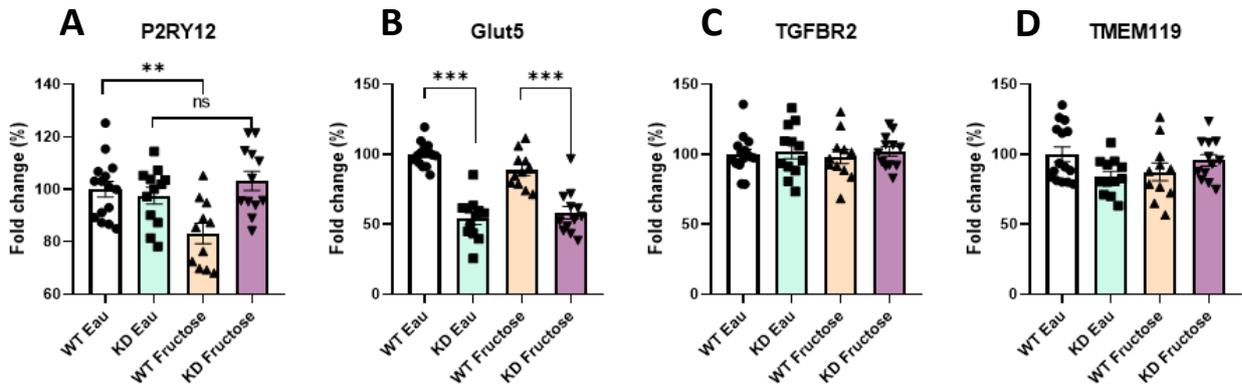
Figure 46 : Etudes des comportements émotionnels et mnésique des souris WT et GLUT5-KD sous régime contrôlé ou enrichi en fructose.

*Tests comportementaux réalisés chez des animaux nourris avec un régime standard ou à 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 8 semaines. A Mesure de la distance totale parcourue dans l'OF. B Mesure du temps passé dans le centre de l'OF. C Mesure du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM. D Mesure du temps de survie pour manger la croquette. E Mesure de la fréquence de toilettage dans le test du Splash Test F Mesure du pourcentage d'exploration en temps de l'objet nouveau dans le test de l'OLM. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Log-rank test : § $p < 0,05$ §§ $p < 0,01$. (n = 7 à 24 / groupe)*

2.4.4 Etude de la microglie

Enfin, nous avons étudié l'impact de ce régime à 25% de fructose sur la physiologie des microglies isolées d'HPC des souris WT et GLUT5-KD. Nous avons premièrement étudié l'expression des gènes de la signature homéostatique. Nous remarquons une diminution significative et spécifique de l'expression du gène GLUT5 dans les microglies issues de souris GLUT-KD, avec une diminution d'environ 50%, quel que soit le régime (Figure 47 B). Nous observons une diminution de l'expression du gène P2RY12 dans les microglies issues de souris WT nourries au fructose (Figure 47 A). Cette diminution n'est plus retrouvée dans les microglies GLUT5-KD issues de souris nourries au fructose. Cependant, nous ne notons aucune différence d'expression des gènes TGFBR2 et TMEM119 quel que soit le régime ou quel que soit le génotype (Figure 47 C-D). Enfin, nous avons évalué les effets d'un régime enrichi en fructose sur l'inflammation en condition basale des microglies. Nous n'observons aucune différence dans l'expression des gènes IL-1 β , IL-6, TGF- β et TNF- α , quel que soit le génotype ou quel que soit le régime (Figure 47 E-H). Par manque d'animaux, l'étude de la réponse inflammatoire en réponse au LPS n'a pas pu être réalisée comme dans les cohortes des souris C57BL6/J (page 133).

Signature homéostatique



Expression basale de cytokines inflammatoire

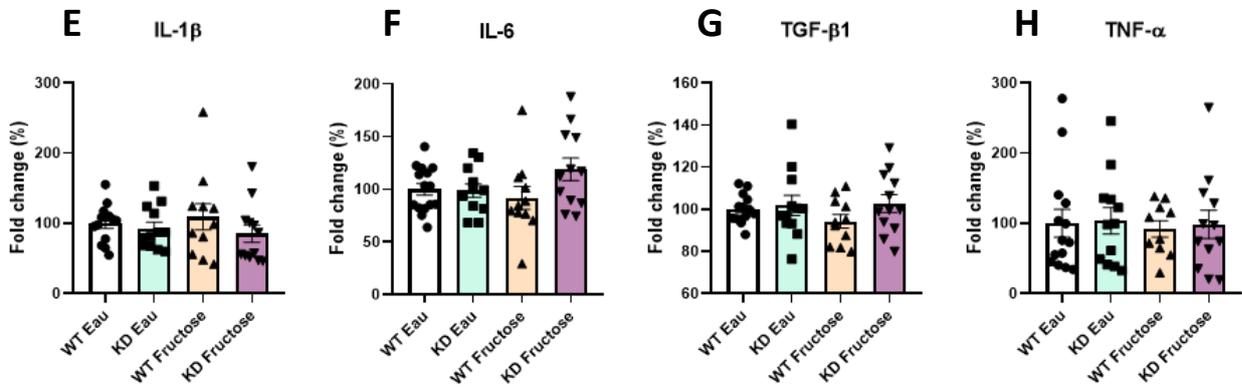


Figure 47 : Etude des effets d'une consommation d'un régime enrichi en fructose sur la physiologie des microglies de l'hippocampe issues de souris WT et GLUT5-KD.

Analyses qPCR de microglies issues des HPC de souris nourries avec un régime standard ou à 25% de fructose dans l'eau de boisson pendant 12 semaines. **A-H** Expression basale des gènes *P2RY12* (**A**), *GLUT5* (**B**), *TGFBR2* (**C**), *TMEM119* (**D**), *IL-1β* (**E**), *IL-6* (**F**), *TGF-β1* (**G**) et *TNF-α* (**H**) de microglies issues d'hippocampe de souris WT et GLUT5-KD soumise à un régime enrichi à 25% de fructose dans l'eau de boisson. Les valeurs du groupe WT-Eau ont été fixées à 100 %. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. Statistique : t-test de Student : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$. (n = 11 à 16 / groupe).

2.5 Discussion des résultats

Dans cette seconde partie des résultats, nous nous sommes intéressés aux effets d'une consommation de fructose sur la microglie et ses conséquences sur la santé cérébrale. Nos données confirment qu'une consommation enrichie en fructose à long terme, dans notre cas pendant 8 semaines, conduit à des altérations des émotions, de la mémoire et du métabolisme (Tableau 4).

Nous observons l'établissement d'un diabète de type 2 chez les souris nourries au fructose avec une hyperglycémie à jeun, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Ces altérations ont été retrouvées dans la littérature dans des études précliniques (Cisternas et al., 2015 ; Djordjevic et al., 2015 ; Gambaro et al., 2018) mais également chez l'homme (Stanhope et al., 2009). En outre, il est intéressant de noter que la prise de poids est significativement plus importante chez les souris nourries avec du fructose à partir de la 8^e semaine de régime. Ce résultat met en lumière l'importance d'entretenir un régime sur le long terme pour induire des dommages, comme le suggéraient les données de la littérature pour les troubles de l'humeur et de la cognition (Sangüesa et al., 2018 ; Wu et al., 2015). Enfin, nos données démontrent également une augmentation de la masse grasse chez les animaux exposés au fructose. Ces résultats mettent en évidence une perturbation du métabolisme lipidique, caractérisée par une augmentation du stockage des lipides. Ils sont cohérents avec la littérature où une dyslipidémie ainsi qu'une accumulation hépatique de lipides ont été décrits lors de la consommation d'un régime enrichi en fructose (Gambaro et al., 2018 ; Pereira et al., 2017 ; Stanhope et al., 2009).

Nos résultats ont permis de confirmer qu'un régime enrichi en fructose induit des comportements de types anxiodépressifs, ainsi que des troubles de la mémoire. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de la littérature (De Souza et al., 2021 ; Reddy et al., 2016 ; Ross et al., 2009 ; Sangüesa et al., 2018 ; Wu et al., 2015).

La principale question qui reste à éclaircir est : comment ce régime enrichi en fructose peut induire des troubles émotionnels et mnésiques ? Nous pouvons considérer 3 processus physiopathologiques non exclusifs liés à la consommation de fructose pouvant contribuer aux problèmes de santé cérébrale observés. Premièrement, en induisant une dysbiose intestinale, la consommation de fructose peut perturber indirectement les comportements émotionnels et mnésiques des souris. Cet aspect sera développé dans la 3e partie des résultats (page 155). Deuxièmement, il est connu que les troubles métaboliques peuvent influencer l'humeur, comme cela a notamment été montré au laboratoire (Martin et al., 2021 ; Zemdegs et al., 2016 ; Zemdegs et al., 2019). Dans ce contexte, notre hypothèse se concentre sur le lien entre l'insulino-résistance cérébrale et les altérations de réseaux neuronaux influençant les comportements émotionnels (Martin et al., 2021). Nous proposons que la modulation de la neuroinflammation des microglies pourrait être un facteur clé dans ce processus, étant donné le rôle bien établi de l'inflammation dans l'induction de l'insulino-résistance périphérique (Al-Mansoori et al., 2022). Pour explorer cette piste, il serait essentiel de déterminer si une alimentation riche en fructose peut spécifiquement induire une insulino-résistance au niveau cérébral, une relation qui reste à établir. Néanmoins, cette hypothèse serait en faveur de l'implication des microglies dans l'émergence de troubles émotionnels et cognitifs. De plus, les résultats de la première partie de la thèse suggèrent un impact direct du fructose sur la physiologie des microglies. Par conséquent troisièmement, le fructose pourrait induire des troubles de l'humeur et de la cognition en perturbant l'homéostasie des cellules microgliales. Cette partie des résultats se focalise particulièrement sur cette question. Toutefois pour soutenir cette hypothèse, encore faut-il que le fructose alimentaire puisse passer la BHE et pénétrer dans le cerveau pour interagir avec ces cellules. En effet, bien que des dosages intracérébraux de fructose ont déjà été réalisés dans la littérature, aucune de ces études n'ont clairement identifié sa source (Hwang et al., 2015 ; Hwang et al., 2017 ; Page et al., 2013). Effectivement, le fructose intracérébral peut être importé de la périphérie grâce au système sanguin, mais il peut également être produit par les cellules cérébrales grâce à la voie de

polyols (Hwang et al., 2017). Les microglies, grâce à l'expression des enzymes de cette voie, pourraient jouer un rôle dans la production endogène de fructose (Huang et al., 2022). Aujourd'hui, nos données de marquage au carbone 14 révèlent que le fructose périphérique peut pénétrer et se distribuer à l'ensemble du cerveau. Cela soulève des implications significatives quant à la compréhension de la manière dont le fructose peut influencer la physiologie cérébrale. De plus, le choix du protocole expérimental revêt une importance capitale dans l'interprétation de ces résultats. En optant pour l'injection intra-jugulaire du fructose, nous avons contourné la métabolisation du fructose par les intestins. De même, le temps d'exposition très court au fructose marqué, soit 5 minutes, a empêché toute métabolisation périphérique par le foie. Ces deux facteurs combinés nous assurent ainsi que le signal au carbone 14 détecté dans le cerveau provient bien du fructose périphérique lui-même et non de ses métabolites, renforçant ainsi la validité de nos conclusions. Par conséquent, le fructose alimentaire, s'il n'est pas entièrement métabolisé en périphérie, peut pénétrer dans le cerveau et impacter le fonctionnement des cellules capables de le capter et de le métaboliser.

Pour répondre à la question de l'implication de la microglie dans les troubles de la santé cérébrale induits par la consommation de fructose, nous avons développé un modèle unique de souris transgénique dont l'expression du gène *glut5* sélectivement est diminuée dans les microglies, et ce, de façon inductible. Dans ce modèle, nous avons confirmé une diminution de GLUT5 spécifiquement dans les microglies. Néanmoins, cette délétion n'est pas totale mais partielle, à environ 60%. Ce résultat est cohérent à la littérature car l'efficacité de recombinaison avec le système transgénique TMEM119-Cre utilisé peut varier de 30 à 90% (Bedolla et al., 2023 ; Faust et al., 2023). Dans ce nouveau modèle génétique, nous avons pu mettre en évidence une altération de l'homéostasie glucidique induite par la consommation de fructose, indépendamment du génotype. De plus, nos données révèlent des comportements pseudo-anxieux grâce au test du NSF, ainsi que des troubles de la mémoire grâce au test de

l'OLM, chez les souris C57BL6/N WT nourries au fructose. En revanche, dans tous les tests comportementaux impactés par la consommation de fructose (NSF et OLM), ces altérations ne sont pas retrouvées chez les souris GLUT5-KD, quelles soient nourries ou non au fructose. Ainsi, ces résultats indiquent que la diminution d'expression de GLUT5 dans les microglies protège les souris des effets du fructose sur l'anxiété et la mémoire, suggérant une implication clef des microglies dans les troubles de la santé cérébrale induits par le fructose.

Toutefois, il est important de souligner que la souche génétique utilisée pour ces résultats est différente de la première souche. En effet, les premières souris WT utilisées étaient des C57BL6/J. Cependant, les souris transgéniques GLUT5-KD ont été créées sur fond C57BL6/N. Or, bien que ces deux souches présentent des caractéristiques très proches, elle se différencient légèrement par l'accumulation de mutations spontanées au fil du temps (Simon et al., 2013). C'est le cas notamment du gène *Nnt* qui contrôle une protéine mitochondriale importante pour le métabolisme des cellules β du pancréas. Les souris C57BL/6J présentent une mutation naturelle qui supprime certains éléments de ce gène, conduisant à des problèmes de régulation du glucose chez les mâles (Nicholson et al., 2010). En suivant un régime riche en graisses, ces souris prennent du poids et développent de l'obésité ainsi qu'une résistance à l'insuline. Les souris C57BL/6N, en revanche, ne portent pas cette mutation et ne présentent pas ces problèmes (Nicholson et al., 2010). De plus, il a été montré que même sous un régime standard, les souris C57BL6/J présentent des altérations métaboliques en comparaison aux souris C57BL6/N (Fergusson et al., 2014). Ainsi, cette différence génétique expliquerait l'absence de prise de poids ou d'altérations du métabolisme lipidique chez les souris nourries au fructose, observée dans nos expérimentations sur le modèle GLUT5-KD sur fond C57BL/6N. Par conséquent, le fructose profiterait d'un terrain génétique favorable chez les souris C57BL6/J pour accentuer des troubles du métabolisme. Par ailleurs, le modèle C57BL/6N présente des niveaux d'anxiété en condition basale plus élevés que le modèle C57BL6/J (Matsuo et al., 2010). Ceci pourrait également expliquer que nous n'ayons pas pu révéler d'effets du régime fructose sur l'anxiété,

mesuré par le test de l'EPM. Effectivement, bien que les expérimentations aient été réalisées sur des cohortes indépendantes, nous remarquons dans nos données que les souris C57BL6/J contrôles passent environ 50s à explorer le bras ouvert (Figure 42 C, page 131), tandis que les souris GLUT5-KD (C57BL/6N) contrôles passent environ 10s à explorer le bras ouvert (Figure 46 C, page 140). Ces niveaux d'exploration respectifs sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature (Matsuo et al., 2010). Ainsi, nous supposons que le niveau d'anxiété basal est trop élevé chez les souris GLUT5-KD pour nous permettre d'étudier un potentiel effet anxiogène du fructose alimentaire par le test de l'EPM. Par ailleurs, nous ne remarquons aucune influence du régime alimentaire ou du génotype dans l'expression de comportement pseudo-dépressif, étudié par le Splash Test. Il ne semble pas que cela soit dû à une différence de souche, car les fréquences de toilettages sont similaires à celles observées dans la souche C57BL6/J. D'autres tests étudiant les comportements de type dépressif nécessitent d'être explorés, comme par exemple le test du FST, où les souris de la souche C57BL6/J exposées au fructose ont montré une augmentation du temps d'immobilité.

Pour aller plus loin, d'autres expérimentations sont en cours en utilisant une nouvelle construction génétique, présentant une délétion spécifique de GLUT5 dans les cellules microgliales sous la dépendance du gène CX3CR1. Les souris issues de ce modèle auront un génotype mixte de C57BL6/J et de C57BL6/N (Figure 48). Ce nouveau modèle nous permettra de faire le pont entre les expérimentations faites sur la première souche et celles effectuées sur la seconde souche. Cela nous permettra également de révéler dans quelle mesure les troubles métaboliques induits par le fructose participent aux perturbations émotionnelles et mnésiques. D'autre part, nous espérons que ce modèle présente des niveaux d'anxiété basaux similaires à la souche C57BL6/J, nous permettant une meilleure exploration de ce comportement (Matsuo et al., 2010).

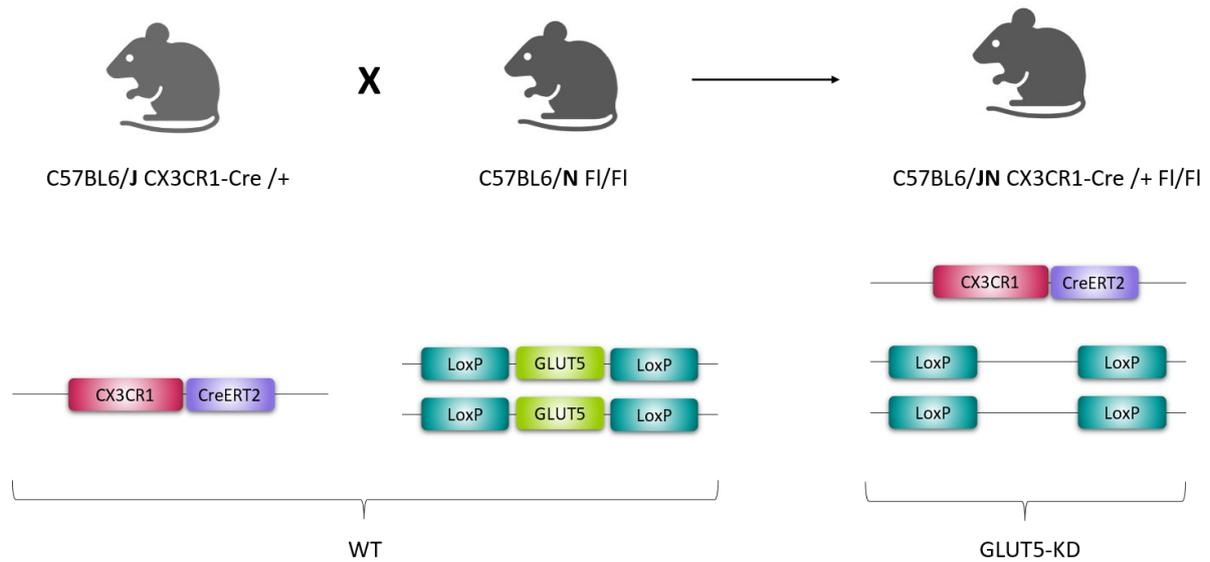


Figure 48 : Construction génétique d'un nouveau modèle de délétion du gène GLUT5 sous le promoteur CX3CR1.

Nos résultats ont mis en lumière le rôle clef des microglies dans l'établissement des troubles de la santé cérébrale induits par une consommation de fructose. Néanmoins, nous ignorons toujours dans quelle mesure les microglies peuvent impacter ces comportements. Pour étudier cette question nous nous sommes particulièrement intéressés à la physiologie et à l'inflammation microgliale. En effet, l'originalité dans nos travaux de thèse repose également sur le fait que nous pouvons corrélérer les atteintes comportementales induites par le fructose alimentaire à des altérations de la microglie. Bien que des études chez la souris avaient été menées sur les effets du fructose sur les comportements émotionnels et mnésiques (Cisternas et al., 2015 ; De Souza et al., 2021 ; dos Santos et al., 2020), ainsi que d'autres sur la neuroinflammation dans un contexte de régime enrichi en fructose (Li et al., 2019 ; Xu et al., 2016), jusqu'à présent, il n'existait pas de données de la littérature étudiant l'inflammation microgliale et les altérations du comportement sur les mêmes animaux.

Ainsi, nos données révèlent qu'un régime enrichi en fructose ne semble pas altérer la signature homéostatique des souris C57BL6/J. Toutefois, nos données ont révélé une

diminution de l'expression du gène P2RY12 dans les microglies issues de souris C57BL6/N nourries au fructose. Sans expérimentations complémentaires, il est difficile d'interpréter ce résultat et surtout il nous est impossible de conclure sur un effet du fructose alimentaire sur l'homéostasie des microglies. Des analyses de séquençage sont en cours afin de caractériser les effets d'une consommation de fructose sur leur signature transcriptomique (Butovsky et al., 2014 ; Butovsky & Weiner, 2018). Elles permettront également d'explorer les voies métaboliques pouvant être impliquées dans la réponse, voire l'adaptation, des microglies au fructose alimentaire. Toutefois, le fait que la diminution de P2RY12 ne soit pas retrouvée dans les microglies issues de souris GLUT5-KD nourries au fructose suggèrerait que cet effet soit dépendant de la capacité de la microglie à absorber ce sucre. Cela indiquerait donc que le fructose alimentaire peut avoir un impact sur la physiologie des microglies, ce qui n'avait jamais été mis en évidence. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence dans l'expression des cytokines inflammatoires en condition basale par les microglies, quel que soit la souche, le génotype ou le régime. Plusieurs études avaient pourtant publié une augmentation de l'expression de ces cytokines dans un contexte de régime enrichi en fructose (Cigliano et al., 2017 ; Djordjevic et al., 2015 ; Li et al., 2015 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2016 ; Yin et al., 2014). Néanmoins, ces quantifications ont été réalisés sur tissus entiers et pas seulement sur des cellules microgliales. Il est donc possible que ces cytokines inflammatoires soient exprimées par d'autres cellules du SNC, comme par exemple les astrocytes qui participent à la neuroinflammation (Renaud et al., 2015).

De manière intéressante, nos données révèlent que les microglies issues de souris C57BL6/J exposées à un régime enrichi en fructose présentent une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoire IL-1 β et TNF- α en réponse à une stimulation au LPS. Ces données sont novatrices car elles constituent la première exploration de la réponse inflammatoire microgliale dans un contexte de régime enrichi en fructose et sont cohérents avec nos données de la première partie *in vitro*. La diminution de l'expression des cytokines IL-1 β et TNF- α est dépendante de la voie de transcription du NF κ B (Tak & Firestein, 2001).

De plus dans une étude, Djordjevic et al, (2015) ont montré dans l'HPC de rat, qu'une consommation d'une solution à 10% de fructose pendant 9 semaines, conduisait à une diminution de l'expression en condition basale des ARN des cytokines IL-1 β et TNF- α spécifiquement, ainsi qu'à une diminution d'expression de la protéine NF κ B. Ensemble ces données suggèrent qu'une consommation de fructose induise un dysfonctionnement de la voie de signalisation dépendante du NF κ B. Comme discuté dans la première partie des résultats, il est possible que cette perturbation de l'inflammation puisse découler de l'activation de l'enzyme AMPK, en réponse à la métabolisation du fructose (Cha et al., 2008). Les analyses de séquençage en cours permettront d'explorer cette piste. Néanmoins, comme nous l'avons également discuté, une réponse inflammatoire adaptée est primordiale pour maintenir l'homéostasie cérébrale (Carbajosa et al., 2018 ; Chakrabarty et al., 2010 ; Cherry et al., 2015 ; Donat et al., 2017 ; Kummer et al., 2021 ; Mazaheri et al., 2017 ; McQuade et al., 2020 ; Paolicelli et al., 2022 ; Wolf et al., 2017). En outre, les microglies jouent un rôle crucial dans la mémoire. En effet, elles peuvent moduler la plasticité des synapses et notamment la potentialisation à long terme (Long-term potentiation ; LTP), un processus par lequel les connexions synaptiques entre les neurones sont renforcées, facilitant ainsi la transmission des signaux électriques et contribuant à l'apprentissage et à la mémoire (Colonna & Butovsky, 2017 ; Lynch, 2004). Les microglies exercent leur influence par le biais de diverses voies de signalisation, y compris la libération de molécules inflammatoires comme l'IL-1 β . Ainsi, il a été montré que la LTP, l'apprentissage et la mémoire sont altérés chez les souris ayant une inhibition de la signalisation de l'IL-1 β (Avital et al., 2003 ; Goshen et al., 2007 ; Spulber et al., 2009). Ainsi, il est possible que les altérations de la mémoire observées dans les tests de l'OLM et du MWM soient dépendantes de l'incapacité pour les microglies de soutenir une activité inflammatoire adéquate, induite par la consommation du fructose. En soutien à cette hypothèse, une étude a démontré qu'un régime contenant 15% de fructose pendant 7 semaines chez la souris entraînait des perturbations de la LTP ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale (Cisternas et al., 2015). Pour aller plus loin, des marquages en

immunohistochimie des microglies permettraient d'étudier les caractéristiques morphologiques de ces cellules. En effet, une morphologie amiboïde est associée à un profil plutôt pro-inflammatoire, tandis une morphologie ramifiée est associée à un profil homéostatique (Morillas et al., 2021). Ainsi, une analyse morphologique compléterait notre caractérisation quant à l'inflammation microgliale induite par le fructose alimentaire. De plus, des études précliniques ont montré une modification de la morphologie des microglies dans l'HPC de rats adultes suite à un régime enrichi en fructose débuté pendant l'adolescence (Hyer et al., 2022).

Ainsi dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'inflammation microgliale et ses implications dans les troubles de la santé cérébrale induits par la consommation de fructose. Néanmoins, les cellules microgliales n'exercent pas leurs fonctions uniquement grâce à la sécrétion de cytokines. Notamment, la fonction phagocytaire des microglies est considérée comme un facteur important affectant l'apparition et le développement de troubles émotionnels comme la dépression (Fang et al., 2023). En effet, des preuves précliniques suggèrent que les microglies activées dans des modèles animaux de dépression ou de stress, peuvent phagocyter de manière aberrante les synapses neuronales, entraînant un dysfonctionnement synaptique et des symptômes dépressifs (Cao et al., 2021 ; Szepesi et al., 2018). Par ailleurs, une étude récente a révélé que des souriceaux nés d'une mère nourrie au fructose présentaient une diminution de la phagocytose dans l'HPC (Wang et al., 2023). Ce résultat révèle que le fructose peut impacter la phagocytose des microglies. En outre, les microglies produisent également des facteurs trophiques tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Woodburn et al., 2023). Or de nombreuses preuves cliniques ont démontré que le BDNF joue un rôle important dans les troubles de l'humeur (Hashimoto, 2010). Des interventions visant à stimuler l'immunité innée, comme l'administration de faibles doses de LPS (75 ou 100 µg/kg), ont montré des effets bénéfiques dans le traitement des comportements dépressifs chez les souris (Cai et al., 2020). Ces effets semblent être médiés par l'activation microgliale régulant la synthèse du BDNF. Ainsi,

maintenir une activité permettant d'assurer les fonctions des microglies pourrait représenter un point central dans l'établissement des troubles émotionnels et cognitifs induits par la consommation de fructose. Ces données quant à l'implication de la phagocytose et de l'expression de facteurs neurotrophiques sont intéressantes mais nécessitent davantage d'investigations dans notre modèle afin d'explorer pleinement le rôle des microglies dans les altérations émotionnelles induites par le fructose.

En résumé, il est possible que le fructose puisse induire des troubles de l'humeur et de la mémoire en impactant les réseaux neuronaux, via des altérations de l'activité microgliale impactant la sécrétion de cytokines et/ou la phagocytose et/ou la production de facteurs neurotrophiques.

Tableau 4 : Résumé des effets métaboliques et comportementaux d'un régime enrichi en fructose.

Effets du fructose sur :	WT (C57BL6/J)	WT (C57BL6/N)	GLUT5-KD (C57BL6/N)
<i>Prise de poids</i>	↗	=	=
<i>Glycémie à jeun</i>	↗	↗	↗
<i>GTT</i>	↘	↘	↘
<i>Masse grasse</i>	↗	=	=
<i>Masse maigre</i>	↘	=	=
<i>Locomotion (OF)</i>	=	=	=
<i>Anxiété (EPM)</i>	↗	=	=
<i>Anxiété (NSF)</i>	↗	↗	=
<i>Incurie (ST)</i>	↗	=	=
<i>Mémoire (OLM)</i>	↘	↘	=

2.6 Conclusion

Nos résultats montrent qu'un régime prolongé enrichi en fructose induit chez la souris adulte des troubles métaboliques, ainsi que des altérations des comportements émotionnels et mnésiques. Nous avons pu corrélérer ces données avec des perturbations de la fonction microgliale. De plus, grâce au modèle transgénique GLUT5-KD créé au laboratoire, nous avons mis en évidence une atténuation des effets délétères du fructose sur la santé cérébrale des souris, suggérant que ces effets sont dépendant de la métabolisation du fructose par les microglies. Néanmoins, les quelques tests comportementaux réalisés ne permettent pas une caractérisation complète des effets cérébraux du fructose. Afin de poursuivre cette étude, nous avons également exploré les effets que pouvait avoir le fructose indirectement sur la santé cérébrale, *via* des altérations du microbiote. Cet axe est développé dans la 3^e partie des résultats.

Partie 3 : Implication du microbiote dans la santé cérébrale

Dans ce dernier axe du projet, j'ai réalisé les analyses biomoléculaires des souris GLUT5-KO (Figure 4). L'étude clinique a été réalisée par le Dr Chloé Melchior du CHU de Rouen et les expérimentations in vivo ont été effectuées par le Dr Véronique Douard de l'Institut Micalis.

Dans la première partie des résultats nous avons étudié si le fructose pouvait directement agir sur les cellules microgliales. Nous avons montré qu'une exposition au fructose pouvait modifier la physiologie de ces cellules. Dans la seconde partie nous avons étudié l'impact d'une consommation de fructose sur la santé cérébrale et les microglies de souris adultes. Nous avons montré que le fructose induit des troubles des comportements émotionnels et mnésiques. De plus, nos résultats suggèrent que ces troubles puissent être dépendants de la métabolisation du fructose par les microglies. Toutefois, nous ne pouvons exclure l'implication du microbiote dans les comportements observés. De plus en plus d'études mettent aujourd'hui en lumière l'importance du rôle du microbiote dans les altérations de la santé cérébrale (Cryan et al., 2019 ; Cussotto et al., 2018). Les capacités d'absorption du fructose étant limitées en raison de la saturation rapide de son transporteur GLUT5, il a été montré que 60 % de la population ne peut pas absorber complètement une charge de 40 g de fructose (Jones et al., 2011). Par conséquent, le fructose non entièrement absorbé atteint les parties distales du tube digestif où il interagit et modifie la composition du microbiote intestinal (Song 2019 ; Beisner et al., 2020 ; Jung et al., 2022). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que le microbiote participe aux effets du fructose sur les troubles de l'humeur et de la cognition. Les résultats issus de cette partie feront l'objet d'une publication très prochainement. C'est pourquoi ce dernier axe est présenté sous le format d'une publication scientifique. La

nomenclature de la taxonomie du microbiote intestinal à récemment été mis à jour. Ainsi pour des raisons de publication, nous avons utilisé la nouvelle taxonomie lors des analyses de microbiote dans ce papier. Un tableau (Tableau 5) permet de comparer ces nomenclatures.

Tableau 5 : Tableau comparatif des nomenclatures taxonomiques des bactéries du microbiote intestinal.

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
Firmicutes	Bacillota
Proteobacteria	Pseudomonadota
Actinobacteria	Actinomycetota
Bacteroidetes	Bacteroidota

Fructose malabsorption increases anxiety in human and animal models

Running title:

Fructose malabsorption increases anxiety

Adeline Coursan¹, Delphine Polve^{1,2}, Anne-Marie Leroy³, Magali Monnoye², Lea Roussin², Marie-Pierre Tavalacci³, Murtiel Quillard³, Mathilde Maccarone³, Olivier Guerin³, Estelle Houivert³, Jérôme Bellenger⁴, Guillaume Gourcerol³, Laurent Naudon², Sophie Layé¹, Charlotte Madore¹, Xavier Fioramonti^{1,}, Chloé Melchior^{3,*}, Véronique Douard^{2,*}*

¹Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, F-33000 Bordeaux, France

²Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS Institute, Jouy-en-Josas, France

³Univ Rouen Normandie, INSERM, Normandie Univ, ADEN UMR1073, Nutrition, Inflammation and microbiota-gut-brain axis, CHU Rouen, CIC-CRB 1404, Department of Gastroenterology, F-76000 Rouen, France

⁴UMR INSERM/uB/AGROSUP 1231, Team Lipness, Labellisée Laboratoire d'Excellence LipSTIC, Dijon, France.

*: These authors equally contributed to this work

Key Words:

Fructose, Glut5, neuroinflammation, mood disorders, gut microbiota

✉ Corresponding authors :

Dr. Véronique Douard

INRAE, UMR1319 Micalis

Domaine de Vilvert, bat 526

78352 Jouy-en-Josas Cedex

France

Phone: +33 1 34 65 28 41

email: veronique.douard@inrae.fr

Dr. Xavier FIORAMONTI

NutriNeuro

UMR 1286 INRAE, Bordeaux University, Bordeaux INP

Bâtiment UFR Pharmacie

146 rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX

France

Phone: +33 5 57 57 12 48

email: xavier.fioramonti@inrae.fr

ABSTRACT

Unbalanced nutrition, especially excessive fructose intake, is a growing public health concern. Fructose absorption is mainly ensured by the GLUT5 transporter in the proximal intestine. Nevertheless, fructose absorption is poorly efficient. About 60 % of the population cannot absorb a load of 35 g of fructose. As a consequence of fructose mal-absorption, fructose intake results in its spillover into the intestine, altering gut microbiota and triggering peripheral inflammation. Peripheral and/or cerebral inflammation (neuroinflammation) are hallmarks of mood disorders. Thus, this study investigated the link between fructose malabsorption and mood disorders, in exploring its association with gut microbiota dysbiosis and neuroinflammation through the development of a human cohort and the use of an animal model of fructose malabsorption. Human data reveal that healthy volunteers with fructose malabsorption (~60% of recruit subjects) present increased plasma level of lipopolysaccharide, higher anxiety traits in the State-Trait of Anxiety Inventory (STAI) and changes in gut microbiota composition. Pre-clinical data show that mal-absorptive Glut5-KO mice fed a 5% fructose diet for 4 weeks show increased anxiety- and depressive-like symptoms, changes in gut microbiota composition and changes in expression of phenotypic selected microglia genes. These findings highlight the intricate interplay between dietary fructose, gut microbiota, and microglia-dependent neuroinflammation influencing mental health.

HIGHLIGHTS

- Fructose malabsorption increases anxiety in healthy volunteers.
- Fructose malabsorption increases anxiety-like behaviors in malabsorptive Glut5-KO mice.
- Fructose malabsorption is associated with gut microbiota dysbiosis and neuroinflammation.

INTRODUCTION

The impact of unbalanced nutrition on cerebral functions is a public health concern. Fructose overconsumption has been pointed out by the different international public health institutes (OMS, ANSES) as potentially harmful (Tappy *et al*, 2018). Since the 1960s, fructose has been extensively added to processed food. For thousands of years, humans consumed <5 g/day while it currently reaches 50-80 g/day in developed countries. In addition, the ending of European sugar quota in 2017 will likely further increase its intake by 8-15 % in the next decade.

Fructose is a monosaccharide which does not need any enzymatic breakdown for its absorption. Fructose absorption is mainly ensured by the GLUT5 transporter which is expressed at the apical side of the enterocytes, primarily in the proximal intestine. Nevertheless, fructose absorption is poorly efficient compared to glucose (Douard & Ferraris, 2013). Carbohydrate malabsorption, including fructose malabsorption, is a frequent and widespread gastrointestinal condition (Born, 2007). About 60 % of the population cannot fully absorb a load of 40g of fructose (Manolescu *et al*, 2007; Jones *et al*, 2011). As a consequence, fructose intake leads to its spillover in the distal parts of the intestine where it interacts with colonic bacteria which generates degradation products such as short-chain fatty acids, carbon dioxide (CO₂), H₂, and CH₄ (Eisenmann *et al*, 2008). In addition, due to its incomplete absorption, fructose spillover may alter gut physiology, including enhanced peripheral inflammation (Enko *et al*, 2018), and microbiota composition as shown using animal models of fructose malabsorption (Zhang *et al*, 2019).

Human and animal studies have proven that altered microbiota composition impacts brain health including increased anxiety or depressive symptoms (Ahmed *et al*, 2022; Lynch *et al*, 2021). Interestingly, it has been reported that the prevalence of anxiety is increased in patients with carbohydrates-malabsorption (Enko *et al*, 2018). Within the brain, neuroinflammation is a hallmark of mood disorders including anxiety and depressive-like behaviors (Castanon *et al*, 2015; Lynch *et al*, 2021; Cryan *et al*, 2020), a conserved protective mechanism ensured by microglia, the resident immune cells of the brain (Colonna & Butovsky, 2017). Studies from our group and others have shown correlation between diet-induced anxiety and depressive-like disorders and increased peripheral and/or brain inflammation (Huet *et al*, 2021; Leyrolle *et al*, 2021; Fourrier *et al*, 2019). High-fructose feeding has also been associated with neuroinflammation and brain dysfunctions including anxiety- and depressive-like behaviors (Spagnuolo *et al*, 2020; Tang *et al*, 2022; Li *et al*, 2019; Cigliano *et al*, 2018). Changes in microbiota composition and metabolism has been associated to increased neuroinflammation through different mechanisms involving the release of microbiota-derived molecules or enhancement of peripheral inflammation, which can impact the brain and promote neuroinflammation (Ahmed *et al*, 2022). Thus, we hypothesize that fructose malabsorption increases mood disorders including anxiety in association with gut microbiota dysbiosis and neuroinflammation.

To answer this hypothesis, we have analyzed emotional behaviors, gut microbiota composition and microglia gene expression of malabsorptive GLUT5-KO mice fed a low amount of fructose. In addition, we developed a clinical study in which we analyzed anxiety and microbiota composition of healthy volunteers with fructose malabsorption.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Adult Glut5-KO or WT (Zhang *et al*, 2019) male mice (8-12 weeks) were fed with a 5% fructose diet (% from kcal) (Table 1; Research diet, New Jersey, USA) for 4 weeks and group-housed in conventional housing cages at Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons (IERP, Jouy-en-Josas) animal facility and at the NutriNeuro animal facility. A group of Glut5-KO male mice of the same age were fed with a 0 % fructose diet (0 % fructose diet was isocaloric and content the same amount of carbohydrate than the 5 % fructose diet; Table 1). Animals were maintained on a 12 hours light-dark cycle with *ad libitum* access to standard chow food and water. All experimental procedures were conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE and approved by the French Ministry of Research and local ethics committees (APAFIS#: 19870 and APAFIS #34430-2021121009471618 v4).

DIET COMPOSITION	0% FRUCTOSE	5% FRUCTOSE
PROTEINS (KCAL%)	20	20
LIPIDS (KCAL%)	16	16
CARBOHYDRATES (KCAL%)	64	64
Corn starch (gm%)	329	329
Sucrose (gm%)	0	0
Dextrose (gm%)	200	150
Fructose (gm%)	0	50
Cellulose BW2000 (gm%)	50	50
Total kcal/kg	3964	3964

Table 1: Diets composition

Behavioral tests. Animals were tested in different anxiety-like and depressive-like behavioral paradigms as previously described (Martin *et al*, 2022; Zemdegs *et al*, 2016, 2019; Mir *et al*, 2020). Briefly, the elevated plus maze (EPM) test was performed for 5 minutes in an apparatus elevated to 120 cm from the floor, including two 35 cm length and 5cm wide open arms and

two closed arms with same dimensions and surrounded with 15 cm high wall. The forced swim test (FST) was carried out for 6 minutes using a Plexiglas cylinder tank fill with water (26 ± 1 °C) in a manner that the mouse cannot reach the floor with its tail. The immobility time was calculated during the 3 first minutes of the test. Tests were spaced by two days of recovery time and increasing in term of stress-related paradigm, starting with the less stressful test (EPM). All videos were analyzed using the ANY-maze software (Stoelting Co., Dublin, Ireland), automatically count on the software in a blinded setting.

Microglia gene expression. Microglia isolation was performed as previously described (Herron *et al*, 2022). Briefly, mice were euthanized by intraperitoneal pentobarbital injection (Exagon[®], 300 mg/kg), 30 min post-buprenorphine administration (0.1 mg/kg) before being transcardially perfused with ice-cold Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco). Following brain's mechanical dissociation, single cell suspensions were prepared and centrifuged over a 37%/70% discontinuous Percoll gradient (GE Healthcare), mononuclear cells were isolated from the interphase. Total RNAs were extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74106) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were determined using Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop technologies). 10 μ L of RNAs were reverse transcribed using Superscript IV VILO (Invitrogen, Life Technologies, France). cDNAs were amplified using commercially available FAM-labeled Taqman[®] probes (Applied Biosystems), [*glut5* (Mm00600311_m1), *csf1r* (Mm01266652_m1), *p2ry12* (Mm00446026_m1), *clec7a* (Mm01183349_m1), *spp1* (Mm00436767_m1), *apoe* (Mm01307193_g1), *il-1b* (Mm00434228_m1), *il-6* (Mm00446190_m1), *tnf-a* (Mm00443258_m1), *tgfb2* (Mm03024091_m1), *B2m* (Mm00437762_m1, used as reference gene)]. Real-time PCR

reaction was performed in duplicate using a LightCycler® 480 instrument II (Roche). Data are normalized relative to B2m ($2^{(-\Delta Ct)}$).

Microbiota composition.

Cecal microbiota analysis

Total DNA was extracted from mice cecal content or healthy volunteers' feces samples with PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, France) and using the mechanical bead-beating disruption method. The V3–V4 hypervariable region of the bacterial 16S rDNA was amplified by PCR (PCR1F_460: CTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG and PCR1R_460: GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) using Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, PRC) (95°C for 3 min and then 35 cycles at 95°C for 15 sec, 65°C for 15 sec, and 72°C for 1 min before a final step at 72°C for 5 min). The purified amplicons were sequenced using Miseq sequencing technology (Illumina) at the GeT-PLaGe platform (Toulouse, France). Paired-end reads obtained from MiSeq sequencing were then dereplicated and processed using the Galaxy supported FROGS version 4.1 (Find, Rapidly, OTUs [Operational Taxonomic Units] with Galaxy Solution) pipeline) (Escudié *et al*, 2018). Amplicon Sequence Variant (ASV) were clustered using Swarm with parameter $d = 1$ and chimeras were filtered following FROGS version 4.1 guidelines. Assignment was performed using 16S_REFseq_Bacteria_20230726 database. ASV with abundances lower than 0.0005% of the total read set were removed prior to analysis. Subsequent analysis were done using the phyloseq R packages (McMurdie & Holmes, 2013). Samples were rarefied to even sampling depths before computing within-samples compositional diversities (observed richness, Chao1 and Shannon index) and between-samples compositional diversity (Bray-Curtis) Raw,

unrarefied ASV counts were used to produce relative abundance graphs and to find family and genera with significantly different abundances among mouse groups or between normo-fructose absorber and fructose malabsorber individuals respectively.

Human study

Assessments and endpoints of the clinical study

The primary endpoint of the clinical study was to evaluate anxiety traits at baseline, using the Spielberger State Anxiety Questionnaire (STAI) score (Gaudry *et al*, 1975), between volunteers with and without fructose malabsorption. Secondary endpoints included fructose consumption, HAD anxiety and depression measured at baseline and final visit, STAI at final visit, fecal calprotectin, blood level biological parameters (LPS, reactive C protein) and microbiota composition.

Study population

Healthy male volunteers aged 18 to 35 with a body mass index (BMI) inferior to 25 were included in our study between the 8th of June 2021 and the 2nd of May 2022 at Center Investigation Center of *CHU de Rouen*, France. Exclusion criteria included the presence of gastrointestinal disorders (including irritable bowel syndrome, celiac disease, and inflammatory bowel disorders), psychiatric conditions, neurological diseases, eating disorders, diabetes, a history of digestive surgery, or any chronic disease or current infectious disease. The volunteers were not allowed to smoke, to have long-term treatment, to follow any diet, to have had antibiotics in the last six months and probiotics in the last three months. Volunteers were excluded if they had a positive glucose breath test, did not follow the

recommendations before the breath tests, and if the STAI questionnaire was not performed at baseline.

The study was approved by the ethical committee “*Comité de protection des personnes Ouest II*” on 25th of June 2021 and was registered at www.clinicaltrials.gov (NCT05371067). All subjects gave written informed consent before participation. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Breath tests

Each volunteer underwent two breath tests. First, the glucose breath test was performed in response to a 75 g load of glucose to rule out small intestinal bacterial overgrowth. End-alveolar breath samples of expired air were collected every 15 min for two hours. The test was considered positive if one of the following results occurred: peak of H₂ or CH₄ above 20 ppm, increase of H₂ or CH₄ levels above 10 ppm in two samples by comparison with individual baseline levels. In the case of a positive glucose breath test, volunteers were excluded. Capillary blood sugar was analyzed at baseline, 1 hour, and 2 hours after glucose intake. The fructose breath test was then performed with a 35g fructose load to identify fructose malabsorbers (Melchior *et al*, 2014). According to the European guidelines, patients followed a strict preparation, including a strict diet for 48 hours before the breath tests (Hammer *et al*, 2022). End alveolar breath samples were collected every 30 min for five hours during the fructose breath test. Both H₂ and CH₄ levels were calculated. The test was considered positive and defined fructose malabsorption when H₂ and/or CH₄ levels rose above 20 ppm. Capillary blood sugar was analyzed at baseline, 15min, 30 min, and 60 min after fructose intake.

Food and anxiety/depression questionnaires

Volunteers filled out a 7-day food diary to assess their fructose intake profile before the final visit. All the volunteers were evaluated for anxiety and depression using two different questionnaires. The anxiety traits were evaluated using the STAI score (Gaudry *et al*, 1975). Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) was used to assess severe anxiety and depressive status.

STAI evaluates the feelings of apprehension, tension, nervousness, and concern that the subject feels. This questionnaire is viewed as an indicator of transient changes in anxiety caused by aversive situations. The STAI comprises 20 items. Items are answered on a 4-point Likert scale ranging from 1 (not at all) to 4 (very much so), with the total score ranging from 20 to 80, with higher scores indicating higher anxiety symptoms. A score above 37 indicates anxiety. The STAI was filled at baseline (visit 1) and final visit (visit2) before breath tests.

The HADS contains 14 items and has two subscales – depression (7 items) and anxiety (7 items). Each item was scored from 0 to 3 (Snaith, 2003). A higher score indicates more severe psychological distress in the respective subscale (score range from 0 to 21). A score below 8 excludes anxiety or depression, and a score above 10 indicates anxiety or depression (Gaudry *et al*, 1975). The HAD questionnaires were filled at baseline (visit 1) and final visit (visit 2) before breath tests. The HAD questionnaires were used to assess anxiety and depression levels of the volunteer in order to exclude individuals displaying severe anxiety and depressive status. As shown in Table 2, the HAD-depression and -anxiety scores were not significantly different between Normo-Abs and Mal-Abs individuals, and importantly the average scores range from 2.1 ± 2.0 to 2.9 ± 2.05 (HAD-depression score) and from 5.2 ± 2.1 to 5.6 ± 2.6 (HAD-anxiety score) for each group respectively rule out severe depressive condition among the cohort.

Biological analysis and Samples

Stool samples were taken at the last visit, within 6 hours of emission. Samples were stored at -80 °C for microbiota and fecal calprotectin analysis. Blood samples were taken in fasting volunteers on the final visit (before breath tests) in order to analyze CRP and insulin levels. All these analyses were performed at the Biological Resources Centre (Dr Valéry Brunel). Plasma (3000 g, 30 min at 4 °C) were used for LPS measurement.

Statistical analysis. Sample size has been estimated based on previous work from our group or others. No randomization was used. The investigator was not blinded to the group allocation for most experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10 (San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm SEM and individual values are plotted on graph when possible, except on Figure 2B-D where data are presented using median in whisker boxes. Outliers were identified using GraphPad Prism 10. After normal Gaussian distribution was verified using the Kolmogorov-Smirnov test, appropriate parametric or non-parametric tests were chosen as mentioned in figure legends. For human study, Statistical analysis was performed SAS (version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Data are expressed as mean \pm SEM and individual values are plotted on graph when possible. Comparison between the two groups of volunteers was performed using Mann-Whitney test.

For microbiota analysis: Alpha diversity index (Observed species, Chao1 and Shannon) were analyzed using 1-way ANOVA. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) test was performed on the Bray–Curtis matrices using 9999 random permutations and at a significance level of 0.05. Phylum and family relative abundances were compared using a Mann-Whitney test. The Spearman's rank correlation coefficients between

the relative abundance of gut microbiome at family level and LPS plasma concentration, STAI score as well as fructose intake profile were determined using R software for correlational statistical analysis. For all, a value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Volunteers with fructose-malabsorption display traits of anxiety and increased level of circulating LPS despite similar fructose intake.

A total of 55 healthy volunteers were included in the study. One healthy volunteer left the study and five healthy volunteers were excluded due to exclusion criteria. Sixty percent of the healthy volunteers evaluated using a 35 g fructose breath test were tested positive for fructose malabsorption (29 fructose malabsorbers (Mal-Abs) and 20 normoabsorbers (Normo-Abs)). Age, weight, BMI did not differ between the two groups (Table 2).

Food diaries do not reveal any difference in the total daily fructose intake between Normo-Abs and Mal-Abs individuals, both consuming on average 28.6 ± 3.4 and 32.8 ± 3.0 g of fructose/day, respectively (Figure 1A). Intake of fructose from beverages and sweet products are similar between Normo-Abs and Mal-Abs volunteers and accounted for around 29% and 46% of the total fructose daily intake, respectively. Fructose intake from fruits and vegetable is also similar between Normo-Abs and Mal-Abs group and represents 18 % of the total fructose intake. About 6 % of the fructose consumed daily originate from either cereals or dairy in both Normo-Abs or Mal-Abs individuals. However, these averages conceal a wide disparity in the total amount of fructose consumed (from 10 to 75 g of fructose/day for Mal-Abs and from 8 to 60 g of fructose/day for Normo-Abs) and in the profile of dietary fructose sources within the cohort, irrespective of fructose malabsorption status (Figure 1B). For

instance, 14% of individuals have a daily fructose consumption above (> 50 g/day) the maximum limit set by the ANSES institute in 2018 (Tappy *et al*, 2018).

The primary aim of the MoodyFructose study was to compare anxiety traits in healthy volunteers with and without fructose malabsorption. Volunteers with fructose malabsorption exhibit significantly more pronounced anxiety traits than volunteers without fructose malabsorption at baseline visit (Figure 1C). Among the circulating inflammatory parameters measured, only LPS plasmatic levels are significantly higher in Mal-Abs than in Normo-Abs (Figure 1D) while fecal calprotectin is similar between the two groups and the reactive C protein level below the detection levels in 47 individuals of the cohort (Table 2).

	Volunteers without fructose malabsorption (Normo-Abs)	Volunteers with fructose malabsorption (Mal-Abs)	p values
Number of volunteers	20	29	
Age (years)	26.2 ± 5.3	25.6 ± 5.5	0.7462
Weight (kg)	75.6 ± 7.8	70.6 ± 8.2	0.1012
BMI (kg/m²)	23.2 ± 1.5	22.4 ± 1.8	0.1080
STAI score visit 2	26.2 ± 4.2	30 ± 7.5	0.0593
HADS anxiety score	5.3 ± 2.2	5.7 ± 2.7	0.5865
HADS depression score	2.2 ± 2	3 ± 2.6	0.3377
Fecal calprotectin (µg/g)	60.6 ± 71.1	51 ± 59.3	0.4527

Table 2: Demographics and clinical characteristics. Comparison between the two groups of volunteers was performed using a Mann-Whitney test. For all the parameters Normo-Abs n=20 and Mal-Abs n=29 excepted for fecal calprotectin Normo-Abs n=17 and Mal-Abs n=26.

levels in Normo-Abs and Mal-Abs volunteers. STAI scores and LPS levels values are means \pm SEM. Fructose intakes, STAI scores and LPS levels were compared using Mann-Whitney comparison: * $p < 0.05$. STAI: State-Trait Anxiety Inventory, LPS: Lipopolysaccharide.

Bacteria associated with fructose malabsorption and traits of anxiety.

Changes in gut microbiota composition can modulate systemic inflammation by altering the levels of circulating LPS (Lynch *et al*, 2021). We therefore analyzed the fecal microbiota composition by 16s sequencing. For a taxonomic overview, Figure 2A shows the relative abundance of bacterial taxa aggregated at the family levels. Taxonomic assignment at family (Figure 2A) or phylum (Supp. Figure S1A) level reveals no difference in bacterial communities between Normo-Abs and Mal-Ab groups. We found that the fecal microbiome is dominated by the family *Lachnospiraceae* (~39% in both groups), *Oscillospiraceae* (20.5 and 18.5% in Normo-Abs and Mal-Ab respectively) and *Bifidobacteriaceae* (9.7 and 14.3% in Normo-Abs and Mal-Ab respectively). *Lachnospiraceae* and *Oscillospiraceae* both belong to the Bacillota phylum that represent more than 60% of the total. Fecal microbiota β -diversity composition, (Figure 2B), does not differ significantly between Normo-Abs and Mal-Abs volunteers. Similarly, the community richness (Chao1 index) and diversity (Shannon index) remain unchanged between the two groups (Figure 2C). However, at the genus level, 2 taxa, *Agathobacter* and *Bifidobacterium* display a significant higher relative abundance in Mal-Abs individuals, while, the 3 genera *Prevotella*, *Enterococcus* and *Zhenpiania* are significantly decreased (Figure 2D).

Interestingly, abundance of certain bacteria taxa is correlated to consumption of fructose coming from specific sources, independently of the presence of fructose malabsorption

(Figure 3A). For example, Streptococcaceae are positively correlated to the amount of fructose consumed in dairy products. Finally, we also found significant correlation between certain bacteria taxa and either the STAI score at baseline or plasma LPS level (Figure 3B). Thus, increased STAI score is correlated to a higher abundance of Turicibacteraceae or Bacteriodaceae, or lower abundance of Eubacteriaceae.

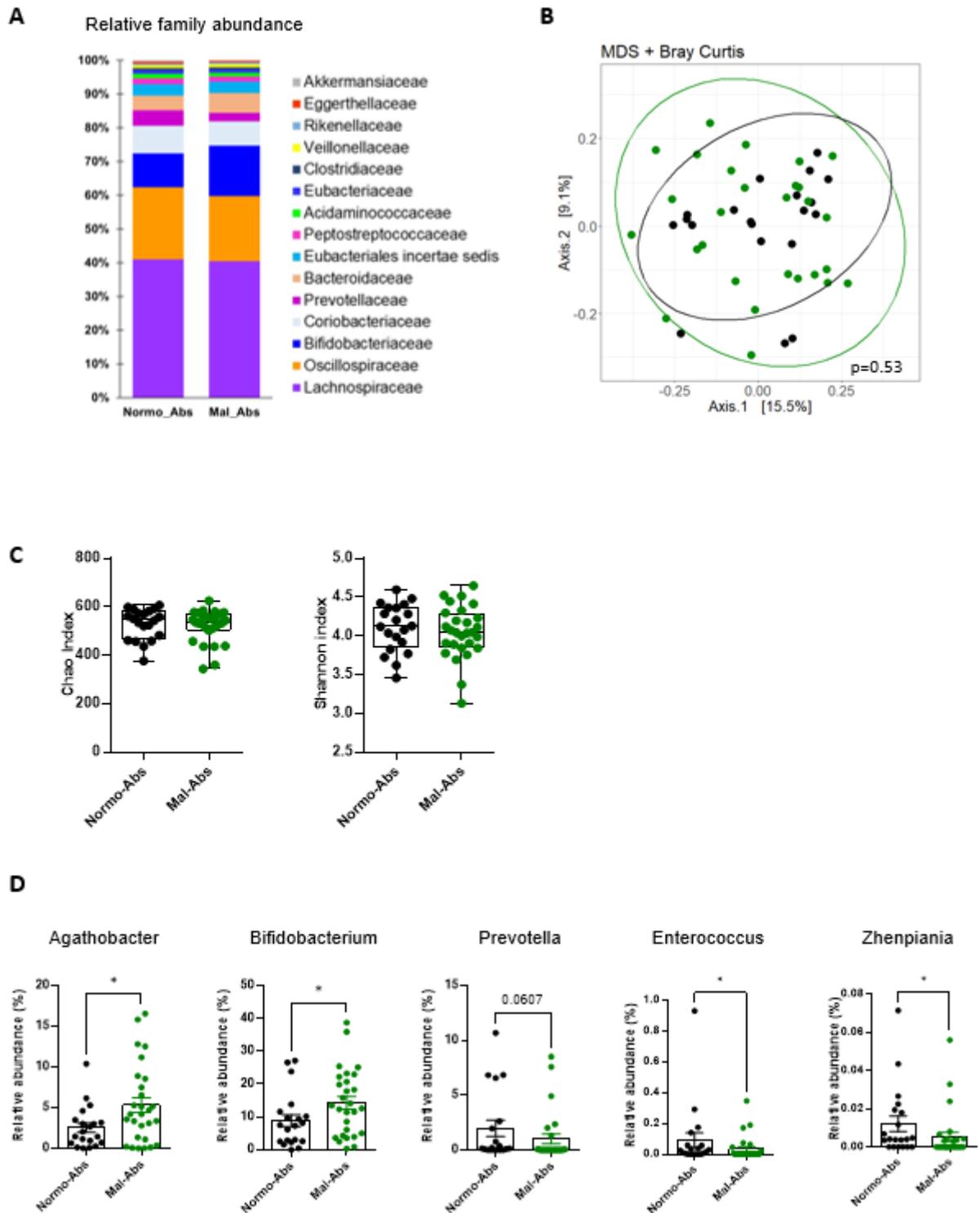


Figure 2: Microbiota composition of fecal samples of Mal-Abs and Normo-Abs volunteers.

(A) Taxonomic overview of the fecal microbiome at the family level for unrarefied data. Bar plots display the relative abundance of the top 15 taxa with the highest average abundance

across group average. **(B)** Principal coordinates analysis (PCoA) of Bray-Curtis compositional dissimilarity. Each dot represents of one volunteer. **(C)** Chao1 and Shannon Index as indicators of a-diversity. **(D)** The differential genus level abundances of the fecal microbiota. Chao1 index, Shannon Index and relative genera abundance values are means \pm SEM. Genera abundance data were compared using Mann-Whitney comparison: * $p < 0.05$.

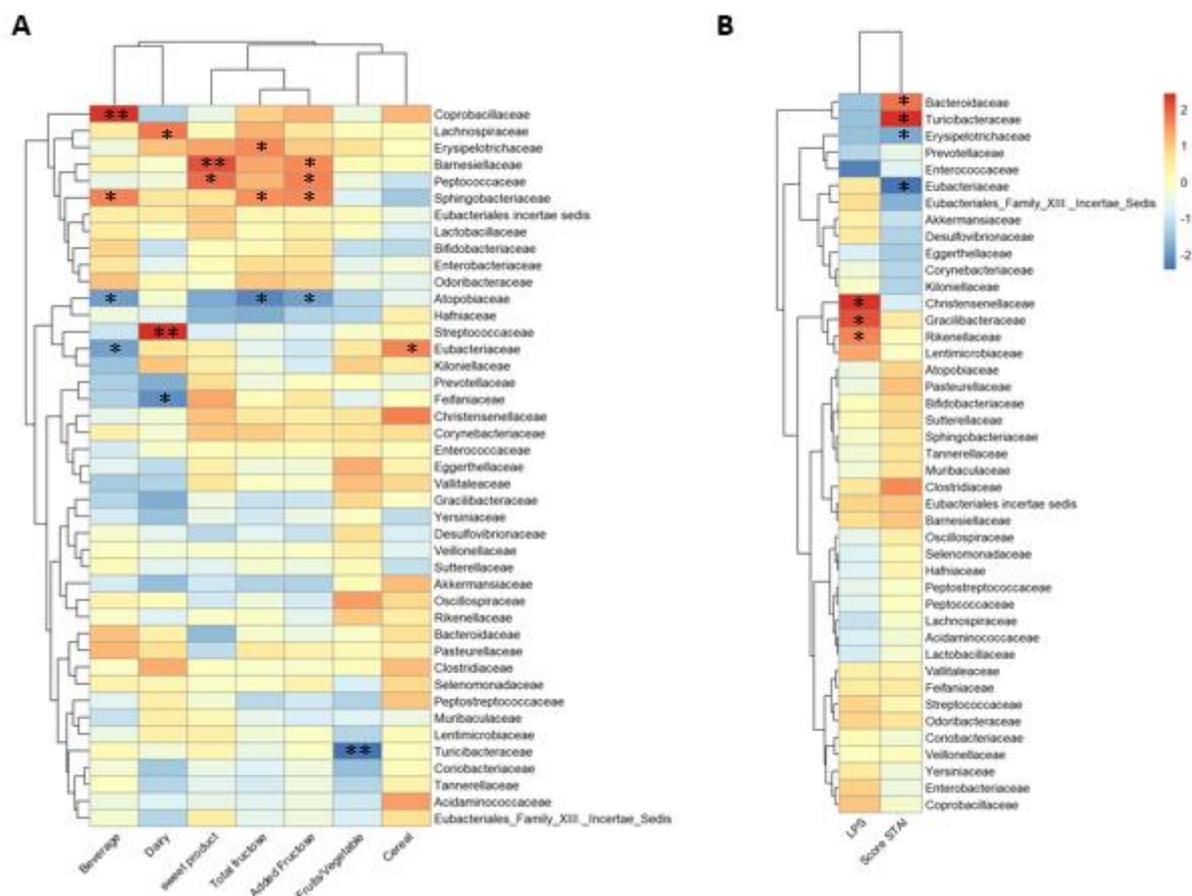


Figure 3: Spearman's correlation (A) Heat map of Spearman's correlation showing significant correlations of gut microbiota at the family level and fructose intake sources. **(B)** Heat map of Spearman's correlation showing significant correlations of gut microbiota at the family level and STAI index and LPS plasma levels. Significant correlations are shown as red (positive) or blue (negative). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Fructose malabsorption triggers anxiety-like behaviors and alters microglia function in mice.

The impact of fructose malabsorption on emotional behaviors was assessed in malabsorptive GLUT5-KO mice. Up to 10% fructose in the diet, fructose is fully absorbed by WT mice (Zhang *et al*, 2019). Therefore, malabsorptive GLUT5-KO mice (GLUT5KO_5F) were fed a 5% fructose diet for 4 weeks before assessment of anxiety- and depressive-like behaviors. WT mice fed 5% fructose (WT5F) for 4 weeks as well as GLUT5-KO mice fed 0% fructose (GLUT5KO_0F) were used as control groups for no fructose malabsorption. In the EPM test, the three groups made the same number of visits to the, covered the same distance and spent the same amount of time in the non-aversive closed arms (Figure 4A, upper left panel). By opposition, GLUT5-KO mice present a decreased number of entries, the distance and time spent into the aversive open arm, as compared to the 2 normo-fructose absorbing control groups (WT5F or GLUT5KO_0F) (Figure 4A, lower left panel). GLUT5KO_5F mice also present increased immobility time in the FST (Figure 4B). All together, these data suggest that fructose malabsorption increases anxiety- and depressive-like behaviors.

To determine whether fructose malabsorption related anxiety- and depressive-like behaviors were linked to microglia-associated neuroinflammation, we measured the expression of selected genes in isolated microglia from normo- and mal-absorptive fructose mice. We found a decreased expression of the homeostatic gene *csf1r* ($p = 0.054$) after fructose exposure in GLUT5_KO5F compared to WT5F without any difference in the expression of the homeostatic genes *P2ry12* or *Tgfbr2* (Supp. Figure S2). Interestingly, we found a decrease in both *Csf1r* and *P2ry12* gene expression after fructose exposure in Glut5-KO mice suggesting a GLUT5-

independent mechanism involved in microglia response to fructose. Expression of cytokine interleukin 1 β (IL1 β) was higher in GLUT5_KO5F mice than in the 2 control groups (WT5F and GLUT5_KO0F) (Figure 4C, upper panel). We also found a trend towards an increase in IL6 expression in microglia of GLUT5_KO5F when compared to WT5F mice ($p=0.067$; Figure 4C, upper panel). Expression of disease-associated microglia (DAM) genes *Clec7a*, ApolipoproteinE (*ApoE*) and osteopontin/secreted phosphoprotein 1 (*Spp1*) genes (Krasemann *et al*, 2017; Keren-Shaul *et al*, 2017) is increased in GLUT5-KO mice fed 5% fructose diet when compared to WT mice (Figure 4C, lower panels), suggesting a role for GLUT5 in finely tuning microglial responses to fructose.

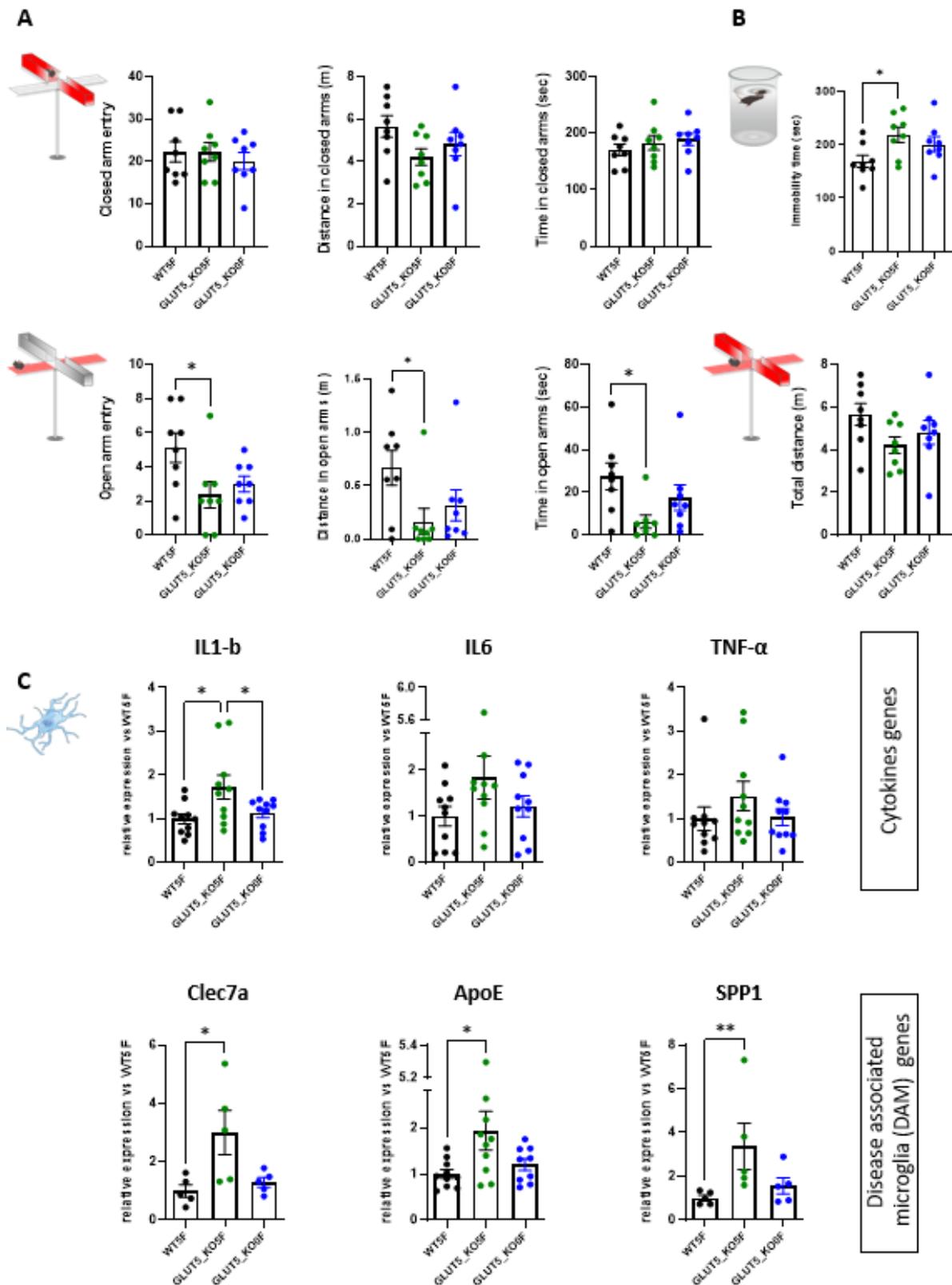


Figure 4: Fructose mal-absorption increases anxiety- and depressive-like behaviors and impairs microglia physiology. (A, B) Number of entries, time spent and distance traveled in

the closed arm (A, upper left panels) or the open arm (A, lower left panels), or total distance traveled (A, lower right panel) in the EPM (A) and immobility time during the FST (B) of WT (WT5F) or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO5F) fed a fructose 5% diet for 4 weeks or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO0F) fed a control diet without any fructose for 4 weeks. **(C)** Expression of cytokines (IL1-b, IL6, TNF- α) or disease-associated microglia (DAM) genes (Clec7a, ApoE, SPP1) quantified in microglia isolated from brains of WT (WT5F) or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO5F) fed a fructose 5% diet for 4 weeks or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO0F) fed a control diet without any fructose for 4 weeks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: One-way ANOVA followed by Holm-Šidák's multiple comparisons test.

Fructose malabsorption is associated with intestinal dysbiosis in mice.

Microbiota-derived metabolites can modulate microglia functions and neuroinflammation even if the mechanism remains elusive (Lynch *et al*, 2021). To address this possibility, we investigated the response of the cecal bacterial ecosystem to fructose malabsorption that parallel alteration of mood disorder and neuroinflammation observed in GLUT5_KO5F mice. Bray-Curtis derived dissimilarity matrices showed that fructose malabsorption contributed significantly ($p < 0.01$) to the different compositions observed in microbial communities of the cecum of the GLUT5_KO5F when compared to WT5F and GLUT5_KO0F (Figure 5A). However, the community richness (Chao1 index) and diversity (Shannon index) remain unchanged among the three groups indicating that fructose malabsorption did not affect the alpha-diversity of the cecal bacterial ecosystem (Figure 5B). Taxonomic assignment at family (Figure 5C) or phylum (Supp. Figure S1B) level reveals differences in bacterial communities between Normo-Abs and Mal-Ab groups. A significant decrease in relative abundance of four families,

was observed in the cecum of GLUT5KO_5F mice when compared to WT5F and GLUT5KO_0F mice (Figure 5C). *Peptostreptococcaceae* belonging to the Bacillota phylum (formerly known as Firmicutes) almost entirely disappeared in response to fructose malabsorption. *Streptococcaceae* and *Christensenellaceae* (belonging to the Bacillota phylum) both described as health-beneficial bacteria displayed a 10-fold relative abundance decrease in response to fructose malabsorption. To the opposite, in the same phylum, *Eubacteriales_Family_XIII._Incertae_Sedis* and *Erysipelotrichaceae* relative abundance increased GLUT5KO_5F mice when compared to WT5F and GLUT5KO_0F mice. In addition, *Prevotellaceae* (Bacteroidota phylum) relative abundance increased ~6 times and became the most abundant family in the cecum of the GLUT5KO_5F. In the same phylum the *Rikenellaceae* relative abundance was divided by two and three in the caecum of the GLUT5KO_5F mice when compared to WT5F and GLUT5KO_0F mice respectively. Finally, the *Corynebacteriaceae* (Actinomycetota phylum formerly known as Actinobacteria) increased by about 2 times in mal-absorptive GLUT5KO_5F as compared to WT5F and GLUT5KO_0F mice.

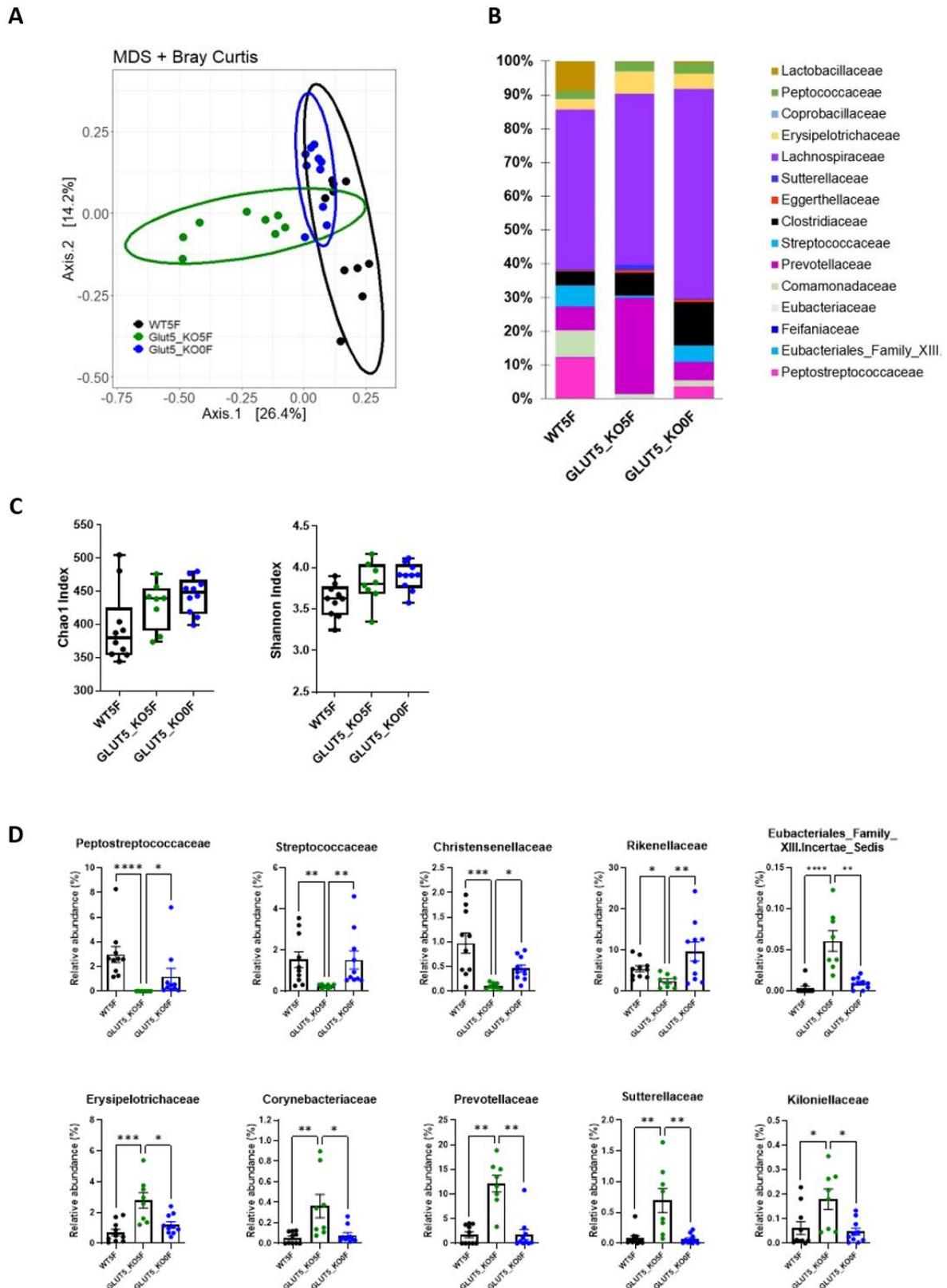


Figure 5: Microbiota composition of cecal sample of WT and GLUT5_KO mice. (A) Principal coordinates analysis (PCoA) of Bray-Curtis compositional dissimilarity. Each dot represents

one mouse **(B)** Taxonomic overview of the fecal microbiome at the family level for unrarefied data. Bar plots display the relative abundance of the top 15 taxa with the highest average abundance across group average. **(C)** Chao1 and Shannon Index as indicators of α -diversity. **(D)** Relative abundances of taxa at the family level that significantly differed in GLUT5_KO5F groups. Chao1 index, Shannon Index and relative family abundance values are means \pm SEM. Chao1 and Shannon Index means were compared by one-way ANOVA followed by THolm-Šídák's multiple comparisons test. Family abundance data were compared using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test: $p^* < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$ and $**** p < 0.0001$.

DISCUSSION

Clinical and pre-clinical data from this study show that fructose malabsorption is associated with gut microbiota dysbiosis and higher level of anxiety. Using animal models, we also show that these impairments associated to fructose malabsorption correlate to changes in microglia gene expression related to neuroinflammation.

Most countries reported intakes of total sugars, fewer reported intakes of added sugars and sucrose, and no country described precisely fructose intake (Sluik *et al*, 2015; Douard & Ferraris, 2013; Newens & Walton, 2016). Our study reported a daily average of 30 g of total fructose per individual. This data are coherent with previous more extensive surveys in Europe or in France (Sluik *et al*, 2015) for this age range even when the total intake of fructose was extrapolated from the total intake of fructose. In addition, the MoodyFructose cohort, despite its homogeneity in terms of age of the volunteers, emphasized a significant heterogeneity in the fructose intake dietary profile among the individuals, contributing to valuable insights into fructose intake patterns and their potential implications for health outcomes.

Fructose overconsumption has been pointed out by the OMS or other national health institutes as potentially harmful. Nevertheless, these nutritional recommendations only rely on the deleterious effect of fructose on energy metabolism or peripheral tissue. There is no human data suggesting that fructose overconsumption may impair brain functions or brain health. Many pre-clinical data using different animal models have however shown that consumption of fructose enriched diets leads to impaired brain health and increase anxiety-

or depressive-like behaviors (Spagnuolo *et al*, 2020; De Souza *et al*, 2021; Wu *et al*, 2015). In some of these studies, fructose-induced brain dysfunctions is associated to increased neuroinflammation (Spagnuolo *et al*, 2020; Li *et al*, 2019; Wu *et al*, 2015). Nevertheless, fructose could impact the brain to promote neuroinflammation through different non-exclusive pathways including a direct effect of fructose on brain cells and microglia, the fructose transporter Glut5 being expressed in microglia (Zhang *et al*, 2019) or via an impact on the gut microbiome. Human or animal studies have effectively shown that fructose overconsumption induces gut dysbiosis (Li *et al*, 2019). In the present study, we used models of fructose mal-absorption in human or animals to tackle this hypothesis that fructose-induced gut dysbiosis takes part in the development of increased neuroinflammation and impaired emotional behaviors. Thus, we show that, independently of fructose intake, human with fructose mal-absorption or GLUT5_KO mice fed moderate amount of fructose present increased anxiety symptoms. Fructose mal-absorber subjects show a slight but significant increase in their STAI score. Most of the subjects show score between 20 to 37, commonly classified as “no or low anxiety” (Gaudry *et al*, 1975). Mean STAI score increases from 26.95 ± 1.0 in normo-absorbers to 30.62 ± 1.5 in mal-absorber subjects, suggesting that fructose mal-absorption increases traits of anxiety without increasing anxiety symptoms related to pathological conditions. This is in agreement with low HAD scores of either normo- or mal-absorber individuals (Table 2) which show that recruited subjects do not present pathological anxiety or depression.

The potential link between gut microbiota and emotional disorders has already been suggested (Cryan *et al*, 2020). Several studies showed that fecal microbiota of depressed

patients differs significantly from healthy subjects (McGuinness *et al*, 2022; Jiang *et al*, 2015; Naseribafrouei *et al*, 2014; Liu *et al*, 2024; Yu *et al*, 2024). Furthermore, numerous and various rodent studies support the link between microbiota and mood disorders (Xu *et al*, 2024; Bailey *et al*, 2011; Yu *et al*, 2017; De Palma *et al*, 2015). For instance, transfer of the gut microbiota from depressed patients to rodent confers mood disturbances in recipient mice (Liu *et al*, 2024; Yu *et al*, 2024). However, there is no consensus between the studies, and so far, no clear microbiome signature associated with anxiety/depression has been identified based only on microbiota composition analysis (McGuinness *et al*, 2022). Moreover, most of the human studies focus on major depressive disorder (McGuinness *et al*, 2022), while in the present article, we targeted the possible link between fructose malabsorption-associated microbiota and anxiety traits.

In our study, the relative abundance of five taxa at the genera level differed significantly between volunteers with and without fructose malabsorption. *Bifidobacterium* is one of the most abundant taxa significantly affected by fructose absorption in the volunteers. Oligo-, di- and monosaccharide promote the growth of genus *Bifidobacterium* (Pokusaeva *et al*, 2011), and previous mice models already emphasized the increase in *Bifidobacterium* in response to moderate fructose malabsorption (Zhang *et al*, 2019), suggesting that *Bifidobacterium* may be a good microbial marker of fructose malabsorption. Despite being mainly described as beneficial in the context of anxiety and depression in rodents and humans (Vuong *et al*, 2017), a previous study also emphasized its negative correlation with mood in humans (Li *et al*, 2016). This study also positively correlated bacterial genera *Prevotella*, which tends to be less abundant in fructose malabsorbers volunteers, with positive mood. Our data also indicated that some bacterial families were positively (Turicibacteraceae and Bacteroidaceae) or

negatively (Eubacteriaceae and Erysipelotrichaceae) associated with the STAI score. High occurrence of *Bacteroidaceae* has been reported in anxious patients with Irritable Bowel Syndrome (Peter *et al*, 2018), but were lower in patients with major depression disorder (O'Neill *et al*, 2024). Previously, the genera *Turicibacter* was positively correlated with cognitive impairment in humans and mice (Jin *et al*, 2019; Sanguinetti *et al*, 2018). Interestingly, in our study, fructose intake from fruit/vegetable was negatively associated with the relative abundance of Turicibacteraceae. Similarly, while Eubacteriaceae was negatively associated with STAI score in volunteers, our data also revealed a negative correlation between Eubacteriaceae abundance and fructose intake from beverages, contrasted with a positive link to fructose intake from cereal. Altogether, these data emphasize the relevance of dietary sources of fructose in modulating gut microbiota, which may have downstream effects on mood regulation. Previous studies already reported the importance of dietary sources in mood disorders (Ceolin *et al*, 2022). However, further research is needed to elucidate the mechanisms underlying these associations and their potential therapeutic implications for managing mood disorders. Here, we found that the levels of LPS in humans and of the proinflammatory cytokine in mouse microglial were significantly increased in response to fructose malabsorption concomitantly to alteration of mood parameters. However, the bacterial taxa positively correlated with STAI score differed from the gram-negative bacterial family (*Christensenellaceae*, *Gracilibacteracrae* and *Rikenellaceae*) correlating with the LPS plasmatic levels in humans, suggesting potential other mechanisms linking microbiota changes to neuroinflammation in the context of fructose absorption.

In the present study, we show changes in selected microglia gene expression in malabsorptive Glut5-KO mice fed 5% fructose chow suggesting that microglia physiology is altered. We found that IL1 β expression significantly increased with a trend towards an increased expression of IL6 suggesting that fructose malabsorption induces a basal microglia-dependent neuroinflammation. Knowing that fructose is poorly absorbed and that fructose fed animals present dysbiosis, our data are in agreement with studies showing that fructose overfeeding is associated with increased cytokines expression in selective brain areas (Spagnuolo *et al*, 2020; Wu *et al*, 2015; Li *et al*, 2019). In addition, we found that malabsorptive GLUT5_KO5F mice show an increased expression of *Clec7a*, *ApoE* and *Spp1*, genes of DAM signature, mostly associated with a phagocytic phenotype and function of microglia. Alterations of microglia phagocytic functions may impact in return the surrounding brain cells and their activities in homeostasis and disease, including neurodegenerative diseases (Krasemann *et al*, 2017). This in line with studies suggesting that fructose overfeeding increases the expression of markers of Alzheimer disease (AD) (Mohamed *et al*, 2020, 2021) and that fructose consumption is associated with a higher risk of AD in humans (Johnson *et al*, 2020; Yan *et al*, 2023). Extended analyses are need to further study the impact of fructose malabsorption on neuroinflammation and the development of neurodegenerative diseases. Importantly, we also found altered homeostatic signature of microglia independently of fructose in Glut5-KO mice (Supp. Figure S2). GLUT5 being a homeostatic marker (Butovsky *et al*, 2014), this suggests that the deletion of Glut5 in microglia may have sensitized microglia to acquire a DAM phenotype. Additional work using conditional deletion of Glut5 in gut epithelial cells or microglia is needed to further understand the impact of fructose malabsorption or Glut5 per se in microglia-dependent control of neuroinflammation.

In conclusion, the combination of human and preclinical model of fructose malabsorption reveals an increase in anxiety in healthy volunteers and anxiety-like behaviors in fructose malabsorptive mice model. Both models were associated with changes in intestinal bacterial ecosystem and inflammation. Examining the mechanistic relationship of inflammatory marker and bacterial taxa in depression and anxiety is a promising future direction. Although gut microbiota and psychiatric disorders seem to be connected, more effort is still needed to understand the potential causative mechanisms underlying the interactions between these systems.

ACKNOWLEDGMENTS

XF and AC thank Bordeaux INP and INRAE for their support. XF, VD and CM have been supported by the Société Française de Nutrition, la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), la Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) et le département AlimH INRAE. Authors are thankful to the animal experimentation platforms CIRCE and IERP. AC, SL, VD, XF are thankful to the RRI Food4BrainHealth. Authors are thankful to Céline André, Virginie Buchbach, Maxime Depierre, Nell Marty and Hélène Renaux, Odile Vandapel for their technical help during the clinical study.

AUTHORS' CONTRIBUTION

AC, DP and VD performed experiments. MM, AC, LR and VD performed analysis. AML, GG, MPT included and acquired clinical data. MM acquired clinical data. MQ were responsible of the samples and storage. OG and EH analysis the clinical study. CM, XF and VD designed and supervised the project and wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests

REFERENCES

- Ahmed H, Leyrolle Q, Koistinen V, Kärkkäinen O, Layé S, Delzenne N & Hanhineva K (2022) Microbiota-derived metabolites as drivers of gut-brain communication. *Gut Microbes* 14: 2102878
- Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG & Lyte M (2011) Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 25: 397–407
- Born P (2007) Carbohydrate malabsorption in patients with non-specific abdominal complaints. *World J Gastroenterol WJG* 13: 5687–5691
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, *et al* (2014) Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17: 131–143
- Castanon N, Luheshi G & Layé S (2015) Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci* 9: 229
- Ceolin G, Breda V, Koning E, Meyyappan AC, Gomes FA, Moreira JD, Gerchman F & Brietzke E (2022) A Possible Antidepressive Effect of Dietary Interventions: Emergent Findings and Research Challenges. *Curr Treat Options Psychiatry* 9: 151–162
- Cigliano L, Spagnuolo MS, Crescenzo R, Cancelliere R, Iannotta L, Mazzoli A, Liverini G & Iossa S (2018) Short-Term Fructose Feeding Induces Inflammation and Oxidative Stress in the Hippocampus of Young and Adult Rats. *Mol Neurobiol* 55: 2869–2883
- Colonna M & Butovsky O (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35: 441–468
- Cryan JF, O’Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V & Dinan TG (2020) The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol* 19: 179–194
- De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, Deng Y, Park AJ, Green W, Denou E, Silva MA, Santacruz A, Sanz Y, *et al* (2015) Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nat Commun* 6: 7735
- De Souza L, Barros W de M, De Souza RM, Delanogare E, Machado AE, Braga SP, Rosa GK, Nardi GM, Rafacho A, Speretta GFF, *et al* (2021) Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral parameters of male and female mice. *Physiol Behav* 228: 113187
- Douard V & Ferraris RP (2013) The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *J Physiol* 591: 401–414
- Eisenmann A, Amann A, Said M, Datta B & Ledochowski M (2008) Implementation and interpretation of hydrogen breath tests. *J Breath Res* 2: 046002

- Enko D, Wagner H, Kriegshäuser G, Brandmayr W, Halwachs-Baumann G, Schnedl WJ, Zelzer S, Mangge H & Meinitzer A (2018) Assessment of tryptophan metabolism and signs of depression in individuals with carbohydrate malabsorption. *Psychiatry Res* 262: 595–599
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S & Pascal G (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinforma Oxf Engl* 34: 1287–1294
- Fourrier C, Bosch-Bouju C, Boursereau R, Sauviant J, Aubert A, Capuron L, Ferreira G, Layé S & Castanon N (2019) Brain tumor necrosis factor- α mediates anxiety-like behavior in a mouse model of severe obesity. *Brain Behav Immun* 77: 25–36
- Gaudry E, Vagg P & Spielberger CD (1975) Validation of the State-Trait Distinction in Anxiety Research. *Multivar Behav Res* 10: 331–341
- Hammer HF, Fox MR, Keller J, Salvatore S, Basilisco G, Hammer J, Lopetuso L, Benninga M, Borrelli O, Dumitrascu D, *et al* (2022) European guideline on indications, performance, and clinical impact of hydrogen and methane breath tests in adult and pediatric patients: European Association for Gastroenterology, Endoscopy and Nutrition, European Society of Neurogastroenterology and Motility, and European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition consensus. *United Eur Gastroenterol J* 10: 15–40
- Herron S, Delpech J-C, Madore C & Ikezu T (2022) Using mechanical homogenization to isolate microglia from mouse brain tissue to preserve transcriptomic integrity. *STAR Protoc* 3: 101670
- Huet L, Delgado I, Dexpert S, Sauviant J, Aouizerate B, Beau C, Forestier D, Ledaguenel P, Magne E & Capuron L (2021) Relationship between body mass index and neuropsychiatric symptoms: Evidence and inflammatory correlates. *Brain Behav Immun* 94: 104–110
- Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, Wang W, Tang W, Tan Z, Shi J, *et al* (2015) Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 48: 186–194
- Jin M, Li J, Liu F, Lyu N, Wang K, Wang L, Liang S, Tao H, Zhu B & Alkasir R (2019) Analysis of the Gut Microflora in Patients With Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 13: 1184
- Johnson RJ, Gomez-Pinilla F, Nagel M, Nakagawa T, Rodriguez-Iturbe B, Sanchez-Lozada LG, Tolan DR & Lanaspa MA (2020) Cerebral Fructose Metabolism as a Potential Mechanism Driving Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 12: 560865
- Jones HF, Butler RN & Brooks DA (2011) Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G202-206
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, *et al* (2017) A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169: 1276-1290.e17

Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O’Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, *et al* (2017) The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47: 566-581.e9

Leyrolle Q, Decoeur F, Briere G, Amadiou C, Quadros AR a. A, Voytyuk I, Lacabanne C, Benmamar-Badel A, Bourel J, Aubert A, *et al* (2021) Maternal dietary omega-3 deficiency worsens the deleterious effects of prenatal inflammation on the gut-brain axis in the offspring across lifetime. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 46: 579–602

Li J-M, Yu R, Zhang L-P, Wen S-Y, Wang S-J, Zhang X-Y, Xu Q & Kong L-D (2019) Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: a benefit of short-chain fatty acids. *Microbiome* 7: 98

Li L, Su Q, Xie B, Duan L, Zhao W, Hu D, Wu R & Liu H (2016) Gut microbes in correlation with mood: case study in a closed experimental human life support system. *Neurogastroenterol Motil* 28: 1233–1240

Liu P, Liu Z, Wang J, Wang J, Gao M, Zhang Y, Yang C, Zhang A, Li G, Li X, *et al* (2024) Immunoregulatory role of the gut microbiota in inflammatory depression. *Nat Commun* 15: 3003

Lynch CMK, Clarke G & Cryan JF (2021) Powering up microbiome-microglia interactions. *Cell Metab* 33: 2097–2099

Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T & Cheeseman C (2007) Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiol Bethesda Md* 22: 234–240

Martin H, Bullich S, Martinat M, Chataigner M, Di Miceli M, Simon V, Clark S, Butler J, Schell M, Chopra S, *et al* (2022) Insulin modulates emotional behavior through a serotonin-dependent mechanism. *Mol Psychiatry*

McGuinness AJ, Davis JA, Dawson SL, Loughman A, Collier F, O’Hely M, Simpson CA, Green J, Marx W, Hair C, *et al* (2022) A systematic review of gut microbiota composition in observational studies of major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 27: 1920–1935

McMurdie PJ & Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8: e61217

Melchior C, Gourcerol G, Déchelotte P, Leroi A-M & Ducrotté P (2014) Symptomatic fructose malabsorption in irritable bowel syndrome: A prospective study. *United Eur Gastroenterol J* 2: 131–137

Mir H-D, Milman A, Monnoye M, Douard V, Philippe C, Aubert A, Castanon N, Vancassel S, Guérineau NC, Naudon L, *et al* (2020) The gut microbiota metabolite indole increases emotional responses and adrenal medulla activity in chronically stressed male mice. *Psychoneuroendocrinology* 119: 104750

- Mohamed HE, Asker ME, Shaheen MA, Eissa RG & Younis NN (2021) Alleviation of fructose-induced Alzheimer's disease in rats by pioglitazone and decaffeinated green coffee bean extract. *J Food Biochem* 45: e13715
- Mohamed HE, Asker ME, Younis NN, Shaheen MA & Eissa RG (2020) Modulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease: New insight on the protective role of green coffee bean extract. *Nutr Neurosci* 23: 27–36
- Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R & Rudi K (2014) Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 26: 1155–1162
- Newens KJ & Walton J (2016) A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. *J Hum Nutr Diet Off J Br Diet Assoc* 29: 225–240
- O'Neill S, Minehan M, Knight-Agarwal CR & Pyne DB (2024) Alterations in gut microbiota caused by major depressive disorder or a low FODMAP diet and where they overlap. *Front Nutr* 10
- Peter J, Fournier C, Durdevic M, Knoblich L, Keip B, Dejaco C, Trauner M & Moser G (2018) A Microbial Signature of Psychological Distress in Irritable Bowel Syndrome. *Psychosom Med* 80: 698–709
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF & van Sinderen D (2011) Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr* 6: 285–306
- Sanguinetti E, Collado MC, Marrachelli VG, Monleon D, Selma-Royo M, Pardo-Tendero MM, Burchielli S & Iozzo P (2018) Microbiome-metabolome signatures in mice genetically prone to develop dementia, fed a normal or fatty diet. *Sci Rep* 8: 4907
- Sluik D, Engelen AI & Feskens EJ (2015) Fructose consumption in the Netherlands: the Dutch National Food Consumption Survey 2007-2010. *Eur J Clin Nutr* 69: 475–481
- Snaith RP (2003) The Hospital Anxiety And Depression Scale. *Health Qual Life Outcomes* 1: 29
- Spagnuolo MS, Iossa S & Cigliano L (2020) Sweet but Bitter: Focus on Fructose Impact on Brain Function in Rodent Models. *Nutrients* 13: E1
- Tang C-F, Wang C-Y, Wang J-H, Wang Q-N, Li S-J, Wang H-O, Zhou F & Li J-M (2022) Short-Chain Fatty Acids Ameliorate Depressive-like Behaviors of High Fructose-Fed Mice by Rescuing Hippocampal Neurogenesis Decline and Blood-Brain Barrier Damage. *Nutrients* 14: 1882
- Tappy L, Morio B, Azzout-Marniche D, Champ M, Gerber M, Houdart S, Mas E, Rizkalla S, Slama G, Mariotti F, *et al* (2018) French Recommendations for Sugar Intake in Adults: A Novel Approach Chosen by ANSES. *Nutrients* 10: 989
- Vuong HE, Yano JM, Fung TC & Hsiao EY (2017) The Microbiome and Host Behavior. *Annu Rev Neurosci* 40: 21–49

Wu H-W, Ren L-F, Zhou X & Han D-W (2015) A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Neurosci* 18: 323–328

Xu Q, Sun L, Chen Q, Jiao C, Wang Y, Li H, Xie J, Zhu F, Wang J, Zhang W, *et al* (2024) Gut microbiota dysbiosis contributes to depression-like behaviors via hippocampal NLRP3-mediated neuroinflammation in a postpartum depression mouse model. *Brain Behav Immun* 119: 220–235

Yan J, Zheng K, Zhang X & Jiang Y (2023) Fructose Consumption is Associated with a Higher Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Prospective Cohort Study. *J Prev Alzheimers Dis* 10: 186–192

Yu H, Yang W-M, Chen Y-H, Guo L, Li R, Xue F, Tan Q-R & Peng Z-W (2024) The gut microbiome from middle-aged women with depression modulates depressive-like behaviors and plasma fatty acid metabolism in female middle-aged mice. *J Psychiatr Res* 173: 139–150

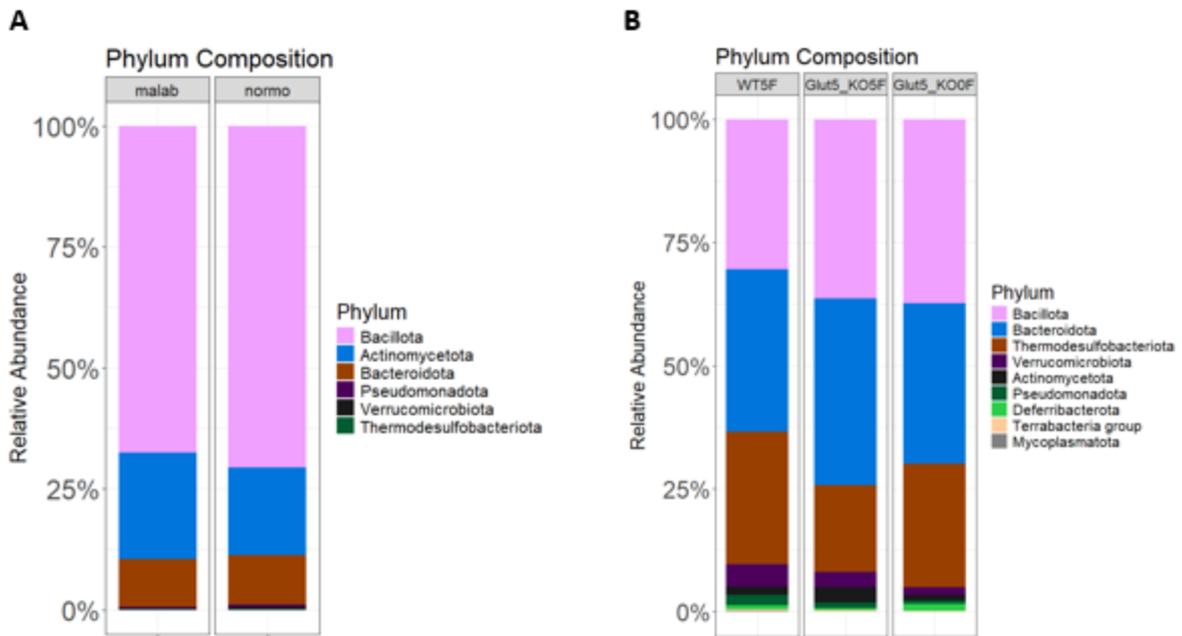
Yu M, Jia H, Zhou C, Yang Y, Zhao Y, Yang M & Zou Z (2017) Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *J Pharm Biomed Anal* 138: 231–239

Zemdegs J, Martin H, Pintana H, Bullich S, Manta S, Marqués MA, Moro C, Layé S, Ducrocq F, Chattipakorn N, *et al* (2019) Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 39: 5935–5948

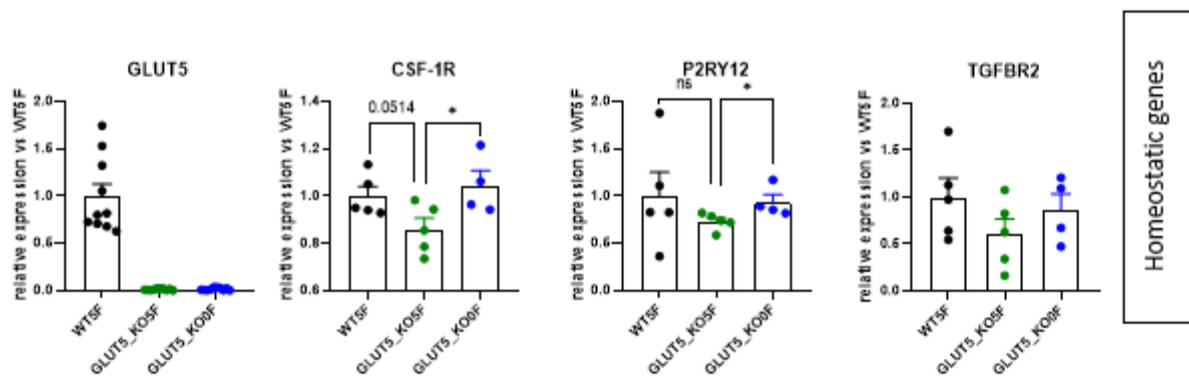
Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, Pénicaud L, Fioramonti X & Guiard BP (2016) High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol* 173: 2095–2110

Zhang X, Grosfeld A, Williams E, Vasiliauskas D, Barretto S, Smith L, Mariadassou M, Philippe C, Devime F, Melchior C, *et al* (2019) Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 33: 7126–7142

SUPPLEMENTARY DATA



Supp. Figure S1: Phylum composition of cecal microbiota from normo- or malabsorptive volunteers (A) or WT (WT5F) or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO5F) fed a fructose 5% diet for 4 weeks or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO0F) fed a control diet without any fructose for 4 weeks.



Supp. Figure S2: Expression of the homeostatic genes (Glut5, Csf-1R, P2yr12 and Tgfb2) quantified in microglia isolated from brains of WT (WT5F) or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO5F) fed a fructose 5% diet for 4 weeks or GLUT5_KO mice (GLUT5_KO0F) fed a control diet without any fructose for 4 weeks. * $p < 0.05$: One-way ANOVA followed by Holm-Šidák's multiple comparisons test.

DISCUSSION GENERALE

Nous avons initialement centré nos recherches sur les effets du fructose sur la santé cérébrale chez les mâles adultes. Cependant, il est essentiel d'explorer les effets de ce sucre sur d'autres classes de la population, notamment les femelles. De plus, il est important d'étendre la recherche sur les effets du fructose aux populations vulnérables aux troubles émotionnels, telles que les personnes âgées et les adolescents. Une approche holistique de la recherche sur le fructose permettrait de mieux comprendre ses impacts sur la santé à différentes étapes de la vie et chez différentes populations, ce qui permettrait d'autant plus améliorer et préciser les recommandations nutritionnelles et les politiques de santé publique relatives à ce sucre.

Certaines études précliniques se sont intéressées aux effets du fructose sur la santé cérébrale des femelles. Elles ont révélé qu'un régime enrichi en fructose induisait des comportements dépressifs plus marqués chez les femelles que chez les mâles (De Souza et al., 2021 ; Kloster et al., 2021). Ces résultats sont en accord avec des études cliniques et précliniques montrant un risque plus élevé de présenter des troubles dépressifs chez les femelles que chez les mâles (Eid et al., 2019). Il serait donc intéressant d'étudier si les effets d'un régime enrichi en fructose sur le comportement pseudo-dépressif des femelles pourrait impliquer les microglies et ainsi être prévenu dans notre modèle génétique GLUT5-KD. De plus, des études menées chez la souris ont révélé des différences notables dans les microglies en fonction du sexe, tant pendant qu'après le développement (Colonna & Butovsky, 2017). Par exemple, les souris mâles présentent davantage de microglies dans l'hippocampe au cours du développement postnatal précoce que les souris femelles. En revanche, à l'âge adulte, les souris femelles présentent significativement plus de microglies dans l'hippocampe que les souris mâles. Ainsi, des perturbations de la fonction des microglies pourraient avoir des répercussions plus importantes chez les femelles au vu de leur densité. Des études ont

également montré que les microglies mâles et femelles diffèrent dans leurs profils transcriptomiques, protéomiques et morphologiques (Paolicelli et al., 2022). Notamment, il semblerait que l'expression de gènes de la fonction inflammatoire des microglies soit différente entre les mâles et les femelles, bien que les études divergent à ce sujet (Thion et al., 2018 ; Villa et al., 2018). Ainsi, il est possible que le fructose impacte différemment les cellules microgliales selon le sexe. Explorer davantage cet aspect permettraient de mieux caractériser les effets d'une consommation de fructose sur les microglies, et leurs conséquences sur la santé cérébrale des animaux. Cela pourrait également apporter un éclairage sur les différences comportementales observées entre les mâles et les femelles sous régime fructose.

Parmi les études précliniques, nous observons également une vulnérabilité des animaux placés sous régime enrichi en fructose pendant l'adolescence. En effet, une étude a en particulier comparé l'effet sur les comportements émotionnels de rats exposés à un régime à 55% de fructose dans la nourriture pendant 8 semaines, débuté pendant l'adolescence ou pendant l'âge adulte (Harrell et al., 2015). Cette étude révèle des comportements pseudo-dépressifs uniquement chez les animaux ayant débuté le régime pendant l'adolescence, et non chez les animaux ayant débuté le régime chez l'adulte. Ces résultats sont particulièrement intéressants car les adolescents, avec les enfants, représentent la classe de la population consommant le plus de sucres (ANSES), et donc la plus exposées aux effets du fructose. De plus, les adolescents sont particulièrement vulnérables aux troubles émotionnels (Lee et al., 2014). Ainsi, explorer les effets du fructose chez les adolescents pourrait revêtir d'une importance capitale en enrichissant notre compréhension des mécanismes mis en jeu. Cela pourrait conduire à des recommandations plus précises et à des interventions ciblées pour promouvoir une alimentation saine auprès des plus jeunes.

Il est intéressant de noter que malgré l'importance croissante des études sur la consommation de fructose et la santé cérébrale, il semble y avoir un manque de recherche spécifique sur les effets du fructose chez les sujets âgés. Cette lacune est d'autant plus préoccupante compte tenu du fait que les troubles de l'humeur sont fréquents chez les

personnes âgées et que leur prévalence augmente avec le vieillissement de la population (Valiengo et al., 2016). Néanmoins, il est vrai que les personnes âgées ont tendance à consommer moins de sucres que les jeunes, ce qui pourrait réduire leur exposition au fructose (ANSES). Cependant, il est également important de prendre en compte les changements physiologiques qui surviennent avec l'âge. Par exemple, une réduction de l'absorption intestinale a été montrée chez les personnes âgées (Drozdowski & Thomson, 2006). Par conséquent une absorption moins efficace du fructose par l'intestin pourrait d'autant plus influencer le microbiote intestinal, dont nous avons montré qu'il joue un rôle crucial dans la santé du cerveau. Également, une diminution avec l'âge des capacités de clearance hépatique a été montrée (Schmucker, 2001). Un défaut du métabolisme du fructose par le foie pourrait entraîner une augmentation du fructose dans le corps, le rendant plus disponible pour agir sur d'autres organes et donc avoir des conséquences potentielles sur la santé cérébrale. Par conséquent, étudier les effets du fructose dans cette classe de la population permettrait d'approfondir nos connaissances et d'apporter de nouvelles données pour améliorer les recommandations alimentaires.

Par ailleurs, les personnes âgées sont particulièrement vulnérables aux maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Liu, 2022). De plus en plus d'études font le lien entre la consommation de fructose et le développement de la maladie d'Alzheimer (Johnson et al., 2020 ; Johnson et al., 2023 ; Spagnuolo et al., 2021). Des études cliniques ont révélé qu'une consommation de fructose était associée avec une augmentation du risque de développer une démence, et en particulier une démence dû à la maladie d'Alzheimer (Yan et al., 2023). De plus, des études précliniques ont révélé chez des animaux nourris au fructose à long-terme, une accumulation de peptides A β , ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau, qui sont deux mécanismes clef de la maladie d'Alzheimer (Luo et al., 2011 ; Mohamed et al., 2020 ; Mohamed et al., 2021). Des altérations similaires ont également été rapportées dans des modèles de régime riche en gras et en sucres, sans qu'un nutriment en particulier n'ait pu être incriminé (Niu et al., 2016). Par conséquent, il est

possible que le fructose puisse accélérer la neurodégénérescence en impactant les fonctions microgliales. En soutien de cette hypothèse, nous avons révélé une augmentation de l'expression de gènes associés à une signature microgliale neurodégénérative (DAM/MGnD) dans notre modèle murin de malabsorption du fructose. De plus, des études ont montré que l'expression de GLUT5 était diminuée dans les microglies issues de modèles animaux de maladies neurodégénératives, dont des modèles de la maladie d'Alzheimer (Butovsky et al., 2014 ; Krasemann et al., 2017). Ainsi, GLUT5 en tant que gène homéostatique (Butovsky et al., 2014), pourrait influencer les effets du fructose dans le contexte des maladies neurodégénératives.

En conclusion, les données de la littérature soulignent la nécessité de mener des études cliniques et précliniques afin de mieux comprendre les effets du fructose sur la neuroinflammation et la santé cérébrale, en tenant compte des variations liées au sexe et à l'âge.

Les travaux de cette thèse ont mis en lumière l'impact du fructose sur la santé à travers l'induction de troubles métaboliques, d'une dysbiose intestinale et la perturbation des microglies. Ces trois facteurs peuvent, ensemble ou individuellement, contribuer au développement de troubles de l'humeur et de la cognition (Cryan et al., 2019 ; Martin et al., 2021 ; Munshi et al., 2020). Les recherches menées ont révélé l'implication clef des microglies et du microbiote intestinal dans l'établissement de ces troubles. En identifiant les acteurs par lesquels le fructose exerce ses effets sur la santé cérébrale, ces résultats offrent une compréhension plus approfondie des effets du fructose, ce qui permet d'améliorer la communication envers le grand public sur ses risques et de guider des politiques de santé publique vers des recommandations plus ciblées. Pour aller plus loin dans la discrimination des acteurs impliqués dans les effets cérébraux du fructose, nous proposons de réaliser des transferts de microbiote de souris nourries au fructose à des souris receveuses sous régime standard. Le microbiote issu de patients mal-absorbant le fructose serait également transféré

à des souris receveuses. Grâce à ces expérimentations, nous étudierons si un changement dans la composition du microbiote, induit par une alimentation enrichie en fructose ou une malabsorption du fructose, est suffisant pour conduire à des troubles émotionnels et cognitifs, révélant leur rôle clef dans ce processus.

De nombreuses questions restent en suspens quant aux effets du fructose sur la santé cérébrale chez l'Homme. Pour y répondre, des études cliniques seraient nécessaires. Pour des raisons éthiques, il n'est pas envisageable de donner volontairement du fructose à des participants dans le cadre d'une étude clinique, surtout si cela pourrait avoir des conséquences néfastes sur leur santé. Cependant, une étude observationnelle pourrait être menée pour examiner les associations entre la consommation habituelle de fructose et les fonctions cognitives et émotionnelles. Nous pourrions recueillir des données sur les habitudes alimentaires des participants grâce à l'utilisation de journaux de suivi alimentaire et les corrélérer avec leurs performances cognitives et leur bien-être émotionnel mesurées par des tests neuropsychologiques standardisés. Bien qu'une telle étude reflète les conditions de la vie quotidienne des participants, ce qui rend les résultats potentiellement plus généralisables à la population générale, les données obtenues permettent uniquement de souligner une association entre la consommation de fructose et l'humeur ou la mémoire.

Une étude interventionnelle de réduction de la consommation de fructose pourrait être envisagée pour étudier les effets de cette réduction sur l'humeur et la mémoire chez l'Homme. Pour ce faire des volontaires sains seraient recrutés pour participer à l'étude. Ils devraient être préalablement identifiés comme consommant régulièrement des quantités significatives de fructose dans leur alimentation quotidienne. Les participants seraient assignés de manière aléatoire à deux groupes. Le premier groupe consommerait un régime contrôle, équivalent à leur régime habituel, tandis que le second groupe serait soumis à un régime limitant spécifiquement la consommation de fructose. Les deux régimes seraient normalisés dans leur composition en fibres alimentaires. Dans l'idéal et avec des fonds illimités, compte tenu des

effets à long terme du fructose, les volontaires sains seraient suivis sur 6 mois. Leur humeur, leur cognition, leur microbiote, leurs paramètres métaboliques glucidiques et lipidiques, ainsi que leur taux sanguin de LPS pour mesurer leur inflammation périphérique seraient analysés au moment de l'inclusion, puis 2, 4 et 6 mois après l'inclusion pour suivre l'évolution au long-terme des effets de l'intervention. Des tests neuropsychologiques standardisés, des questionnaires sur l'humeur, du séquençage 16S du microbiote fécal et des dosages biologiques seraient utilisés pour recueillir ces données. En parallèles, des imageries en tomographie par émission de positron (TEP) ou des imageries par résonance magnétique (IRM) nous permettraient d'évaluer la morphologie et la densité des microglies (Garcia-Hernandez et al., 2022 ; Hafizi et al., 2017). De cette façon, nous espérons soulever un lien de causalité entre une consommation de fructose et des troubles de l'humeur et de la cognition. Nous espérons également révéler l'implication de l'un ou plusieurs facteurs clés dans l'établissement de ces troubles, entre les microglies, le microbiote ou le métabolisme.

Un facteur important à prendre en compte lors de l'étude des effets du fructose est la forme par laquelle le fructose est consommée. En effet, une récente étude a démontré qu'une consommation enrichie en fructose (100g de fructose) apporté par du HFCS induit une dysbiose intestinale avec une diminution de l'abondance des bactéries du phylum *Firmicutes* et une augmentation de l'abondance des bactéries du phylum *Bacteroidetes* (Beisner et al., 2020). En revanche, une même consommation de 100g de fructose apporté par des fruits à montrer un effet inverse sur la composition bactérienne du microbiote, avec une augmentation de l'abondance des *Firmicutes* et une diminution de l'abondance des *Bacteroidetes* (Beisner et al., 2020). Les auteurs avancent un effet bénéfique de l'apport de fibres alimentaires par les fruits pour expliquer les effets des régimes sur le microbiote intestinal. D'autre part, les résultats d'une méta-analyse révèlent une association positive entre la consommation de boissons sucrées et le risque de développer un syndrome métabolique (Semnani-Azad et al., 2020). De plus, cette association ne s'étend pas à d'autres sources alimentaires de sucres

contenant du fructose, avec une association négative pour la consommation de fruits (Semnani-Azad et al., 2020). Ces résultats sont cohérents avec une autre étude démontrant que l'apport de sucres liquides conduit à un plus grand risque de développer un syndrome métabolique qu'une consommation de sucres solides (Sundborn et al., 2019). Les auteurs proposent que les effets délétères des boissons sucrées soient dus à la rapidité d'absorption et de métabolisation du fructose lorsqu'il est apporté sous forme liquide. En somme, ces données soulignent l'importance cruciale de considérer dans l'évaluation de ses effets sur la santé, non seulement la quantité, mais également de la qualité du fructose consommé

En France, le sucre de betterave représente la grande majorité des sucres consommés (Cultures Sucre). Jusqu'en 2017, une politique agricole commune européenne a historiquement protégé l'industrie européenne de la betterave sucrière grâce à des quotas qui ont maintenu les prix des matières premières à un niveau élevé et empêché les importations étrangères (Aguirre et al., 2015). L'Union Européenne (UE) a également maintenu un plafond de production du HFCS à environ 5 % de toute la production de sucre, offrant ainsi des protections supplémentaires à l'industrie européenne de la betterave sucrière en empêchant le remplacement à grande échelle du saccharose par ce sirop (Aguirre et al., 2015). Ainsi, la libéralisation du marché depuis 2017 se traduit par la possibilité de produire et d'exporter sans contraintes de volumes, mais également permet une plus grande production du HFCS. Par conséquent, suite à la suppression des quotas sucriers, le ministère de l'Agriculture et du Développement rural de la Commission Européenne a estimé que la production de HFCS passera de moins de 4 % à environ 10 % du marché des édulcorants en 2026 dans l'ensemble de l'UE (Commission européenne, 2018). Néanmoins, nous ne disposons aujourd'hui pas de données quant à l'utilisation précise du HFCS en Europe ou en France.

Face à l'évolution de la consommation du fructose (quantitativement et qualitativement), de nouvelles recommandations alimentaires plus précises mériteraient d'être apportées. Par exemple, notre étude clinique a révélé qu'une consommation moyenne de 30g de fructose par jour était suffisante pour perturber le microbiote intestinal chez les individus

présentant une malabsorption du fructose, et entrainer une augmentation des traits anxieux. Ainsi, sur la base de ces données, nous pourrions suggérer d'abaisser la recommandation actuelle de 50g de fructose par jour à 30g de fructose par jour, soit 60g de sucres totaux par jour. Cette proposition est d'autant plus pertinente que la moitié de la population est malabsorbante pour le fructose et est donc exposée aux conséquences de cette malabsorption (Jones et al., 2011). De plus, cette proposition est en adéquation avec les politiques des autorités sanitaires telles que l'ANSES et l'OMS qui recommandent une réduction globale de la consommation de sucre. Elle s'inscrit également parfaitement dans les recommandations du Programme National Nutrition Santé (PNNS) (Figure 49). De cette façon, nous visons à encourager des choix alimentaires plus équilibrés et à réduire les risques associés à une consommation excessive de sucre pour la santé métabolique et cérébrale.

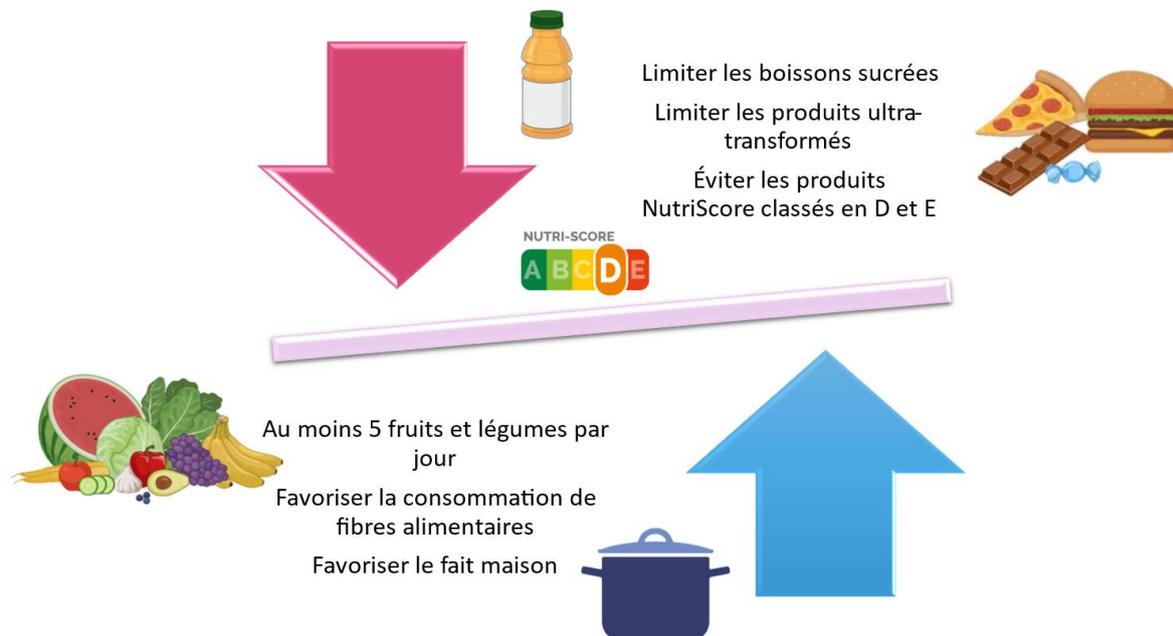


Figure 49 : Recommandations alimentaires du PNNS. (Adapté du PNNS 4).

CONCLUSION

Au cours de ce projet de thèse nous avons démontré premièrement que le fructose pouvait directement impacter et modifier l'état inflammatoire des microglies. Nous avons également confirmé qu'une consommation de fructose conduits à des troubles métaboliques, émotionnels et cognitifs, ainsi qu'à une dysbiose intestinale (Figure 50). De plus, nous avons mis en évidence le rôle clef des microglies et du microbiote intestinal dans le développement des troubles cérébraux causés par la consommation de fructose. Cependant, il reste encore à prouver l'implication des troubles métaboliques résultant de la consommation de fructose dans l'établissement de ces troubles cérébraux.

L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre les effets du fructose sur la santé cérébrale. Ils s'inscrivent directement dans les recommandations de l'ANSES de mener de nouvelles études pour mieux évaluer la relation entre la consommation de sucres et les pathologies associées. Ainsi, les enjeux de cette thèse sont multiples, tant sur le plan sociétal que sur le plan de la santé publique. En permettant de mieux comprendre les risques associés à une consommation de sucre, nos recherches permettraient d'élaborer des recommandations nutritionnelles et des politiques de santé publique plus efficaces. De plus, nos résultats pourraient contribuer à sensibiliser le public aux dangers d'une consommation de fructose et à promouvoir une alimentation plus saine et équilibrée. Enfin, nos travaux pourraient influencer les décisions politiques en matière de réglementation de l'industrie alimentaire, notamment en vue de réduire la consommation de sucre, mais également pour plus de transparence dans la composition des sucres utilisés.

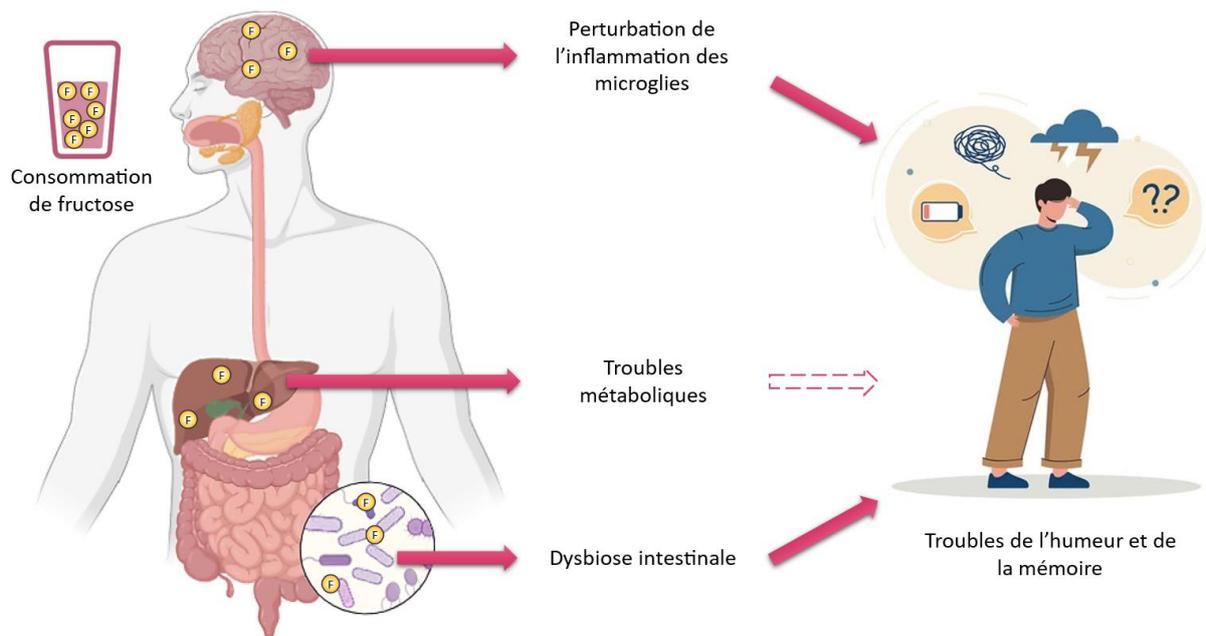


Figure 50 : Bilan des effets d'une consommation de fructose sur la santé cérébrale.

REFERENCES

A

Aguirre, E. K., Mytton, O. T., & Monsivais, P. (2015). Liberalising agricultural policy for sugar in Europe risks damaging public health. *BMJ* (Online), 351. <https://doi.org/10.1136/bmj.h5085>

Akhavan, T., & Anderson, H. (2007). Effects of glucose-to-fructose ratios in solutions on subjective satiety, food intake, and satiety hormones in young men 1-3. In *Am J Clin Nutr* (Vol. 86). <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/86/5/1354/4650858>

Albenberg, L. G., & Wu, G. D. (2014). Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*, 146(6), 1564–1572. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.058>

Al-Mansoori, L., Al-Jaber, H., Prince, M. S., & Elrayess, M. A. (2022). Role of Inflammatory Cytokines, Growth Factors and Adipokines in Adipogenesis and Insulin Resistance. In *Inflammation* (Vol. 45, Issue 1, pp. 31–44). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01559-z>

Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 6, pp. 335–346). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.45>

Andres-Hernando, A., Li, N., Cicerchi, C., Inaba, S., Chen, W., Roncal-Jimenez, C., Le, M. T., Wempe, M. F., Milagres, T., Ishimoto, T., Fini, M., Nakagawa, T., Johnson, R. J., & Lanasa, M. A. (2017). Protective role of fructokinase blockade in the pathogenesis of acute kidney injury in mice. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14181>

Andrews, P., & Johnson, R. J. (2020). Evolutionary basis for the human diet: consequences for human health. *Journal of Internal Medicine*, 287(3), 226–237. <https://doi.org/10.1111/joim.13011>

Arora, T., & Bäckhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *Journal of Internal Medicine*, 280(4), 339–349. <https://doi.org/10.1111/joim.12508>

Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E., & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: Health and disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427>

Assier, E., Boissier, M. C., & Dayer, J. M. (2010). Interleukine-6 : de la découverte de la cytokine au développement d'un traitement ciblé. *Revue Du Rhumatisme (Edition Francaise)*, 77, S16–S22. [https://doi.org/10.1016/S1169-8330\(10\)70004-1](https://doi.org/10.1016/S1169-8330(10)70004-1)

Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., & Yirmiya, R. (2003). Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus*, 13(7), 826–834. <https://doi.org/10.1002/hipo.10135>

B

Bartley, C., Brun, T., Oberhauser, L., Grimaldi, M., Molica, F., Kwak, B. R., Bosco, D., Chanson, M., & Maechler, P. (2019). Chronic fructose renders pancreatic beta-cells hyper-responsive to glucose-stimulated insulin secretion through extracellular ATP signaling. www.physiology.org/journal/ajpendo

Bazan JF., Bacon KB., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D., Zlotnik A., & Schall TJ. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385.

Bedolla, A., Mckinsey, G., Ware, K., Santander, N., Arnold, T., & Luo, Y. (2023). Finding the right tool: a comprehensive evaluation of microglial inducible cre mouse models. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.17.536878>

Beisner, J., Gonzalez-Granda, A., Basrai, M., Damms-Machado, A., & Bischoff, S. C. (2020). Fructose-induced intestinal microbiota shift following two types of short-term high-fructose dietary phases. *Nutrients*, 12(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu12113444>

Benardout, M., Le Gresley, A., Elshaer, A., & Wren, S. P. (2022). Fructose malabsorption: causes, diagnosis and treatment. In *British Journal of Nutrition* (Vol. 127, Issue 4, pp. 481–489). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001215>

Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), E1738–E1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>

Biesiekierski, J. R. (2014). Fructose-induced symptoms beyond malabsorption in FGID. *United European Gastroenterology Journal*, 2(1), 10–13. <https://doi.org/10.1177/2050640613510905>

Bluthé, R. M., Dantzer, R., & Kelley, K. W. (1992). Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Research*, 573(2), 318–320. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90779-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90779-9)

Bouguiyou, N., Roulet, F., Bronchti, G., Frasnelli, J., & Al Aïn, S. (2022). Anxiety and Depression Assessments in a Mouse Model of Congenital Blindness. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.807434>

Brand-Miller, J. C., Stockmann, K., Atkinson, F., Petocz, P., & Denyer, G. (2009). Glycemic index, postprandial glycemia, and the shape of the curve in healthy subjects:

Analysis of a database of more than 1000 foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(1), 97–105. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26354>

Brionne, T. C., Tesseur, I., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2003). Loss of TGF- β 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, 40(6), 1133–1145. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00766-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00766-9)

Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 17(1), 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>

Butovsky, O., & Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 622–635. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>

C

Cai, Z., Ye, T., Xu, X., Gao, M., Zhang, Y., Wang, D., Gu, Y., Zhu, H., Tong, L., Lu, J., Chen, Z., & Huang, C. (2020). Antidepressive properties of microglial stimulation in a mouse model of depression induced by chronic unpredictable stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109931>

Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 11, Issue 10, pp. 577–591). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>

Cao, P., Chen, C., Liu, A., Shan, Q., Zhu, X., Jia, C., Peng, X., Zhang, M., Farzinpour, Z., Zhou, W., Wang, H., Zhou, J. N., Song, X., Wang, L., Tao, W., Zheng, C., Zhang, Y., Ding,

Y. Q., Jin, Y., ... Zhang, Z. (2021). Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. *Neuron*, 109(16), 2573-2589.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.012>

Capuron, L., & Castanon, N. (2017). Role of inflammation in the development of neuropsychiatric symptom domains: Evidence and mechanisms. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 31, pp. 31–44). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/7854_2016_14

Carbajosa, G., Malki, K., Lawless, N., Wang, H., Ryder, J. W., Wozniak, E., Wood, K., Mein, C. A., Dobson, R. J. B., Collier, D. A., O'Neill, M. J., Hodges, A. K., & Newhouse, S. J. (2018). Loss of Trem2 in microglia leads to widespread disruption of cell coexpression networks in mouse brain. *Neurobiology of Aging*, 69, 151–166. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.019>

Cardona, A. E., Piro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D. R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J. C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, 9(7), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>

Castanon, N., Luheshi, G., & Layé, S. (2015). Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00229>

Cha, S. H., Wolfgang, M., Tokutake, Y., Chohnan, S., & Daniel Lane, M. (2008). Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. In *PNAS November* (Vol. 4). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0809255105

Chakrabarty, P., Jansen-West, K., Beccard, A., Ceballos-Diaz, C., Levites, Y., Verbeeck, C., Zubair, A. C., Dickson, D., Golde, T. E., & Das, P. (2010). Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition in vivo: evidence against inflammation as

a driving force for amyloid deposition. *The FASEB Journal*, 24(2), 548–559.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-141754>

Charrez, B., Qiao, L., & Hebbard, L. (2015). The role of fructose in metabolism and cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 22(2), 79–89.
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0009>

Chen, W. L., Wang, Y. Y., Zhao, A., Xia, L., Xie, G., Su, M., Zhao, L., Liu, J., Qu, C., Wei, R., Rajani, C., Ni, Y., Cheng, Z., Chen, Z., Chen, S. J., & Jia, W. (2016). Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential. *Cancer Cell*, 30(5), 779–791.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.006>

Cheng, J., Palva, A. M., De Vos, W. M., & Satokari, R. (2013). Contribution of the intestinal microbiota to human health: From birth to 100 years of age. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 323–346. https://doi.org/10.1007/82_2011_189

Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2015). Arginase 1+ microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0411-8>

Chung, Y. C., Jin, H. M., Cui, Y., Kim, D. S., Jung, J. M., Park, J. H., Jung, E. S., Choi, E. K., & Chae, S. W. (2014). Fermented milk of *Lactobacillus helveticus* IDCC3801 improves cognitive functioning during cognitive fatigue tests in healthy older adults. *Journal of Functional Foods*, 10, 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.007>

Cigliano, L., Spagnuolo, M. S., Crescenzo, R., Cancelliere, R., Iannotta, L., Mazzoli, A., Liverini, G., & Iossa, S. (2017). Short-Term Fructose Feeding Induces Inflammation and Oxidative Stress in the Hippocampus of Young and Adult Rats. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 2869–2883. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0518-2>

Cisternas, P., Salazar, P., Serrano, F. G., Montecinos-Oliva, C., Arredondo, S. B., Varela-Nallar, L., Barja, S., Vio, C. P., Gomez-Pinilla, F., & Inestrosa, N. C. (2015). Fructose

consumption reduces hippocampal synaptic plasticity underlying cognitive performance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(11), 2379–2390. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.016>

Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 35, pp. 441–468). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>

Cryan, J. F., O’riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

Cummings, B. P., Stanhope, K. L., Graham, J. L., Evans, J. L., Baskin, D. G., Griffen, S. C., & Havel, P. J. (2010). Dietary fructose accelerates the development of diabetes in UCD-T2DM rats: amelioration by the antioxidant, -lipoic acid. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298, 1343–1350. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00468.2009.-Sustained>

Cunningham, C. L., Martínez-Cerdeño, V., & Noctor, S. C. (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(10), 4216–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013>

Cussotto, S., Sandhu, K. V., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). The Neuroendocrinology of the Microbiota-Gut-Brain Axis: A Behavioural Perspective. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 51, 80–101. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.04.002>

D

De Palma, G., Lynch, M. D. J., Lu, J., Dang, V. T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P. M., Pastor, M. P., Sidani, S., Pinto-Sanchez, M. I., Philip, V., McLean, P. G.,

Hagelsieb, M. G., Surette, M. G., Bergonzelli, G. E., Verdu, E. F., Britz-McKibbin, P., Neufeld, J. D., ... Bercik, P. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Science Translational Medicine*, 9(379), 1–15. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6397>

De Souza, L., Barros, W. de M., De Souza, R. M., Delanogare, E., Machado, A. E., Braga, S. P., Rosa, G. K., Nardi, G. M., Rafacho, A., Speretta, G. F. F., & Moreira, E. L. G. (2021). Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral parameters of male and female mice. *Physiology and Behavior*, 228(August 2020), 113187. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113187>

DeBosch, B. J., Chi, M., & Moley, K. H. (2012). Glucose transporter 8 (GLUT8) regulates enterocyte fructose transport and global mammalian fructose utilization. *Endocrinology*, 153(9), 4181–4191. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1541>

Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., & Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14(3–4), 193–209. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00021-2)

Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2018). Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *Journal of Visualized Experiments*, 141. <https://doi.org/10.3791/58593>

Dinareello, C. A. (1996). Biologic Basis for Interleukin-I in Disease. In *The Journal of The American Society of Hematology* (Vol. 87, Issue 6).

Dinesh Babu, K. S., Janakiraman, V., Palaniswamy, H., Kasirajan, L., Gomathi, R., & Ramkumar, T. R. (2022). A short review on sugarcane: its domestication, molecular manipulations and future perspectives. In *Genetic Resources and Crop Evolution* (Vol. 69, Issue 8, pp. 2623–2643). Institute for Ionics. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01430-6>

DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139(S2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

Djordjevic, A., Bursać, B., Veličković, N., Vasiljević, A., & Matić, G. (2015). The impact of different fructose loads on insulin sensitivity, inflammation, and PSA-NCAM-mediated plasticity in the hippocampus of fructose-fed male rats. *Nutritional Neuroscience*, 18(2), 66–75. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000098>

Do, M. H., Lee, E., Oh, M. J., Kim, Y., & Park, H. Y. (2018). High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/nu10060761>

Doerge, H., Schürmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., & Joost, H. G. (2000). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16275–16280. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16275>

Donat, C. K., Scott, G., Gentleman, S. M., & Sastre, M. (2017). Microglial activation in traumatic brain injury. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00208>

Dos Santos, B., Schmitz, A. E., de Almeida, G. R. L., de Souza, L. F., Szczepanik, J. C., Nunes, E. A., Brunetta, H. S., Mack, J. M., Prediger, R. D., Cunha, M. P., & Dafre, A. L. (2020). Fructose Intake Impairs Cortical Antioxidant Defenses Allied to Hyperlocomotion in Middle-Aged C57BL/6 Female Mice. *Neurochemical Research*, 45(12), 2868–2883. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03135-7>

Douard, V., & Ferraris, R. P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(2). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90245.2008>

Drozdowski, L., & Thomson, A. BR. (2006). Aging and the intestine. *World Journal of Gastroenterology*, 12(47), 7578–7584. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i47.7578>

Duhé, R. J., & Farrar, W. L. (1998). Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: How the two-faced god wields a double-edged sword. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.1>

E

Eid, R. S., Gobinath, A. R., & Galea, L. A. M. (2019). Sex differences in depression: Insights from clinical and preclinical studies. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 176, pp. 86–102). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.01.006>

Eisch, A. J., & Petrik, D. (2012). Depression and Hippocampal Neurogenesis: A Road to Remission? In *Science* (Vol. 338, Issue 6103, pp. 68–72). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1222939>

F

Fan, L., Gao, W., Nguyen, V., Jefferson, J. R., Liu, Y., Fan, F., & Roman, R. J. (2020). Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajprenal at Cornell Univ (132.174.252.179).

Fang, S., Wu, Z., Guo, Y., Zhu, W., Wan, C., Yuan, N., Chen, J., Hao, W., Mo, X., Guo, X., Fan, L., Li, X., & Chen, J. (2023). Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1193053>

Faust, T. E., Feinberg, P. A., O'Connor, C., Kawaguchi, R., Chan, A., Strasburger, H., Frosch, M., Boyle, M. A., Masuda, T., Amann, L., Knobloch, K. P., Prinz, M., Schaefer, A., & Schafer, D. P. (2023). A comparative analysis of microglial inducible Cre lines. *Cell Reports*, 42(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113031>

Fergusson, G., Éthier, M., Guévremont, M., Chrétien, C., Attané, C., Joly, E., Fioramonti, X., Prentki, M., Poitout, V., & Alquier, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Molecular Metabolism*, 3(9), 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.006>

Gabbay, K. H. (1973). The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *New England Journal of Medicine*, 288, 831–836.

Galic, S., Fullerton, M. D., Schertzer, J. D., Sikkema, S., Marcinko, K., Walkley, C. R., Izon, D., Honeyman, J., Chen, Z. P., Van Denderen, B. J., Kemp, B. E., & Steinberg, G. R. (2011). Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4903–4915. <https://doi.org/10.1172/JCI58577>

Gambara, S. E., Zubiría, M. G., Portales, A. E., Rey, M. A., Rumbo, M., & Giovambattista, A. (2018). M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.004>

Garcia-Hernandez, R., Cerdán Cerdá, A., Trouve Carpena, A., Drakesmith, M., Koller, K., Jones, D. K., Canals, S., & De Santis, S. (2022). Mapping microglia and astrocyte activation in vivo using diffusion MRI. In *Sci. Adv* (Vol. 8).

Gersch, M. S., Mu, W., Cirillo, P., Reungjui, S., Zhang, L., Roncal, C., Sautin, Y. Y., Johnson, R. J., & Nakagawa, T. (2007). Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(2), 1256–1261. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00181.2007>.

Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>

Ginhoux Florent, Greter Melanie, Leboeuf Marylene, Nandi Sayan, See Peter, Gokhan Solen, Mehler Mark F, Conway Simon J, Guan Lai Ng, Stanley E Richard, Samokhvalov Igor M, & Merad Miriam. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from

primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845.
<https://doi.org/10.1126/science.1194554>

Giri, S., Nath, N., Smith, B., Viollet, B., Singh, A. K., & Singh, I. (2004). 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -4-Ribofuranoside Inhibits Proinflammatory Response in Glial Cells: A Possible Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Journal of Neuroscience*, 24(2), 479–487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4288-03.2004>

Glezer, I., Chernomoretz, A., David, S., Plante, M. M., & Rivest, S. (2007). Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation. *PLoS ONE*, 2(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000310>

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., De Bruijn, M. F., Geissmann, F., & Rodewald, H. R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>

Goran, M. I., Ulijaszek, S. J., & Ventura, E. E. (2013). High fructose corn syrup and diabetes prevalence: A global perspective. *Global Public Health*, 8(1), 55–64. <https://doi.org/10.1080/17441692.2012.736257>

Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., & Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8–10), 1106–1115. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.09.004>

Gritti, D., Delvecchio, G., Ferro, A., Bressi, C., & Brambilla, P. (2021). Neuroinflammation in Major Depressive Disorder: A Review of PET Imaging Studies Examining the 18-kDa Translocator Protein. In *Journal of Affective Disorders* (Vol. 292, pp. 642–651). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.06.001>

Guo, B., Zhang, M., Hao, W., Wang, Y., Zhang, T., & Liu, C. (2023). Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. In *Translational Psychiatry* (Vol. 13, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02297-y>

H

Hafizi, S., Da Silva, T., Gerritsen, C., Kiang, M., Bagby, R. M., Prce, I., Wilson, A. A., Houle, S., Rusjan, P. M., & Mizrahi, R. (2017). Imaging microglial activation in individuals at clinical high risk for psychosis: An in Vivo PET Study with [18F] FEPPA. *Neuropsychopharmacology*, 42(13), 2474–2481. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.111>

Hagemeyer, N., Hanft, K. M., Akritidou, M. A., Unger, N., Park, E. S., Stanley, E. R., Staszewski, O., Dimou, L., & Prinz, M. (2017). Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathologica*, 134(3), 441–458. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1747-1>

Hall, K. D., Ayuketah, A., Brychta, R., Cai, H., Cassimatis, T., Chen, K. Y., Chung, S. T., Costa, E., Courville, A., Darcey, V., Fletcher, L. A., Forde, C. G., Gharib, A. M., Guo, J., Howard, R., Joseph, P. V., McGehee, S., Ouwkerk, R., Raising, K., ... Zhou, M. (2019). Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism*, 30(1), 67-77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008>

Hannou, S. A., Haslam, D. E., McKeown, N. M., & Herman, M. A. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 2, pp. 545–555). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI96702>

Harrell, C. S., Burgado, J., Kelly, S. D., Johnson, Z. P., & Neigh, G. N. (2015). High-fructose diet during periadolescent development increases depressive-like behavior and

remodels the hypothalamic transcriptome in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.025>

Harris Interactive. (2024). Rapport-Toluna-Harris-Enquete-sur-les-Francais-et-l'alimentation-MINEFI-V2.

Harrison, J. K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., Mcnamara ¶, R. K., Streit, W. J., Salafranca, M. N., Adhikari, S., Thompson, D. A., Botti, P., Bacon § †, K. B., & Feng, L. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia (Vol. 95). www.pnas.org.

Hashimoto, K. (2010). Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions *pn_2113* 341..357. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 64, 341–357. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2010.02113.x>

Hayasaki, T., Ishimoto, T., Doke, T., Hirayama, A., Soga, T., Furuhashi, K., Kato, N., Kosugi, T., Tsuboi, N., Lanaspá, M. A., Johnson, R. J., Maruyama, S., & Kadomatsu, K. (2019). Fructose increases the activity of sodium hydrogen exchanger in renal proximal tubules that is dependent on ketohexokinase. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 71, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.017>

Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., & Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1512–1519. <https://doi.org/10.1038/nn1805>

Helsley, R. N., Moreau, F., Gupta, M. K., Radulescu, A., DeBosch, B., & Softic, S. (2020). Tissue-Specific Fructose Metabolism in Obesity and Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 20(11). <https://doi.org/10.1007/s11892-020-01342-8>

Helwig, U., Koch, A. K., Reichel, C., Jessen, P., Büning, J., Schreiber, S., & Langhorst, J. (2021). A Prospective Multicenter Study on the Prevalence of Fructose Malabsorption in Patients with Chronic Inflammatory Bowel Disease. In *Digestion* (Vol. 102, Issue 3, pp. 397–403). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000507851>

Herron, S., Delpech, J. C., Madore, C., & Ikezu, T. (2022). Using mechanical homogenization to isolate microglia from mouse brain tissue to preserve transcriptomic integrity. *STAR Protocols*, 3(4). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101670>

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, & Iwamatsu A. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(doi:10.1038/324073a0), 73–76.

Huang, Y. K., Liu, C. C., Wang, S., Cheng, H. C., Meadows, C., & Chang, K. C. (2022). The Role of Aldose Reductase in Beta-Amyloid-Induced Microglia Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232315088>

Huet, L., Delgado, I., Dexpert, S., Sauvant, J., Aouizerate, B., Beau, C., Forestier, D., Ledaguenel, P., Magne, E., & Capuron, L. (2021). Relationship between body mass index and neuropsychiatric symptoms: Evidence and inflammatory correlates. *Brain, Behavior, and Immunity*, 94, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.031>

Hui, H., Huang, D., Mcarthur, D., Nissen, N., Boros, L. G., Heaney, A. P., & Geffen, D. (2009). Direct Spectrophotometric Determination of Serum Fructose in Pancreatic Cancer Patients From the Divisions of *Endocrinology (Vol. 38, Issue 6). www.pancreasjournal.com

Hwang, J. J., Johnson, A., Cline, G., Belfort-Deaguiar, R., Snegovskikh, D., Khokhar, B., Han, C. S., & Sherwin, R. S. (2015). Fructose levels are markedly elevated in cerebrospinal fluid compared to plasma in pregnant women. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128582>

Hwang, J. J., Jiang, L., Hamza, M., Dai, F., Belfort-DeAguiar, R., Cline, G., Rothman, D. L., Mason, G., & Sherwin, R. S. (2017). The human brain produces fructose from glucose. *JCI Insight*, 2(4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90508>

Hyer, M. M., Dyer, S. K., Kovalchick, L. V., Targett, I., Burns, C. M., Kloster, A., Wegener, A. J., Sanchez, C. S., & Neigh, G. N. (2022). Fructose-Induced Cognitive Impairment

Co-occurs with Morphological Changes in Dendrites and Microglia of Male Rats. *Psychoneuroimmunology Journal*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.32371/pnij/246142>

I

Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A.-M., Pingaud, M., Devers, S., & Belzung, C. (2010). Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. *PLoS ONE*, 5(4), e10404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010404>

J

Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G. J., Birnbaum, M. J., & Rabinowitz, J. D. (2018). The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metabolism*, 27(2), 351-361.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>

Janssen-Duijghuijsen, L., Looijesteijn, E., van den Belt, M., Gerhard, B., Ziegler, M., Ariens, R., Tjoelker, R., & Geurts, J. (2024). Changes in gut microbiota and lactose intolerance symptoms before and after daily lactose supplementation in individuals with the lactase nonpersistent genotype. *American Journal of Clinical Nutrition*, 119(3), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2023.12.016>

Johnson, R. J., Gomez-Pinilla, F., Nagel, M., Nakagawa, T., Rodriguez-Iturbe, B., Sanchez-Lozada, L. G., Tolan, D. R., & Lanaspa, M. A. (2020). Cerebral Fructose Metabolism as a Potential Mechanism Driving Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.560865>

Johnson, R. J., Sánchez-Lozada, L. G., Andrews, P., & Lanaspa, M. A. (2017). Perspective: A historical and scientific perspective of sugar and its relation with obesity and diabetes. *Advances in Nutrition*, 8(3), 412–422. <https://doi.org/10.3945/an.116.014654>

Johnson, R. J., Tolan, D. R., Bredesen, D., Nagel, M., Sánchez-Lozada, L. G., Fini, M., Burtis, S., Lanaspa, M. A., & Perlmutter, D. (2023). Could Alzheimer's disease be a maladaptation of an evolutionary survival pathway mediated by intracerebral fructose and uric acid metabolism? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 117(3), 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2023.01.002>

Jones, B. D. M., Daskalakis, Z. J., Carvalho, A. F., Strawbridge, R., Young, A. H., Mulsant, B. H., & Husain, M. I. (2020). Inflammation as a treatment target in mood disorders: review. *BJPsych Open*, 6(4). <https://doi.org/10.1192/bjo.2020.43>

Jones, H. F., Butler, R. N., & Brooks, D. A. (2011). Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300, 202–206. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00457.2010.-Fructose>

Jones, N., Blagih, J., Zani, F., Rees, A., Hill, D. G., Jenkins, B. J., Bull, C. J., Moreira, D., Bantan, A. I. M., Cronin, J. G., Avancini, D., Jones, G. W., Finlay, D. K., Vousden, K. H., Vincent, E. E., & Thornton, C. A. (2021). Fructose reprogrammes glutamine-dependent oxidative metabolism to support LPS-induced inflammation. *Nature Communications*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21461-4>

Jordão, M. J. C., Sankowski, R., Brendecke, S. M., Sagar, Locatelli, G., Tai, Y. H., Tay, T. L., Schramm, E., Armbruster, S., Hagemeyer, N., Groß, O., Mai, D., Çiçek, Ö., Falk, T., Kerschensteiner, M., Grün, D., & Prinz, M. (2019). Neuroimmunology: Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science*, 363(6425). <https://doi.org/10.1126/science.aat7554>

Jung, S., Bae, H., Song, W. S., & Jang, C. (2022). Dietary Fructose and Fructose-Induced Pathologies. *Annual Review of Nutrition*, 42(56), 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-062220-025831>

K

Kang, R., Gamczyk, M., Lenahan, C., Tang, J., Tan, S., & Zhang, J. H. (2020). The Dual Role of Microglia in Blood-Brain Barrier Dysfunction after Stroke. *Current Neuropharmacology*, 18(12), 1237–1249. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200529150907>

Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017 Jun 15;169(7):1276-1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28602351.

Khan, S., Waliullah, S., Godfrey, V., Khan, A. W., Ramachandran, R. A., Cantarel, B. L., Behrendt, C., Peng, L., Hooper, L. V., & Zaki, H. (2020). Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 12). <http://stm.sciencemag.org/>

Khorshidian, N., Shadnoush, M., Zabihzadeh Khajavi, M., Sohrabvandi, S., Yousefi, M., & Mortazavian, A. M. (2021). Fructose and high fructose corn syrup: are they a two-edged sword? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(5), 592–614. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1862068>

Kim, H., Kim, M., Im, S. K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. In *Laboratory Animal Research* (Vol. 34, Issue 4, pp. 147–159). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>

Kim, Y., Park, S. C., Wolf, B. W., & Hertzler, S. R. (2011). Combination of erythritol and fructose increases gastrointestinal symptoms in healthy adults. *Nutrition Research*, 31(11), 836–841. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.09.025>

Kloster, A., Hyer, M. M., Dyer, S., Salome-Sanchez, C., & Neigh, G. N. (2021). High Fructose Diet Induces Sex-specific Modifications in Synaptic Respiration and Affective-like Behaviors in Rats. *Neuroscience*, 454, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.11.039>

Kofod, J., Elfving, B., Nielsen, E. H., Mors, O., & Köhler-Forsberg, O. (2022). Depression and inflammation: Correlation between changes in inflammatory markers with antidepressant response and long-term prognosis. *European Neuropsychopharmacology*, 54, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.09.006>

Köhler, C. A., Freitas, T. H., Maes, M., de Andrade, N. Q., Liu, C. S., Fernandes, B. S., Stubbs, B., Solmi, M., Veronese, N., Herrmann, N., Raison, C. L., Miller, B. J., Lanctôt, K. L., & Carvalho, A. F. (2017). Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 135(5), 373–387. <https://doi.org/10.1111/acps.12698>

Köhler, C. A., Freitas, T. H., Stubbs, B., Maes, M., Solmi, M., Veronese, N., de Andrade, N. Q., Morris, G., Fernandes, B. S., Brunoni, A. R., Herrmann, N., Raison, C. L., Miller, B. J., Lanctôt, K. L., & Carvalho, A. F. (2018). Peripheral Alterations in Cytokine and Chemokine Levels After Antidepressant Drug Treatment for Major Depressive Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 55, Issue 5, pp. 4195–4206). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0632-1>

Köhler-Forsberg, O., N. Lydholm, C., Hjorthøj, C., Nordentoft, M., Mors, O., & Benros, M. E. (2019). Efficacy of anti-inflammatory treatment on major depressive disorder or depressive symptoms: meta-analysis of clinical trials. In *Acta Psychiatrica Scandinavica* (Vol. 139, Issue 5, pp. 404–419). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/acps.13016>

Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47(3), 566-581.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>

Kummer, K. K., Zeidler, M., Kalpachidou, T., & Kress, M. (2021). Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. *Cytokine*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155582>

L

Larrieu, T., & Layé, S. (2018). Food for mood: Relevance of nutritional omega-3 fatty acids for depression and anxiety. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01047>

Layé, S., Gheusi, G., Cremona, S., Combe, C., Kelley, K., Dantzer, R., Parnet, P., & Parnet Endogenous, P. (2000). Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. In *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* (Vol. 279). <http://www.ajpregu.org>

Layé, S., Parnet, P., Goujon, E., & Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Molecular Brain Research*, 27(1), 157–162. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90197-X](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90197-X)

Lee, F. S., Heimer, H., Giedd, J. N., Lein, E. S., Šestan, N., Weinberger, D. R., & Casey, B. J. (2014). Adolescent mental health-Opportunity and obligation: Emerging neuroscience

offers hope for treatments. *Science*, 346(6209), 547–549.
<https://doi.org/10.1126/science.1260497>

Lee, S., Varvel, N. H., Konerth, M. E., Xu, G., Cardona, A. E., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2010). CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *American Journal of Pathology*, 177(5), 2549–2562. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100265>

Lentze, M. J. (2018). The History of Maltose-active Disaccharidases. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 66.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001960>

Lenz, K. M., & Nelson, L. H. (2018). Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00698>

Levin RJ. (1994). Digestion and absorption of carbohydrates - from molecules and membranes to humans. *Am J Clin Nutr*.

Li, J. M., Ge, C. X., Xu, M. X., Wang, W., Yu, R., Fan, C. Y., & Kong, L. D. (2015). Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(2), 189–202.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201400307>

Li, J. M., Yu, R., Zhang, L. P., Wen, S. Y., Wang, S. J., Zhang, X. Y., Xu, Q., & Kong, L. D. (2019). Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: A benefit of short-chain fatty acids. *Microbiome*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0713-7>

Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 117, Issue 5, pp. 1175–1183). <https://doi.org/10.1172/JCI31537>

Liu, H., Huang, D., McArthur, D. L., Boros, L. G., Nissen, N., & Heaney, A. P. (2010). Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer Research*, 70(15), 6368–6376. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4615>

Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D., & Ma, X. (2018). Butyrate: A double-edged sword for health? In *Advances in Nutrition* (Vol. 9, Issue 1, pp. 21–29). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx009>

Liu, R. M. (2022). Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23041989>

Lubawy, M., & Formanowicz, D. (2023). High-Fructose Diet–Induced Hyperuricemia Accompanying Metabolic Syndrome–Mechanisms and Dietary Therapy Proposals. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 20, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043596>

Luo, D., Hou, X., Hou, L., Wang, M., Xu, S., Dong, C., & Liu, X. (2011). Effect of pioglitazone on altered expression of A β metabolism-associated molecules in the brain of fructose-drinking rats, a rodent model of insulin resistance. *European Journal of Pharmacology*, 664(1–3), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.045>

Luo, S., Monterosso, J. R., Sarpelleh, K., & Page, K. A. (2015). Differential effects of fructose versus glucose on brain and appetitive responses to food cues and decisions for food rewards. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(20), 6509–6514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503358112>

Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003.-One>

M

Malik, V. S., Popkin, B. M., Bray, G. A., Després, J. P., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(11), 2477–2483. <https://doi.org/10.2337/dc10-1079>

Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, & Cheeseman C. (2007). Facilitated Hexose Transporters: New Perspectives on Form and Function. *Physiology*, 22(10.1152/physio.00011.2007), 234–240.

Mansur, R. B., Brietzke, E., & McIntyre, R. S. (2015). Is there a “metabolic-mood syndrome”? A review of the relationship between obesity and mood disorders. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 52, pp. 89–104). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.017>

Martin, H., Bullich, S., Guiard, B. P., & Fioramonti, X. (2021). The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 33, Issue 4). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jne.12928>

Massagué, J., Attisano, L., & Wrana, J. (1994). The TGF-beta family and its composite receptors. In *Wilhelm RouxArch. Develop. BioL* (Vol. 3).

Matsuo, N., Takao, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Tanda, K., & Miyakawa, T. (2010). Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00029>

Mazaheri, F., Snaidero, N., Kleinberger, G., Madore, C., Daria, A., Werner, G., Krasemann, S., Capell, A., Trümbach, D., Wurst, W., Brunner, B., Bultmann, S., Tahirovic, S., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Butovsky, O., & Haass, C. (2017). TREM 2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury . *EMBO Reports*, 18(7), 1186–1198. <https://doi.org/10.15252/embr.201743922>

McCoy, M. K., & Tansey, M. G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-45>

McLarty, J. L., Marsh, S. A., & Chatham, J. C. (2013). Post-translational protein modification by O-linked N-acetyl-glucosamine: Its role in mediating the adverse effects of diabetes on the heart. In *Life Sciences* (Vol. 92, Issue 11, pp. 621–627). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.006>

McQuade, A., Kang, Y. J., Hasselmann, J., Jairaman, A., Sotelo, A., Coburn, M., Shabestari, S. K., Chadarevian, J. P., Fote, G., Tu, C. H., Danhash, E., Silva, J., Martinez, E., Cotman, C., Prieto, G. A., Thompson, L. M., Steffan, J. S., Smith, I., Davtyan, H., ... Blurton-Jones, M. (2020). Gene expression and functional deficits underlie TREM2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19227-5>

Mellor, K. M., Bell, J. R., Wendt, I. R., Davidoff, A. J., Ritchie, R. H., & Delbridge, L. M. D. (2011). Fructose modulates cardiomyocyte excitation-contraction coupling and ca²⁺ handling in vitro. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025204>

Mellor, K. M., Ritchie, R. H., Davidoff, A. J., & Delbridge, L. M. D. (2010). Elevated dietary sugar and the heart: Experimental models and myocardial remodeling. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 88, Issue 5, pp. 525–540). National Research Council of Canada. <https://doi.org/10.1139/Y10-005>

Michaud, D. S., Liu, S., Giovannucci, E., Willett, W. C., Colditz, G. A., & Fuchs, C. S. (2002). Dietary Sugar, Glycemic Load, and Pancreatic Cancer Risk in a Prospective Study. <http://jnci.oxfordjournals.org/>

Miller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., & Felger, J. C. (2013). Cytokine targets in the brain: Impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depression and Anxiety*, 30(4), 297–306. <https://doi.org/10.1002/da.22084>

Miller G. (2005). The dark side of glia. *Science*, 308, 778–781.

Mizunashi, K., Chaya, T., Kanamoto, T., Omori, Y., & Furukawa, T. (2015). Obif, a transmembrane protein, is required for bone mineralization and spermatogenesis in mice. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133704>

Mizuno, T. M., Lew, P. S., & Jhanji, G. (2021). Regulation of the fructose transporter gene *Slc2a5* expression by glucose in cultured microglial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312668>

Mohamed, H. E., Asker, M. E., Shaheen, M. A., Eissa, R. G., & Younis, N. N. (2021). Alleviation of fructose-induced Alzheimer's disease in rats by pioglitazone and decaffeinated green coffee bean extract. *Journal of Food Biochemistry*, 45(5). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13715>

Mohamed, H. E., Asker, M. E., Younis, N. N., Shaheen, M. A., & Eissa, R. G. (2020). Modulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease: New insight on the protective role of green coffee bean extract. *Nutritional Neuroscience*, 23(1), 27–36. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1468535>

Montrose, D. C., Nishiguchi, R., Basu, S., Staab, H. A., Zhou, X. K., Wang, H., Meng, L., Johncilla, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Morales, D. K., Wells, M. T., Simpson, K. W., Zhang, S., Dogan, B., Jiao, C., Fei, Z., Oka, A., Herzog, J. W., Sartor, R. B., & Dannenberg, A. J. (2021). Dietary Fructose Alters the Composition, Localization, and Metabolism of Gut Microbiota in Association With Worsening Colitis. *CMGH*, 11(2), 525–550. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.09.008>

Morillas, A. G., Besson, V. C., & Lerouet, D. (2021). Microglia and neuroinflammation: What place for p2ry12? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 4, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22041636>

Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)

Munshi, S., Loh, M. K., Ferrara, N., DeJoseph, M. R., Ritger, A., Padival, M., Record, M. J., Urban, J. H., & Rosenkranz, J. A. (2020). Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 84, 180–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.11.023>

N

Nicholson, A., Reifsnnyder, P. C., Malcolm, R. D., Lucas, C. A., MacGregor, G. R., Zhang, W., & Leiter, E. H. (2010). Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity*, 18(10), 1902–1905. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.477>

Nishiguchi, R., Basu, S., Staab, H. A., Ito, N., Zhou, X. K., Wang, H., Ha, T., Johncilla, M., Yantiss, R. K., Montrose, D. C., & Dannenberg, A. J. (2021). Dietary interventions to prevent high-fructose diet-associated worsening of colitis and colitis-associated tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis*, 42(6), 842–852. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab007>

Niu, L., Han, D. W., XU, R. L., Han, B., Zhou, X., Wu, H. W., Li, S. H., Qu, C. X., & Liu, M. (2016). A high-sugar high-fat diet induced metabolic syndrome shows some symptoms of Alzheimer's disease in rats. *J Nutr Health Aging*, 20(5), 509–513.

Noble, E. E., Hsu, T. M., Jones, R. B., Fodor, A. A., Goran, M. I., & Kanoski, S. E. (2017). Early-life sugar consumption affects the rat microbiome independently of obesity. *Journal of Nutrition*, 147(1), 20–28. <https://doi.org/10.3945/jn.116.238816>

O

O'Callaghan, J. P., Sriram, K., & Miller, D. B. (2008). Defining "Neuroinflammation." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139(1), 318–330. <https://doi.org/10.1196/annals.1432.032>

Organisation mondiale de la Santé. (2023). Apport en glucides chez l'adulte et l'enfant : résumé de la ligne directrice de l'OMS.

Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 173, Issue 4, pp. 649–665). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>

Osimo, E. F., Pillinger, T., Rodriguez, I. M., Khandaker, G. M., Pariante, C. M., & Howes, O. D. (2020). Inflammatory markers in depression: A meta-analysis of mean differences and variability in 5,166 patients and 5,083 controls. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 87, pp. 901–909). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.02.010>

Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., & Abdelmalek, M. F. (2008). Fructose Consumption as a Risk Factor for Non-alcoholic Fatty Liver Disease.

P

Page, K. A., Chan, O., Cline, G. W., Naik, S., Constable, R. T., & Sherwin, R. S. (2013). Effects of Fructose vs Glucose on Regional Cerebral Blood Flow in Brain Regions Involved With Appetite and Reward Pathways. *309*(1), 63–70.

Pan, Y., & Kong, L. D. (2018). High fructose diet-induced metabolic syndrome: Pathophysiological mechanism and treatment by traditional Chinese medicine. In

Pharmacological Research (Vol. 130, pp. 438–450). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.020>

Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>

Parker, K., Salas, M., & Nwosu, V. C. (2010). High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 5(5), 71–78.
<http://www.academicjournals.org/BMBR>

Patel, C., Douard, V., Yu, S., Gao, N., & Ferraris, R. P. (2015). Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *FASEB Journal*, 29(9), 4046–4058. <https://doi.org/10.1096/fj.15-272195>

Pawelec, P., Ziemka-Nalecz, M., Sypecka, J., & Zalewska, T. (2020). The impact of the *cx3cl1/cx3cr1* axis in neurological disorders. In *Cells* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1–17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells9102277>

Pereira, R. M., Botezelli, J. D., da Cruz Rodrigues, K. C., Mekary, R. A., Cintra, D. E., Pauli, J. R., da Silva, A. S. R., Ropelle, E. R., & de Moura, L. P. (2017). Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9040405>

Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., Martin, F. P., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., Traynor, J., Gregory, C., De Palma, G., Pigrau, M., Ford, A. C., Macri, J., Berger, B., Bergonzelli, G., Surette, M. G., ... Bercik, P. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A

Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459.e8.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>

Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 229(2), 327–336.

Portugal-Nunes, C., Reis, J., Coelho, A., Moreira, P. S., Castanho, T. C., Magalhães, R., Marques, P., Soares, J. M., Amorim, L., Cunha, P. G., Santos, N. C., Costa, P., Palha, J. A., Sousa, N., & Bessa, J. M. (2021). The Association of Metabolic Dysfunction and Mood Across Lifespan Interacts With the Default Mode Network Functional Connectivity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.618623>

Q

Qi, P., Xie, C., Guo, B., & Wu, C. (2016). Dissecting the role of transforming growth factor- β 1 in topmouth culter immunobiological activity: A fundamental functional analysis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27179>

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
<https://doi.org/10.1038/nature08821>

R

Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. In *Nature Neuroscience* (Vol. 19, Issue 8, pp. 987–991). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>

Reddy, B. R., Maitra, S., Jhelum, P., Kumar, K. P., Bagul, P. K., Kaur, G., Banerjee, S. K., Kumar, A., & Chakravarty, S. (2016). Sirtuin 1 and 7 mediate resveratrol-induced recovery from hyper-anxiety in high-fructose-fed prediabetic rats. *Journal of Biosciences*, 41(3), 407–417. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9627-8>

Renaud, J., Thérien, H. M., Plouffe, M., & Martinoli, M. G. (2015). Neuro-inflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde? In *Medecine/Sciences* (Vol. 31, Issue 11, pp. 979–988). Editions EDK. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111012>

Roohi, E., Jaafari, N., & Hashemian, F. (2021). On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos? In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02100-7>

Ross, A. P., Bartness, T. J., Mielke, J. G., & Parent, M. B. (2009). A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(3), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.05.007>

Roy, V. K., & Krishna, A. (2013). The expression pattern of the glucose transporter GLUT-5 in the testis during the spermatogenic cycle of the vespertilionid bat *Scotophilus heathi*. *General and Comparative Endocrinology*, 191, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.016>

Rumessen, J. J., & Gudmand-Hoyer, E. (1986). Malabsorption of Fructose-Sorbitol Mixtures Interactions Causing Abdominal Distress.

Sahasrabuddhe, V., & Ghosh, H. S. (2022). Cx3Cr1-Cre induction leads to microglial activation and IFN-1 signaling caused by DNA damage in early postnatal brain. *Cell Reports*, 38(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110252>

Saito, M., Saito, M., & Das, B. C. (2019). Involvement of AMP-activated protein kinase in neuroinflammation and neurodegeneration in the adult and developing brain. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Vol. 77, pp. 48–59). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.01.007>

Sakrajda, K., & Szczepankiewicz, A. (2021). Inflammation-related changes in mood disorders and the immunomodulatory role of Lithium. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 4, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22041532>

Sangüesa, G., Cascales, M., Griñán, C., Sánchez, R. M., Roglans, N., Pallàs, M., Laguna, J. C., & Alegret, M. (2018). Impairment of Novel Object Recognition Memory and Brain Insulin Signaling in Fructose- but Not Glucose-Drinking Female Rats. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6984–6999. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0863-1>

Santarelli, L., Gobbi, G., Debs, P. C., Sibille, E. L., Blier, P., Hen, R., & Heath, M. J. S. (2001). Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1912–1917. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1912>

Sasaki, A., Yamaguchi, H., Horikoshi, Y., Tanaka, G., & Nakazato, Y. (2004). Expression of glucose transporter 5 by microglia in human gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(5), 447–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00556.x>

Schernhammer, E. S., Hu, F. B., Giovannucci, E., Michaud, D. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Fuchs, C. S. (2005). Sugar-sweetened soft drink consumption and risk of

pancreatic cancer in two prospective cohorts. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(9), 2098–2105. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0059>

Schmucker, D. L. (2001). Liver Function and Phase I Drug Metabolism in the Elderly A Paradox. *Drugs Aging*, 18(11), 837–851. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118110-00005>.

Sellami, E., Anhê, G. F., Douard, V., & Anhê, F. F. (2023). The Gut as a Potential Centerpiece in Fructose-Driven Dysmetabolism. *Current Molecular Biology Reports*, 9(4), 44–51. <https://doi.org/10.1007/s40610-023-00156-3>

Semnani-Azad, Z., Khan, T. A., Blanco Mejia, S., De Souza, R. J., Leiter, L. A., Kendall, C. W. C., Hanley, A. J., & Sievenpiper, J. L. (2020). Association of Major Food Sources of Fructose-Containing Sugars with Incident Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open*, 3(7). <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.9993>

Sengar, G., & Sharma, H. K. (2014). Food caramels: a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 51, Issue 9, pp. 1686–1696). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0633-z>

Shemer, A., Grozovski, J., Tay, T. L., Tao, J., Volaski, A., Süß, P., Ardura-Fabregat, A., Gross-Vered, M., Kim, J. S., David, E., Chappell-Maor, L., Thielecke, L., Glass, C. K., Cornils, K., Prinz, M., & Jung, S. (2018). Engrafted parenchymal brain macrophages differ from microglia in transcriptome, chromatin landscape and response to challenge. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07548-5>

Shenkin, A. (2006). Micronutrients in health and disease. In *Postgraduate Medical Journal* (Vol. 82, Issue 971, pp. 559–567). <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047670>

Shoham, D. A., Durazo-Arvizu, R., Kramer, H., Luke, A., Vupputuri, S., Kshirsagar, A., & Cooper, R. S. (2008). Sugary soda consumption and albuminuria: Results from the national

health and nutrition examination survey, 1999-2004. PLoS ONE, 3(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003431>

Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., & Doetschman, T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease [14]. *Nature*, 359(6397), 693–699. <https://doi.org/10.1038/359693a0>

Shuster, J., Jenkins, A., Logan, C., Barnett, T., Riehle, R., Zackson, D., Wolfe, H., Dale, R., Daley, M., Malik, I., Schnarch, S., & Corp, A. (1992). SOFT DRINK CONSUMPTION AND URINARY STONE RECURRENCE: A RANDOMIZED PREVENTION TRIAL. In *J Clin Epidemiol* (Vol. 45, Issue 8).

Sierra, A., Paolicelli, R. C., & Kettenmann, H. (2019). Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 42, Issue 11, pp. 778–792). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.004>

Sievenpiper, J. L., De Souza, R. J., Mirrahimi, A., Yu, M. E., Carleton, A. J., Beyene, J., Chiavaroli, L., Di Buono, M., Jenkins, A. L., Leiter, L. A., Wolever, T. M. S., Kendall, C. W. C., & Jenkins, D. J. A. (2012). Effect of Fructose on Body Weight in Controlled Feeding Trials A Systematic Review and Meta-analysis. www.annals.org

Simon, M. M., Greenaway, S., White, J. K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E. J., Dacquin, R., Djebali, S., Estabel, J., Graw, J., Ingham, N. J., Jackson, I. J., Lengeling, A., Mandillo, S., Marve, J., ... Brown, S. D. M. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biology*, 14(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r82>

Smith, A. P., Sutherl, D., & Hewlett, P. (2015). An investigation of the acute effects of oligofructose-enriched inulin on subjective wellbeing, mood and cognitive performance. *Nutrients*, 7(11), 8887–8896. <https://doi.org/10.3390/nu7115441>

Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 87, Issue 1, pp. 10–20). <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>

Song, G., Gan, Q., Qi, W., Wang, Y., Xu, M., & Li, Y. (2023). Fructose Stimulated Colonic Arginine and Proline Metabolism Dysbiosis, Altered Microbiota and Aggravated Intestinal Barrier Dysfunction in DSS-Induced Colitis Rats. *Nutrients*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/nu15030782>

Spagnuolo, M. S., Iossa, S., & Cigliano, L. (2021). Sweet but bitter: Focus on fructose impact on brain function in rodent models. *Nutrients*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu13010001>

Spittau, B., Dokalis, N., & Prinz, M. (2020). The Role of TGF β Signaling in Microglia Maturation and Activation. *Trends in Immunology*, 41(9), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.003>

Spulber, S., Mateos, L., Oprica, M., Cedazo-Minguez, A., Bartfai, T., Winblad, B., & Schultzberg, M. (2009). Impaired long term memory consolidation in transgenic mice overexpressing the human soluble form of IL-1ra in the brain. *Journal of Neuroimmunology*, 208(1–2), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.01.010>

Stanhope, K. L. (2016). Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 53, Issue 1, pp. 52–67). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1084990>

Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Hatcher, B., Cox, C. L., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J. P., Seibert, A., Krauss, R. M., Chiu, S., Schaefer, E. J., Ai, M., Otokozawa, S., Nakajima, K., Nakano, T., ... Havel, P. J. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1322–1334. <https://doi.org/10.1172/JCI37385>

Steeland, S., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2018). A new venue of TNF targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051442>

Sundborn, G., Thornley, S., Merriman, T. R., Lang, B., King, C., Lanaspá, M. A., & Johnson, R. J. (2019). Are Liquid Sugars Different from Solid Sugar in Their Ability to Cause Metabolic Syndrome? In *Obesity* (Vol. 27, Issue 6, pp. 879–887). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/oby.22472>

Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>

T

Tada, M., Konno, T., Tada, M., Tezuka, T., Miura, T., Mezaki, N., Okazaki, K. ichi, Arakawa, M., Itoh, K., Yamamoto, T., Yokoo, H., Yoshikura, N., Ishihara, K., Horie, M., Takebayashi, H., Toyoshima, Y., Naito, M., Onodera, O., Nishizawa, M., ... Kakita, A. (2016). Characteristic microglial features in patients with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Annals of Neurology*, 80(4), 554–565. <https://doi.org/10.1002/ana.24754>

Tak, P., & Firestein, G. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7–11.

Tappy, L., & Le, K. A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>

Tay, T. L., Mai, D., Dautzenberg, J., Fernández-Klett, F., Lin, G., Sagar, S., Datta, M., Drougard, A., Stempf, T., Ardura-Fabregat, A., Staszewski, O., Margineanu, A., Sporbert, A., Steinmetz, L. M., Pospisilik, J. A., Jung, S., Priller, J., Grün, D., Ronneberger, O., & Prinz, M. (2017). A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nature Neuroscience*, 20(6), 793–803. <https://doi.org/10.1038/nn.4547>

Teff, K. L., Elliott, S. S., Tschöp, M., Kieffer, T. J., Rader, D., Heiman, M., Townsend, R. R., Keim, N. L., D'Alessio, D., & Havel, P. J. (2004). Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2963–2972. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031855>

Theytaz, F., de Giorgi, S., Hodson, L., Stefanoni, N., Rey, V., Schneiter, P., Giusti, V., & Tappy, L. (2014). Metabolic fate of fructose ingested with and without glucose in a mixed meal. *Nutrients*, 6(7), 2632–2649. <https://doi.org/10.3390/nu6072632>

Thion, M. S., Low, D., Silvin, A., Chen, J., Grisel, P., Schulte-Schrepping, J., Blecher, R., Ulas, T., Squarzoni, P., Hoeffel, G., Couplier, F., Siopi, E., David, F. S., Scholz, C., Shihui, F., Lum, J., Amoyo, A. A., Larbi, A., Poidinger, M., ... Garel, S. (2018). Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell*, 172(3), 500-516.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.042>

Thorens, B., & Mueckler, M. (2013). The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(0), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>.The

Ting, E. Y. C., Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2020). Role of interleukin-6 in depressive disorder. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21062194>

Ting, K. K. Y. (2024). Fructose overconsumption-induced reprogramming of microglia metabolism and function. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1375453>

Tirone, T. A., & Brunicardi, F. C. (2001). Overview of glucose regulation. *World Journal of Surgery*, 25(4), 461–467. <https://doi.org/10.1007/s002680020338>

Tobin, V., Gall, M. Le, Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A. G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M. H., Magnan, C., Leturque, A., & Brot-Laroche, E. (2008). Insulin

internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes*, 57(3), 555–562. <https://doi.org/10.2337/db07-0928>

Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B., & Gage, F. H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 24, Issue 1, pp. 67–87). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>

Tran, L. T., Yuen, V. G., & McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: A review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 332(1–2), 145–159. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0184-4>

Turrin, N. P., Gayle, D., Ilyin, S. E., Flynn, M. C., Langhans, W., Schwartz, G. J., & Plata-Salamán, C. R. (2001). Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Research Bulletin*, 54(4), 443–453. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00445-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00445-2)

U

Uher, R., Tansey, K. E., Dew, T., Maier, W., Mors, O., Hauser, J., Zvezdana Dernovsek, M., Henigsberg, N., Souery, D., Farmer, A., & Peter McGuffin, Frcp. (2014). An Inflammatory Biomarker as a Differential Predictor of Outcome of Depression Treatment With Escitalopram and Nortriptyline.

V

Valiengo, L. da C. L., Stella, F., & Forlenza, O. V. (2016). Mood disorders in the elderly: Prevalence, functional impact, and management challenges. In *Neuropsychiatric Disease and*

Treatment (Vol. 12, pp. 2105–2114). Dove Medical Press Ltd.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S94643>

Vallières, L., & Rivest, S. (1997). Regulation of the Genes Encoding Interleukin-6, Its Receptor, and gp130 in the Rat Brain in Response to the Immune Activator Lipopolysaccharide and the Proinflammatory Cytokine Interleukin-1 β .

Ventura, A. K., & Mennella, J. A. (2011). Innate and learned preferences for sweet taste during childhood. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 14, Issue 4, pp. 379–384). <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328346df65>

Vezzani, A., & Viviani, B. (2015). Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. In *Neuropharmacology* (Vol. 96, Issue PA, pp. 70–82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.027>

Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., Lolli, F., Marcello, E., Sironi, L., Vegeto, E., & Maggi, A. (2018). Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Reports*, 23(12), 3501–3511. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.048>

Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Molecular Psychiatry*, 5(6), 604–615. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000813>

Von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>

W

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>

Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482–504.

Wang, C. Y., Chen, Y. W., Tain, Y. L., Chang, S. K. C., Huang, L. T., Hsieh, C. W., & Hou, C. Y. (2020). Fast quantification of short-chain fatty acids in rat plasma by gas chromatography. *Journal of Food Science*, 85(6), 1932–1938. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15172>

Wang, Q., Lu, M., Zhu, X., Gu, X., Zhang, T., Xia, C., Yang, L., Xu, Y., & Zhou, M. (2022). The role of microglia immunometabolism in neurodegeneration: Focus on molecular determinants and metabolic intermediates of metabolic reprogramming. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 153). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113412>

Wang, Y. L., Han, Q. Q., Gong, W. Q., Pan, D. H., Wang, L. Z., Hu, W., Yang, M., Li, B., Yu, J., & Liu, Q. (2018). Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3>

Wang, Z., Lipshutz, A., Liu, Z.-L., Trzeciak, A. J., Miranda, I. C., Martínez de la Torre, C., Schild, T., Lazarov, T., Saitz Rojas, W., V Saavedra, P. H., Romero-Pichardo, J. E., Baako, A., Geissmann, F., Faraco, G., Gan, L., Iker Etchegaray, J., Lucas, C. D., Parkhurst, C. N., Zeng, M. Y., ... Appel Alzheimer, R. (2023). Early life high fructose exposure disrupts microglia function and impedes neurodevelopment. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.14.553242>

Weng, Y., Fan, X., Bai, Y., Wang, S., Huang, H., Yang, H., Zhu, J., & Zhang, F. (2018). SLC2A5 promotes lung adenocarcinoma cell growth and metastasis by enhancing fructose utilization. *Cell Death Discovery*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0038-5>

Więdołcha, M., Marcinowicz, P., Krupa, R., Janoska-Jaździk, M., Janus, M., Dębowska, W., Mosiołek, A., Waszkiewicz, N., & Szulc, A. (2018). Effect of antidepressant treatment on peripheral inflammation markers – A meta-analysis. In *Progress in Neuro-*

Psychopharmacology and Biological Psychiatry (Vol. 80, pp. 217–226). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.026>

Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 79, pp. 619–643). Annual Reviews Inc.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>

Woodburn, S. C., Asrat, H. S., Flurer, J. K., Schwierling, H. C., Bollinger, J. L., Vollmer, L. L., & Wohleb, E. S. (2023). Depletion of microglial BDNF increases susceptibility to the behavioral and synaptic effects of chronic unpredictable stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 109, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.01.014>

Wu, H. W., Ren, L. F., Zhou, X., & Han, D. W. (2015). A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutritional Neuroscience*, 18(7), 323–328.
<https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000133>

Wysokiński, A., Sobów, T., Kłoszewska, I., & Kostka, T. (2015). Mechanisms of the anorexia of aging—a review. *Age*, 37(4). <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9821-x>

X

Xu, M. X., Yu, R., Shao, L. F., Zhang, Y. X., Ge, C. X., Liu, X. M., Wu, W. Y., Li, J. M., & Kong, L. D. (2016). Up-regulated fractalkine (FKN) and its receptor CX3CR1 are involved in fructose-induced neuroinflammation: Suppression by curcumin. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.001>

Y

Yan, J., Zheng, K., Zhang, X., & Jiang, Y. (2023). Fructose Consumption is Associated with a Higher Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Prospective Cohort Study. *J Prev Alzheimers Dis*, 10, 186–192.

Yin, H., Liu, N., & Chen, J. (2022). The Role of the Intestine in the Development of Hyperuricemia. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.845684>

Yin, Q., Ma, Y., Hong, Y., Hou, X., Chen, J., Shen, C., Sun, M., Shang, Y., Dong, S., Zeng, Z., Pei, J. J., & Liu, X. (2014). Lycopene attenuates insulin signaling deficits, oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive impairment in fructose-drinking insulin resistant rats. *Neuropharmacology*, 86, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.020>

Z

Zemdegs, J., Martin, H., Pintana, H., Bullich, S., Manta, S., Marqués, M. A., Moro, C., Laye, S., Ducrocq, F., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C., Rampon, C., Pénicaud, L., Fioramonti, X., & Guiard, B. P. (2019). Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. *Journal of Neuroscience*, 39(30), 5935–5948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2904-18.2019>

Zemdegs, J., Quesseveur, G., Jarriault, D., Pénicaud, L., Fioramonti, X., & Guiard, B. P. (2016). Themed Section: Updating Neuropathology and Neuropharmacology of Monoaminergic Systems High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice LINKED ARTICLES. *British Journal of Pharmacology*, 173, 2095. <https://doi.org/10.1111/bph.v173.13/issuetoc>

Zhang, C., Li, L., Zhang, Y., & Zeng, C. (2020). Recent advances in fructose intake and risk of hyperuricemia. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 131). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110795>

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., ... Douard, V. (2019). Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. *FASEB Journal*, 33(6), 7126–7142. <https://doi.org/10.1096/fj.201801526RR>

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>

Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S. B., Li, G., Duncan, J. A., Cheshier, S. H., Shuer, L. M., Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G. H., & Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 89(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>

Zhao, S., Jang, C., Liu, J., Uehara, K., Gilbert, M., Izzo, L., Zeng, X., Trefely, S., Fernandez, S., Carrer, A., Miller, K. D., Schug, Z. T., Snyder, N. W., Gade, T. P., Titchenell, P. M., Rabinowitz, J. D., & Wellen, K. E. (2020). Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature*, 579(7800), 586–591. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2101-7>

Zhao, X., Eyo, U. B., Murugan, M., & Wu, L. J. (2018). Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. In *Developmental Neurobiology* (Vol. 78, Issue 6, pp. 604–617). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dneu.22576>

Zhao, X., Zmijewski, J. W., Lorne, E., Liu, G., Park, Y.-J., Tsuruta, Y., Abraham, E., & Y-j, P. (2008). Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, 497–504. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90210.2008.-AMP-acti>

Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., Zhang, X., Yang, D., Yang, Y., Meng, H., Li, W., Melgiri, N. D., Licinio, J., Wei, H., & Xie, P. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular Psychiatry*, 21(6), 786–796. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.44>

Zöller, T., Schneider, A., Kleimeyer, C., Masuda, T., Potru, P. S., Pfeifer, D., Blank, T., Prinz, M., & Spittau, B. (2018). Silencing of TGF β signalling in microglia results in impaired homeostasis. *Nature Communications*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06224y>

SITES

www.anses.fr

www.coca-cola.com

www.cultures-sucre.com

www.europa.eu

www.foodintolerances.org

www.franceagrimer.fr

www.who.int

PhD Portfolio

Formations universitaires :

- 2020-2024** : Doctorat en Neurosciences. Laboratoire Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), équipe NutriMind, **Bordeaux**. Sous la direction du Dr Xavier Fioramonti / xavier.fioramonti@inrae.fr
- 2019-2020** : Licence de réorientation en Science de la Terre et de l'environnement. Université Paul Sabatier, **Toulouse** (31). Classement : 1/15
- 2017-2019** : Master de Neurosciences Moléculaires, Cellulaires et Intégratives. Université de **Caen** (14). Classement : 2 / 28
- 2015-2017** : Licence Sciences de la Vie de la Terre, parcours Biotechnologies. Université SSI de **Lorient** (56). Classement : 1 / 24

Formations générales :

- 2024** : Premiers Secours en Santé Mentale (PSSM) à **Bordeaux**. 14 heures.
- 2023** : Se former à l'enseignement, enseigner à l'Université : « Réflexions sur les pratiques pédagogiques » à **Bordeaux**. 18 heures.
- 2021** : Formation expérimentation animale de niveau concepteur rongeurs à **Bordeaux**. 22 heures.

Expériences professionnelles scientifiques :

- 2020-2024** : Projet de Doctorat « Effet du fructose sur le cerveau ». Laboratoire Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro). Du 1^{er} Octobre 2020 au 31 Aout 2024 – Université de **Bordeaux**. Sous la direction du Dr Xavier Fioramonti / xavier.fioramonti@inrae.fr
- 2019** : Projet de Master 2 « Modulation du métabolisme du cholestérol par thérapie génique dans le syndrome de Rett ». Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM). Du 9 janvier au 10 Juin 2019 – Université de **Paris Sorbonne**. Sous la direction du Dr Françoise Piquet / francoise.piquet@icm-institute.org
- 2018** : Projet de Master 1 « Etude des projections de la tVTA sur la VTA et l'hypothalamus latéral : implications potentielles dans la prise alimentaire hédonique ». Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA). Du 2 avril au 24 Mai 2018 – Université de **Strasbourg**. Sous la direction du Dr Katia Befort / katia.befort@unistra.fr
- 2017** : Projet de Licence 3 « Interaction bactérie PGPR – plantes endémiques de maquis miniers utilisables pour la revégétalisation ». Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE). Du 9 Janvier au 24 Février 2017 – Université de **Nouvelle-Calédonie**. Sous la direction du Dr Linda Guentas / linda.guentas@univ-nc.nc

Publications :

2024 : **Adeline Coursan**, Delphine Polve, Anne-Marie Leroi, Magali Monnoye, Lea Roussin, Marie-Pierre Tavalacci, Murtiel Quillard, Mathilde Maccarone, Olivia Guerin, Estelle Houive, Jérôme Bellenger, Guillaume Gourcerol, Laurent Naudon, Sophie Layé, Charlotte Madore, Xavier Fioramonti, Chloé Melchior, Véronique Douard. Exploring the Connection Between Gut Microbiota and Anxiety in Fructose Malabsorption: Insights from Human and Animal Research.

Soumis à Microbiome.

2023 : Martin H, **Coursan A**, Lallement J, Di Miceli M, Kandiah J, Raho I, Buttler J, Guilloux JP, De Deurwaerdere P, Layé S, Routh VH, Guiard BP, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C, Fioramonti X. Serotonergic neurons are involved in the counter-regulatory response to hypoglycemia. *J Neuroendocrinol.* 2023 Dec;35(12):e13344. doi: 10.1111/jne.13344. Epub 2023 Oct 19. PMID: 37857383.

Communications scientifiques :

2023 : Communication orale aux Journées Francophones de Nutrition (JFN) à **Marseille**. « Moody-Fructose : Effect of fructose consumption on mood disorders ».

2023 : Communication orale au colloque de la Société Neuroendocrinologie (SNE) à **Rouen**. « Moody-Fructose : Effect of fructose consumption on mood disorders ».

2022 : e-poster aux Journées Francophones de Nutrition (JFN) à **Toulouse**. « Moody-Fructose : Effets du fructose sur le cerveau ».

2022 : Participation au prix Jean-Marc Gey à **Bordeaux**. « Moody-Fructose : Effets du fructose sur le cerveau - Enjeux de développement durable et de la responsabilité sociétale ».

Vulgarisations scientifiques :

2024 : Conférence grand publique à **Mont de Marsan**, accompagnée du Dr Xavier Fioramonti. « Effets des sucres sur le cerveau ».

2023 : Atelier pour la semaine du cerveau à **Bordeaux**. « Les sens et le comportement alimentaire ».

2023 : Intervention dans un lycée à **Gujan-Mestras**. « Introduction : Les sucres » et « Effets des sucres sur le cerveau ».

2022 : Intervention dans une école primaire à **Pau**. « Effets des sucres sur le cerveau ».

2022 : Conférence grand publique à **Pau**, accompagnée du Dr Xavier Fioramonti. « Effets des sucres sur le cerveau ».

2022 : Participation au programme PubhD à **Bordeaux**. « Haribo, est-ce vraiment beau la vie ? »

Encadrements :

- 2023** : Etudiante L3 Licence Sciences de la vie (Margaux Debauchez) – 1 semaine d'introduction aux neurosciences
- 2023** : Etudiante M1 Master Neurosciences (Annika Glatzel) – 1 semaine d'introduction aux neurosciences
- 2023** : Etudiante M1 Master Neurosciences (Eva Bentéjac) – 2 mois de stage
- 2022** : Etudiante M1 Biochimie, Biologie moléculaire, cellulaire appliquée (Bérénice Fortunato-Marsol) – 2 mois de stage
- 2022** : Etudiante IUT Génie Biologique (Ella Vannieuwenhuysse) – 2 mois de stage
- 2021** : Etudiante M1 Magistère De Biologie (Delphine Polvé) – 2 mois de stage

Missions complémentaires d'enseignements :

- 2022-2023** : Niveau 2eme année de Licence à l'Université de **Bordeaux**. 16h de TP en Microbiologie + 16h de TD en Biochimie (Enzymologie et Métabologie).

Titre : Impact de la consommation de fructose sur la microglie et la santé cérébrale

Résumé : Le fructose, un monosaccharide naturellement présent dans les fruits et le miel, a vu sa consommation décupler ses dernières décennies, avec aujourd'hui une consommation quotidienne se situant autour des 55g. Bien qu'un grand nombre d'études ont démontré l'effet délétère d'une consommation de fructose sur les troubles métaboliques, les effets de ce sucre sur la santé cérébrale ont été négligés. Le cerveau est entièrement équipé pour absorber et métaboliser le fructose. En effet, le transporteur spécifique du fructose, GLUT5, est exprimé presque exclusivement dans la microglie. Des défauts du contrôle de la neuroinflammation, un processus contrôlé par ces cellules, sont associés à des troubles du comportements émotionnels et mnésiques. D'autre part, une consommation de fructose conduit à une dysbiose intestinale. Cette dysbiose peut également induire des troubles de l'humeur et de la mémoire. Ainsi, l'hypothèse de ce projet est qu'une consommation de fructose peut perturber la santé cérébrale directement via des altérations de la microglie, et/ou indirectement via une dysbiose du microbiote intestinal. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé plusieurs approches complémentaires. Nos résultats *in vitro* révèlent que le fructose perturbe la réponse inflammatoire des microglies. *In vivo*, nos résultats montrent qu'une alimentation enrichie en fructose induit des comportements de type anxiodépressifs, ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale. Ils révèlent aussi l'implication clef des cellules microgliales dans l'établissement de ces troubles. Parallèlement, nos résultats *in vivo* et notre étude clinique mettent en lumière l'implication du microbiote intestinal dans l'établissement de comportement pseudo-dépressifs ou de traits anxieux, induits par la malabsorption du fructose. Ces données pourront contribuer à améliorer les recommandations alimentaires actuelles.

Mots clés : fructose ; microglie ; microbiote intestinal ; neuroinflammation ; santé cérébrale ; troubles de l'humeur

Title: Impact of fructose consumption on microglia and brain health

Abstract: Fructose, a monosaccharide naturally occurring in fruits and honey, has seen its consumption increase tenfold in recent decades, with today a daily intake around 55g. While numerous studies have demonstrated the deleterious effects of fructose consumption on metabolic disorders, the effects of this sugar on brain health have been neglected. The brain is fully equipped to absorb and metabolize fructose. Indeed, the fructose-specific transporter, GLUT5, is expressed almost exclusively in microglia. Defects in the control of neuroinflammation, a process controlled by these cells, are associated with emotional and memory disorders. Moreover, fructose consumption leads to intestinal dysbiosis. This dysbiosis can also induce mood and memory disorders. Thus, the hypothesis of this project is that fructose consumption can disrupt brain health directly through alterations in microglia and/or indirectly through dysbiosis of the intestinal microbiota. To address this hypothesis, we used several complementary approaches. Our *in vitro* results reveal that fructose disrupts the inflammatory response of microglia. *In vivo*, our results show that a fructose-enriched diet induces anxiodepressive-like behaviors, as well as spatial memory impairment. They also reveal the key role of microglial cells in the establishment of these disorders. In parallel, our *in vivo* results and clinical study highlight the involvement of the intestinal microbiota in the establishment of pseudo-depressive behaviors or anxious traits induced by fructose malabsorption. This data could contribute to improving current dietary recommendations.

Keywords: fructose; microglia; gut microbiota; neuroinflammation; brain health; mood disorders